

Freie Universität Berlin



Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

DISSERTATION

Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf
der Grundlage optimierter kationischer Lipide

Detlef Groth
Neue Scheune 5
14548 Ferch

18. November 2000

Gutachter:

Prof. Dr. Burghardt Wittig
Prof. Dr. Eberhard Riedel

Datum der Disputation: 23.10.2000

Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

Für Julia

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	10
1 Einleitung und Zielstellung	13
1.1 Ziele der Genapplikation	13
1.2 Gentransfermethoden	15
1.2.1 Physikalische und virale Verfahren	15
1.2.2 Synthetische Gentransfersysteme	17
1.3 Zielstellung der Arbeit	31
2 Materialien und Methoden	33
2.1 Materialien	33
2.1.1 Chemikalien	33
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	33
2.1.3 Geräte	36
2.1.4 Biologische Materialien	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Herstellung der DNA	38
2.2.2 Herstellung der Liposomen	42
2.2.3 Herstellung der Lipoplexe	44
2.2.4 Herstellung der Lipopolyplexe	45
2.2.5 Biophysikalische Untersuchungen	45
2.2.6 Elektronenmikroskopie	48
2.2.7 Zellkultur	49
2.2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen	49
2.2.9 Bestimmung von Reportergenaktivität und Zellvitalität	50
2.2.10 Bestimmung der Anzahl der transfizierten Zellen	52
3 Ergebnisse	55
3.1 Biophysik der Gentransfersvesikel	55
3.1.1 Eigenschaften der Liposomen	55
3.1.2 Eigenschaften der Lipoplexe	60
3.2 Transfektionsergebnisse	65
3.2.1 Gentransfereigenschaften verschiedener kationischer Lipide	65
3.2.2 Einfluß des Helferlipides auf die Gentransferrate	69
3.2.3 Steigerung der Genexpression mit Hilfe kationischer Polymere	73
3.2.4 Einfluß der Qualität der Plasmid-DNA	76
3.2.5 Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses	79

3.2.6	Einfluß des Komplexierungsmediums	81
3.2.7	Einfluß der Komplexbildungszeit auf die Stabilität der Vesikel .	83
3.2.8	Einfluß der Serumkonzentration	87
3.2.9	Einfluß von Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentra- tion	90
4	Diskussion	93
4.1	Lipidchemie	94
4.1.1	Kationisches Lipid	94
4.1.2	Helferlipid	97
4.2	Liposomen	98
4.2.1	Bildung und Größe der Liposomen	98
4.2.2	Elektrostatische Eigenschaften	100
4.3	Lipoplexbildung	103
4.4	Genstransfer	107
4.4.1	Struktur des kationischen Lipides und Anteil des Helferlipides .	109
4.4.2	DNA-Qualität	111
4.4.3	DNA-Komplexierung mit Polykationen	111
4.4.4	Einfluß von Medium, Konzentration und Komplexbildungszeit .	114
4.4.5	Serumeinfluß	117
4.4.6	Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentration	119
4.5	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	122

Abkürzungen

AAV	Adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
A-Chol	Alanylcholesterol
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrom</i> erworbenes Immundefizienz Syndrom
Amp	Ampicillin
ampr	Ampicillin-Resistenzgen
Axxxnm	Absorption bei xxx nm
β -gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
Chol	Cholesterol
CPRG	Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid
Da	Dalton
DAC-Chol	3β [N-(N,N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DC	Dünnschichtchromatografie
DC-Chol	3β [N-(N',N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DCQ-Chol	Ethylendiamin-[N-(Carboxycholesteryl) -N',N'-dimethyl-N'-(2-hydroxyethyl)-ammonium]-bromid
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-methylhydroxyethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(N5-carbamoyl-spermine)-propan
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermin
DOPE	1,2-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSGA	N-Amidino- β -alanin-[2-(1,3-dioleoyloxy)propyl]amid-hydrochlorid
DOSPA	2,3-Diolyloxy-N-[2(spermincaboxamido)ethyl] -N,N-dimethyl-1-propanammoniumtrifluoroacetat
DOSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propan
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>good manufacturing practice</i> , gute Herstellungspraxis

HBSS	Hanks' balancierte Salzlösung
HC	4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	β -Lactamase-Gen für das Enzym β -Galaktosidase
L/D	Lipid zu DNA (Verhältnis)
LPD	Lipid-Protamin-DNA(-Komplex)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
luc	Luziferase-Gen
LUV	große unilamellare Vesikel
M	Mol
MCS	<i>multi cloning site</i> , multipler Klonierungsort
MEM	modifiziertes Eagle's Medium
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MHC	Membranhistokompatibilitätskomplex
MLV	multilamellare Vesikel
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MTP	96-Well-Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
O-Chol	L-Ornithylcholesterol
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
P-Chol	Cholesterylputrescin
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDMAEMA	Polydimethylaminoethylmethacrylat
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PS	Protaminsulfat
PTH	Parathormon
RES	Retikuloendotheliales System
REV	<i>reverse phase evaporation vesicle</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut(-Medium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp-Chol	Dicarbobenzoxyspermin-Carbamoyl-Cholesterol bzw. Lipid #67
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i> , kleine unilamellare Vesikel
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit
ÜNK	Übernachtskultur
v/v	Volumen/Volumen = Volumenverhältnis
w/w	<i>weight/weight</i> = Gewichtsverhältnis
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel der Herstellung stabiler liposomaler Gentransfervesikel für den *in vitro* und *in vivo* Gentransfer angefertigt. Diese Vesikel sollen auch für eine klinische Anwendung am Menschen geeignet sein. Anforderungen an solche Vesikel sind: hohe Transfereffizienz, Stabilität und Sicherheit für Patient und Anwender.

Die Arbeit beinhaltete Untersuchungen zu der Herstellung, den biophysikalischen Eigenschaften, der *in vitro* Gentransfereffizienz sowie zur Stabilität und Lagerfähigkeit der Gentransfervesikel.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Gentransfereffizienz von folgenden Faktoren beeinflußt wird: den Bestandteilen der Gentransfervesikel, der Herstellung der Vesikel, dem Ablauf der Transfektion, der Zellart und deren Kulturbedingungen.

Bezüglich der Vesikelbestandteile wurde festgestellt, daß sich für hohe *in vitro* Transfektionsraten Lipide mit einer Sperminkopfgruppe besonders eignen. Die aus solchen Lipiden hergestellten liposomalen Gentransfervesikel sind jedoch nur kurzzeitig aktiv und für eine längere Lagerung nicht geeignet.

Dagegen waren aus monokationischen Lipiden (DAC-Chol) hergestellte Liposomen für eine Formulierung von längerfristig stabilen Gentransferkomplexen geeignet. Die Effizienz und Lagerfähigkeit dieser Vesikel konnte durch den Zusatz von Protaminsulfat noch gesteigert werden. Eine weiter erhöhte Stabilität und die Möglichkeit eines Einfrierens der vorformulierten Gentransferkomplexe wurde durch den Zusatz von Saccharose ermöglicht. Saccharose senkte jedoch die Kurzzeitaktivität der Gentransfervesikel auf etwa ein Drittel der Aktivität von Gentransfervesikeln, welche ohne Zuckerzusatz hergestellt worden waren. Die verringerte Kurzzeitaktivität konnte durch eine erhöhte Dosierung der Gentransferkomplexe ausgeglichen werden.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Verwendung von Lipid/Protaminsulfat/DNA-Komplexen, welche in saccharosehaltiger Lösung hergestellt wurden, einen effektiven Gentransfer *in vitro* gewährleistet und ein vielversprechender Ansatz für *in vivo* Untersuchungen sowie mögliche klinische Anwendungen ist.

Abstract

The aim of this work was the preparation of stable liposomal gene transfer vesicles for the *in vitro* and *in vivo* gene transfer. It should be possible to use these vesicles for clinical issues on humans. The requirements for such vesicles are: high efficiency, stability and security for the user and the patient.

The work contained investigations to the production, the biophysical characteristics, that *in vitro* gene transfer efficiency as well as for stability and shelf-life of the gene transfer vesicles.

Our results show that the gene transfer efficiency is influenced by the following factors: the constituents of the gene transfer vesicles, the production of the vesicles, the flow of the transfection, the cell type and their culture conditions.

Concerning the vesicle constituents it was stated that for high *in vitro* transfection rates lipids with a spermin headgroup are particularly suitable. Out such lipids manufactured liposomal gene transfer vesicles are however only briefly active and for a longer storage not suitably.

