

تقنية النانو في توصيل الجين اللافيروسي Nanotechnology in Nonviral Gene Delivery

لاثا م. سانثاكومران، واليكس تشن، سي.ك.أس.بيلاي، وثرزيا توماس، وهويكسين هي،
وت. ج. توماس

Latha M. Santhakumaran, Alex Chen, C. K. S. Pillai, Thresia Thomas, Huixin He,
and T. J. Thomas

الملخص Abstract

يعتمد العلاج الجيني على كفاءة انتقال الأليغونيوكلوتيدات وحمض نووي DNA البلازميد خلال غشاء الخلية، بالآليات التي لم تحدّد جيداً في الوقت الحاضر. وتتقدم الأبحاث الخاصة بناقلات توصيل الجين الفيروسي واللافيروسي بخطوات متسارعة في المجالات الأكاديمية والصناعية، وذلك للاستفادة من المقومات الكاملة للمعرفة المكتسبة، من خلال جهد تسلسل الجينوم البشري، ويتم محاصرة الناقلات الفيروسية بالآثار الجانبية السامة على الجهاز المناعي. وقد تكون ناقلات توصيل الجين اللافيروسي مجردة من هذا التأثير المناوئ. وعلى أية حال، فمعظم ناقلات توصيل الجين اللافيروسي غير فعالة بشكل كافٍ للاستخدام في الأحوال السريرية. إن العقبة الرئيسية في تطوير ناقلات توصيل الجين الفعالة، بما في ذلك ناقلات توصيل الأليغونيوكلوتيدات، هي قلة فهمنا لخواص الحمض النووي DNA الفيزيائية، في

وجود ناقلات التوصيل. لقد أوضحت عدة تحقيقات، بما فيها تلك الناشئة من مختبراتنا، أن تشكيل جسيمات الحمض النووي النانوية، هي المرحلة الأولى الحرجة في امتصاص الأليغونيوكلوتيدات، وحمض نووي DNA البلازميد في الخلايا السرطانية. وسنقوم في هذا الفصل بوصف العوامل التي تثير تشكيل جزيئات الحمض النووي، والتوصيف الفيزيائي لجسيمات الحمض النووي النانوية، والآليات المشاركة في تشكيل الجسيم النانوي، وتطبيقات العلاج الجيني.

١٠,١ مقدمة Introduction

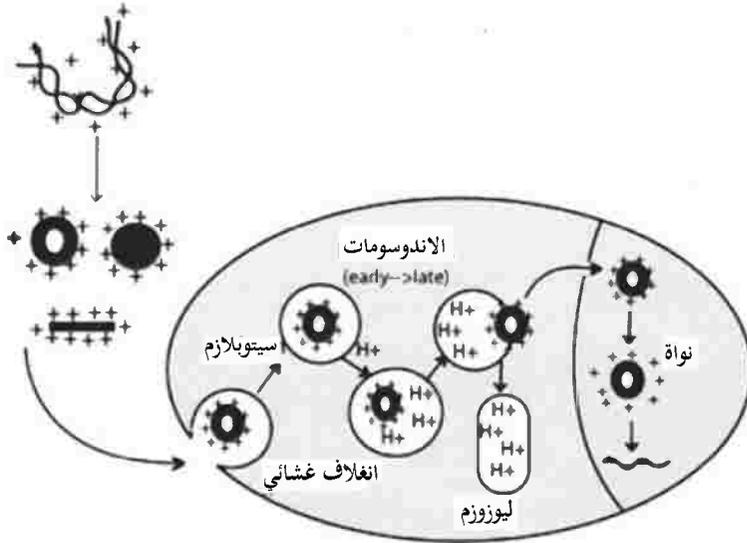
إن التعرف على الجينات المتعلقة بالمرض، وتتابع النيوكليوتيد الكامل لها خلال مشروع الجينوم البشري، يعطينا فرصة مذهشة لمحاربة عدد كبير من الأمراض بجينات مصممة، إما على شكل أليغونيوكلوتيدات علاجية أو بلازميدات تحمل تسلسلات جينية. ويعتمد العلاج الجيني على الانتقال الفعال للحمض النووي DNA/ أليغونيوكلوتيدات (ODNs) خلال غشاء الخلية. وهذه العملية ليست فعالة بالمرّة، والآلية أو الآليات الأساسية غير واضحة في الوقت الحاضر [1, 2]. ومن المثير للانتباه، أن الفيروسات اتقنت تقنية الاختراق خلال غشاء الخلية؛ بسبب تركيب جسيماتها النانوية، و/ أو طبيعة البروتينات الموجودة على الغلاف الفيروسي [3, 4]. ولذلك فقد تم استخدام أنواع مختلفة من الفيروسات، من ضمنها الفيروسات الانقلابية (الفهقرية) retroviruses، والفيروسات الغدية adenoviruses، والفيروسات الغدية المرتبطة (AVV) adeno-associated viruses، كناقلات توصيل جين من قبل العديد من الباحثين [5]. وبالإضافة إلى قدراتها على نقل الجينات، تتداخل الجسيمات الفيروسية مع الجهاز المناعي، عن طريق إطلاق إنتاج الأجسام المضادة والبروتينات الأخرى [6, 7]. ولقد سبب إنتاج البروتينات غير المرغوبة في العديد من الحالات أعراضاً جانبية خطيرة، من

ضمنها الوفاة في التجارب السريرية [7]. ولذلك تشترك عدة مختبرات أكاديمية وصناعية في العمل على تطوير ناقلات توصيل الجين اللافيروسي.

يتضمن تطوير ناقلات توصيل الجين اللافيروسي تفاعل مجموعات فوسفات الحمض النووي DNA المشحونة سالبا مع العوامل التي تحمل مجموعات متعددة الشحنة الموجبة، و/ أو السلاسل البوليمرية. وكانت هذه العملية، المعروفة بتكثيف الحمض النووي DNA، موضوع بحث مكثف خلال العقود الثلاث الماضية [1, 8-12]. وفي العديد من الحالات، يتم اشتقاق الجزيئات الكاتيونية من التراكيب الكيميائية للبولي أمينات الطبيعية، مثل بترسين $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)$ putrescine، وسبرميدين $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)$ spermidine، وسبرمين $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)$ spermine. وتحت الظروف الأيونية والرقم الهيدروجيني pH الفسيولوجي، يتم شحن هذه الجزيئات إيجابياً، ومن ثم تكون القوة المهيمنة في تفاعلاتها مع الحمض النووي DNA إلكتروستاتيكية، على الرغم من أن التفاعلات محددة الموقع، تستخدم أيضاً للقيام بدور ثانوي [13-15]. ولقد استخدم أيضاً الكاتيون اللاعضوي، هكسامين الكوبالت $(\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+})$ من قبل العديد من الباحثين، لدراسة آلية تكثيف الحمض النووي DNA [9, 14-16]. وعموماً، يؤدي تكثيف الحمض النووي إلى جسيمات حمض نووي DNA نانوية متميزة مورفولوجياً، كما هو مثبت بتقنيات مجهرية القوى الذرية والإلكترونية [17,18]. وعلى أية حال، تكون معقدات الحمض النووي DNA المشكلة مع هذه الجزيئات الكاتيونية الصغيرة غير مستقرة، وعرضة للتفكك تحت الظروف الأيونية الفسيولوجية؛ ولذلك تم تشييد بولي أمينات ذات تكافؤ أعلى ومشتقات سبرمين، وسبرميدين كناقلات توصيل جين [1, 19]. إن متعدد الكاتيونات (بولي كاتيونات) المشيد، يُكثف الحمض النووي DNA في جسيمات نانوية، ويُسهّل نفاذها الخلوي. ويمكن أن تُثير البوليمرات والبولي أمينات

الكاتيونية تكثيف جزيئات الحمض النووي الكبيرة إلى جسيمات مدججة (مضغوطة)، بما يسمح باندماج مناطق تنظيم الجين [20]. وكذلك تكون الناقلات (المتجهات) اللافيروسية مرنة لدمج مجموعات وظيفية؛ لكي تُسهّل التوضع النووي، واستهداف محدد الخلية [21]. إن ناقلات توصيل الجين المستقرة وغير السامة، والقابلة للتحلل الحيوي، مع القدرة على حماية الحمض النووي DNA من التفكك، تكون ذات أهمية قصوى [20-22]. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تُسهّل هذه الناقلات الامتصاص الخلوي من خلال مستقبلات الغشاء، وتسمح بإطلاق دخلولي (فجوة ابتلاع داخلية) endosomal من الحمض النووي DNA [23-26].

إن الخطوة الأولى في الانتقال الخلوي لجسيمات الحمض النووي DNA النانوية عبارة عن تفاعل إلكتروستاتيكي بين الحامل / معقد الحمض النووي DNA، وغشاء البلازما الأنيوني [1, 27, 28]. ويؤدي تشكيل المعقد بين الحمض النووي DNA والجزيئات الكاتيونية إلى جسيمات نانوية موجبة الشحنة، كما هي مقاسة بجهد زيتا - potential. والتركيب موجب الشحنة، يُسهل عملية الالتصاق إلى مستقبلات سطح الخلية سالبة الشحنة والالتقام الخلوي endocytosis. وكمية الشحنات السالبة على سطح الخلية وحجم الحامل / معقد الحمض النووي DNA، يبدوان كمحددات لتوصيل الجين الناجح [29]. واعتماداً على حجم حامل / معقد الحمض النووي DNA، قد يحدث التقام خلوي يتوسطه مستقبل، والتهام خلوي pinocytosis أو بلعمة phagocytosis. وفي السيتوبلازم تكون الإندوسومات غير مستقرة؛ مما يؤدي إلى إطلاق الحمض النووي DNA. والرسم التخطيطي لامتناس الحمض النووي DNA في الخلايا موضح في الشكل رقم (١٠،١) [1]. والعوامل الشائعة المستخدمة في تكثيف الحمض النووي DNA، وتطبيقات توصيل الجين مدونة أدناه.



الشكل رقم (١٠, ١). امتصاص الحمض النووي DNA بخلايا الثدييات. يتم ضغط الحمض النووي DNA في وجود بولي كاتيونات إلى تراكيب منظمة، مثل حلقات أو حلزونات، وقضبان، وركوبات أو شبه كروية. تتفاعل هذه الجسيمات مع البروتيوجلايكانات الأنيونية proteoglycans على سطح الخلية، ويتم انتقالها من خلال الالتقام الحيوي. وتتراكم هذه العوامل الكاتيونية في الحويصلات الحمضية، ويرفع الرقم الهيدروجيني pH للاندوسومات، يتم تثبيط تحلل الحمض النووي DNA بانزيمات ليوزومية lysosomal. إنها أيضاً تدعم التدفق البروتيني، والتي تزعزع استقرار الإندوسوم، وتطلق الحمض النووي DNA. ويتم بعد ذلك انتقال الحمض النووي DNA إلى النواة، إما من خلال مسام نووية، وإما بمساعدة إشارات التوضع النووية، وإزالة التكتيف بعد الانفصال عن حاملة التوصيل الكاتيونية (تم إعادة طبعها بإذن من المرجع [1]).

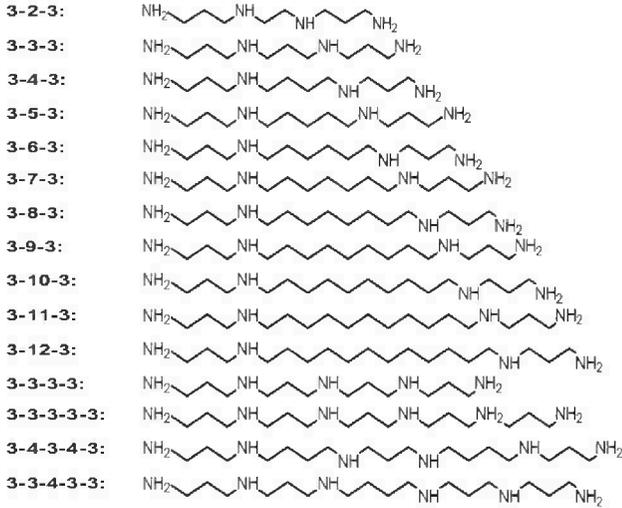
١٠, ٢ العوامل التي تُثير تشكيل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية

Agents That Provoke DNA Nanoparticle Formation

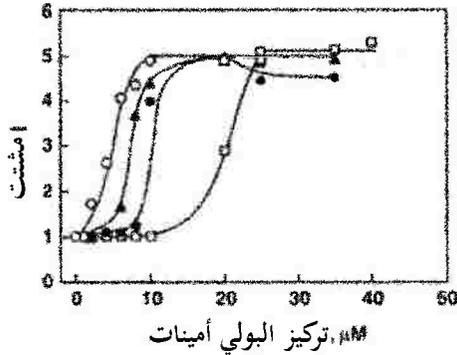
١٠, ٢, ١ البولي أمينات (متعدد الأمينات) Polyamines

إن البولي أمينات، وسبرميدين، وسبرمين ونظائرها المشيدة مُعززة وممتازة لتشكيل جسيم الحمض النووي DNA النانوي [8, 9, 14, 18, 30-33]. وقد تم دراسة

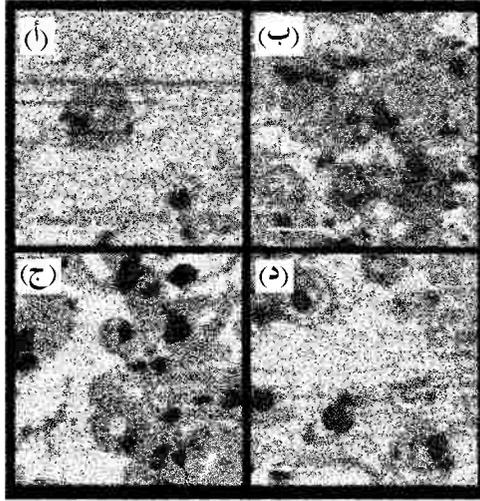
قدرة البولي أمينات ونظائرها (الشكل رقم ١٠،٢) على دمج الحمض النووي DNA من قبل عدة باحثين، كنظام نموذجي لفهم آلية ضغط الحمض النووي DNA في رأس العائية phage [8,9]. ولقد استخدم بلومفيلد Bloomfield وزملاؤه [8, 9, 13, 14, 32] نظرية تكثيف الأيون المضاد المطورة من قبل مانينج Manning [34]، وريكورد Record [35]، وآخرين [35]، لحساب معادلة شحنة الحمض النووي، في وجود سبرميدين وسبرمين، ووجدوا أنه يحدث طي الحمض النووي عند معادلة شحنة بنسبة أكبر < 0.89 . ويعود العمل السابق البولي أمينات الكاتيونية كشحنات نقطية بدون أي تركيب معرف، ولكن هناك اثنان من الكاتيونات ثلاثية التكافؤ، هما هكسامين الكوبالت ثلاثي التكافؤ³⁺ Cobalt hexamine وسبرميدين ثلاثي التكافؤ³⁺ spermidine، حيث تختلف قدرتهما على تكثيف الحمض النووي DNA؛ مما يشير إلى أهمية التفاعلات محددة الموقع، بالإضافة إلى التفاعلات الإلكتروستاتيكية الأهم [14]. وقد أظهرت دراسات حديثة على سلسلة من متشابهات سبرمين متساوية التكافؤ، أهمية تركيب البولي أمين في تكثيف الحمض النووي DNA (الشكل رقم ١٠،٣) [30]. وهناك أيضاً اختلافات كبيرة في الألفة النسبية لهذه المتشابهات نحو الحمض النووي DNA، كما تم قياسها بتجربة إزاحة بروميد الإثديوم (الجدول ١٠،١). وعلى الرغم من أن البولي أمينات رباعية التكافؤ، ليست فعالة جداً في نقل الحمض النووي DNA في الخلايا، إلا أن نظائرها ذات التكافؤ الأعلى، بما ذلك الهكسامينات؛ تسهل عملية نقل أليغونيوكليو تيد ٣٧-نيوكليو تيد (nt) داخل خلايا الثدي السرطانية (الشكل رقم ١٠،٤) [19]. وتستطيع الهكسامينات تكثيف حمض نووي DNA البلازميد إلى جسيمات نانوية حلقية، كما هو مقاس بمجهر القوى الذرية (AFM) (الشكل رقم ١٠،٥ والجدول رقم ١٠،٢).



الشكل رقم (٢، ١٠). التركيب الكيميائي للبولي أمين الطبيعي، سيرمين (3-4-3) ونظائره. إن نظائر البولي أمين مختصرة بنظام رقمي، يمثل عدد مجموعات تجسير الميثيلين بين مجموعات الأمين الأولى والثانوي.



الشكل رقم (٣، ١٠). رسم نموذجي للشدة النسبية من الضوء المشتت عند ٩٠°، مرسومة مقابل تراكيز السيرمين (○)، (▲) 3-10-3 و 3-11-3 (●) و 3-12-3 (□). محلول الحمض النووي λ-DNA بتركيز فوسفات الحمض النووي DNA ١,٥ ميكرومول، ذائبة في محلول صا د برقم هيدروجيني ٤، pH من كاكوديولات الصوديوم، بتركيز ١٠ ملي مول (أعيد طبعها بتصريح من المرجع [30]).



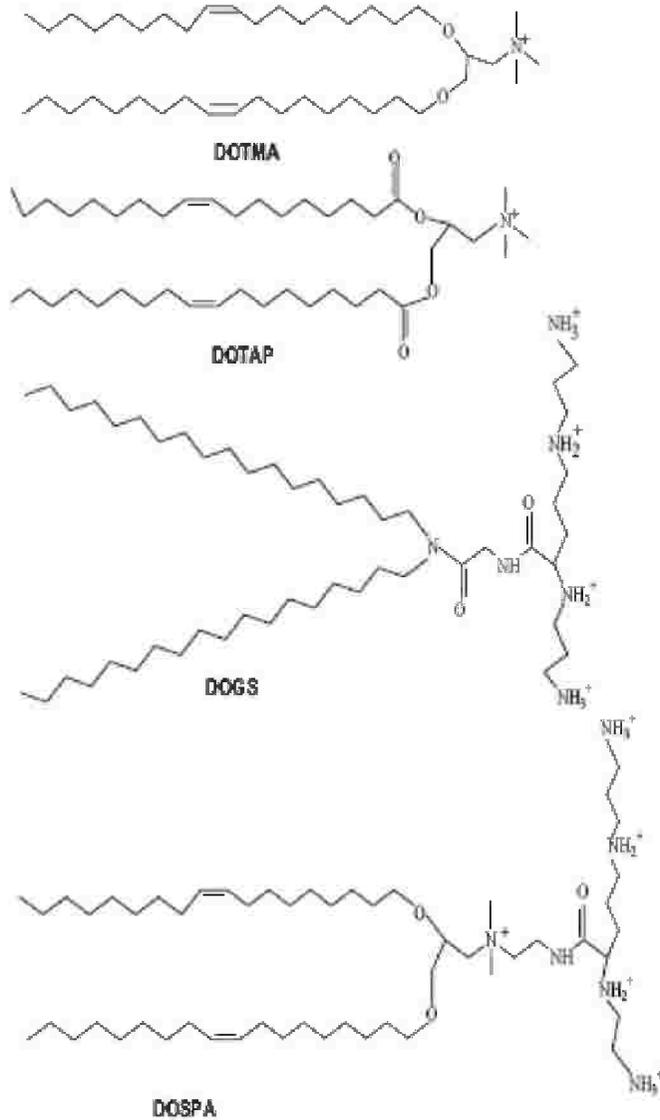
الشكل رقم (٥، ١٠). صورة مجهر القوة الذرية، تعرض التراكيب الحلقية لحمض نووي البلازميد pGL3 المتشكل بالتحضين مع (أ) ٢٥ ميكرومول سبرمين، (ب) ٥ ميكرومول 3-3-3، (ج) ٢ ميكرومول 3-4-3، و(د) حلقات متشكلة جزئياً رعدت في وجود 3-3-4-3. وتوفر الصورة (د) دليلاً على النفاذ الحمض النووي لتشكيل الحلقات. مقياس الرسم ٢٠٠ نانومتر. (أعيد طبعها بتصريح من: Nucleic Acids Press Research 2004, 32, 127-134. Copyright 2004 Oxford University المرجع [19]).

الجدول رقم (١، ١٠). ثوابت الترابط النسبية لنظائر البولي أمين لحمض نووي الغدة التوتية في العجل، تم قياسها بطريقة تنافس بروميد الإثيديوم.

متشابه البولي أمين	ثابت الترابط النسبي ^١
3-2-3	0.4
3-3-3	0.6
3-4-3(spermine)	1.0
35-3	1.3
3-6-3	1.1
3-7-3	1.0
3-8-3	0.7
3-9-3	0.5
3-10-3	0.5
3-11-3	0.4

^١ تم حساب ثوابت الترابط كمعكوس لـ ٥٠٪ من تركيز نظائر البولي أمين المطلوب، ليحل محل ٥٠٪ من بروميد الإثيديوم المرتبط إلى λ-DNA. إمكانية الإعادة مع هذه النتائج، كانت ضمن حدود ٣٪ في القياسات المتكررة. يتم تطبيع (معايرة) النتائج بالنسبة إلى السبرمين (أعيد طبعه بإذن من المرجع [30]).

(2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermincarboxamido)-ethyl]N,N-dimethyl- DOSPA) وتتوفر هذه المركبات كعوامل تعداء الحمض النووي التجارية. وهذه العوامل يمكن أن تُشكّل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية، عن طريق التفاعل الإلكتروستاتيكي بين مجموعات الرأس القطبية موجبة الشحنة للدهن، ومجموعات الفوسفات سالبة الشحنة للحمض النووي DNA [36]. وزيادة عدد المجموعات الأيونية لكل جزيء والمسافة بين المجموعة الأيونية والمجموعة الكارهة للماء، تساند كفاءة تعداء الدهون الكاتيونية. إن تشكيل الجسيمات النانوية بالتعقيد (بالتراكم) مع الدهون، لا تحسن فقط انتقال الحمض النووي DNA من خلال الحواجز الخلوية، ولكنها تحميه أيضاً من التحلل الإنزيمي في أوساط زراعة الخلية [38-41]، ويتراوح حجم الجسيمات في المدى من 50 إلى 1000 نانومتر. وتم إيجاد الجسيمات الكبيرة من معقدات الحمض النووي DNA / ليبوسوم لتعداد الخلايا خارج الجسم. ويتم امتصاص معقدات الحمض النووي DNA / ليبوسوم من خلال الالتقام، وبعد الاستيعاب، يُفرز الحمض النووي DNA من العربة الالتقامية، تاركاً خلفه الليبوسوم [42]. وعلى أية حالة، تعد كفاءة التعداء لمعقدات الحمض النووي DNA / الليبوسوم منخفضة نسبياً داخل الجسم. وبالإضافة إلى ذلك، فقد ذكر أن العديد من الدهون الكاتيونية تكون سامة [43]. ولقد أظهرت الدراسات على الفئران وقرود المكاك macaques، أن التعرض لجرعات عالية أو متكررة، يؤدي إلى الأمراض المجهرية، وأمراض الرئة الإجمالية.



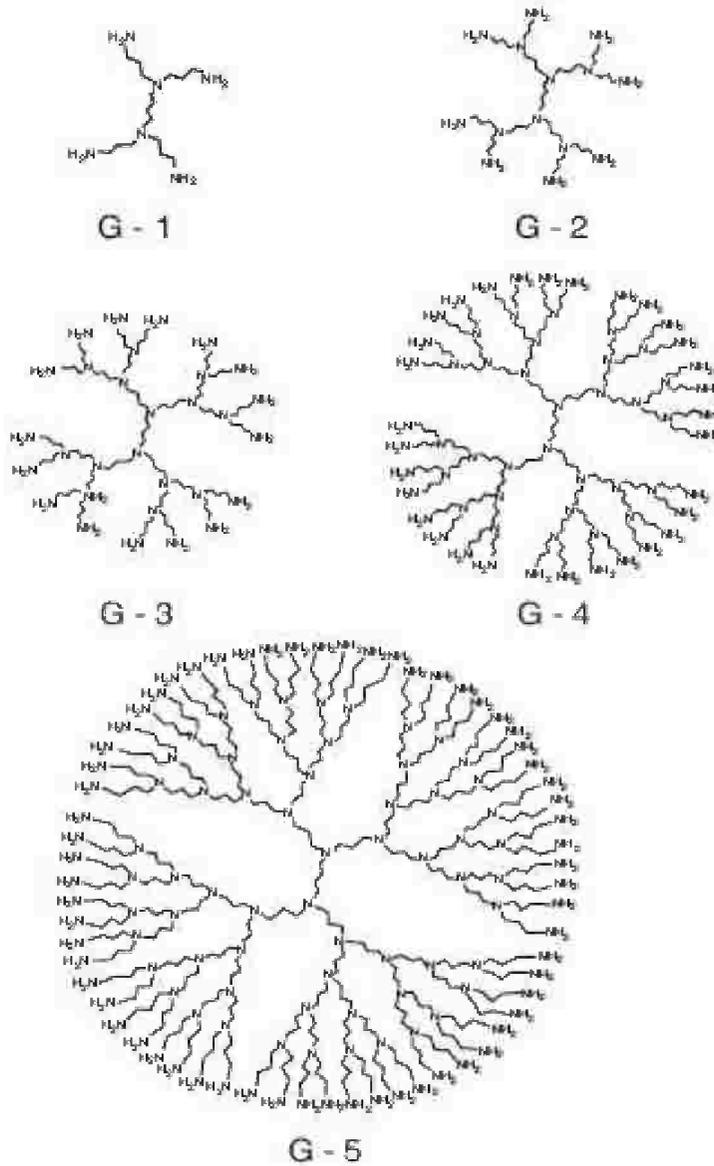
الشكل رقم (٦، ١٠). التراكيب الكيميائية للدهون الكاتيونية المستخدمة عموماً. تم تعريف المختصرات في النص.

١٠,٢,٣ البولي إيثيلين إيمين Polyethylenimine

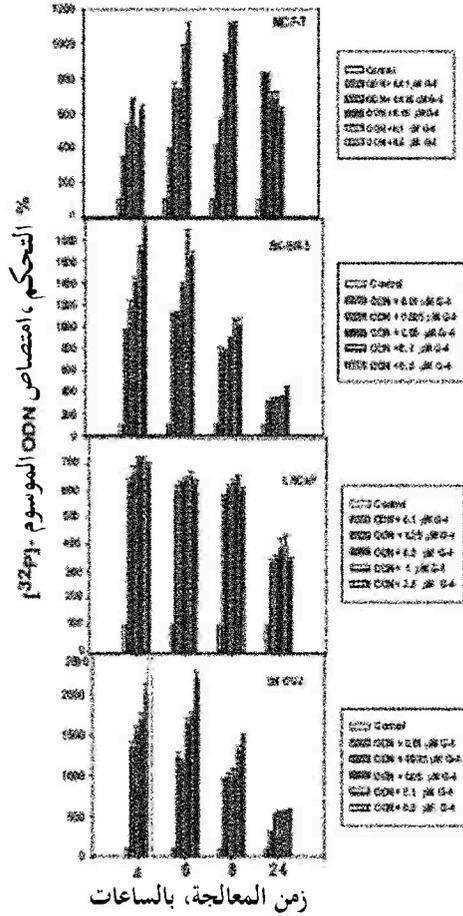
إن البولي إيثيلين إيمين (PEI) polyethylenimine عبارة عن مجموعة من البوليمرات المشيدة (الاصطناعية)، المعروفة بكفاءتها في نقل أليغونوكليوتيدات حمض نووي DNA البلازميد في تشكيلة متنوعة من أنواع الخلايا، والنماذج الحيوانية [44]. ويستطيع البولي إيثيلين إيمين PEI الخطي والمتفرع (الشكل رقم ١٠,٧) حث تكثيف الحمض النووي DNA إلى الجسيمات النانوية. إن الطبيعة الخطية والمتفرعة للبولي إيثيلين إيمين PEI، بالإضافة إلى وزنه الجزيئي تؤدي أدوارا مهمة في تكثيف الحمض النووي DNA، وكفاءة التعداد [45]. ويحتوي البولي إيثيلين إيمين PEI المتفرع على مجموعات أمينية أولية، وثانوية، وثلاثية، كما يعمل كأسفنج بروتوني في الرقم الهيدروجيني pH للدخول (لفجوة الابتلاع الداخلية) endosome [1, 23]. ومن المعتقد أن تساهم السعة الصادة (المنظمة) للبولي إيثيلين إيمين PEI في قدرته على توصيل الحمض النووي DNA داخل الخلايا بدون تحلل. وخلافاً للبوليمرات الأخرى، يمتلك البولي إيثيلين إيمين PEI نشاطا ابتلاعيا داخليا ذاتيا، ولا يحتاج إلى أي عامل ابتلاع داخلي للهروب من فجوة الابتلاع الداخلية [23, 45, 46]. وأظهر الفحص المجهرى متحد البؤرة، حدوث نقل معقد الحمض النووي مع البولي إيثيلين إيمين PEI DNA بدون تفكك للمعقد [47]. إن الذوبانية الضعيفة لمعقد الحمض النووي / البولي إيثيلين إيمين PEI/DNA، في الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي pH، وسمية البولي إيثيلين إيمين PEI في دراسات النموذج الحيواني، هي القيود الرئيسة في استعمال هذا البوليمر كحامل جيني. وذكرت الدراسات أن مشتقا من البولي إيثيلين إيمين PEI مع البولي إيثيلين جليكول (PEG) polyethylene glycol، يُزيد الذوبانية، ويخفض سمية البولي إيثيلين إيمين PEI [47-50]. إن عملية الربط مع البولي إيثيلين جليكول PEGylation، تحسّن من استقرار الجسيمات النانوية، وتزيد زمن دورانها (مكوّنها) داخل الجسم.

٤, ٢, ١٠ الديندريمرات (البوليمرات الشجرية) Dendrimers

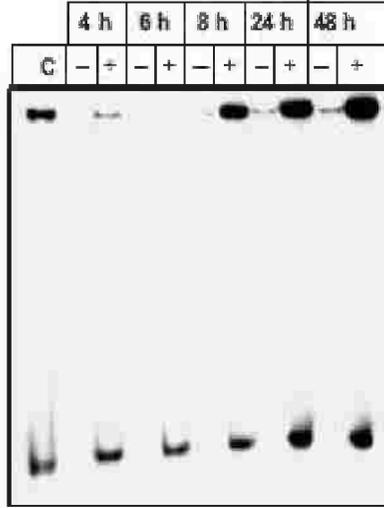
لقد تم دراسة ديندريمرات البولي أميدو أمين (PAMAM) polyamidoamine ، والبولي بروبيلين إيمين (PPI) polypropylenimine (الشكل رقم ١٠.٨) لقدرتها على حث تشكيل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية ، وتسهيل نقل الحمض النووي DNA [52-57]. وقد ذكر تومالايا Tomalia وآخرون [52] تحضير أول سلسلة كاملة من الديندريمرات ، تمتلك مراكز متفرعة ثلاثية التماثل أساسها $2N > 1$. وبالمقارنة إلى البوليمرات الخطية والمتفرعة ، أحادية التشتت (الانتشار) ، وإمكانية التحكم في وظيفتها السطحية ، تجعل الديندريمرات الفئة المثيرة للاهتمام من ناقلات التوصيل الجيني. وكان هانسليبر Haensler وسزوكا Szöka [53] أول من أظهر أن ديندريمرات البولي أميدو أمين PAMAM عوامل نقل جينات كفاء لتشكيلة متنوعة من خلايا الثدييات المستزرعة. وقد تبين أن الأجيال ٢ ، و ٣ من ديندريمرات البولي بروبيلين إيمين PPI ، تكون فعالة في تعداء حمض نووي DNA البلازميد في الخلايا A431 [54]. ولقد وجدنا أن كل الأجيال الخمس من ديندريمرات البولي بروبيلين إيمين PPI ، تستطيع أن تُسهّل نقل أوليغونيوكلوتيد التشكيل الثلاثي 31-nt في خطوط الخلايا السرطانية في الثدي ، والبروستاتا ، والمبيض (الشكل رقم ١٠,٩) [56]. وتتملك الجسيمات النانوية المتكونة بأوليغونيوكلوتيد أنصاف أقطار هيدروديناميكية ، تتراوح من ١٠٠ إلى ٢٠٠ نانومتر (الجدول رقم ١٠,٣). إن جسيمات الأوليغونيوكلوتيد النانوية ، تكون محمية من الهضم الإنزيمي داخل الخلايا لمدة تصل إلى ٤٨ ساعة من العلاج (الشكل رقم ١٠,١٠). وبيّنت دراسات حيود الأشعة السينية السنكروترونية ، أن المعقد المتكون من جيل الديندريمر ٤ ، والحمض النووي DNA ، يكون في حالة بلورية سائلة [58] ، مشابهة للتراكيب البلورية السائلة المرصودة بمعقدات البولي أمين/الحمض النووي DNA [59].



الشكل رقم (٨، ١٠). التركيب الكيميائية لخمسة أجيال من ديندريمرات البولي بروبيلين إيمين PPI. يتم تمثيل تعقيد الديندريمرات بأرقام الجيل (G1 إلى G2).