On the other hand from monocationic lipids (DAC-Chol) manufactured liposomes were suitable for the preparation of long term stable gene transfer complexes. The efficiency and shelf-life of these vesicles could be still increased by the addition of protaminsulfate. An even more increased stability and the possibility of freezing the preformulated gene transfer complexes was enabled by the addition of saccharose. Saccharose lowered however the short time activity of the gene transfer vesicles to a third of the activity of gene transfer vesicles, which had been manufactured without sugar addition. However the reduced short time activity could become balanced by an increased dosage of the gene transfer complexes.

The investigations show that the use of lipid/protaminsulfate/DNA complexes, which were manufactured in a saccharose containing solution ensures an effective gene transfer *in vitro* and a promising beginning for *in vivo* investigations as well as possible clinical applications is.

Kapitel 1

Einleitung und Zielstellung

Am Ende dieses Jahrhunderts ergeben sich mit der Möglichkeit Organismen durch die Applikation von DNA genetisch zu verändern für die Wissenschaft und die Medizin völlig neue Perspektiven. Die Erforschung der Gen-Funktionen und die Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen rückt damit in den Mittelpunkt biomedizinischer Forschung und Entwicklung. Für eine erfolgreiche Behandlung von Patienten müssen jedoch folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- die Wahl eines geeigneten Gens für die Therapie der Erkrankung
- ein präklinischer Wirksamkeitsnachweis
- die GMP-gerechte Herstellung der Komponenten, die für die Genapplikation notwendig sind
- die sichere und effiziente Applikation des verwendeten Gens
- die targetspezifische Aktivität bei systemischer Applikation um Nebenwirkungen zu minimieren

Für den Gentransfer wurden bislang eine Reihe verschiedener Methoden und Verfahren auf biologischer, physikalischer oder synthetischer Grundlage entwickelt. Sie alle besitzen verschiedene Vor- und Nachteile. Da sicherlich kein einzelnes dieser Gentransfersysteme für alle Anwendungen geeignet sein wird, ist die Weiterentwicklung jedes einzelnen Verfahrens für die Erweiterung der Therapiemöglichkeiten beim Patienten wichtig. Dabei sind die synthetischen Gentransfersysteme aufgrund der Möglichkeit Gentransfersvesikel unter definierten Bedingungen herzustellen und anzuwenden von besonderer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis und zur Entwicklung der Systeme auf synthetischer Grundlage leisten.

1.1 Ziele der Genapplikation

Das Einbringen genetischen Materials in eukaryontische Zellen ist ein Verfahren zur Untersuchung von Genfunktionen und zur Therapie von Erkrankungen, die durch Gendefekte ausgelöst werden. Nach der Sequenzanalyse des Genoms ermöglicht die selektive Expression der Gene in der Zellkultur oder durch Versuchstiere die Identifizierung ihrer Funktion und trägt zum Verständnis molekularbiologischer Zusammenhänge bei.

Krankheit	Therapiestrategie	Beispielgene
Tumor	Suizidgenapplikation	Thymidinkinase, Cytosindesaminase
	Substitution ausgefallener Gene	p53, p16
	Expression von Tumor-suppressoren	p21
	Stimulierung des Immun-systems	IL-2, IL-4, TNF- α
monogenetischer Gendefekt	Substitution nicht funktionstüchtiger Gene	Adenosindesaminase, CF-tcr (Cystische Fibrose), LDL-Rezeptor
HIV/AIDS	Vakzinierung	HIV-env, rev

Tabelle 1.1: **Beispiele für Krankheiten und gentherapeutische Ansätze zu ihrer Behandlung**

Wesentliche Aspekte für die Applikation der DNA sind das Erreichen einer hohen Transfereffizienz bei gleichzeitig niedriger Zelltoxizität.

Die Applikation von DNA in Zellen des menschlichen Organismus zur Therapie von Erkrankungen wird als Gentherapie bezeichnet. Die somatische Gentherapie wird als „die Applikation eines therapeutischen Gens in somatisches Gewebe mit dem Ziel einer selektiven Korrektur bzw. Modulation von Erkrankungen“ definiert [102]. Ziel ist dabei zum einen der Ersatz ausgefallener oder pathologisch veränderter Genfunktionen und zum anderen eine Expression von zusätzlichen Genen zu Therapie-zwecken. Die Genexpression wird dabei durch eine Verabreichung expressionsfähiger DNA-Moleküle, zumeist von Plasmid-DNA, erreicht. Zu einer Unterdrückung der unerwünschten Expression von Genen, wie z.B. von aktivierten Onkogenen, werden dagegen Antisense-Oligonukleotide, Antisense-Plasmide oder Ribozyme - RNA schneidende RNA-Moleküle - eingesetzt. Im Gegensatz zur Gentherapie von nichtreproduktiven Körperzellen ist die sogenannte Keimbahn-Gentherapie aus ethischen Gesichtspunkten umstritten und in Deutschland bisher nicht erlaubt. Einen Überblick über verschiedene gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen gibt Tabelle 1.1.

Die Anzahl der weltweit durchgeführten gentherapeutischen, klinischen Studien stieg von weniger als 400 im Jahre 1994 auf über 3000 im Jahre 1997 [3]. Zu den ersten Erkrankungen die gentherapeutisch behandelt wurden, gehörten monogenetische Erkrankungen wie die Adenosin-Desaminase Defizienz [160] und die Zystische Fibrose (CF; auch Mukoviszidose) [22]. Die Stoffwechselerkrankung Zystische Fibrose, eine häufig auftretende, autosomal rezessive Erkrankung in der weißen Bevölkerung Nordeuropas und Nordamerikas (1 Fall auf 2500 Lebendgeburten), ist auf die fehlende Expression des CF-Transmembranregulator-Proteins zurückzuführen. Dies führt zu oftmals tödlich verlaufenden Infektionen der Lunge. Nur 9 % der Patienten werden der-

zeit älter als 30 Jahre. Ziel der gentherapeutischen Behandlungsversuche war es, durch die exogene Gabe expressionsfähiger Plasmid-DNA eine Erhöhung des Gehaltes an CF-Transmembranregulator-Protein und dadurch eine Besserung des Allgemeinzustandes der Patienten zu erreichen. In den Studien kam es nach der Applikation der DNA zu einer kurzzeitigen Abschwächung der Krankheitssymptome, wobei allerdings die normale medikamentöse Behandlung der Erkrankung fortgesetzt wurde. Aus diesem Grunde ist ein positiver Effekt der Gentherapie bei diesen Untersuchungen nicht zweifelsfrei nachzuweisen. Wegen der zeitlich begrenzten Expression der DNA ist eine wiederholte, unter Umständen lebenslange, Applikation der therapeutischen Nukleinsäure notwendig [16].

Neben der Therapie von monogenetischen Defekten ist in zunehmendem Maße die Behandlung von Tumoren Schwerpunkt der Forschung. Derzeit haben etwa zwei Drittel aller gentherapeutischen Studien die Behandlung von Tumoren zum Inhalt, etwa 20 % haben die Therapie von AIDS zum Ziel und 8 % der Studien zielen auf die Behandlung der zystischen Fibrose [17]. Bei der Gentherapie von Tumoren stehen dabei die sogenannte korrektive Therapie, die Immuntherapie und die zytotoxische Therapie im Mittelpunkt [151]. Bei der korrektiven Gentherapie wird versucht, die im Laufe der Tumorprogression sich häufenden Gendefekte - insbesondere bei Genen welche für zellzyklusregulierende Proteine kodieren - durch eine gezielte Applikation von funktionsfähigen Genen, die diesen Zyklus regulieren wie z.B. p53 oder p16, zu behandeln. Dies soll zu einem Wachstumsstop des Tumors und zur Apoptose der Tumorzellen führen. Dagegen ist die Immuntherapie auf eine Wiederherstellung der Immunreaktivität des Tumors - z.B. durch eine verstärkte Expression von MHC-Proteinen - und auf die Stärkung der Immunantwort des Patienten gerichtet.

Ein weiteres Beispiel für bei der Tumorbehandlung eingesetzte Therapiene, sind die sogenannten Suizid- oder Selbstmordgene. Diese werden mit dem Ziel verabreicht, transfizierte Zellen abzutöten. Dabei erfolgt eine Applikation von Genen deren Expressionsprodukte im Tumor untoxische Prodrug (engl. *prodrug*) in toxische Pharmaka umwandeln. Ein Beispielgen für diese Therapiestrategie ist das Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase-Gen (HSVtk). Transfizierte Tumorzellen, welche das virale Thymidin-Kinase-Gen exprimieren, produzieren nach Gabe des Virustatikums Ganciclovir (GCV) - des Prodrug - den zytotoxischen Metaboliten GCV-Triphosphat und sterben ab. Die nicht transfizierten Körperzellen werden dagegen durch das Prodrug nicht beeinträchtigt. Dies führt zu einer verminderten systemischen Toxizität der Behandlung. Ein besonderer Vorteil bei diesem Therapieansatz ist, daß auch Tumorzellen, die das HSVtk-Gen nicht exprimieren durch den sogenannten *bystander effect* absterben. Dabei werden die toxischen Metaboliten der transfizierten Zellen über die *gap-junctions*, interzelluläre Verbindungen, auf benachbarte Tumorzellen übertragen, welche danach ebenfalls abgetötet werden [106].