الشكل رقم (٩، ١٠). الامتصاص الخلوي لأوليغونوكليوتيد 31-nt مرقوم ^{31}P في وجود دينديمرات الجيل 4 (G-4) من البولي بروبيلين إيمين PPI. وتم معالجة خطوط الخلايا المختلفة (سرطان الثدي SK-BR-3 و MCF-7، وسرطان البروستاتا LNCaP، وسرطان المبيض SK-OV-3) بمستوى 250,000 cpm من أوليغونوكليوتيد 31-nt مرقوم ^{31}P بعد التعقيد مع دينديمر الجيل 4 في ستة أطباق حوضية. وفي الأزمنة المشار إليها، تم إزالة الوسط، وغسل الخلايا بملح فوسفات صاد بارد ثلاث مرات، وتم تقدير الخلايا المتحلل والمرتبطة بالنشاط الإشعاعي عن طريق حساب الوميض. ويشير التحكم control إلى استخدام ال ODN المرقوم في غياب الدينديمر. ويتم حساب زيادة النسبة المئوية في الامتصاص بالرجوع إلى مجموعة التحكم. والنتائج موضحة، هي متوسط لثلاثة قياسات ثلاثية منفصلة. وترمز ال S.E.M إلى مقياس الخطأ. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [56]).



الشكل رقم (١٠، ١٠). يتم استقرار الحمض النووي DNA بتشكيل الجسيم النانوي، مع ديندريمير الجيل الرابع G-4 من البولي بروبيلين إيمين PPI. وتم معالجة خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231 بأوليغونيوكلوتيد ODN 31-nt مرقوم- ^{31}P بمفرده، أو بمعقد أوليغونيوكلوتيد 31-nt مرقوم- ^{31}P /ديندريمير الجيل الرابع G-4 لنقاط الزمن المشار إليها. وتم غسل الخلايا بمحلول ملحي لفوسفات صاد و DNaseI (٣٠٠ وحد مل⁻¹)؛ لإزالة ال ODN المرتبط بسطح الخلية. وتم بعد ذلك استخلاص ال ODN المرقوم- ^{31}P من الخلايا، وتمييزه باستشراد هلام البولي أكريلاميد ٢٠%. وتعرض الطرائق ٢، ٤، ٦، ٨ و ١٠ ال ODN مرقوم- ^{31}P المستخلص من خلايا عولجت ب ODN مرقوم- ^{31}P بمفرده. وتعرض الطرائق ٣، ٥، ٧، ٩ و ١١ ال ODN المرقوم- ^{31}P المستخلص من خلايا عولجت بمعقد ODN/G-4 مرقوم- ^{31}P . والطريقة ١، هو ODN مرقوم- ^{31}P في ماء معقم، يستخدم كعلامة لهجرة ال ODN المرقوم- ^{31}P السليم في الهلام. ولجسيمات ODN/G-4 النانوية استقرار كبير رائع داخل الخلايا. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [56]).

الجدول رقم (٣, ١٠). نصف القطر الهيدروديناميكي للجسيمات النانوية المتكونة من أوليغونوكليوتيد 31-nt في وجود ديندربيرات البولي بروبيلين إيمين^١.

تركيز الدينديمر (ميكرومول)	نصف القطر الهيدروديناميكي (نانومتر)				
	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
1	-	-	240±11	172±1	196±2
2.5	-	-	181±12	143±10	160±8
5	279±9	193±16	166±1	156±1	163±8
10	235±4	233±15	137±9	137±3	158±4

^١ تم عمل جميع القياسات باستخدام جهاز تشتت ضوء الليزر الديناميكي، وأجريت القياسات في محلول صاد، يحتوي على تركيز فسيولوجي من الكاتيونات تقريباً (١٢٠ ملي مول كلوريد البوتاسيوم، ١٠ ملي مول كلوريد الصوديوم، ٢ ملي مول كلوريد المغنسيوم و٠.١ ملي مول كلوريد الكالسيوم) في درجة حرارة ٢٢ مئوية. وكان تركيز أوليغونوكليوتيد المستخدم في هذه التجارب، هو ٠.١ ميكرومول أوليغمر.

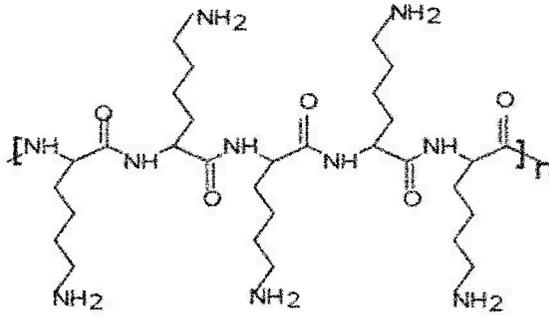
^٣ يشير الشرط إلى عدم تشكل الجسيمات. (أعيد طباعته بإذن من المرجع [56]).

١٠, ٢, ٥ البروتينات والبولي ببتيدات Proteins and Polypeptides

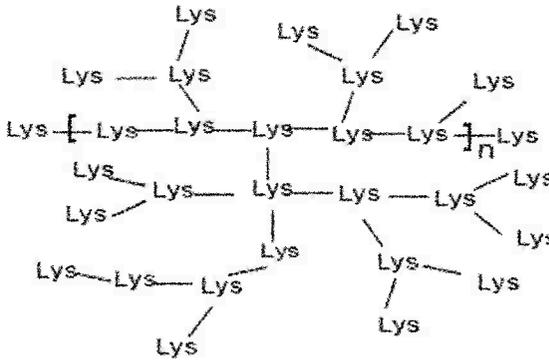
يتم تحقيق تشكيل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية داخل الخلية بشكل رئيسي، عن طريق تفاعل الحمض النووي DNA مع البروتينات الكاتيونية أو الببتيدات، مثل الهيستونات والبروتامينات. ويتم تكثيف الحمض النووي DNA في الحيوان المنوي وبعض الفيروسات بالبروتامين، الذي يحتوي على نطاقات غنية بالأرجينين، الذي يستطيع أن يرتبط مع العمود الفقري لثنائي أستر الفوسفور phosphodiester للحمض النووي DNA. وتكثيف الحمض النووي DNA وسيط البروتامين، يسبب بقايا أرجينين مجاورة لتشابك كل من جديليتي الحمض النووي DNA الحلزوتين؛ مما يجعله غير نشط استنساخياً (من ناحية الاستنساخ) [60,61]. وهناك عدة دراسات تستخدم البروتامين والبروتينات ذات الصلة لحث ولتحقيق استقرار جسيمات الحمض النووي DNA النانوية لتوصيل الجين.

يحتوي البوليمر ببتيد الكاتيوني بولي-L-لايسين (PLL) poly-L-lysine (الشكل رقم ١٠،١١) على مجموعات أمين بروتونية، يمكنها أن تتفاعل مع الحمض النووي DNA، وتثير تشكيل الجسيم النانوي [63، 62، 18، 17]. وهكذا يعتمد حجم الجسيمات النانوية على طبيعة البوليمر L-لايسين PLL (خطي مقابل متفرع، بالإضافة إلى الظروف الأيونية للوسط) (الشكل رقم ١٠،١٢) [17]. وبالرغم من أن البوليمر L-لايسين PLL ليس عاملاً فعالاً جداً لتعداء الحمض النووي DNA في الخلايا، إلا أن اقترانه بالمستقبل، يعزز قدرته كعربة توصيل جيني [64-67]. إن تكوين المعقد بين الحمض النووي DNA وبولي-L-لايسين PLL، يمكن أن يحمي أيضاً الحمض النووي DNA من التحلل الإنزيمي داخل البيئة الخلوية [68].

كما ذكر أن الببتيدات ذات الوزن الجزيئي المنخفض، تعمل على تكثيف الحمض النووي DNA إلى جسيمات نانوية، ولكن كفاءة هذه المعقدات داخل الجسم لتوصيل الجين، تكون ضعيفة بسبب الألفة المنخفضة من الببتيدات للحمض النووي DNA. ومن أجل تحسين كفاءة التعداء، وارتباط الحمض النووي DNA، تم إدخال روابط عرضية مستقرة إلى المتكثفات، باستخدام عوامل ثنائية الوظيفة، كمجموعات جلوتارالدهيد glutaraldehyde أو سلفهيدريل sulfhydryl [9، 69-71]. وتمتلك الببتيدات القصيرة بقايا سيستين cystein متعددة، تشكل روابط ثنائي الكبريتيد بين الببتيد، عندما يرتبط بالحمض النووي DNA وبعد الاستيعاب. ويتم تمديد عمر النصف للحمض النووي DNA في كبد الفأر بصياغة نظام توصيل جيني مرتبط بالسلفهيدريل [72].



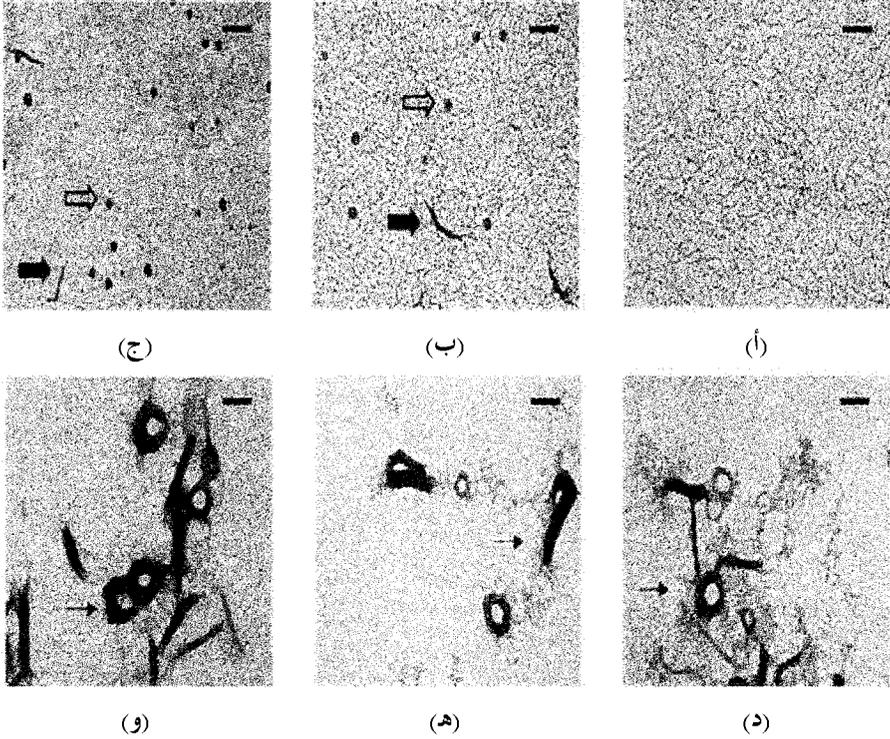
البولي-L-لايسين (الخطي)



Poly-L-lysine (branched)

البولي-L-لايسين (المتفرع)

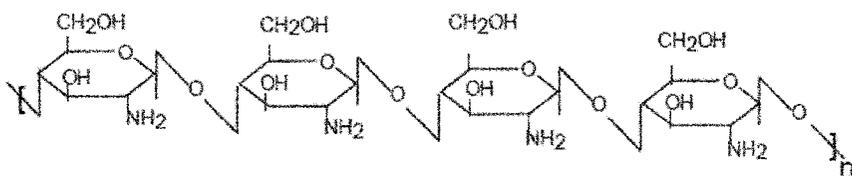
الشكل رقم (١٠، ١١). التراكيب الكيميائية الخطية والمتفرعة للبولي L-لايسين poly-L-lysine.



الشكل رقم (١٢، ١٠). صور المجهر الإلكتروني لتراكيب معقدات الحمض النووي DNA مكثفة محضرة عند قوى أيونية مختلفة، ونسب حمض نووي/ بولي L-لايسين مختلفة. صور المجهر الإلكتروني لمعقدات الحمض النووي المصبوغة بخلات اليورانيل ٤%، حُضرت باستخدام بلازميدات pCMV-Luc و GalPLL256 [17]. وتم صيغ العينات لمدة ٣٠ دقيقة بعد تحضيرها. (أ-ج) عينات حمض نووي محضرة في ١ مول كلوريد الصوديوم مع GalPLL256. (د-و) عينات حمض نووي محضرة في صفر مول كلوريد الصوديوم مع GalPLL256. وتكون قيم r (بولي L-لايسين إلى نسبة الحمض النووي DNA) على النحو التالي (أ، د) ٠,٢٥؛ و(ب، هـ) ٠,٥؛ و(ج، و) ٠,٧٥. ولم يكن هناك أي ضبط لتركيز الملح قبل معالجة العينات. وتشير الأسهم المفتوحة للمعقدات الكروية؛ الأسهم المصمتة لمعقدات تشبه القضيب (غالبية الأقطار ١٠٠ نانومتر)؛ الأسهم الرفيعة للتركيب المتكسد مشتمل على قضبان كبيرة ومعقدات حلقيية. مقياس الرسم في كل الصور يمثل ١٠٠ نانومتر. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [17]).

١٠,٢,٦ البوليمرات Polymers

الشيتوزان Chitosan عبارة عن بوليمر طبيعي ، يتكون من وحدتين فرعيتين من D-جلوكوزامين D-glucosamine و N-أسيتيل-D-جلوكوزامين N-acetyl-D-glucosamine مرتبطتين معاً بروابط جلوكوزية glycosidic (الشكل رقم ١٠,١٣). إنها غير سامة نسبياً ، ولديها كفاءة تعداء عالية بعد تشكيل الجسيم النانوي [73-77]. إن التعديل الكيميائي مُجدٍ في هذا النظام ؛ بسبب توفر عدد كبير من المجموعات الوظيفية السطحية. وتم إيجاد الشيتوزان ومشتقاته لتكون ناقلات واعدة للتوصيل الجيني [73].



الشكل رقم (١٠,١٣). التركيب الكيميائي للشيتوزان.

إن البوليمرات المتعادلة ، مثل البولي إيثيلين جليكول PEG ، وبولي (أكسيد الإيثيلين) ؛ تسبب تكثيف الحمض النووي DNA في القوة الأيونية العالية [78]. وتعمل هذه البوليمرات المرنة غير المشحونة كعوامل حشد ، وتثير تكثيف الحمض النووي DNA من خلال آلية الحجم المستبعد. ويستخدم البولي إيثيلين جليكول PEG كجزء من البوليمرات المطعمة بالتزامن مع البولي إيثيلين إيمين PEI ، ومستقبلات الفولات (ملح حمض الفوليك) ، والبولي لايسين ؛ لتحسين استقرار متكثف الحمض النووي DNA وكفاءة التعداء [79-81].

باختصار ، إن عددا كبيرا من العوامل التي تستطيع التفاعل مع الحمض النووي DNA ، وتثير تشكيل الجسيم النانوي قيد الدراسة حالياً في الأماكن الأكاديمية والصناعية ، من أجل تطوير ناقلات توصيل الجين اللافيروسية.

١٠,٣ توصيف جسيمات الحمض النووي DNA النانوية

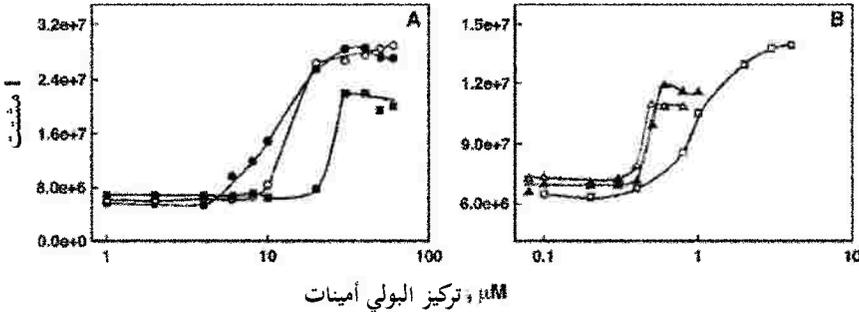
Characterization of DNA Nanoparticles

إن الطرائق الثلاث التالية تستخدم عموماً لتوصيف جسيمات الحمض النووي DNA النانوية في تطبيقات العلاج الجيني: (i) تشتت ضوء الليزر. (ii) المجهر الإلكتروني. (iii) مجهر القوة الذرية.