1.2 Gentransfermethoden

1.2.1 Physikalische und virale Verfahren

Neben der Wahl des therapeutischen Genes sowie der für seine Regulation erforderlichen Elemente wie Promotoren, Enhancer und Polyadenylierungssignale, ist die Entwicklung einer geeigneten Methode zum Einbringen der DNA in die Zielzelle, der Trans-

	Vorteile	Nachteile
Adenoviren	infizieren auch sich nicht teilende Zellen; hohe Virustiter und hohe Transfereffizienzen erreichbar	immunogen, nur cDNA bis zu 7.5 kb applizierbar, nur kurzzeitige Genexpression
AAV	induzieren keine Immunreaktionen, nicht-humanpathogener Virus; Transfektion auch sich nicht teilender Zellen	niedrige Gentransfereffizienz, nur cDNA bis 4.9 kb applizierbar; rekombinante AAVs integrieren unspezifisch
Retroviren	infizieren nur sich teilende Zellen (selektiv); Integration in die Wirts-DNA, dadurch langanhaltende Genexpression	infizieren nur sich teilende Zellen; immunogen; nur niedrige Virustiter erreichbar, cDNA nur bis 8kb;
Herpesviren	cDNA bis zu 30kb integrierbar; sehr hohe Virustiter möglich; Infektion auch sich nicht teilender Zellen	immunogen; sehr zytotoxische Infektion
Lentiviren	infizieren auch sich nicht teilende Zellen; langandauernde Genexpression in einer Vielzahl von Geweben und Zellen	Keine umfangreichen Erfahrungen bisher, teils humanpathogen (HIV)
Liposomen	kaum immunogen; leicht modifizierbar; einfach herzustellen; wiederholt anwendbar	nur kurzzeitige und relativ niedrige Genexpression, Interaktion mit Serumproteinen
nackte DNA	leicht herstellbar; einfache Anwendung; nicht immunogen,	niedrige Transfektionseffizienz, nur im Muskel wirksam; schnelle Entfernung aus dem Blut

Tabelle 1.2: **Vor- und Nachteile verschiedener in der Klinik erprobter Gentransfervesikel** (modifiziert nach Boulikas [17])

fektion [127], ein entscheidender Schritt. Generell unterscheidet man biologische - zu meist virale -, physikalische und physikochemische Transfermethoden [127, 150, 154]. Dabei sind die physikalischen Methoden wie die Elektroporation [118] und die Mikroinjektion [21] nur für den *ex vivo* und den *in vitro* Gentransfer geeignet. Die intramuskuläre Injektion [6, 161] und die sogenannte *Jet*-Injektions-Methode [165] lassen sich auch für den *in vivo* Gentransfer in Muskelgewebe, die Leber und die Haut anwenden. Bei der Anwendung in anderen Organen sind diese Methoden nicht effizient genug oder wegen der verwendeten Wolframpartikel (*Jet*-Injektion) für die Anwendung beim Menschen nicht geeignet.

Derzeit von besonderer Bedeutung für die klinische Anwendung ist die Applikation von Genen mit Hilfe rekombinanter Viruspartikel, welche aus viralen Proteinen und veränderter genetischer Information bestehen. In das virale Genom werden fremde Gensequenzen eingebracht, die später in der Zielzelle exprimiert werden sollen.

Klinisch wird dabei in etwa 50 % der Studien der retrovirale, in etwa 20 % der adenovirale und in etwa 15 % der liposomale Gentransfer angewandt [17]. Mit Hilfe des retroviralen Gentransfers gelingt es, das genetische Material stabil in das Wirtsgenom sich teilender Zellen zu integrieren. Die resultierende Genexpression ist zwar von längerer Dauer aber im Vergleich zu der mit Adenoviren erreichbaren relativ niedrig. Problematisch bei dieser Applikationsmethode ist vor allem die Entwicklung einer

spezifischen Immunantwort gegen die implantierten viruspartikelproduzierenden Helferzellen sowie gegen die Hüllproteine des Virus. Außerdem besteht die Möglichkeit der Generierung von replikationskompetenten Viren als Folge von Rekombinationsereignissen. Um dieses Risiko zu minimieren wurden eine Reihe von Sicherheitsmutationen in die viralen Expressionvektoren eingefügt. Aber auch bei diesen veränderten rekombinanten Viruspartikeln kann die zufällige Geninsertion durch die virale Integrase zu einer Aktivierung von zellulären Onkogenen bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren führen - ein Grund weshalb diese Verfahren nicht unbedenklich sind.

Auch Vektoren auf der Basis von Adenoviren sind aussichtsreiche Gentransfervektoren. Diese erreichen hohe Transfektionsraten sowohl in sich nicht als auch in sich teilendem Gewebe. Der adenovirale Gentransfer führt, da die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert wird, zu einer hohen aber nur relativ kurzzeitigen Expression des rekombinanten Gens. Einer wiederholten Applikation steht zumeist die heftige Immunantwort des Recipienten entgegen.

Neben Retro- und Adenoviren sind weitere rekombinante Viruspartikel auf der Basis von Adenoassoziierten-Viren (AAV), Herpes-Simplex-Viren (HSV) und Humanen Immundefizienzviren (HIV) in der Entwicklung.

Insgesamt lassen die notwendigen umfangreichen zellbiologischen und medizinischen Vorarbeiten und die aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen hohe Kosten bei der klinischen Anwendung der viralen Gentransferverfahren erwarten.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, daß in letzter Zeit synthetische kationische Lipide [4, 27, 119, 143] oder Polymere [5, 7, 107, 126] dazu verwendet werden eine wichtige Barriere des Gentransfers mit Viren, die negativ geladene Virushülle, zu maskieren. Bei Verwendung dieser synthetisch/viralen Gentransfervehikel kann die Effizienz der Viren nochmals um ein bis zwei Größenordnungen gesteigert werden.

1.2.2 Synthetische Gentransfersysteme

1.2.2.1 Polymerverbindungen

Im Gegensatz zu den biologischen und physikalischen Methoden der Genapplikation basieren die synthetischen Verfahren zumeist auf chemisch oder enzymatisch hergestellten Komponenten. Es handelt sich dabei entweder um polykationische Peptide bzw. Polymere oder um Lipide. 1965 fanden Vaheri [115] und Mitarbeiter, daß sich mit Hilfe des Polykations Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) die Infektivität von Polio-Virus-RNA erheblich steigern lässt [115]. Trotz der relativ niedrigen Gentransfereffizienz und einer hohen Toxizität wird dieses Polymer auch heute noch für den *in vitro* Gentransfer von DNA verwandt [85]. Auch die Kalziumphosphatpräzipitationstechnik [57], die auf der Komplexbildung von DNA mit Ca^{2+} Ionen in Phosphatpuffer beruht, wird derzeit noch angewandt. Kritisch ist hierbei die Präzipitatbildung, die nur innerhalb eines engen pH-Bereiches abläuft und methodisch schwer zu standardisieren ist. Sowohl diese Methode als auch die DEAE-Dextran-Transfektion sind auf *in vitro* und *ex vivo* Anwendungen begrenzt. Für eine klinische Anwendung kommen beide Methoden nicht in Frage.

Von wachsender Bedeutung sind dagegen synthetische Vektoren auf der Basis von Polymeren wie Polyethylenimin (PEI [18]), Polydimethylaminoethylmethacrylat (PDMAEMA [25, 24]) oder die sogenannten *starburst*-Polyamidoamin (PAMAM)-Den-

	Polymerverbindungen	kationische Liposomen
Beispiele	DEAE-Dextran	Lipopolyamine
	poly-L-Lysin	Cholesterolderivate
	Polyethylenimin	doppelkettige Lipide
	PAMAM-Dendrimere	Lipopoly-L-Lysine
	PDMAEMA	Detergenzien
Komplex	Polyplex	Lipoplex
Transfektion	Polyfektion	Lipofektion

Tabelle 1.3: **Beispiele synthetischer Gentransfersysteme und Nomenklatur der Komplexe bzw. der Transfektionsverfahren** (nach Felgner u.a. [45])

drimere [83, 145]. Bei einigen dieser Vektoren müssen allerdings zusätzlich lysomotrophe Agentien wie Chloroquin zugesetzt werden, um den Durchgang der DNA durch das Lysosom zu ermöglichen [25, 24]. Der ohne Chloroquin schlechte Durchgang der Komplexe durch das Lysosom limitiert die *in vivo* Anwendbarkeit dieser Vektorsysteme. Auch das organische Polymer PEI ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_n-\text{H}$) mit der höchsten denkbaren Kapazität an positiver Ladung, jedes dritte Atom ist ein protonisierbarer Amino-Stickstoff, kann für den *in vitro* und *in vivo* Gentransfer verwandt werden [1, 18]. Wie eigene Untersuchungen zeigen, ist die Effizienz dabei allerdings nicht sehr hoch.