١٠,٣,١ تشتت ضوء الليزر Laser Light Scattering

لقد كان لبومفيلد Bloomfield وزملائه [8, 14, 82] الريادة في تطبيق تشتت ضوء الليزر، لدراسة تكثيف الحمض النووي DNA. وتركيب الحمض النووي DNA الممتد في المحلول، يكون على شكل يشبه الدودة، وتكون مساحة السطح غير كافية لتشتت الضوء. ولذلك لا تختلف كثيراً شدة الضوء المشتت بواسطة محلول مخفف من الحمض النووي DNA (~ ١ ميكرومول)، عن المحلول الصاد الذي يُذاب فيه الحمض النووي DNA. وعلى أية حال، تحدث زيادة ملحوظة في شدة الضوء المشتت عند تركيز حرج من عامل التكثيف؛ مما يدل على ضغط الحمض النووي DNA في تراكيب ذات مساحة سطح عالية، مثل الأجسام شبه الكروية، والملفات الحلقية. وتعتمد الزيادة في شدة الضوء المشتت على تركيز عامل التكثيف إلى حد ما، ومن ثم تستوي عند التراكيز الأعلى (الشكل رقم ١٠,١٤) [33]. ويمكن أن تحدد فعالية عوامل التكثيف كميّاً من خلال تعيين القيمة EC_{50} ، وهي عبارة عن تركيز عامل التكثيف عند منتصف تكثيف الحمض النووي DNA. وفي محلول صاد يحتوي على ١٠ ملي مول كاكوديلات الصوديوم Na cacodylate (رقم هيدروجيني pH ٧,٤)، فإن القيمة EC_{50} بالنسبة للسبرمين (3-4-3)، ونورسبرمين (3-3-3)، وبتامين (3-3-3-3)، واثنين من الهكسامين (3-3-3-3-3 و 3-4-3-4-3)، هي ١١,٣، ١٠,٦، ١,٥، ٠,٤٩ و ٠,٥٢ على الترتيب [33]. وتدل النتائج على أن البتامين ونظائره الهكسامين، هما الأكثر فعالية من السبرمين في تكثيف البلازميد pGL3.

يوفر تشتت الضوء الديناميكي قياسات سريعة ودقيقة لحجم الجسيم ، وتوزيع حجم الجسيم لجسيمات الحمض النووي DNA النانوية في المحلول. وتسبب الجزيئات التي تخضع لحركة بروائية Brownian تقلبات في شدة الضوء المشتت [82]. ولدى شدة الضوء المشتت هذه مقياس زمني ، يرتبط بعلاقة مع سرعة حركة الجزيئات ، ومن ثم إلى حجمها. وفي الإعداد التجريبي ، يمر شعاع الليزر من خلال خلية كوارتز صغيرة تحتوي على العينة (خليط من البولي أمين / الحمض النووي DNA) ، ويتم تجميع الضوء المشتت عند زاوية ٩٠° ، بالنسبة لمسار الشعاع ، ويحوّل إلى نبضات كهربائية ، يمكن معالجتها وتحليلها بواسطة سلسلة من برامج الحاسوب ؛ لاستخراج معلومات عن حجم الجسيم ، ومعامل الانتشار ، وبارامترات أخرى. وعلى سبيل المثال ، فتجميع الفوتونات في نوافذ زمنية أو قنوات ، والتحليل اللاحق (ارتباط ذاتي) لهذه البيانات ، يعطي معامل الانتشار الانتقالي D_t . وبالنسبة للجسيمات أحادية التشتت الأصغر بكثير من الشعاع الساقط ، تعطي دالة الارتباط الذاتي $g^{(1)}(\tau)$ بالمعادلة التالية [82] :



الشكل رقم (١٤، ١٠). رسوم مغالية للشدة النسبية للضوء المشتت عند زاوية ٩٠° ، مرسومة مقابل تراكيز السبرمين ونظائره. كان تركيز محلول حمض نووي DNA البلازميد لوسيفيريز pGL-3 luciferase ١,٥ ميكرومول فوسفات الحمض النووي DNA ، ذائب في ١٠ ملي مول محلول صا د كاكوديلات الصوديوم، pH ٧,٢. والرموز موضحة على النحو التالي: (أ) (●) 3-3-3 ، (○) 3-4-3 ، (■) 3-2-3 ؛ (ب) () 3-3-3-3 ، (Δ) 3-3-3-3-3 و (▲) 3-4-3-4-3. (أعيد طبعها بإذن Nucleic Acids Research 2004, 32, 127-134. حقوق طبع ٢٠٠٤ ، مطابع جامعة أكسفورد من المرجع [33]).

$$(1) \quad g^l(\tau) = \exp(-Dq^2(\tau)),$$

حيث إن (τ) زمن الاضمحلال ، و $q (= 4\pi n/\lambda_0 \sin\theta/2)$ متجه التشتت ، الذي يكون دالة في معامل انكسار المذيب n ، الطول الموجي للشعاع الساقط λ_0 ، زاوية التشتت θ ، ومعامل الانتشار D . ويتم حساب نصف القطر الهيدروديناميكي (R_h) من معامل الانتشار ، باستخدام معادلة ستوكس - آينشتاين Stokes-Einstein التالية :

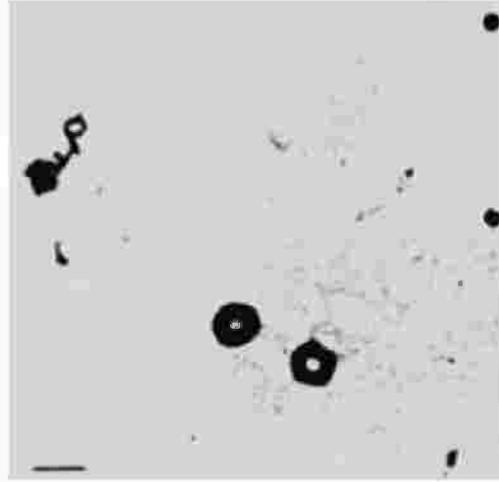
$$(2) \quad R_h = kT/6\pi\eta D$$

حيث إن k ثابت بولتزمان Boltzmann ، و T درجة الحرارة المطلقة ، و η لزوجة المذيب. قد تكون نتائج تجارب تشتت الضوء معقدة في حالة وجود غبار أو جسيمات أخرى في العينة. ويمكن التحايل على هذا بترشح المحلول خلال مرشحات غشائية ، بمسام حجمها 0.45 ميكرومتر ، وعملية طرد مركزي للعينة لمدة 30 دقيقة ، عند سرعة $5000 \times$ جم. ومدى الحجم الذي يمكن قياسه بأجهزة تشتت الضوء الديناميكية التجارية ، هو $1-100$ نانومتر.

٢,٣,١ المجهر الإلكتروني Electron Microscopy

لقد تم استخدام المجهر الإلكتروني (EM) لرؤية جسيمات الحمض النووي DNA النانوية المتشكلة في وجود كاتيونات متعددة التكافؤ (الشكل رقم ١٠,١٥). ويمكن أن يستخدم المجهر الإلكتروني EM لتحديد حجم ، وشكل ، وأبعاد جسيمات الحمض النووي DNA. وقد استخدم هود Hud وزملاؤه [83, 84] هذه التقنية في تحديد التراص السداسي للحمض النووي DNA في ملفات حلقيية ، باستخدام مجهر تثبيت الأنسجة وقطعها بالتجميد freeze-fracture. والإجراء التجريبي في المختبر بسيط نسبياً بالوصول إلى سهولة المجهر الإلكتروني الجيدة. ويتم وضع محاليل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية (المتكونة بخلط وتحضين الحمض النووي DNA مع عامل

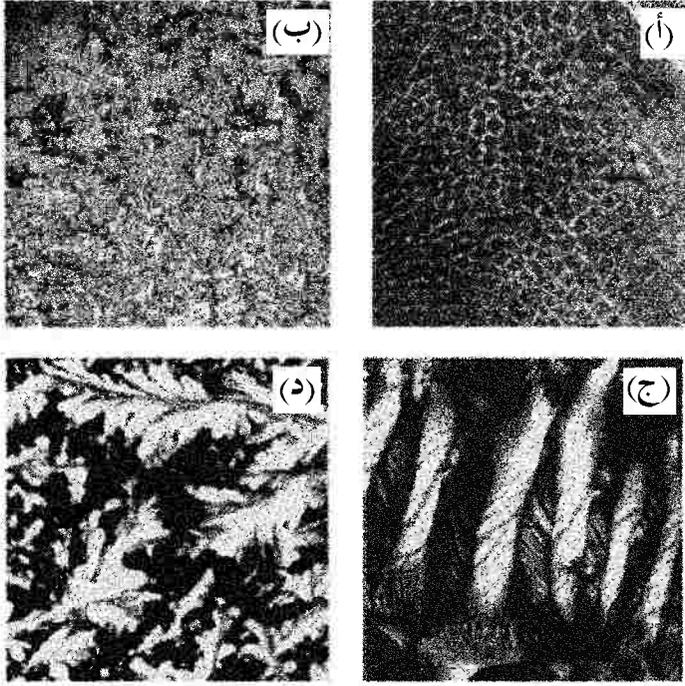
التكثيف) على شبكات فورمفار Formvar مغلقة [31, 83, 84]. وبعد مرور فترة زمنية ٣-٥ دقائق، يُجفف (يُصفى) المحلول بورقة ترشيح، وتصبغ الشبكات بنقطة من خلات اليورانيل ١٪ / وزن / حجم. ويتم رصد العينات في المجهر الإلكتروني بالتكبير الملائم. ويكمن مصدر الخطأ الرئيس في المجهر الإلكتروني الماسح في تحضير العينة، وتشويهاة أو عدم انتظام الصورة. وقد يؤدي فصل الجسيمات أثناء تحضير العينة إلى ترسيب غير متجانس. والعينة (أخذ العينات) الإحصائية السيئة الناتجة من حساب عدد صغير فقط من الجسيمات، تكون بمثابة قيد آخر. ويمكن قياس جسيمات مدى الحجم الكبير (٥-٥٠٠٠٠٠٠ نانومتر) باستخدام المجهر الإلكتروني.



الشكل رقم (١٥, ١٠). صورة المجهر الإلكتروني لجسيمات الحمض النووي DNA النانوية، المشكلة في وجود سبريميدين. تم وضع محلول Poly(dA-dT).poly(dA-dT) (٣ ميكرومول فوسفات الحمض النووي DNA) في ١٠ ملي مول من كلوريد الصوديوم، ١ ملي مول من كاكوديالات الصوديوم و ٢٠٠ ميكرومول من السبريميدين على شبكة مغلقة بالكربون، وتم صبغها بخلات اليورانيل ١٪. شريط القياس ١٠٠ نانومتر.

ويمكن استكمال المجهر الإلكتروني بمجهر الاستقطاب لتحديد التراكيب البلورية السائلة للحمض النووي DNA، في وجود عوامل التكتيف [59]. ولهذه الدراسات، يتم ترسيب المتكتفات بين الشريحة، وشريحة التغطية الزجاجية.

لإحكام الغلق تختم شرائح التغطية بمحلول البوليمرين ومُلدّن في الزايلين؛ لمنع الجفاف. وتسمح التراكيب بتحقيق الاستقرار خلال فترة، تتراوح من بضعة دقائق إلى بضعة ساعات. وتشير الدراسات الحديثة إلى تكوين نوعين من الطور البلوري السائل: طور كوليسترولي cholesteric phase، وطور سداسي في الحمض النووي DNA المعالج بالبولي أمين الطبيعي (الشكل رقم ١٠، ١٦) [59]. ويمكن تحديد الاستقرار الترموديناميكي (الديناميكي الحراري) thermodynamic stability للأطوار الكوليسترولية المتشكلة من الحمض النووي DNA بمراقبة الأطوار المختلفة تحت المجهر كدالة في الحرارة، وتركيز الملح، وتخفيف الحمض النووي DNA. ومن المهم دراسة ما إذا كانت قدرة الحمض النووي DNA على تشكيل أطوار بلورية سائلة مختلفة، تتعلق بكفاءة العوامل المختلفة؛ لتسهيل الانتقال الخلوي للحمض النووي DNA والأوليغونوكليوتيدات أم لا.



الشكل رقم (١٠, ١٦). تأثيرات السبرمين و N^1 - أستيل سبرمين على انتقالات الطور البلوري السائل لحمض نووي DNA الغدة التوتية للعجل. (أ) تم خلط الحمض النووي DNA (٢٥ ميكرومول في محلول صاد كاكوديلات الصوديوم)، مع ١ ملي مول سبرمين، وحضنت الشريحة الزجاجية في درجة حرارة ٢٢ مئوية لمدة ١٥ دقيقة ($\times 100$). وتم ملاحظة طور كوليسترولي مستوي بشبكة ثلاثية الأبعاد. (ب) تم تحضين الشريحة الزجاجية في (أ) لمدة ١٢ ساعة في درجة حرارة ٣٧ مئوية، وشوهت من خلال لوح تحت أقطاب متقاطعة ($\times 200$). وتم العثور على بنية البصمة بحدود الحبة المتوازية ومضادة الاتجاه. (ج) ولوحظ طور كوليسترولي كبير الدرجة، عندما تم تحضين الشريحة الزجاجية لمدة ٢٤ ساعة، في درجة حرارة ٣٧ مئوية ($\times 180$). (د) تم خلط الحمض النووي DNA مع N^1 - أستيل سبرمين، وحضن لمدة ٤٨ ساعة في درجة حرارة ٣٧ مئوية ($\times 45$). وتم الحصول على الطور البلوري. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [59]).

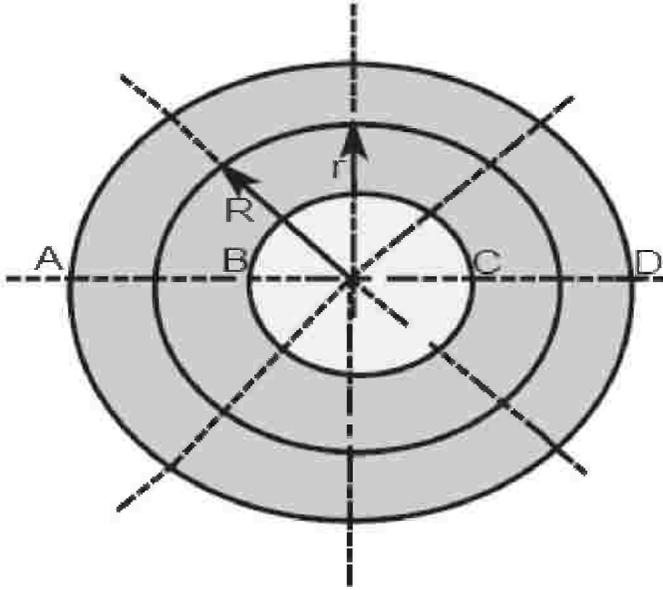
١٠,٣,٣ مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscopy

إن مجهر القوة الذرية (AFM)، هو التقنية المفضلة لرؤية جسيمات الحمض النووي DNA النانوية، ويقوم مجهر القوة الذرية بعمل قياسات كمية ثلاثية الأبعاد. وقد أدى مجهر القوة الذرية AFM- الذي اخترع في عام ١٩٨٦م - إلى زيادة مجال تطبيق مجهر التنفق الماسح إلى العينات البيولوجية الحية، وغير الموصلة، والليننة [85-88]. ولمجهر القوة الذرية AFM إمكانات عديدة، تشمل تصوير التفاصيل الطبوغرافية للأسطح من المستوى تحت الجزيئي إلى المستوى الخلوي [89]، ومراقبة العمليات الديناميكية للجزيئات الوحيدة في المحاليل ذات الصلة فسيولوجياً [90]، وقياس التفاعلات الجزيئية [90]، وتمييز الخواص الميكانيكية للجزيئات الوحيدة أو للتراكيب النانوية الوحيدة [92]. وعموماً، فإن خلط الحمض النووي DNA مع عامل تكثيف في محلول، يُشكّل جسيمات الحمض النووي DNA النانوية. وعلى أية حال، لقد تم تحضير جسيمات نانوية أيضاً على السطح الصلب للتصوير. وعندما تتشكّل الجسيمات النانوية في محلول، فإنه يمكن تثبيتها على سطح ميكامشقوق حديثاً، ويتم إجراء التصوير بمجهر القوة الذرية AFM، إما في الهواء، وإما في المحلول. وعموماً، فالتصوير في الهواء أسهل بكثير من التصوير تحت شروط المحلول، ويمكنه توفير معلومات مورفولوجية وتركيبية قيمة عن جسيمات الحمض النووي DNA النانوية في ثلاثة أبعاد. وعلى سبيل المثال، يمكن الحصول بسهولة على الحجم، والارتفاع، والشكل، وحجم الجسيم للتراكيب الكروية أو شبيهة القضيب، بعد الحصول على صور مجهر القوة الذرية AFM. أما بالنسبة للتراكيب الحلقية، التي تتشكل عادة أثناء تكثيف الحمض النووي DNA، فيمكن تحديد نصف القطر الحلقية والحجم عن طريق برمجيات مجهر القوة الذرية AFM، كما هو موصوف من قبل راکستراو Rackstraw وآخرين (الشكل رقم ١٠,١٧) [92]. ويمكن أخذ مقاطع عرضية لجسيمات شبيهة الحلقة عند

فواصل بزاوية ٤٥°، ويتم تحديد أنصاف الأقطار الحلقية من المقاطع العرضية عند ارتفاع النصف الأقصى، من أجل تقليل تأثيرات التواء الرأس للحد الأدنى. ويمكن حساب حجم الجسم النانوي الوحيد باستخدام المعادلة التالية:

$$(3) \quad Volum = 2\pi^2 r^2 R$$

حيث إن قيم r و R ، كما عرفت في مفتاح مصطلحات الشكل رقم (١٠، ١٧).