Bei den sogenannten PAMAM-Dendrimern handelt es sich um dreidimensionale, oligo- bzw. polymere Moleküle, die von einem Ammoniakern ausgehend synthetisiert werden. Für eine effektive Transfektion müssen diese kugelförmigen Moleküle jedoch wieder teilweise degradiert werden [145]. Dieser Degradationsschritt beeinträchtigt die *in vivo* Anwendbarkeit des Vektorsystems, da die bei der Degradation entstehenden nicht näher definierbaren Mischprodukte einer klinischen Anwendung entgegen stehen.

Um eine effektivere Aufnahme der DNA in die Zielzelle und in deren Zellkern zu ermöglichen wurden außerdem Polymere wie poly-L-Lysin (PLL) und PEI z.B. mit Hilfe von Transferrin [32, 79] oder mit fusogenen Influenzapeptiden [153] chemisch modifiziert. Problematisch hierbei ist jedoch die komplizierte Synthese der modifizierten Polymere. Eine Übersicht über die verschiedenen Gentransfersysteme und die Nomenklatur der Komplexe bzw. der Transfektionsverfahren gibt Tabelle 1.3.

1.2.2.2 Klassische liposomale Gentransfermethoden

Liposomen, künstliche Membranvesikel die sich spontan in wässriger Lösung aus Phospholipidmolekülen bilden können [9, 10], werden seit mehr als 20 Jahren u.a. zur Applikation therapeutischer Substanzen wie Zytostatika [148], in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie, als Immunadjuvantien und in den letzten Jahren auch zur Applikation von Nukleinsäuren [101] verwandt (zu den verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten von Liposomen vgl. [87]).

Für eine Applikation verkapselter DNA wurden zu Beginn vor allem Immunliposomen [68], Transferrin-Liposomen [23, 140] und fusogene Liposomen entwickelt. Letztere tragen in ihrem Inneren einen Komplex aus DNA und Kernprotein bzw. basischen Peptiden und auf der Oberfläche fusogene Virusproteine [75, 76, 149]. Derartige liposomale Formulierungen sind jedoch wegen der aufwendigen Herstellung und der Immunreaktivität gegen die gekoppelten Oberflächenproteine in ihrer Anwendbarkeit limitiert.

Ein weiterer schwerwiegender Nachteil herkömmlicher Liposomen ist der relativ ineffiziente Einschluß der DNA und die Schädigung der DNA in Folge des starken mechanischen Stresses bzw. anderer Belastungen bei der Herstellung bzw. der Verkapselung des genetischen Materials in den Liposomen.

1.2.2.3 Kationische Liposomen

Das synthetisch hergestellte kationische Lipide und aus ihnen präparierte Liposomen sich zur Applikation rekombinanter DNA [46], mRNA [100], Antisense-Oligomeren [26], Proteinen [34] und Ribozymen [134, 146] eignen, ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Bei der Lipofektion, der Applikation von Nukleinsäuren mit Hilfe kationischer Lipide [45], wird die DNA über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen assoziiert und über einen bisher noch unvollständig verstandenen Mechanismus in die Zielzelle transferiert. Die Transferrate bei *in vitro* Experimenten ist dabei - in Abhängigkeit von der Zelllinie - mit der Effizienz des retroviralen Gentransfers vergleichbar. Die Lipofektion hat in den letzten Jahren auch für *in vivo* Anwendungen an Bedeutung gewonnen. Zur Zeit befinden sich die ersten kationischen Liposomen in einer klinischen Phase I/II Prüfung [103].

In der Praxis zeichnen sich kationische Liposomen durch eine einfache Handhabung, geringe Immunreaktivität und damit wiederholbare Anwendbarkeit bei niedrigem Sicherheitsrisiko für Anwender und Empfänger aus (vgl. Tab. 1.2).

Chemische Struktur der Lipide: Die kationischen Liposomen bestehen aus einer in Wasser suspendierten Dispersion eines kationischen Lipides oder eines Gemisches aus kationischem Lipid und neutralen Helferlipid. Eine Eignung dieser Vesikel für den Gentransfer in eukaryontische Zellen wurde erstmalig von Felgner und Mitarbeitern im Jahre 1987 [46] gezeigt. Das Lipid N-[1-2,3-Dioleoxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA #4, Abb. 1.1, S. 20) bildet sowohl mit als auch ohne den Zusatz eines neutralen Helferlipides wie Phosphatidylethanolamin (PE) Doppelschichtstrukturen. Die quarternäre Trimethylammoniumgruppe verursacht in wässrigen Lösungen eine positive Ladungsoberfläche der sich spontan bildenden multilamellaren Vesikel. Diese positiv geladenen Liposomen sind in der Lage, die in Folge der Phosphodiesterbindungen negativ geladene DNA zu komplexieren und eukaryontische Zellen 5-100fach effizienter zu transfizieren, als es mit Hilfe der Kalziumphosphat- bzw. der DEAE-Dextran-Transfektion möglich ist. Neben dem von Felgner und Mitarbeitern synthetisierten kationischen Lipid DOTMA [46], wurden für den Gentransfer nachfolgend weitere, strukturell recht unterschiedliche kationische Lipide synthetisiert (siehe Tabelle 1.4).