الشكل رقم (١٠، ١٧). تمثيل التركيب الحلقي المستخدم لحساب حجم المتكثف باستخدام المعادلة رقم (٣). في هذا الشكل: $r = \{(A-D)(B-C)\}/4$ و $R = \{(B-C)/2\} + r$.

وفي الحالة الثانية، يمكن أن تُشكّل المتكثفات مباشرة على الركيزة، ويتم تصويرها بمجهر القوة الذرية AFM مباشرة، إما في الهواء، وإما تحت محلول. وهناك العديد من الملامح الجذابة للتصوير تحت المحلول، والأكثر وضوحاً، هي القدرة على تتبع عملية التكتيف الديناميكي في محاليل صادة ذات الصلة فسيولوجياً في الزمن

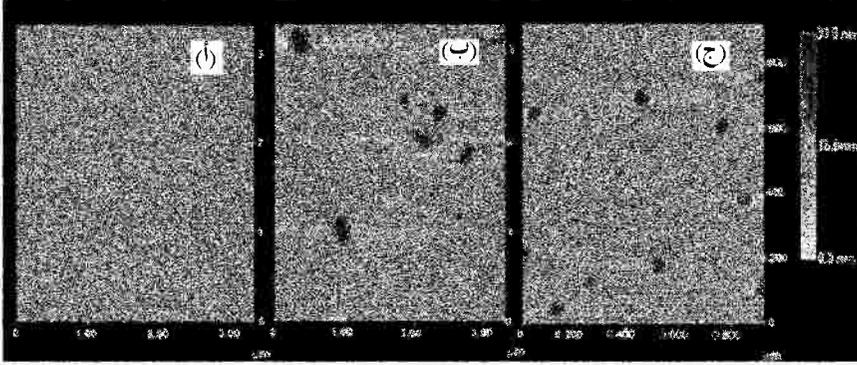
الحقيقي. وبالمقارنة مع المجهر الإلكتروني، فإن القدرة على التصوير في محلول تحت ظروف طبيعية، هي الملمح الأكثر تميزاً لمجهر القوة الذرية AFM. ويمكن تشغيل مجهر القوة الذرية AFM في كل من نمط النقر، ونمط الاتصال لتصوير جزيئات الحمض النووي DNA النانوية. ونمط النقر هو الأكثر استخداماً عموماً؛ لأن التأثير التدميري لرأس مجهر القوة الذرية AFM على جسيمات الحمض النووي DNA النانوية (التي تكون لينة عادة)، يكون أقل بكثير في التصوير بنمط النقر عنه في التصوير بنمط الاتصال.

١٠,٣,٣,١ دراسات جسيمات الحمض النووي النانوية بمجهر القوة

الذرية DNA Nanoparticle Studies by AFM

تم عرض أمثلة لتشكيل جسيم الحمض النووي DNA النانوي في وجود ديندرير البولي برويلين إيمين PPI (الجيل 4)، وسبرميدين كما في الشكل رقم (١٨, ١٠). ويتغير تدريجياً تركيب الحمض النووي DNA من تراكيب بلازميد غير مكثفة تماماً إلى تراكيب شبيهة الزهرة متكثفة جزئياً، في وجود ٢.٥ ميكرومول من ديندرير البولي برويلين إيمين PPI. وفي وجود ١٠ ميكرومول من السبرميدين، تلاحظ جسيمات نانوية متكثفة بالكامل ومضغوطة. وباستخدام مجهر القوة الذرية، لاحظ إواتاكي Iwataki وآخرون [93] منافسة بين ضغط السلاسل الوحيدة، وحزم السلاسل المتعددة في جزيئات الحمض النووي DNA العملاقة، مع وجود السبرميدين كعامل تكثيف. وعندما كان تركيز الحمض النووي DNA > 1 ميكرومول في وحدات مزدوجة القاعدة، تكثفت جزيئات الحمض النووي DNA الفردية في تركيب مضغوط، بينما حدث تجمع شبيه بليف سميك من السلاسل المتعددة، عندما زاد تركيز الحمض النووي DNA إلى ١٠ ميكرومول. وفي دراسات أخرى، تم ملاحظة مورفولوجيات مختلفة، بما في ذلك تراكيب شبه متفرعة، وملفات حلقية، وأقراص، وزهور بمجهر

القوة الذرية AFM، عند مراحل مختلفة من تكثيف الحمض النووي DNA، أو تحت شروط تكثيف مختلفة [94-96].



الشكل رقم (١٠، ١٨). صور مجهر القوة الذرية لتشكيل جسيم حمض نووي نانوي لبلازميد pGL3 في وجود ديندريمر PPI وسبرميدين. (أ) حمض نووي البلازميد على سطح ميكا. (ب) حمض نووي البلازميد مكثف جزئياً، في وجود ٢,٥ ميكرومول من ديندريمر PPI الجيل 4-. (ج) حمض نووي البلازميد مكثف جزئياً في وجود ١٠ ميكرومول سبرميدين.

لقد تم دراسة تشكيل جسيم الحمض النووي النانوي في وجود البولي-L-لايسين (PLL)، والبولي-L-لايسين المعدل، وسبرميدين، والبولي إيثيلين إيمين PEI على نطاق واسع، باستخدام مجهر القوة الذرية [101 - 96, 18]. واستخدم هانزما Hansma ومعاونوه [101, 96, 18] مجهر القوة الذرية لدراسة مدى تكثيف الحمض النووي في ١٠٠ معقد من المعقدات المختلفة تقريباً للحمض النووي، مع البولي-L-لايسين أو البولي-L-لايسين المرتبط بروتينات سكرية، و(ASOR) asialoorosomuroid أو orosomuroid. وقد وجدوا أن تكثيف الحمض النووي يكون فعالاً مع ١٠ كليو دالتون بولي-L-لايسين، المرتبط تساهمياً بـ ASOR عند نسبة لايسين: نيوكليوتيد (lys:nt) ١ : ٥، أو بنسبة أعلى من ذلك. وتحت هذه الشروط،

يتم إنتاج أعداد كبيرة من الملفات الحلقية والقضبان القصيرة بأطوال كنتورية من ٣٠٠-٤٠٠ نانومتر. وعلاوة على ذلك، فقد وجدوا أن معقد الـ PLL-ASOR عزز التعديل الجيني في كبد الفأر من ١٠ إلى ٥٠ ضعفاً تقريباً بالمقارنة بالبولي-L-لايسين بمفرده. وأظهرت الدراسة التي أعدها والفيرت Wolfert وسيمور Seymour [99] عن تأثير الوزن الجزيئي للبولي-L-لايسين على حجم جسيمات الحمض النووي النانوية، أن البولي-L-لايسين الأصغر (وزن جزيئي: ٣٩٧٠)، ينتج معقدات أكثر تجانساً، بأقطار تتراوح من ٢٠ إلى ٣٠ نانومتر، مقارنة بالمعقدات الكبيرة (١٢٠-٣٠٠ نانومتر)، المتشكلة في وجود البولي-L-لايسين، مرتفع الوزن الجزيئي (وزن جزيئي: ٢٢٤٥٠٠). إن جسيمات الحمض النووي النانوية المتشكلة مع البولي-L-لايسين، منخفض الوزن الجزيئي لها سمية خلوية منخفضة جداً، بالمقارنة مع تلك المتشكلة مع البولي-L-لايسين، مرتفع الوزن الجزيئي. ومن المثير للاهتمام، أن البولي إيثيلين إيمين أكثر كفاءة من البولي-L-لايسين لتشكيل الجسيم النانوي، بالنسبة لتطبيقات توصيل الجين [45, 94, 100, 101]. وتظهر دراسات مجهر القوة الذرية تجمع الحمض النووي وجسيمات نانوية متكتفة جزئياً في وجود البولي-L-لايسين PLL، بينما يستطيع البولي إيثيلين إيمين PEI حث الجسيمات النانوية من ٣٠-٦٠ نانومتر. وقد وُجدت حلقات، وتراكيب خطية ممتدة، وملفات حلقية، وقضبان، ووسيطات أخرى في دراسات مجهر القوة الذرية AFM للجسيمات النانوية المستحثة بمتراقات بوليمر البولي-L-لايسين.

عرض هان Han وآخرون [102] تكثيف حمض نووي DNA البلازميد بواسطة بوليمر دهني، يذوب في الماء إلى جسيمات كروية، بقطر ٥٠ نانومتر تقريباً. وأثبت ليم Lim وآخرون [103] بمجهر القوة الذرية AFM تشكيل معقدات قابلة للتحلل الحيوي، تتجمع ذاتياً بين الحمض النووي، وحامل الجين البوليمري غير

السام، وهو بولي α -(٤-أمينوبوتيل)-L-حمض الجليكوليك [poly[α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid].

بالإضافة إلى عوامل تكثيف الحمض النووي الكاتيونية، فقد أظهرت أيضاً محبات الدهون والماء المتعادلة التي لديها وحدة تمييز حمض نووي جزيئية بمنطقة كارهة للماء، ووحدة بولي إيثيلين جليكول PEG، قدرة على تكثيف حمض نووي البلازميد بنجاح [78, 79]. وتعرض دراسات مجهر القوة الذرية مدى لحالات مطوية من طي جزئي للتراكيب الحلقيّة فوق الجزيئية المكثفة، والتي لها قطر خارجي وداخلي حوالي ١٠٠ نانومتر و٢ نانومتر (مدى 21 ± 11 نانومتر) على الترتيب. وتمثل محبات الدهون والماء هذه، الخطوة الأولى نحو تحديد متطلبات التصميم لعامل تكثيف / الحمض النووي الانتقائي. ولقد درس أيزوب Isobe وآخرون [104] تكثيف حمض نووي البلازميد، مع فوليرينات وظيفية بمجهر القوة الذرية. وقد قام جالياموف Gallyamov وآخرون [105] بفحص عملية ضغط الحمض النووي T4DNA ذي الوزن الجزيئي المرتفع مباشرة في خلية سائل مجهر القوة الذرية. كما تم الحصول على صور مجهر القوة الذرية للكريات المتشكلة بضغط الحمض النووي في بيئات الكحول- الماء، في تركيز أيزوبروبانول مرتفع (٨٠٪). وباستخدام تقنية إزالة الانتواء (الالتفاف) من صور مجهر القوة الذرية، فإنه يتبين أن الكرية تحتوي فقط على جزيء حمض نووي واحد معبأ (مكتظ) بإحكام. وتثبت دراستنا الحديثة تشكيلا حلقيًا لحمض نووي البلازميد، في وجود نظائر البولي أمين (الشكل رقم ١٠.٥) [33].

كما تم دراسة تكثيف الحمض النووي الحادث على الأسطح [106-111]. واستخدم ديمترياديس Dimitriadis وآخرون [106] مجهر القوة الذرية لدراسة الشكل الجزيئي للحمض النووي الممتز من محاليل مائية، تحتوي على كاتيونات أحادية التكافؤ (Na^+) ، وثنائية التكافؤ (Ca^{2+}) ، وثلاثية التكافؤ $(spermidine^{3+})$ على ركائز صلبة مختلفة

(سطوح محبة للماء، ومحبة للماء متوسطة، وكارهة للماء). وقد تبين أن تفاعل الحمض النووي / الحمض النووي، توسط طاقة سطح الركيزة؛ مما أدى إلى تشكيل مجموعة متنوعة من التراكييب. كما تبين أن تراكييب الحمض النووي المكثف، يتم تشكيلها على الأسطح الكارهة للماء، حتى في غياب الكاتيونات متعددة التكافؤ. وأظهرت الدراسة التي أجراها آلن Allen وآخرون [108] على معقدات البروتامين- الحمض النووي المرتبط بالميكابمجهز القوة الذرية، أن مورفولوجيا التراكييب تتنوع اعتماداً على طريقة تحضير العينة. وعلى سبيل المثال، يتم ملاحظة الجذيلة البينية، والتحزم الجنب بالجنب من الحمض النووي، والتراكييب شبه الحلقية بالنسبة للمعقدات المتكونة في المحلول، بعد خلط الحمض النووي والبروتامين مباشرة. كما تلاحظ من حين لآخر، تجمعات كبيرة من الحمض النووي. وعلى أية حال، فإذا ارتبط الحمض النووي أولاً بسطح الميكاب، قبل إضافة البروتامين، فإنه تتشكل تراكييب حلقية محددة جيداً فقط، دون تحزم أو تجمع الحمض النووي. والقطر المتوسط للحلقات، هو ٣٩.٤ نانومتر. وتدل التراكييب على أن الحمض النووي المكثف، يتكدس رأسياً بأربعة إلى خمسة أدوار، بكل حلزون يحتوي على أقل قدر ٣٦٠-٣٧٠ زوج قاعدة من الحمض النووي ذي الشكل-B. وقد عرض فانج Fang وآخرون [110,111] التكتيف ثنائي الأبعاد لجزيئات الحمض النووي، على غشاء دهني كاتيوني بمجهز القوة الذرية. ولقد وجد أن سيولة الغشاء الكاتيوني، عززت التراص المحكم لكل من جزيئات الحمض النووي الخطية والدائرية، دون الاعتماد على طول الحمض النووي. إن متوسط المسافة الحلزونية البينية للحمض النووي المكتظ بإحكام، يكون أكثر من ضعف متوسط قطر الحمض النووي.

من الجدير بالملاحظة أن تراكييب الجسيمات النانوية المختلفة المشكلة مع الحمض النووي، تعتمد على ما إذا كان يتم تنفيذ عملية التكتيف في محلول أو على

سطح صلب. وعلى سبيل المثال، عرض آلين وآخرون [108] تراكيب حلقيّة متميزة، عندما يُضاف البروتامين إلى الحمض النووي على سطح الميكا. وعلى أية حال، عندما يتم خلط وتحضين الحمض النووي والبروتامين في محلول قبل النقل إلى سطح الميكا، تجد شبكة من الحمض النووي ببضعة حلقات رفيعة. وأعلن فانج وآخرون [110] عن نتائج مماثلة، عندما استخدموا السيلانات silanes كعوامل تكثيف. وعندما يتم تحضين مسبقاً للسيلانات والحمض النووي في محلول، تلاحظ وجود تراكيب حلقيّة (حلزونية) looped، بما في ذلك أشكال السجق والزهرة. بينما على سطح السيلكون، فإن السيلانات تُكثف الحمض النووي إلى حلقات مستقلة متميزة، والتي يعتمد حجمها على طول الحمض النووي.

١٠,٣,٣,٢ قيود تقنية مجهر القوة الذرية Limitation of AFM Technique

بالمقارنة إلى المجهر الإلكتروني النفاذ، فإن مجهر القوة الذرية، لا يوفر فقط صوراً ثلاثية الأبعاد مباشرة لجسيمات الحمض النووية النانوية، ولكنه لديه القدرة أيضاً على العمل في المحلول، وبالتالي يقدم سيلاً جديداً لتحديد تراكيب العينات البيولوجية بدرجة وضوح عالية، في ظروف أيونية ذات الصلة فسيولوجياً، والرقم الهيدروجيني pH. وعلى أية حال، مثل أي تقنية فيزيائية، فإن مجهر القوة الذرية AFM ليس كاملاً، وله قيود تستند على طريقة تحضير العينة. وكما نُوقش سابقاً، يتم تحضير معظم جسيمات الحمض النووي النانوية؛ لتوصيل الجين اللافيروسي في المحلول. ولكي يتم تصوير هذه الجسيمات النانوية بمجهر القوة الذرية، يجب أن يتم نقلها أولاً وتثبيتها على ركيزة، والتي تكون الميكا في معظم الحالات، ومن ثم تُثبت الركيزة على جهاز مجهر القوة الذرية. ويتبع تحضير العينة الشائع إجراء من خطوتين:

١- ترسب متكامل لمحلول جسيمات الحمض النووي النانوية على سطح ميكا

مشقوق حديثاً (معدّل أو غير معدّل).

٢- شطف العينة وتجفيفها بنفخ هواء على سطح الميكا، بعد فترة الحضانة المحددة سلفاً.

وإن كان هذا هو الإجراء الأساسي المتبع، إلا أن تفاصيل تحضير العينة تختلف من مختبر إلى آخر. وعلى سبيل المثال، استخدم صن Sun وآخرون [112] ورق ترشيح لإزالة المحلول المتبقي، بعد ترسيب محلول التكتيف على سطح الميكا بفترة حضانة لمدة دقيقة. وقد تتداخل هذه الطريقة قليلاً مع تثبيت متكثفات الحمض النووي على السطح، عن طريق الشطف بالماء، والذي يمكنه، إما جرف متكثفات الحمض النووي، وإما حث إزالة التكتيف. ووجد فانج وآخرون [111] أن الشطف بالماء قبل تجفيف سطح الميكا يفشل؛ بسبب إزالة التكتيف السريع للمتكثفات condensates. ولتجنب إزالة التكتيف، قاموا بتجفيف العينات بهواء مضغوط بعد فترة حضانة لمدة خمس دقائق، وبعد ذلك يتم التصوير بمجهر القوة الذرية بدون شطف. ويستطيع هذا الإجراء منع إزالة التكتيف للمتكثفات على سطح الميكا، مع التأكيد بأن تركيزاً عالياً من عوامل التكتيف، قد يتداخل مع التصوير بمجهر القوة الذرية. وفي معظم الحالات، يكون تثبيت متكثفات الحمض النووي بشكل رئيس، نتيجة للتفاعل الإلكتروليتي بين متكثفات الحمض النووي وسطح الميكا. ولذلك فعندما تكون متكثفات الحمض النووي موجبة الشحنة إجمالاً، فإن المتكثفات يمكنها عادة أن تمتاز وتلتصق بالميكا غير المعدلة بشحنة سالبة إجمالية. وعلى أية حال، فعندما تكون متكثفات الحمض النووي سالبة الشحنة إجمالاً، أو التفاعل بين متكثفات الحمض النووي موجبة الشحنة، وسطح الميكا غير المعدل ضعيف جداً على تثبيت متكثفات الحمض النووي، يجب تبني إجراء مناسب؛ للحصول على تثبيت ناجح. ويتم استخدام إجراء شائع لتعديل سطح الميكا. وعلى سبيل المثال، لقد قام دونلاب Dunlap وآخرون [94] بتعديل الميكا لتكون موجبة الشحنة (ميكا مغطاة بالبولي-L-اورنيثين) (poly-L-ornithine)؛ لتثبيت

المتكثفات غير المكتملة بشحنة سالبة إجمالاً، بينما تستخدم ميكا مكشوفة بشحنة سالبة؛ لتثبيت متكثفات مشبعة تماماً، والتي تكون موجبة الشحنة. وعلاوة على ذلك، استخدم دونلاب وآخرون [94] إجراء آخر لتحسين التصاق بعض المتكثفات إلى السطح، حيث يتم فيه تغطيس ركيزة الميكا المحضرة أولاً في المحلول المتكثف المخفف، ويتم عمل طرد مركزي لمدة ١٥ دقيقة، ومن ثم تشطف الركيزة للتصوير. وبهذا الإجراء يتم إجبار سطح الركيزة والمتكثفات، ليكونا في اتصال وثيق مع بعضهم بعضاً؛ مما يؤدي إلى التفاعل الأقوى.

ويتضح من الأمثلة أعلاه، أن التطوير للإجراء المناسب لتحضير متكثفات الحمض النووي على سطح الميكا للتصوير، هو مفتاح نجاح التصوير بمجهر القوة الذرية. وبدون تثبيت ناجح لمتكثفات الحمض النووي على سطح ميكا، يكون مضللاً لاستنتاج عدم تكوّن متكثفات، واستناداً على نتيجة عدم رصد متكثفات بمجهر القوة الذرية. وقد يكون من الخطأ أيضاً، استنتاج أن بعض المتكثفات تتكون في المحلول فقط، استناداً على نتائج مجهر القوة الذرية. وكما نوقش سابقاً، فإن الحمض النووي غير المكثف أو المكثف جزئياً، قد يصبح مكثفاً بالكامل على سطح الميكا [104-108].

ويمكن استخدام مجهر القوة الذرية لتوصيف جسيمات بمدى حجم واسع من ١ إلى ٨٠٠٠ نانومتر. كما تسمح هذه التقنية بتفريق (بالمحال) جزيئات الحمض النووي مزدوج الجديلة الوحيدة على سطح الميكا.

٤,١٠ الاعتبارات الآلية في تشكيل جسيم الحمض النووي DNA النانوي

Mechanistic Considerations in DNA Nanoparticle Formation

إن الحمض النووي يكون إلى حد كبير عبارة عن جزيء مشحون في المحلول، ويتفاعل مع المذيب والمواد المذابة على مدى مسافة طويلة فعلاً. وتتناثر مجموعات الفوسفات المشحونة سالباً من جزيء الحمض النووي في المحلول مع بعضها بعضاً؛ مما

يؤدي إلى سلسلة دودية الشكل بطول مستمر، يصل إلى ٥٠ نانومتر تقريباً [113]. ويعتمد شكل الحمض النووي في المحلول على تفاعل البوليمر والمذيب، وعلى التفاعل بين الأجزاء المختلفة للبوليمر. ويحدث التكثيف نتيجة لتفاعل القوى التفاعلية المختلفة، في وجود عامل تكثيف، ففي وجود الجزيئات الكاتيونية، يكون تكثيف الحمض النووي في الغالب محكوماً بتفاعل إلكتروستاتيكي بين الكاتيونات، ومجموعات الفوسفات المشحونة سالباً. ويمكن تحقيق تكثيف الحمض النووي في محلول خارج الجسم، بإضافة بسيطة من الكاتيونات متعددة التكافؤ، والبوليمرات الكاتيونية، أو جزيئات الاحتشاد المتعادلة [9].

إن النظريات المستندة على التفاعل الإليكتروستاتيكي للأيونات موجبة الشحنة مع الحمض النووي، تطرح فرضية التنافس الأيوني، وبالتالي تشتق القوة الدافعة لربط أيون متعدد التكافؤ بالحمض النووي من صافي الكسب في الأنتروبي، بإطلاق الأيونات أحادية التكافؤ، المرتبطة بالحمض النووي، مثل أيون Na^+ في المحلول:



وعندما يزداد تركيز أيون Na^+ الكلي في الوسط، يقل صافي الكسب في الأنتروبي عن إطلاق أيون Na^+ المرتبط إلى المحلول؛ مما يستلزم زيادة تركيز الأيونات متعددة التكافؤ؛ للتنافس مع أيون Na^+ ؛ لكي يتم طي الحمض النووي في تراكيب مضغوطة، مثل الحلقات.

وعادة يتم تمثيل اعتماد قيمة الـ EC_{50} (تركيز عامل تكثيف عند ٥٠٪ من تكثيف الحمض النووي) لأيونات متعددة التكافؤ، على تركيز أيون Na^+ ، عن طريق رسم $\ln[\text{EC}_{50}]$ ، مقابل $\ln[\text{Na}^+]$ بيانياً. ويكون ميل هذا الرسم مقياساً لألفة الترابط من

الأيونات المضادة مع الحمض النووي، وفقاً لنظرية تكثيف الأيون المضاد
: (8, 30, 32, 34, 35, 114)

$$(4) \quad 1 + \ln(1000\Theta_1 / c_1 v_{p1}) = -2 z_1 \xi (1 - z_1 \Theta_1 - z_2 \Theta_2) \ln(1 - e^{-kb})$$

$$(5) \quad \ln(\Theta_2 / c_2) = \ln(v_{p2} / 1000e) + (z_2 / z_1) \ln(10000\Theta_1 e / c_1 v_{p1})$$

حيث إن c_1 ، و c_2 ، هما تركيز الأيونات المضادة بشحنات z_1 ، و z_2 ، المساهمة في معادلة الشحنة الجزئية Θ_1 ، و Θ_2 ، ويشغلان حجمي v_{p1} ، و v_{p2} على الترتيب، وعندما ترتبط بالحمض النووي، و k هو بارامتر حجب ديبي Debye. و $\xi = q_p^2 / \epsilon k T b$ ، حيث q_p شحنة البروتون، ϵ ثابت العزل الكهربائي الكلي، و b متوسط فاصل الشحنة المحوري للبولي إلكتروليت، في غياب أي أيونات مرتبطة. وبصيغة أخرى، يُعطي البارامتر ξ بالنسبة بين طول بـجـيروم Bjerrum، و متوسط فاصل الشحنة المحوري، الذي يكون عبارة عن ناتج قسمة طول الكنتور (المحيط) على عدد مجموعات الشحنة. وبالنسبة للحمض النووي B-DNA مزدوج الحلزون، يكون $\xi = 4.2$ ، بينما للحمض النووي DNA وحيد الجدلية، يكون $\xi = 1.8$. لقد قام كل من مانينج [34] وريكورد [35] بحساب هذه القيم، في حين قدم أولسون Olson ومانينج [115] تفسيراً شكلياً لهذه النتيجة. ويتم الحصول على قيمة k بالمعادلة التالية:

$$(6) \quad k = 3.92 z^{1/2} c^{1/2} (nm^{-1})$$

باستخدام هذه القيمة لـ k ، في المعادلة رقم (٤)، وإدخال الحد الأول من المعادلة رقم (٤) في المعادلة رقم (٥)، يمكن أن تشتق المعادلة التالية بعد إعادة الترتيب:

$$(7) \quad \ln c_2 = [\ln \Theta_1 - \ln(v_{p2} / 1000e) + 2z_2 \xi (1 - r) \ln(3.29 b \xi^{1/2})] + z_2 \xi (1 - r) \ln c_1$$

في المعادلة رقم (٧)، $r = z_1\Theta_1 + z_2\Theta_2$ ، وقد تم إدخال التقريب $kb \sim (1 - e^{-kb})$ في المعادلة رقم (٤). وتم حساب المدى الأقصى لمعادلة شحنة الحمض النووي، بدمج أيون Na^+ ، وأيون متعدد التكافؤ، وكان $\sim 91\%$ [8]. واستبدال هذه القيمة لـ r ، ويمكن حساب الميل من رسم $\ln c_2$ ، مقابل $\ln c_1$ ، وكان ١.٥ من المعادلة رقم (٧). وقيم الميل المحددة تجريبياً قريبة جداً من هذه القيمة للبولي أمينات ثلاثية ورباعية التكافؤ. وعلى أية حال، تفشل هذه النظرية عند دراسة أيونات مضادة بشحنات موجبة أكبر من أربعة؛ بسبب الألفة العالية من هذه الأيونات للحمض النووي في التركيز المنخفض لأيون Na^+ [33]. ولم تظهر بعد أي نظرية لحساب معادلة الشحنة للحمض النووي بالكاتيونات المتعددة، مثل PEI و PLL.

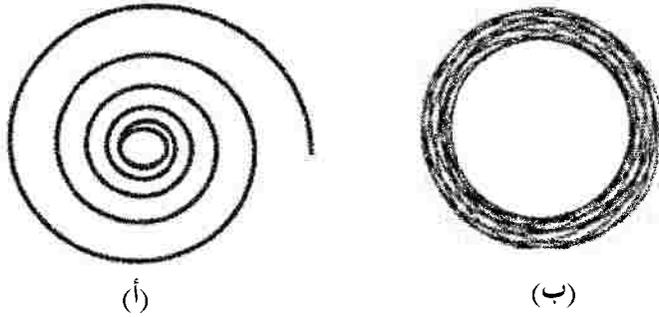
تؤدي قوى الإماهة (التميو)، وتقلبات الأيون المضاد دوراً مهماً في تكثيف الحمض النووي. وقد يؤدي التقلب الحراري في كثافة شحنة الأيون المضاد المكثف على طول سلسلة الحمض النووي إلى عدم الانتظامية. ويمكن أن يؤدي التفاعل مع بولي إلكتروليت موجب، إلى عكس توزيع الشحنة على الحمض النووي [116]. وفي القوة الأيونية العالية، يسبب زيادة حجب التنافر بين الشحنات ترتيب الحمض النووي، الذي يكون مضغوطاً أكثر. ولقد درس فينلي Fenley وآخرون [117] تكثيف الأيونات المضادة على أشكال مختلفة من سلاسل الحمض النووي، في الحمض النووي الخطي، ودوائر الحمض النووي، وترتيب حمض نووي ملفوف جداً دائري مغلق، ووجدوا أن تكثيف الأيون المضاد، يكون ذا علاقة بشكل الحمض النووي. إن الحمض النووي المضغوط أكثر، يُكثف الأيونات المضادة أكثر.

إن إعادة ترتيب جزيئات الماء بين مزدوجات الحمض النووي، في وجود عوامل تكثيف، يكون أيضاً سمة مهمة لتكثيف الحمض النووي. وقد درس كانكيا

Kankia وآخرون [118] تأثير التميؤ في تكثيف الحمض النووي، في وجود $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ، باستخدام تقنيات قياس الكثافة البصرية والموجات فوق الصوتية. ووجد أن الترابط كان مصحوباً بإزالة الماء من أغلفة تميؤ الحمض النووي و $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ، طبقاً للاتصال المباشر بين الجزيئات. وقد لوحظ تغير الشكل الجزيئي في تركيب الحمض النووي نحو الشكل C-، في وجود أيونات Mn^{2+} ، خلال دراسات ازدواج اللون الدائري، والاهتزازية، والإلكترونية [119]. وقدرة الـ Mn^{2+} على تشويش تركيب الحمض النووي، قد تكون من خلال زعزعة استقرار طبقات التميؤ على الحلزون المزدوج، وكسر جزئي للروابط الهيدروجينية بين أزواج القاعدة [120,121].

لقد تم طرح نظريتين رئيسيتين، لتوضيح تشكيل التراكيب الحلقية أثناء تكثيف الحمض النووي (الشكل رقم ١٩، ١٠). واللف المحيطي للحمض النووي لتشكيل حلزونات، تم دراسته لتشكيل الحلزون في الدراسات السابقة [9, 32, 33, 120, 121]. ودعمت بعض دراسات المجهر الإلكتروني ومجهر القوة الذرية هذا النموذج. واقترح هود وآخرون [122] الآلية الحركية التي يكون جزيء الحمض النووي في المحلول ملفوفاً فيها بنصف قطر ثابت، إلى سلسلة من الحلقات متساوية الحجم، والتي تُشكل حلزونات في وجود عوامل التكتيف، ويتفق جيداً هذا النموذج مع ملاحظات عديدة في الدراسات السابقة. ووفقاً لهذا النموذج، يوفر التشكيل التلقائي لحلقات الحمض النووي، في وجود عوامل تكثيف حدوث تنوي لتشكيل الحلزون أو الحلقة. وهذا هو المفضل حركياً؛ بسبب تقلب البوليمر العشوائي. ومن المقترح أن يكون حجم الحلقة الابتدائية عاملاً في تحديد حجم التكتيف [122]. وأثناء تشكيل حلزون الحمض النووي، يستمر نمو الحلقة داخلياً وخارجياً على حد سواء؛ مما يحفظ قطر الحلزون مساوياً تماماً لحلقة التنوي. إن القطر الأكثر احتمالاً للحلقة التي تتشكل تلقائياً من جزيء الحمض النووي، تم حسابه ليكون ٥٠ نانومتر، تحت ظروف تكون القوة

الأيونية للوسط فيها أكبر من ١ ملي مول. وقد قارن كونويل Conwell وآخرون [83] المتكثفات المتكونة في قوة أيونية منخفضة، وفي وجود ملح إضافي، ووضح أن سمك الحلزون يعتمد على تركيز الملح، ففي وجود الملح الإضافي، يحدث نمو ثانوي للحلزون نحو الخارج؛ مما يسبب زيادة حجم الحلزون عن قطر الحلقة الابتدائية.



الشكل رقم (١٩، ١٠) تمثيل تخطيطي لـ (أ) لف محيطي و(ب) نماذج الحلقة الثابتة؛ لتشكيل الجسيمات النانوية الحلقية للحمض النووي.

كما تم اقتراح آلية بديلة لتحول كرية الحلزون كسبب للتكثيف [123, 33]. وتستند النظرية على أن تحول الحلزون إلى كرية لبوليمر مرن في مذيبات ضعيفة، يكون صحيحاً فقط في تراكيز الحمض النووي المنخفضة [125, 124]. ونظراً لأن تركيز الحمض النووي يكون عالياً جداً داخل المتكثفات، فإن هذه النظرية لا تستطيع تفسير العملية الفعلية للتكثيف. وفي الحالة المكثفة، يتواجد الحمض النووي كبلورات سائلة، بتباعدات (بفواصل) شبكية قريبة من بلورات سائل الحمض النووي الكلي في نفس الضغط الأسموزي [123, 59]. ويمكن اعتبار المتكثفات، مثل بلورات سائلة صغيرة، بطاقة حرة مساهمة من الجزء الكلي، وبسبب الحجم المحدود [126]. والمساهمة من

الحجم المحدود، تتضمن الطاقة السطحية وطاقة المرونة. ويقترح التوفيق بين هذه الطاقات؛ لتكون عاملاً في تحديد شكل المتكثف.