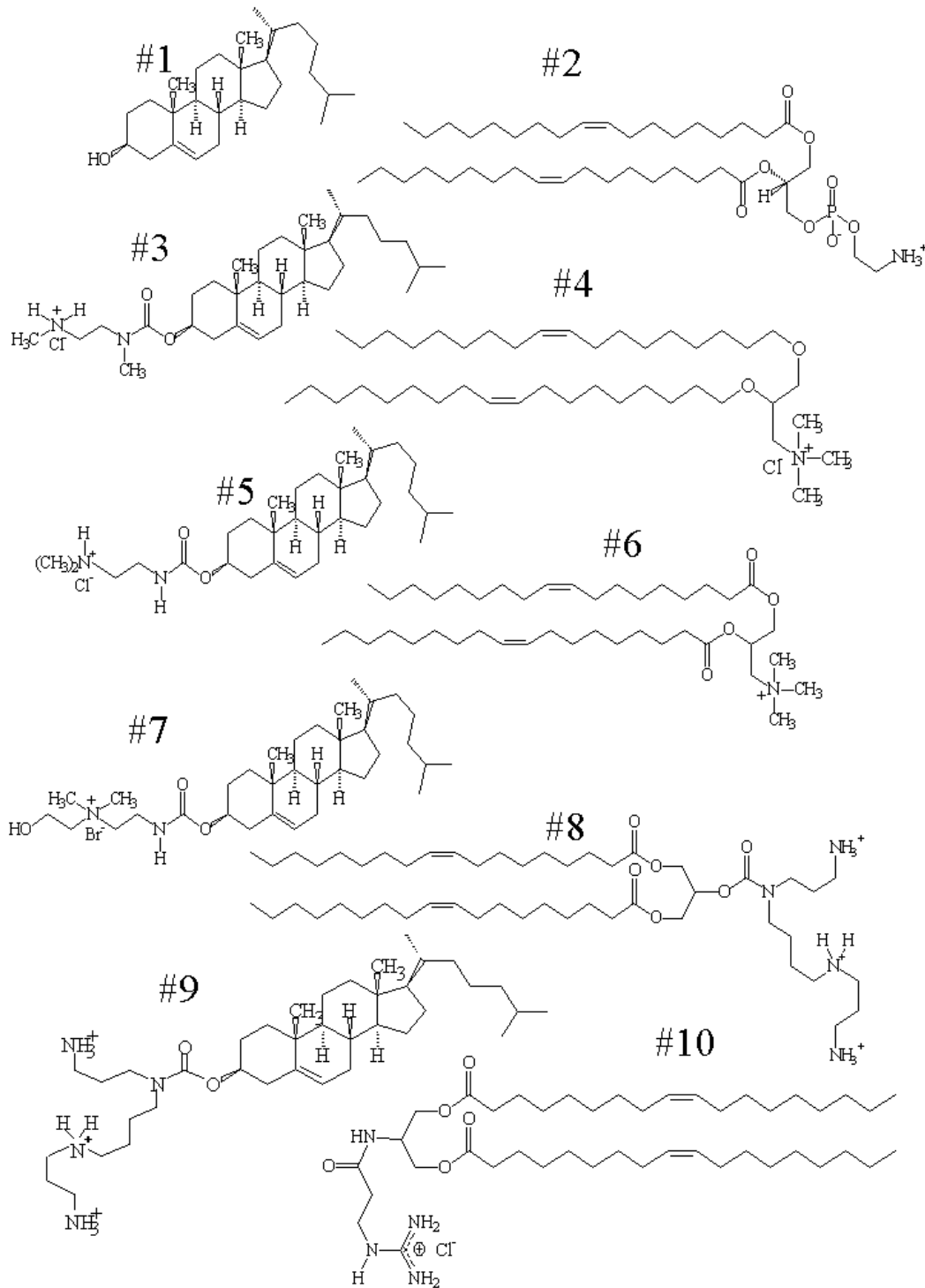


Abbildung 1.1: **Struktur verschiedener kationischer und neutraler Lipide**

#1 Cholesterol; #2 DOPE; #3 DAC-Chol; #4 DOTMA; #5 DC-Chol; #6 DOTAP;
#7 DCQ-Chol; #8 DOCSPER; #9 Sp-Chol; #10 DOSGA

Nach der Definition von Gao und Huang [53] müssen diese Lipide im wesentlichen folgende chemische Komponenten enthalten:

- eine positiv geladene Kopfgruppe
- eine Verbindungsbrücke (*Spacer*)
- eine hydrophobe/lipophile Ankergruppe

Der lipophile Teil der kationischen Lipide basiert dabei häufig auf Ether-Lipiden (DOTMA #4, DMRIE, β -AE-DMRIE, DOSPA). Aber auch Cholesterol-Derivate (DAC-Chol #3, DC-Chol #5, DCQ-Chol #7, Sp-Chol #9) und Lipide mit Aminopropan- (DOSPER) bzw. Glycerinanker (DOTAP #6, DOCSPER #8) wurden beschrieben. Die hydrophilen, kationischen Kopfgruppen der Lipide unterscheiden sich nach ihrer Struktur und Ladung. Synthetisiert wurden monokationische (DOTMA, DMRIE, DDAB, DOTAP, DC-Chol, DAC-Chol) und polykationische (β -AE-DMRIE, DOGS, DOSPER, DOCSPER, Sp-Chol) Lipide. Insbesondere das natürlich vorkommende Polykation Spermin wurde häufig als Baustein der kationischen Kopfgruppe verwendet. Dieses biogene Polyamin Spermin und auch Spermidin zeichnen sich durch eine hohe Affinität gegenüber Polynukleotiden aus und bilden sehr stabile, kompakte Komplexe mit der DNA. Spermin selbst dient der Komplexierung der DNA im Kopf der Spermien und wird für wissenschaftliche Zwecke zumeist aus Heringssperma gewonnen. Durch die Modifikation eines Sperminmoleküls mit einem lipophilen 1,3-Diglycerid-Gerüst konnten wir ein neuartiges Lipopolyamin (DOCSPER #8, s. Abb. 1.1) entwickeln, welches eine sehr hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig geringer Zelltoxizität aufweist [58, 131].

In unserer Arbeitsgruppe wurde außerdem ein kationisches Lipid mit einem Cholesterolgrundgerüst und einer monokationischen Kopfgruppe synthetisiert (DAC-Chol #3 [123]). Es handelt sich dabei um ein Struktur analogon zu der von Gao und Huang [51] synthetisierten Verbindung DC-Chol. DAC-Chol zeichnet sich gegenüber DC-Chol vor allem durch seine verbesserte Liposomenbildungsfähigkeit aus. Es ist wegen seiner geringen Toxizität insbesondere für den Gentransfer in humane Zellen geeignet. Eine Formulierung dieses Lipides mit dem Helferlipid DOPE ist kommerziell für *in vitro*-Transfektionen erhältlich (DAC-30TM; Eurogentec, Belgien).

Ein Nachteil einer großen Anzahl kationischer Lipide ist die vielfach beobachtete Zelltoxizität, welche u.a. auf eine geringe biologische Abbaubarkeit (nicht hydrolysierbare Etherbindung im Falle des DOTMA) bzw. auf Protein-Kinase-C-inhibitorische Effekte der Lipide mit ihren unnatürlichen, quarternären Ammoniumgruppen zurückzuführen ist [40]. Aus diesem Grund zielten unsere eigenen Arbeiten auf die Herstellung bioabbaubarer kationischer Lipide ab. Mit diesen sind hohe Gentransferraten bei gleichzeitig niedriger Zelltoxizität zu erreichen.

Helferlipide: Die Effizienz des Gentransfers mit kationischen Amphiphilen kann zumeist durch den Zusatz eines neutralen Helferlipids wie DOPE, Phosphatidylcholin (PC) oder Cholesterol (Chol) gesteigert werden. Nachteilig bei der Verwendung eines Helferlipids ist zum einen die aufwendige Formulierung der Liposomen und zum anderen wie im Falle der Verwendung von DOPE die möglichen Abbaureaktionen, z.B. die Hydrolyse der Esterbindungen und die Oxidation der ungesättigten Doppelbindungen

Lipid	kationische Kopfgruppe/ lipophiler Anker	Referenz
<i>Doppelkettige Amphiphile</i>		
DOTMA	Trimethylamin*/ Etherlipid	[46]
DMRIE	Hydroxyethyl dimethylamin/ Etherlipid	[44]
β -AE-DMRIE	Aminoethyl dimethylamin/ Etherlipid	[157]
DOSPA	Spermin/ Etherlipid	[67]
DDAB	Quarternäres Amin/ aliphatische Kohlenwasserstoffketten	[125]
DOTAP	Trimethylamin/ Glycerollipid	[93]
DOGS	Spermin/ aliphatische Kohlenwasserstoffketten	[97]
DOSPER	Spermin/ Propylamin mit 2 veresterten Ölsäureketten	[19]
DOCSPER	Spermin/ Glycerollipid mit 2 Ölsäureketten	[58]
<i>Cholesterolderivate</i>		
DC-Chol	Dimethylamin/ Cholesterol	[51]
DAC-Chol	Methylamin/ Cholesterol	[123]
DCQ-Chol	Hydroxyethyl dimethylamin/ Cholesterol	[131]
Sp-Chol (bzw. Lipid #67)	Spermin/ Cholesterol	[89, 131]

Tabelle 1.4: **Kationische Lipide für den Gentransfer**

* Trimethylamin bedeutet drei Methylgruppen am protonisierten Stickstoff, ein vierter Kohlenstoff bildet die Brücke zum lipophilen Anker, d.h. es handelt sich um ein quarternäres Stickstoffatom. Die exakten chemischen Namen sind im Abkürzungsverzeichnis enthalten.

in den Fettsäureseitenketten [88]. Aus diesem Grunde wurden auch Phosphatidylethanolamine mit vollständig gesättigten Fettsäuren [44, 170] sowie Cholesterol [71, 130] für die Formulierung von kationischen Liposomen eingesetzt. Während dabei die gesättigten Phosphatidylethanolaminderivate wenig effektiv waren, scheint der natürliche und daher weniger zelltoxische Membranbestandteil Cholesterol insbesondere für den *in vivo* Gentransfer [71] bzw. für die Transfektion von Suspensionzellen geeignet zu sein [130].

Einige doppelkettige Amphiphile sind allerdings auch ohne Zusatz von Helferlipiden in der Lage DNA in Zellen zu transferieren [19, 58, 97, 157]. Es wurde jedoch von verschiedenen Autoren gezeigt, daß sich auch bei diesen Lipiden bestimmte Gentransfer-eigenschaften - so z.B. die relativ geringe Varianz wirksamer Lipid/DNA Verhältnisse - durch den Zusatz von Helferlipiden verbessern lassen [58, 133].

Vorkomplexierung der DNA: Ein weiteres Problem beim Gentransfer mit kationischen Lipiden ist die relativ große und sehr breit gestreute Vesikelgröße welche durch die relativ schwache Komplexierung der DNA bedingt ist. Infolge einer nach der DNA-Zugabe verringerten Oberflächenladung der Lipoplexe nimmt die Abstoßung zwischen den einzelnen Vesikeln ab und durch Fusionsereignisse kommt es zur Bildung von teilweise über 1 μm großen Partikeln. Diese großen Lipoplexe sind für eine *in vivo* Anwendung ungeeignet. Die Komplexierung durch die Liposomen ist offenbar nicht ausreichend für eine länger anhaltende Stabilisierung der Vesikel. Um kleinere, stabilere und serumresistente Gentransfervesikel zu erhalten ging man in den letzten Jahren dazu über, die DNA vor der Zugabe der Liposomen mit einem kationischen Protein oder Polymer wie PLL oder Protaminsulfat (PS) zu komplexieren [53, 95]. Diese, als Lipopolyplexe oder Lipid-Polykation-DNA-(LPD)-Komplexe [95] bezeichneten Vesikel, zeigen im Vergleich zu Lipoplexen, welche nur aus DNA und kationischen Liposomen bestehen, *in vitro* und *in vivo* vielfach höhere Transfektionsergebnisse. Einen Überblick über Herstellung und Bezeichnung der in dieser Arbeit eingesetzten Gentransfervesikel gibt die Abbildung 1.2.

Biophysikalische Charakterisierung: Trotz des großen Interesses und der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ist die Natur der kationischen Liposomen und der Lipoplexe bisher nur unzureichend verstanden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Vesikel standen bisher vor allem die Optimierung der chemischen Struktur der kationischen Lipide [41, 44, 46, 51, 89, 157] und der Einfluß von verschiedenen Helferlipiden [41, 44, 133] auf die Transfektionseigenschaften. Die Voraussetzungen einer optimalen Lipoplexbildung und die Bedeutung verschiedener Einflußfaktoren - wie z.B. der Zeitverlauf der Lipoplexbildung oder die Beschaffenheit des Komplexierungsmediums für die erzielten Transferergebnisse - wurden dabei oft nur sehr unzureichend berücksichtigt.

Erst in den letzten Jahren ist versucht worden tiefer in die Zusammenhänge von Struktur und Wirkung einzudringen und mehr über die biophysikalischen Eigenschaften der Liposomen und der Lipoplexe sowie über ihr Verhalten beim Gentransfer in Erfahrung zu bringen. Dieses Wissen ist insofern unentbehrlich, als eine mögliche klinische Anwendung liposomaler Gentransfervesikel das detaillierte Verständnis der ablaufenden Prozesse voraussetzt.

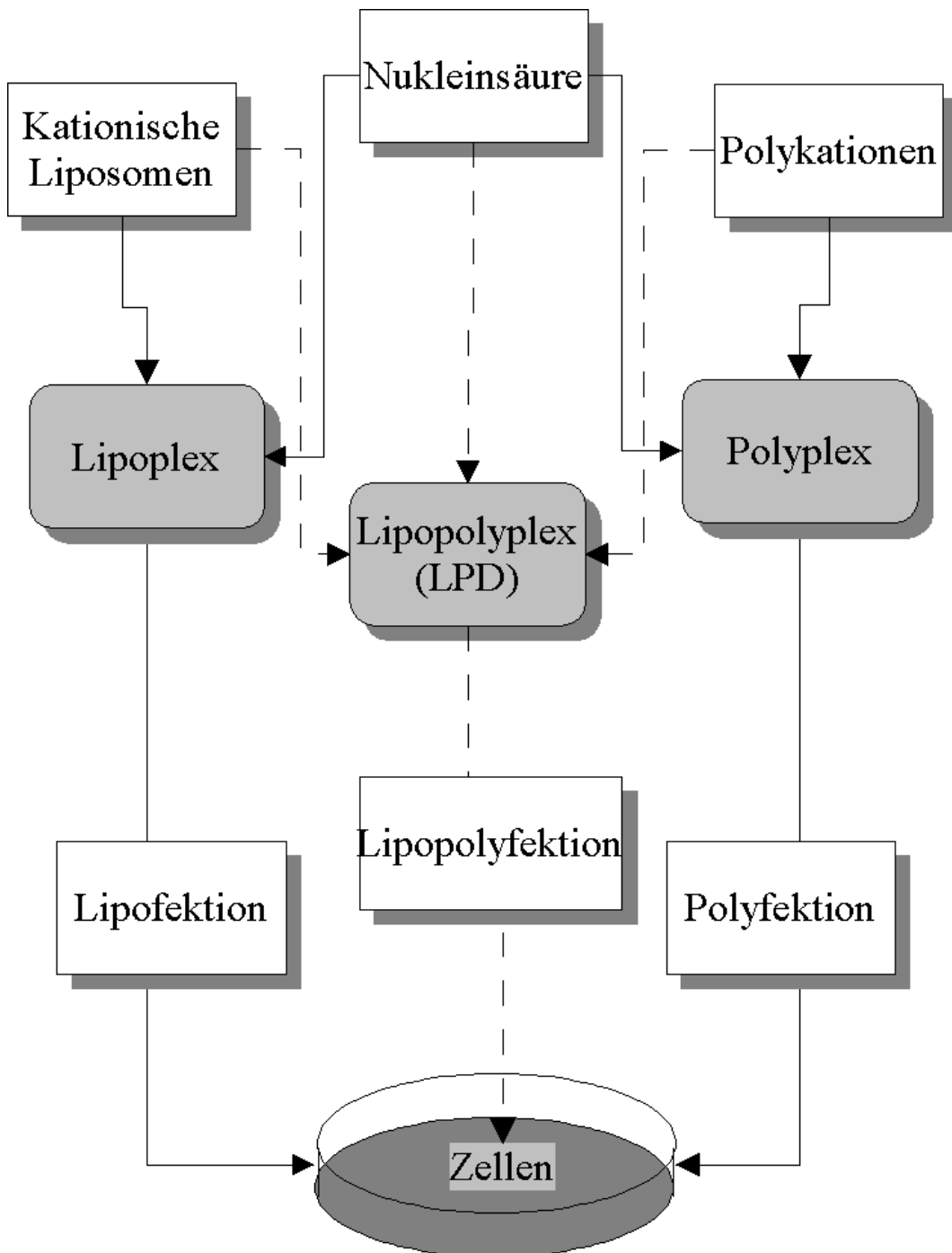


Abbildung 1.2: Herstellung und Bezeichnung der in der Arbeit beschriebenen Gentransfervesikel

Liposomen: Wie bereits oben ausgeführt, werden kationische Liposomen entweder aus einem kationischen Amphiphil oder häufiger aus einer Mischung des kationischen Lipides mit einem Helferlipid wie DOPE oder Cholesterol hergestellt. Die Eigenschaften der entstandenen Liposomen hängen sowohl von der chemischen Struktur des kationischen Lipides als auch von der Art des Helferlipides ab. Diese Faktoren beeinflussen Parameter wie die Vesikelgröße, das Zetapotential oder den pH-Wert an der Liposomenoberfläche.

Liposomenbildung: Im Allgemeinen bilden kationische Cholesterolderivate im Gegensatz zu doppelkettigen kationischen Lipiden (wie z.B. DOTMA oder DOCSPER) ohne den Zusatz des Helferlipides DOPE keine für den Gentransfer geeigneten Liposomen. Die Ursache dafür ist eine stärkere Membranrigidität der Liposomen durch den Cholesterolanker. Cholesterol, eingesetzt als Helferlipid, erhöht die Phasenübergangstemperatur (T_c), macht damit die Membran rigider und erschwert den Phasenübergang. Bei Überschreiten der Phasenübergangstemperatur geht die Lipidmembran von einem Gelzustand mit relativ unbeweglichen Lipidmolekülen zu einem Flüssigzustand mit frei beweglichen Lipidmolekülen über.

Im Gegensatz zu Cholesterol erniedrigt DOPE wegen der sterischen Struktur der Ölsäureseitenketten die Phasenübergangstemperatur und steigert damit die Membranfluidität. Im Ergebnis kommt es zu einer erleichterten Liposomenbildung nach der Zugabe von wäßrigem Medium zu den Lipidfilmen. Die höhere Fluidität der Membran durch die ungesättigten Seitenketten der doppelkettigen Amphiphile ist wahrscheinlich für deren bessere Liposomenbildungsfähigkeit verantwortlich.

Zetapotential: Als Zetapotential bezeichnet man die Ladung an der Oberfläche der Liposomen, die bei der Bewegung in einem elektrischen Feld nicht abgestreift werden kann. Neben der Membranfluidität ist das Zetapotential ein entscheidender Parameter für die Wechselwirkung mit anderen Komponenten wie DNA oder RNA. Nach den Untersuchungen von Eastman und Mitarbeitern [36] ist das Zetapotential bei der Abwesenheit von DNA unabhängig von der chemischen Struktur und der Ladung des kationischen Lipides. Es ist allerdings abhängig vom Medium in dem es gemessen wird: höhere Ionenkonzentrationen schirmen die positiven Ladungen der kationischen Lipide ab, die diffuse Schicht wird dünner und das Zetapotential der Liposomen wird erniedrigt.