يحدث تكثيف الحمض النووي مستحث الاحتشاد، في وجود بوليمرات متعادلة، مثل بولي إيثيلين جليكول، وبولي أكسيد الإيثيلين. وقد ذكر أن الحمض النووي المضغوط في الخلايا البكتيرية، كان مستحث الاحتشاد [126]. وهذا الشكل من التكثيف، هو المفضل في القوة الأيونية العالية، حيث يكون التنافر الإلكترونيستاتيكي على طول السلسلة محجوباً لصالح التكثيف. ويعرض اعتماد القوة الأيونية لتكثيف الحمض النووي مستحث الاحتشاد وجود حالتين. في القوة الأيونية العالية، يكون تركيز عامل التكثيف اللازم للتكثيف مستقلاً عن القوة الأيونية. ومع ذلك، وفي القوة الأيونية المنخفضة، يكون التركيز الحرج لعامل التكثيف حساساً للقوة الأيونية [127].

١٠,٥ تطبيقات العلاج الجيني المنهجي

Systemic Gene Therapy Applications

على الرغم من أن تطوير معظم ناقلات توصيل الجين اللافيروسي، يجري باستخدام نماذج زراعة الخلايا خارج الجسم، إلا أن التوصيل الجيني المنهجي يواجه تحديات عديدة. إن التغلب على تحلل مصل وسيط إنزيم الإندونوكليز endonucleas لحمض نووي البلازميد، ومنع تجمع الجسيمات النانوية، في وجود بروتينات المصل، والحاجة لاستهداف نسيج معين، هي المتطلبات الرئيسة لإدارة تراكيب البلازميد لأغراض علاجية [128]. وبالإضافة إلى استخدام الليبوزومات، والدهون الكاتيونية، والبوليمرات والبيبتيدات/البروتينات، فقد بذلت محاولات لصنع حمض نووي كاره للماء، وتجميعه في جسيمات بحجم نانوي أو ميكروني، مع تحسين جوهري في التحويل

الجيني [129]. إن كبسلة (تغليف) حمض نووي البلازميد في غلاف دهني وطلاءه بطبقة خارجية من البولي إيثيلين جليكول PEG، يسمح بدوران ممتد بعد التعاطي في الوريد، ويؤدي إلى تراكم ١٠٪ من الجرعة المحقونة في الورم البعيد [130]. ويصف شينازاي Chenasy وآخرون [131] كبسلة حمض نووي البلازميد في دهون كاتيونية، وترسيخ استقرارها بالبولي إيثيلين جليكول PEG بنقصان كبير في تصفية البلازما. ولقد أعلن كل من كوي Cui وممبير Mumper [132] عن حصر حمض نووي البلازميد، باستخدام شمع استحلاب ومخفف توتر سطحي كاتيوني. وتم إنتاج جسيمات نانوية مستقرة ومتماثلة (١٠٠-١٦٠ نانومتر)، ومغطاة بحمض نووي البلازميد على سطح تلك الجزيئات النانوية الكاتيونية المتكونة، أو المحصورة داخلها. ويظهر حقن وريد الذيل في الفئران، أن ٤٠٪ من حمض نووي البلازميد المحصور تبقى في الدوران، مقارنة بـ ١٦٪ للحمض النووي المكشوف، لمدة ٣٠ دقيقة بعد الحقن.

والمثال على العربة اللافيروسية الناجحة المستخدمة في العلاج الجيني، هو اللوفيكيتين leuvectin [133]. واللوفيكيتين عبارة عن معقد من حمض نووي البلازميد/والدهن، متكون من ناقل بروتين الشفرة البشرية أنترلوكين-٢ interleukin-2 (IL-2) في عربة تحتوي على نسبة كتلية ٥ : ١ من دهني DOPE/DMRIE (١، ٢- دايميربستيل أو كسوبروبيول-٣-ثنائي ميثيل هيدروكسي أثيل أمونيوم بروميد)/(ثنائي أولليل فوسفواتيل أيثانول أمين). ويؤدي تعداء معقد DMRIE/DOPE، وحمض نووي البلازميد IL-2 خارج الجسم إلى تعديل مستويات المداومة لـ IL-2 النشاط بيولوجياً [134]. وفي نموذج سرطان الخلايا الكلوية للفئران، أدى حقن المعقد DMRIE/DOPE وحمض نووي البلازميد IL-2 داخل الورم إلى تراجع الورم بالكامل في معظم الفئران. ولقد تم اختبار اللوفيكيتين في المرحلة الأولى والثانية من التجارب السريرية [135]. وتشير نتائج هذه الدراسات إلى إمكانية استخدامه في سرطان البروستاتا، وسرطان الخلايا

الكلوية، ومرضى ورم ملائي (سرطان الجلد) melanoma. وتم استخدام ناقلات واعدة أخرى تتضمن DOTAP : لبيوزوم كاتيوني كولوسيترولي، لتوصيل الجينات p53، وFHIT إلى سرطان الرئة الابتدائي والنقيلي [136].

إن صياغات الإيروسول المستندة على PEI للعلاج الجيني مباشرة بالنسبة للخلل الوظيفي الرئوي، مثل التكيف الكيسي، ونقص α_1 -مضاد التريسين α_1 -antitrypsin، وارتفاع ضغط الدم الرئوي، والربو، وسرطان الرئة [137]. إن الأيروسول المستند على PEI مستقر أثناء التذرية (أو الرش)، يؤدي إلى تعداء عالي الكفاءة، واستجابة علاجية في العديد من نماذج ورم الرئة الحيوانية، بالاقتران مع الجينات p53 وIL-12. وعلى أية حال، فتنشيط الجهاز المناعي والالتهابي، هو المشكلة الحقيقية في إدارة الناقلات اللافيروسية إلى الرئة [138]. وتتركز البحوث الحالية على تحسين التوصيل والتعديل الجيني، عن طريق تعديل ناقلات التوصيل، بالإضافة إلى التقنيات الفيزيائية، مثل التثقيب الكهربائي (عملية إدخال كروموسومات إلى الخلية بالنبض الكهربائي) electroporation، والموجات فوق الصوتية [139, 140].

٦, ١٠ التوجهات المستقبلية Future Directions

إن تقنية النانو مجال متعدد التخصصات، ويشهد توسعا مع التعهد بتطورات جديدة في الطب، وعلم الجينات، والاتصالات وعلم الإنسان الآلي. وفي المقياس النانومتري، تبدو قوى الترتيب الذاتي وخواص المواد مختلفة تماماً عن تلك في المقياس الكبير. ومن الضروري إتقان الفهم النظري لخواص الحمض النووي في المقياس النانومتري، ولتقنيات توصيل الحمض النووي كجسيمات نانوية إلى أنواع خلايا محددة والحالات المرضية. وقيد التطوير أيضاً أفكار مبتكرة، مثل التجمع الذاتي لحمض نووي على جسيمات كربونات معدنية نانوية، وإذابة الكربونات المعدنية بالأحماض؛

لتكوين كبسولات حمض نووي دقيقة [141]. ويتم استكشاف المعلومات الطبوغرافية بشكل رئيس في دراسات مجهر القوة الذرية الحالية؛ لتكثيف الحمض النووي، بالرغم من أن مجموعة متنوعة من المعلومات، بما فيها الخواص الميكانيكية، والخواص المغناطيسية، والمعلومات التيرموديناميكية، يمكن الحصول عليها من مجهر القوة الذرية. والتجارب التي تتضمن سحباً على جزيئات الحمض النووي الوحيدة، وعوامل التكثيف، وقياسات المرونة بمجهر القوة الذرية، يمكن أن تقدم رؤى قيمة للتغيرات الديناميكية في مورفولوجيا الحمض النووي تحت الشروط المختلفة. ويمكن تحقيق التخطيط ثنائي الأبعاد لمرونة العينة بتسجيل منحنيات القوة، حينما يقوم رأس مجهر القوة الذرية بمسح العينة من جانب إلى آخر [142]. ومن المستغرب أن التقارير عن الخواص الميكانيكية لمتكثفات الحمض النووي، مثل المرونة والصلابة، شحيحة جداً في الأبحاث. ومن المقبول انتقال الحمض النووي المكثف إلى الخلايا بالالتقام الخلوي، ثم يهرب داخل السيتوبلازم من خلال الإندوسومات (فجوات الابتلاع الداخلية). ويعتقد أن الانتقال التالي من السيتوبلازم إلى النواة، هو الحاجز الحرج؛ لأن المتكثفات في أغلب الأحيان تُغير تركيبها بعد الالتقام الخلوي. وسيكون من القيم فحص الخواص الميكانيكية والمورفولوجية لمتكثفات الحمض النووي، فيما يتعلق باستقرار المتكثفات بعد الالتقام الخلوي، وأخيراً فيما يتعلق بكفاءة التعداء الجيني.

شكر وتقدير Acknowledgments

لقد تم دعم هذا العمل بالمنح NIH CA042439 و CA073058 و CA080163 من معهد السرطان الوطني، ومنحة من مؤسسة سوزان ج. كومن Susan G. Komen للأبحاث سرطان الثدي.

الاختصارات Abbreviations

AAV	adeno-associated virus	فيروس مرتبط - غددي
AFM	atomic force microscopy	مجهر القوة الذرية
DMRIE	1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium bromide	٢,١-دايميرستيل أو كسوبروبيل-٣-ثنائي ميثيل هيدروكسي أثيل أمونيوم بروميد
DOGS	dioctadecylamidoglycylspermine-4-trifluoroacetic acid	وثنائي أتاديكيل اميدوجليكيل سبرمين-٤-رباعي فلورو حمض الخل
DOPE	dioleoylphosphatidyl ethanolamine	ثنائي أولييل فوسفواتيل إيثانول أمين
DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N-[2-(sperminocarboxamido)-ethyl]N,N-dimethyl-propan-1 aminium trifluoroacetate	٣,٢-ثنائي أولييلوكسي)-N-[٢-(سبرمين كربوكسوأميدو)-إثيل]N,N-ثنائي ميثيل - بروبان-١ - أمونيوم ثلاثي فلورو الخلات
DOTAP	N-1 (-2,3-dioleoyloxy) propyl)-N, N, N-trimethylammoniummethyl sulphate	N-(١-٣,٢-ثنائي أولييلوكسي) بروبييل)-N,N,N-ثلاثي ميثيل أمونيوم إثيل الكيرينات
DOTMA	N-1- (2,3-dioleoyloxy) propyl)-N, N, N-trimethylammonium chloride	N-(١-٣,٢-ثنائي أولييلوكسي) بروبييل)-N,N,N-ثلاثي ميثيل أمونيوم إثيل الكلوريد
EM	electron microscope	المجهر الإلكتروني
ODN	oligodeoxyribonucleotide	أوليغوديوكسي ريبونوكليوتيد
PAMAM	polyamidoamine	بولي أميدوأمين
PEG	polyethylene glycol	بولي إثيلين جليكول
PEI	polyethylenimine	بولي إثيلين إيمين
PLL	poly-L-lysine	بولي -L-لايسين
PPI	polypropylenimine	بولي بروبيلين إيمين

المراجع References

- 1 Vijayanathan, V., Thomas, T., Thomas, T. J. (2002) DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry* 41, 14085–14094.
- 2 Huang, L., Hung, M.-C., Wagner, E. (1999) *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. Academic Press, San Diego, CA.
- 3 Varmus, H. (1988) Retroviruses. *Science* 240, 1427–1435.
- 4 Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., Stevenson, M. (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666–669.
- 5 Amalfitano, A. (2003) Use of multiply deleted adenovirus vectors to probe adenovirus vector performance and toxicities. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5, 362–366.
- 6 Chuah, M. K., Collen, D., Van den Driessche, T. (2003) Biosafety of adenoviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 3, 527–543.
- 7 Reid, T., Warren, R., Kirn, D. (2002) Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* 9, 979–986.
- 8 Wilson, R. W., Bloomfield, V. A. (1979) Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light scattering study. *Biochemistry* 18, 2192–2196.
- 9 Bloomfield, V. A. (1996) DNA condensation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 334–341.
- 10 Blessing, T., Remy, J. S., Behr, J. P. (1998) Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 1427–1431.
- 11 Montign, W. J., Houchens, C. R., Illenye, S., Gilbert, J., Coonrod, E., Chang, Y. C., Heintz, N. H. (2001) Condensation by DNA looping facilitates transfer of large DNA molecules into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 29, 1982–1988.
- 12 Blagbrough, I. S., Geall, A. J., Neal, A. P. (2003) Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy. *Biochem. Soc. Trans* 31, 397–406.
- 13 Bloomfield, V.A. (1991) Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers* 31, 1471–1481.
- 14 Thomas, T. J., Bloomfield, V. A. (1983) Collapse of DNA caused by trivalent cations: pH and ionic specificity effects. *Biopolymers* 22, 1097–1106.
- 15 Widom, J., Baldwin, R. L. (1983) Monomolecular condensation of k-DNA induced by cobalt hexamine. *Biopolymers* 22, 1595–1620.
- 16 Thomas, T. J., Bloomfield, V. A. (1985) Quasielastic laser light scattering and electron microscopy studies of the conformational transitions and condensation of poly(dA-dT).poly (dA-dT). *Biopolymers* 24, 2185–2194.
- 17 Liu, G., Molas, M., Grossmann, G. A., Pasumarthy, M., Perales, J. C., Cooper, M. J., Hanson, R. W. (2001) Biological properties of poly-*l*-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.* 276, 34379–34387.

- 18 Golan, R., Pietrasanta, L. I., Hsieh, W., Hansma, H. G. (1999) DNA toroids: stages in condensation. *Biochemistry* 38, 14069–14076.
- 19 Thomas, R. M., Thomas, T., Wada, M., Sigal, L. H., Shirahata, A., Thomas, T. J. (1999) Facilitation of the cellular uptake of a triplex-forming oligonucleotide by novel polyamine analogues: structure-activity relationships, *Biochemistry* 38, 13328–13337.
- 20 Wu, C. H., Wilson, J. M., Wu, G. Y. (1989) Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J. Biol. Chem.* 264, 16985–16987.
- 21 Zauner, W., Ogris, M., Wagner, E. (1998) Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* 30, 97–113.
- 22 Lim, Y. B., Choi, Y. H., Park, J. S. (1999) A self-destroying polycationic polymer: biodegradable poly(4-hydroxy-L-proline ester). *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5633–5639.
- 23 Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P., Behr, J. P. (2001) Towards synthetic viruses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 245–253.
- 24 Luo, D., Aaltzman, W.M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18, 33–37.
- 25 Rudolph, C., Muller, R. H., Rosenecker, J. (2002) Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J. Gene Med.* 4, 66–74.
- 26 Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., Birnstiel, M. L. (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3410–3414.
- 27 Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 7413–7417.
- 28 Kumar, V. V., Singh, R. S., Chaudhuri, A. (2003) Cationic transfection lipids in gene therapy: successes, set-backs, challenges and promises. *Curr. Med. Chem.* 10, 1297–306.
- 29 Matsui, H., Johnson, L. G., Randell, S. H., Boucher, R. C. (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1117–1126.
- 30 Vijayanathan, V., Thomas, T., Shirahata, A., Thomas, T. J. (2001) DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects. *Biochemistry* 40, 13644–13651.
- 31 B_tcher, C., Endisch, C., Fuhrhop, J. H., Catterall, C., Eaton, M. (1998) High yield preparation of oligomeric C-type DNA toroids and their characterization by cryoelectron microscopy. *J. Am. Chem. Soc* 120, 12–17.
- 32 Bloomfield, V. A. (1997) DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* 44, 269–282.
- 33 Vijayanathan, V., Thomas, T., Antony, T., Shirahata, A., Thomas, T.J. (2004) Formation of DNA nanoparticles in the presence of novel polyamine analogues:

- a laser light scattering and atomic force microscopic study. *Nucleic Acids Res* 32, 127–134.
- 34 Manning, G. S. (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys* 11, 179–246.
- 35 Record, M. T. Jr., Anderson, C. F., Lohman, T. M. (1978) Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.* 11, 103–178.
- 36 Pedroso de Lima, M. C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H., Duzgunes, N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev* 47, 277–294.
- 37 Sugiyama, M., Matsuura, M., Takeuchi, Y., Kosaka, J., Nango, M., Oku, N. (2004) Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 24–30.
- 38 Brown, M. D., Schatzlein, A. G., Uchegbu, I. F. (2001) Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.* 229, 1–21.
- 39 Templeton, N. S., Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stray, H. H., Roberts, D. D., Pavlakis, G. N. (1997) Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression, *Nat. Biotechnol.* 15, 647–652.
- 40 Juliano R. L., Akhtar, S. (1992) Liposomes as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. *Antisense Res. Dev* 2, 165–176.
- 41 Zelphati, O., Szoka, Jr., F. C. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 11493–11498.
- 42 Simoes, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Duzgunes, N., De Lima Pedroso, M. C. (2004) On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev* 56, 947–965.
- 43 Filion, M.C., Philip, N. C. (1998) Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. *Int. J. Pharm.* 162, 159–170.
- 44 Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. (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.
- 45 Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E., Danos, O. (2001) Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.* 3, 135–144.
- 46 Klemm, A. R., Young, D., Lloyd, J. B. (1998) Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.* 56, 41–46.
- 47 Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/ DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 5177–5181.
- 48 Kircheis, R., Wightman, L., Wagner, E. (2001) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 341–358.
- 49 Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., Wagner, E. (1999) Pegylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components,

- extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6, 595–605.
- 50 Petersen, H., Fechner, P. M., Martin, A. L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C. J., Fischer, D., Davies, M. C., Kissel, T. (2002) Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Biocor.jug. Chem.* 13, 845–854.
- 51 Oupicky, D., Ogris, M., Howard, K. A., Dash, P. R., Ulbrich, K., Seymour, L. W. (2002) Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol. Ther.* 5, 463–472.
- 52 Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1985) A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polym. J. (Tokyo)* 17, 117–132.
- 53 Haensler, J., Sz_ka, F. (1993) Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Biocor.jug. Chem.* 4, 372–379.
- 54 Zinselmeyer, B. H., Mackay, S. P., Schatzlein, A. G., Uchegbu, I. F. (2002) The lower generation poly(propylenimine) dendrimers are effective gene transfer agents. *Pharm. Res.* 19, 960–967.
- 55 Choi, Y., Mecke, A., Orr, B. G., Holl, M. M. B., Baker, J. R., Jr. (2004) DNA-directed synthesis of generation 7 and 5PMAM dendrimer nanoclusters. *Nano Lett.* 4, 391–397.
- 56 Santhakumaran, L. M., Thomas, T., Thomas, T. J. (2004) Enhanced cellular uptake of a triplex forming oligonucleotide by nanoparticle formation in the presence of polypropylenimine dendrimers. *Nucleic Acids Res* 32, 2102–2112.
- 57 Bielinska, A., Kukowska-Latallo, J. F., Johnson, J., Tomalia, D. A., Baker, J. R. Jr. (1996) Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 24, 2176–2182.
- 58 Evans, H. M., Ahmad, A., Ewert, K., Pfohl, T., Martin-Herranz, A., Bruinsma, R. F., Safinya, C. R. (2003) Structural polymorphism of DNA-dendrimer complexes. *Phys. Rev. Lett.* 91, 075501.
- 59 Saminathan, M., Thomas, T., Shirahata, A., Pillai, C. K., Thomas, T. (2002) Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics. *Nucleic Acids Res* 30, 3722–3731.
- 60 Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (1999) Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286, 120–123.
- 61 Balhorn, R., Brewer, L., Corzett, M. (2000) DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 230–234.
- 62 Sparrow, J. T., Edwards, V. V., Tung, C., Logan, M. J., Wadhwa, M. S., Duguid, J., Smith, L. C. (1998) Synthetic peptide-based DNA complexes for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* 30, 115–131.