Elektrostatistische Parameter: Im Gegensatz zum Zetapotential sind die elektrostatischen Parameter, die mit Hilfe des pH-abhängigen Fluorophores 4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin (HC) bestimmt werden, abhängig von der chemischen Struktur der kationischen Kopfgruppe. Nach Untersuchungen von Zuidam und Barenholz [172] ist z.B. DC-Chol mit seiner tertiären Aminogruppe bei physiologischem pH-Wert im Umgebungsmedium weniger protonisiert, als Lipide mit quarternären, also nicht pH-abhängigen Kopfgruppen wie DOTAP oder DMRIE. Die Autoren vermuten, daß dies zu einer schwächeren Komplexierung der DNA führt und damit die Freisetzung der DNA in der Zelle erleichtert wird. Dadurch könnte eine effizientere Transfektion der Zellen begünstigt werden.

Wie die biophysikalischen Untersuchungen zeigen, bestimmen die chemische Struktur des kationischen und des Helferlipides die Größe und die Struktur der entstehenden Liposomen. Hohe Anteile ungesättigter Verbindungen in den lipophilen Seitenketten der Lipide führen zu einer verbesserten Liposomenbildung. Die Anwesenheit quarternärer Amine in den Liposomen führt zu einem höheren pH-Wert auf der Lipo-

somenoberfläche wogegen das Zetapotential offenbar unabhängig von der chemischen Struktur des Lipides ist.

Lipoplexe: Beim Mischen von kationischen Liposomen und DNA entstehen infolge der ionischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatbrücken der DNA und den positiv geladenen Kopfgruppen der kationischen Lipide spontan Komplexe. Es handelt sich um einen sehr dynamischen Vorgang bei dem der zeitliche Verlauf der Komplexbildung und die Struktur der Lipoplexe von verschiedenen Faktoren abhängig ist.

Lipid/DNA-Verhältnis: Gershon und Mitarbeiter fanden, daß die Mischung von kationischen Liposomen und DNA zu recht unterschiedlichen Komplexen führt, deren Struktur z.B. von dem Ladungsverhältnis zwischen der DNA und den Liposomen abhängig ist [55]. Diese und auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, daß bei niedrigen L/D-Verhältnissen, also einem Überschuß von DNA, kleine Lipoplexe (<40 nm) mit lose gebundener DNA koexistieren [62, 120]. Größere Lipoplexe (>100 nm bis mehrere μm) treten dagegen bei neutralen und leicht positiven Ladungsverhältnissen auf. Bei hohen L/D-Verhältnissen ist die DNA von den Liposomen verpackt, teilweise kann aber auch noch DNA auf der Liposomenoberfläche vorhanden sein. Die Lipid/DNA-Komplexe befinden sich offenbar im dynamischen Gleichgewicht mit kleinen Clustern dünn mit Lipid überzogener bzw. freier DNA [44, 142, 167].

Optimale Gentransferergebnisse wurden von der Mehrzahl der Autoren mit schwach bis stark positiven Verhältnissen von Lipid zu DNA erreicht, also mit Verhältnissen bei denen die Lipoplexstruktur sehr heterogen ist [133, 164]. So fanden Kawaura und Mitarbeiter durch Atomabsorptions-Untersuchungen heraus, daß die für den Gentransfer optimale Größe ihrer Liposomen - bestehend aus einem kationischen Cholesterolderivat und dem Helferlipid DOPE - 0.4 μm bis 1.4 μm beträgt [77].

Auf der Grundlage der verschiedenen biophysikalischen Untersuchungen wurden zwei verschiedene Strukturmodelle für die Lipoplexe entwickelt. Die Autoren des ersten Modells vermuten, daß die DNA an der Außenseite der Vesikel durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbiert wird [36, 46], in dem anderen Modell wird postuliert, daß die DNA von der Lipidhülle eingeschlossen wird [55, 122]. Letztere Hypothese stützen die Synchrotron-Röntgenstrahl-Beugungsexperimente von Rädler und Mitarbeitern [120], welche aus ihren Ergebnissen folgern, daß Komplexe aus DOTMA/DOPE und DNA hochgeordnete flüssigkristalline Phasen ausbilden. In diesen ist die DNA in die multilamellaren Lipiddoppelschichten eingelagert. Gershon und Mitarbeiter [55] verweisen in ihren Untersuchungen auf einen Zweistufenprozeß: Bei niedrigen L/D-Verhältnissen würde die DNA an den Liposomen adsorbiert, bei Überschreiten eines kritischen L/D-Verhältnisses käme es zur Zusammenfaltung der DNA. Auch die Ergebnisse von Pitard und Mitarbeitern [117] deuten auf einen derartigen Stufenprozeß hin. Bei hohen L/D-Verhältnissen von ihrem Lipopolyamin und der DNA beobachteten die Autoren stark gepackte, kleine Lipoplexe. Dagegen fanden sie bei neutralen Ladungsverhältnissen große Aggregate. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Yoshikawa und Mitarbeiter bei ihren Untersuchungen mit dem Lipopolyamin DOGS [166]. Sie fanden bei Zugabe des Lipids zu der DNA ein Aufwinden der langgestreckten DNA zu kleineren Strukturen ähnlich der von Nukleosomen. Im Verlaufe der Zeit aggregierten diese Komplexe jedoch zu größeren Strukturen.

Medium: Neben dem L/D-Verhältnis beeinflußt auch das Medium in dem die Kom-

plexbildung erfolgt die Struktur der Lipoplexe. Diese Tatsache ist erst seit kurzem Gegenstand von Untersuchungen. Arbeiten von Barthel und Mitarbeitern [12] lassen schlußfolgern, daß bei der Transfektion von DOGS/DNA-Komplexen ein bedeutender Einfluß der Ionenkonzentration und der Art der Ionen auf die Effizienz des Gentransfers vorliegt. Für die Herstellung der Gentransferkomplexe fanden die Autoren einen vorteilhaften Effekt bei der Entfernung von Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie bei der Verwendung von DMEM-Medium. Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch weitere wichtige Faktoren, wie die Konzentration der Liposomen und der DNA sowie der Zeitverlauf der Komplexbildung, nicht berücksichtigt. Pitard und Mitarbeiter [117], Escriou und Mitarbeiter [38] sowie Kichler und Mitarbeiter [78] untersuchten wesentlich systematischer den Einfluß, den die Zusammensetzung des Mediums auf die Gentransferaktivität von Lipopolyamin/DNA-Komplexen hat. Pitard und Mitarbeiter stellten eine Veränderung der Morphologie der Komplexe in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration fest. Je höher die Konzentration von NaCl, desto größer waren die Komplexe und die *in vitro* bestimmten Gentransfereffizienzen. Kichler [78] und Escriou [38] beobachteten außerdem eine hohe Genexpression bei neutralen L/D-Verhältnissen wenn die Komplexbildung in Medien erfolgte, die Phosphat-, Acetat- oder Hydrogencarbonationen enthielten.

Chemische Struktur: Auch die Suche nach den möglichen Zusammenhängen zwischen der chemischen Struktur der Lipide und ihrer Eignung als Gentransfersvesikel führte bisher zumeist zu wenig aussagekräftigen Resultaten. So vermuteten Akao und Mitarbeiter [2] auf der Basis ihrer Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Phasenübergangstemperatur und der Gentransferaktivität, eine Annahme die von Balasubramaniam und Mitarbeitern [8] bei der Analyse von DOTMA-Analoga nicht bestätigt werden konnte. Auch wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen dem Zetapotential und der Gentransferpotenz herzustellen [144]. Nach den Untersuchungen von Stegemann und Mitarbeitern [141] ist ein solche Wechselbeziehung aber nicht vorhanden.

Wie ausgeführt wurde, beeinflussen sehr viele Faktoren die Effektivität der Transfektion. Bisher konnten jedoch keine eindeutigen Gesetzmäßigkeiten zum Zusammenhang von chemischer Struktur, den biophysikalischen Eigenschaften und der Morphologie auf der einen Seite sowie den Gentransfereigenschaften *in vitro* und *in vivo* auf der anderen Seite festgestellt werden. Die Vielzahl der erfolgreich für den Gentransfer eingesetzten Verbindungen und die möglichen Varianzen in der chemischen Struktur erschweren die Herstellung eines derartigen Zusammenhanges in erheblichen Ausmaß.