- 63 Brown, M. D., Gray, I.E., Tetley, L., Santovena, A., Rene, J.,Schatzlein, A. G., Uchegbu, I. F. (2003) In vitro and in vivo gene transfer with poly(amino acid) vesicles. *J. Control. Release* 93, 193–211.
- 64 Wagner, E., Cotton, M., Mechtler, K., Kirlappos, H., Birnstiel, M. L. (1991) DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents: synthesis by linkage of polylysine or ethidium homodimer to the transferrin carbohydrate moiety. *Biocor.jug. Chem* 2, 226–231.
- 65 Midoux, P., Monsigny, M., (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/ pDNA complexes. *Biocor.jug. Chem* 10, 406–411.
- 66 Hansma, H. G. (2001) Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem* 52, 71–92.
- 67 Schaffer, D. V., Lauffenburger, D. A. (1998) Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J. Biol. Chem.* 273, 28004–28009.
- 68 Chiou, H. C., Tangco, M. V., Levine, S. M., Robertson, D., Kormis, K., Wu, C. H., Wu, G. Y. (1994) Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers. *Nucl. Acids Res* 22, 5349–5446.
- 69 Adami, R. C., Rice, K. G. (1999) Metabolic stability of glutaraldehyde cross-linked peptide DNA condensate. *J. Pharm. Sci.* 8, 739–746. 70 Ouyang, M., Remy, J., Sz_ka, F. C. (2000) Controlled template-assisted assembly of plasmid DNA into nanometric particles with high DNA concentration. *Biocor.jug. Chem* 11, 104–112.
- 71 McKenzie, D. L., Kwok, K. Y., Rice, K. G. (2000) A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J. Biol. Chem.* 275, 9970–9977.
- 72 Kwok, K. Y., Park, Y., Yang, Y., McKenzie, D. L., Liu, Y., Rice, K. G. (2003) In vivo gene transfer using sulfhydryl cross-linked PEG-peptide/ glycopeptide DNA co-condensates. *J. Pharm. Sci.* 92, 1174–1185.
- 73 Borchard, G. (2001) Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* 52, 145–150.
- 74 Aral, C., Akbuga, J. (2003) Preparation and in vitro transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA:poly(Lysine) complexes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 321–326.
- 75 Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J. C. (2004) Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 1–8.
- 76 Richardson, S. C., Kolbe, H. V., Duncan, R. (1999) Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm.* 178, 231–243.
- 77 Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., Remy, J. S. (1998) Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm. Res.* 15, 1332–1339.

- 78 Vasilevskaya, W., Khokhlov, A. R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K. (1995) Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *J. Chem. Phys.* 102, 6595–6602.
- 79 Petersen, H., Fechner, P. M., Martin, A. L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C. J., Fischer, D., Davies, M. C., Kissel, T. (2002) Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug. Chem.* 13, 845–854.
- 80 Bennis, J. M., Maheshwari, A., Furgeson, D. Y., Mahato, R. I., Kim, S. W. (2001) Folate-PEG-folate-graft-poly ethylenimine-based gene delivery. *J. Drug Target.* 9, 123–139.
- 81 Faraasen, S., Voros, J., Csucs, G., Textor, M., Merkle, H. P., Walter, E. (2003) Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharm. Res.* 20, 237–246.
- 82 Bloomfield, V. A. (1981) Quasi-elastic light scattering applications in biochemistry and biology. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10, 421–450.
- 83 Conwell, C. C., Vilfan, I. D., Hud, N. V. (2003) Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9296–9301.
- 84 Hud, N. V., Downing, K. H. (2001) Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14925–14930.
- 85 Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933.
- 86 Hansma, P. K., Elings, V. B., Marti, O., Bracker, C. E. (1988) Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. *Science* 242, 209–216.
- 87 Marti, O., Elings, V., Haugan, M., Bracker, C. E., Schneir, J., Drake, B., Gould, S. A., Gurley, J., Hellems, L., Shaw, K. (1988) Scanning probe microscopy of biological samples and other surfaces. *J. Microsc.* 152, 803–809.
- 88 Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M., Gaub, H. E. (1992) From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* 257, 1900–1905.
- 89 Engel, A., Muller, D. J. (2000) Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* 7, 715–718.
- 90 Zlatanova, J., Lindsay, S. M., Leuba, S. H. (2000) Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 37–61.
- 91 Florin E. L., Moy, V. T., Gaub H. E. (1994) Adhesion forces between individual ligandreceptor pairs. *Science* 264, 415–417.
- 92 Rackstraw, B. J., Martin, A. L., Stolnik, S., Roberts, C. J., Garnett, M. C., Davies, M. C., Tendler, S. J. B. (2001) Microscopic Investigations into PEG-cationic polymer-induced DNA condensation. *Langmuir* 17, 3185–3193.

- 93 Iwataki, T., Kidoaki, S., Sakaue, T., Yoshikawa, K., Abramchuk, S. S. (2004) Competition between compaction of single chains and bundling of multiple chains in giant DNA molecule. *J. Chem. Phys.* 120, 4004–4011.
- 94 Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R., Monaco, L. (1997) Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 25, 3095–3101.
- 95 Fang, Y., Hoh, J. H., (1998) Early intermediates in spermidine-induced DNA condensation on the surface of mica. *J. Am. Chem. Soc* 120, 8903–8909.
- 96 Hansma, H. G., Golan, R., Hsieh, W., Lollo, C. P., Mullen-Ley, P., Kwoh, D. (1998) DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 26, 2481–2487.
- 97 Lin, Z. Wang, C., Feng, X., Liu, M., Li, J., Bai, C. (1998) The observation of the local ordering characteristics of spermidine-condensed DNA: atomic force microscopy and polarizing microscopy studies. *Nucleic Acids Res* 26, 3228–3234.
- 98 Maurstad, G., Danielsen, S., Stokke, B. T. (2003) Analysis of compacted semiflexible polyanions visualized by atomic force microscopy: influence of chain stiffness on the morphologies of polyelectrolyte complexes. *J. Phys. Chem.* 107, 8172–8180.
- 99 Wolfert, M. A., Seymour, L. W. (1996) Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly-*l*-lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther.* 3, 269–273.
- 100 Marschall, P. Malik, N., Larin, Z. (1999) Transfer of YACs up to 2.3Mb intact into human cells with polyethylenimine. *Gene Ther.* 6, 1634–1637.
- 101 Sitko, J. C., Mateescu, E. M., Hansma, H. G. (2003) Sequence-dependent DNA condensation and the electrostatic zipper. *Biophys. J.* 84, 419–431.
- 102 Han, S. Mahato, R. I., Kim, S. W. (2001) Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjug. Chem* 12, 337–345.
- 103 Lim, Y.-B. Han, S.-O., Kong, H.-U., Lee, Y., Park, J.-S., Jeong, B. K., Sung, W. (2000) Biodegradable polyester, poly[-(4-aminobutyl)- l-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm. Res.* 17, 811–816.
- 104 Isobe, H., Sugiyama, S., Fukui, K., Iwasawa, Y., Nakamura, E. (2001) Atomicforce microscope studies on condensation of plasmid DNA with functionalized fullerenes. *Angew. Chem (Int. Ed.)* 40, 3364–3367.
- 105 Gallyamov, M. O., Pyshkina, O. A., Sergeev, V. G., Yaminsky, I. V. (2000) T4DNA condensation in water-alcohol media. *Poverkhnost* 7, 88–91.
- 106 Dimitriadis, E. K., Pascual, J., Horkay, F. (2004) Morphology of DNA adsorbed from solutions on hydrophobic surfaces. 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA.
- 107 Koltover, I., Wagner K., Safinya, CR. (2001) DNA condensation in two dimensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 14046–14051.
- 108 Allen, M. J., Bradbury, E. M., Balhorn, R. (1997) AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucleic Acids Res* 25, 2221–2226.
- 109 Martin, A. L., Davies, M.C., Rackstraw, B. J., Roberts, C. J., Stolnik, S., Tendler, S. J. B., Williams, P. M. (2000) Observation of DNAPolymer

- condensate formation in real time at a molecular level. *FEBS Lett* 480, 106–112.
- 110 Fang, Y., Yang, J. (1997) Two-dimensional condensation of DNA molecules on cationic lipid membranes. *J. Phys. Chem.* 101, 441–449.
- 111 Fang, Y., Spisz, T. S., Hoh, J. H. (1999) Ethanol-induced structural transitions of DNA on mica. *Nucleic Acid Res.* 27, 1943–1949.
- 112 Sun, X.-G., Cao, E.-H., Zhang, X.-Y., Liu, D., Bai, C., (2002) The divalent cation-induced DNA condensation studied by atomic force microscopy and spectra analysis. *Inorg. Chem. Commun.* 5, 181–186.
- 113 Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., Tinoco, I. Jr. (1999) *Nucleic Acids Structures, Properties, and Functions*. University Science Books, Sausalito, CA.
- 114 Manning, G. S., Ray, J (1998) Counterion condensation revisited. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 461–476.
- 115 Olson, W. K., Manning, G. S. (1976) A configurational interpretation of the axial phosphate spacing in polynucleotide helices and random coils. *Biopolymers* 15, 2391–2405.
- 116 Nguyen, T. T., Shklovskii, B. I. (2002) Model of inversion of DNA charge by a positive polymer: fractionalization of the polymer charge. *Phys. Rev. Lett.* 89, 018101.
- 117 Fenley, M. O., Manning, G. S., Marky, N. L., Olson, W. K. (1998) Excess counterion binding and ionic stability of kinked and branched DNA. *Biophys. Chem.* 74, 135–152.
- 118 Kankia, B. I., Buckin, V., Bloomfield, V. A. (2001) Hexamine cobalt(III)-induced condensation of calf thymus DNA: circular dichroism and hydration measurements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2795–2801.
- 119 Polyanychko, A. M., Andrushchenko, V. V., Chikhirzhina, E. V., Vorob'ev, V. I., Wieser, H. (2004) The effect of manganese (II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Res* 32, 989–996.
- 120 Marx, K. A., Reynolds, T. C. (1983) Ion competition and micrococcal nuclease digestion studies of spermidine-condensed calf thymus DNA. Evidence for torus organization by circumferential DNA wrapping. *Biochim. Biophys. Acta* 741, 279–287.
- 121 Kornyshev, A. A., Leikin, S. (1998) Symmetry laws for interaction between helical macromolecules. *Biophys. J* 75, 2513–2519.
- 122 Hud, N. V., Downing, K. H., Balhorn, R. (1995) A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 92, 3581–3585.
- 123 Pelta, J. Jr., Durand, D., Doucet, J., Livolant, F. (1996) DNA mesophases induced by spermidine: structural properties and biological implications. *Biophys. J.* 71, 48–63.
- 124 Yoshikawa, K., Takahashi, M., Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, A. R. (1996) Large discrete transition in a single DNA molecule appears continuous in the ensemble. *Phys. Rev. Lett* 76, 3029–3031.

- 125 Ubbink, J., Odijk, T. (1995) Polymer- and salt-induced toroids of hexagonal DNA. *Biophys. J.* 68, 54–61.
- 126 Cunha, S., Woldringh, C. L., Odijk T. (2001) Polymer-mediated compaction and internal dynamics of isolated Escherichia coli nucleoids. *J. Struct. Biol.* 136, 53–66.
- 127 de Vries R. (2001) Flexible polymer-induced condensation and bundle formation of DNA and F-actin filaments. *Biophys. J.* 80, 1186–1194.
- 128 Chesnoy, S., Huang, L. (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 27–47.
- 129 Hara, T., Tan, Y., Huang, L. (1997) In vivo gene delivery to the liver using reconstituted chylomicron remnants as a novel nonviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14547–14552.
- 130 Monck, M. A., Mori, A., Lee, D., Tam, P., Wheeler, J. J., Cullis, P. R., Scherrer, P. (2000) Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J. Drug Target.* 7, 439–452.
- 131 Chesnoy, S., Durand, D., Doucet, J., Stolz, D. B., Huang, L. (2001) Improved DNA/emulsion complex stabilized by poly (ethylene glycol) conjugated phospholipid. *Pharm. Res.* 18, 1480–1484.
- 132 Cui, Z., Mumper, R. J. (2002) Plasmid DNA entrapped nanoparticles engineered from microemulsion precursors: in vitro and in vivo evaluation. *Bioconjug. Chem.* 13, 1319–1327.
- 133 Kaushik, A. (2001) Leuvectin Vical Inc. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2, 976–981.
- 134 Hoffman, D. M., Figlin, R. A. (2000) Intratumoral interleukin 2 for renal-cell carcinoma by direct gene transfer of a plasmid DNA/DMRIE/DOPE lipid complex. *World J. Urol.* 18, 152–156.
- 135 Galanis, E., Hersh, E. M., Stopeck, A. T., Gonzalez, R., Burch, P., Spier, C., Akporiaye, E. T., Rinehart, J. J., Edmonson, J., Sobol, R. E., Forscher, C., Sondak, V. K., Lewis, B. D., Unger, E. C., O'Driscoll, M., Selk, L., Rubin, J. (1999) Immunotherapy of advanced malignancy by direct gene transfer of an interleukin-2DNA/DMRIE/DOPE lipid complex: phase I/II experience. *J. Clin. Oncol.* 17, 3313–3323.
- 136 Ramesh, R., Saeki, T., Templeton, N. S., Ji, L., Stephens, L. C., Ito, I., Wilson, D. R., Wu, Z., Branch, C. D., Minna, J. D., Roth, J. A. (2001) Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. *Mol. Ther.* 3, 337–50.
- 137 Densmore, C. L. (2003) Polyethyleneimine-based gene therapy by inhalation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 1083–1092.
- 138 Ferrari, S., Griesenbach, U., Geddes, D. M., Alton, E. (2003) Immunological hurdles to lung gene therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 1–8.
- 139 Fratantoni, J. C., Dzekunov, S., Singh, V., and Liu, L. N. (2003) A non-viral gene delivery system designed for clinical use. *Cytotherapy* 5, 208–210.

- 140 Hosseinkhani, H., Tabata, Y. (2004) PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, Pronectin(R). *J. Control. Release* 97, 157–171.
- 141 Shchukin, D. G., Patel, A. A., Sukhorukov, G. B., Lvov, Y. M. (2004) Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3374–3375.
- 142 Thompson, J. B., Hansma, H. G., Hansma, P. K., Plaxco, K. W. (2002) The backbone conformational entropy of protein folding: experimental measures from atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 322, 645–652.