1.2.2.4 Mechanismen der Lipofektion

In den letzten Jahren wurden eine ganze Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die die Untersuchung der Lipoplexaufnahme und das weitere Schicksal der DNA in der Zelle zum Inhalt haben. Einen Überblick über den postulierten Aufnahmemechanismus der Lipoplexe durch die Zelle und die beim Gentransfer zu überwindenden Barrieren gibt die Abbildung 1.3 wieder.

Lipoplexaufnahme: Versuchsergebnisse unserer eigenen wie auch anderer Arbeitsgruppen legen nahe, daß die Aufnahme der lipidkomplexierten DNA hauptsächlich durch Endozytose [49, 77, 167] unter Proteoglycan vermittelten Interaktionen erfolgt [84, 109]. So beobachteten Zabner und Mitarbeiter [167] Gold- oder Ethidium-markierte

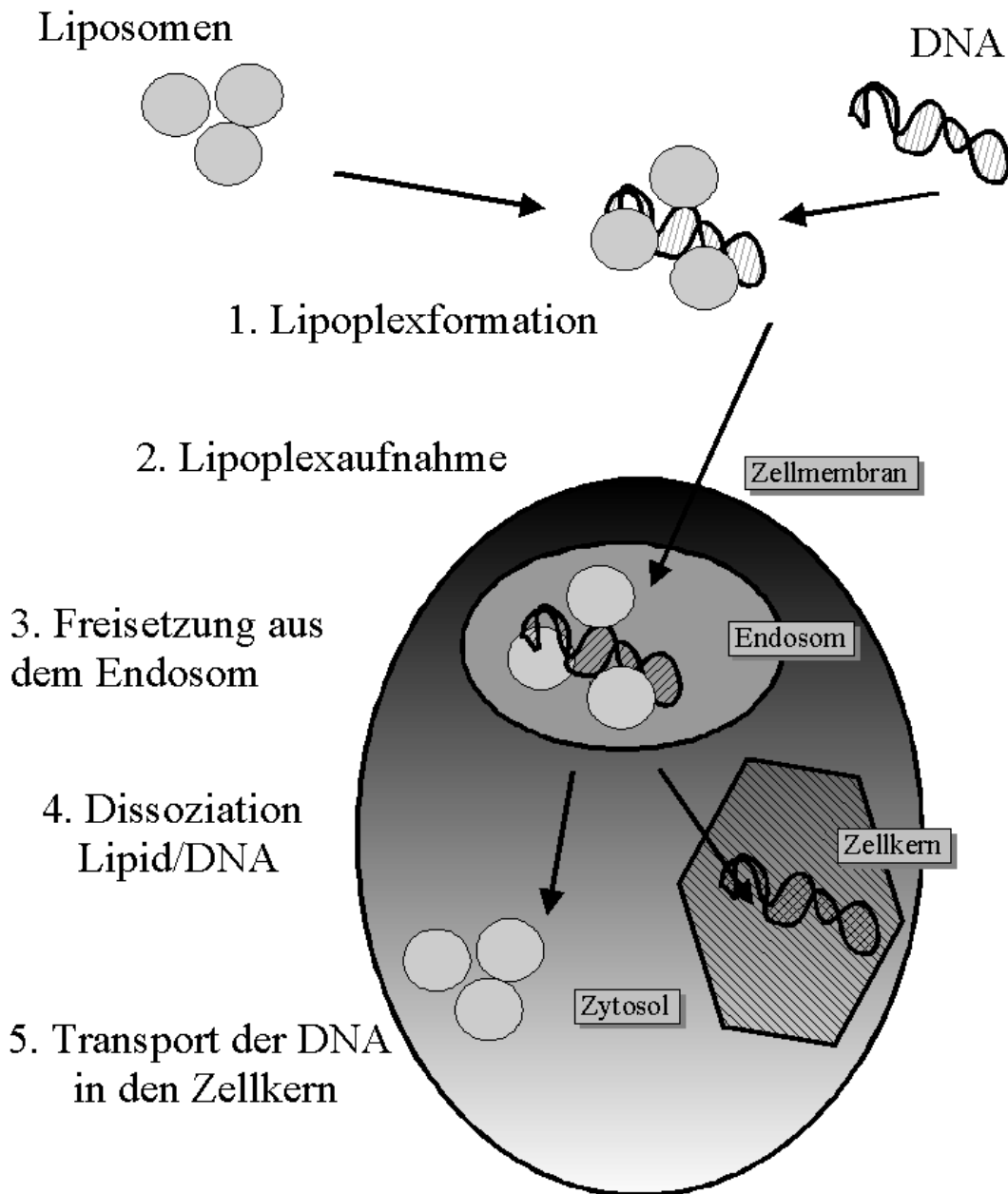


Abbildung 1.3: Postulierter Mechanismus des Gentransfers mit Lipoplexen

DNA nach der Transfektion mit DMRIE/DOPE-Liposomen vor allem in endosomalen Kompartimenten aber nicht frei im Zytosol bzw. im Zellkern. Auch wurde wiederholt gezeigt, daß lysosomotrophe Agenzien wie Chloroquin oder NH_4Cl die Transferrate erhöhen [44, 170] und das der Endozytoseinhibitor Wortmannin die Transferrate senkt [77]. Wie Zabner und Mitarbeiter [167] weiterhin herausfanden, sind bei Verwendung von Ethidium-markierter DNA fast alle Zellen positiv für die Fluoreszenz, aber weniger als 50 % positiv für die Genexpression. Dies wurde dahingehend interpretiert, daß nicht die Aufnahme der Komplexe in die Zelle wohl aber der Durchgang durch die endosomale Membran eine wichtige Barriere für den Gentransfer ist. Für kaum transfizierbare Zellen, wie z.B. Primärzellen, ist möglicherweise allerdings schon die Lipoplexaufnahme

in die Zelle limitiert.

Endosom: Die Dissoziation der DNA vom kationischen Lipid findet nach Xu und Szoka [162] im wesentlichen innerhalb des Endosoms mittels einer Ladungsneutralisierung der positiv geladenen Lipoplexe durch anionische Lipide statt. Nach dem Modell der Autoren wird die endosomale Membran durch die aufgenommenen Lipoplexe destabilisiert, es kommt zum Flip-Flop der zytoplasmatischen, negativ geladenen Lipide ins Endosomeninnere und dadurch zur Ladungsneutralisierung. Erfolgt danach eine Membranfusion von Liposom bzw. Lipoplex und Endosom, wird die Freisetzung der DNA und deren Transfer ins Zytoplasma ermöglicht [155]. Offenbar verbleibt jedoch der überwiegende Teil der DNA im Endosom und nur ein kleiner Teil erreicht den Zellkern [52, 167]. Die Freisetzung der DNA scheint vor allem aus den frühen endosomalen Kompartimenten zu erfolgen [49, 168].

Im Gegensatz zu einer von Remy und Mitarbeitern [121] aufgestellten Hypothese, konnten Xu und Szoka bei ihren Untersuchungen keine Freisetzung der DNA aus dem Lipoplex durch die Zugabe eines Überschusses an DNA nachweisen. Warum es erst im Endosom und nicht schon an der Zelloberfläche zur Fusion der Membranen und zur DNA-Freisetzung kommt, erklären die Autoren mit dem Verlust an Clathrin und anderen Proteinen im Verlaufe der Endosomenreifung sowie mit den unterschiedlichen Bedingungen im Endosom und an der Zelloberfläche. Nach ihrer Auffassung scheint an der Zellmembran der Grad der Membranschädigung für die Fusion nicht ausreichend zu sein.

Fusionstheorie: Trotzdem werden diese direkte Fusion der Lipoplexe mit der Zellmembran [46, 136] und auch die Phagozytose [104] als Aufnahmemechanismus der DNA in die Zelle diskutiert. Friend und Mitarbeiter [49] wollen die direkte Fusion insofern nicht ausschließen, da diese ein schneller und damit schlecht zu dokumentierender Prozeß sei. Die Fusionstheorie stützen u.a. Ergebnisse von Felgner und Mitarbeitern [46] die die Fluoreszenz-markierte Lipide nach der Applikation der Lipoplexe auf der Zelloberfläche nachwiesen.

Kerntransport: Nach der Aufnahme der rekombinanten DNA in die Zelle und ihrer Freisetzung aus dem Endosom stellen die Dissoziation des Lipides von der DNA und der Transport der DNA durch die Kernmembran weitere Hindernisse für die DNA-Expression im Zellkern dar. So führte die Kern-Injektion von Lipid-komplexierter DNA zu einer Verringerung der Genexpression im Vergleich zu injizierter freier DNA. Dieser Befund deutet auf die notwendige Dissoziation des Lipides von der DNA für das Erreichen einer Genexpression in der Zielzelle hin [162]. Desweiteren wurde eine Abhängigkeit der Transfereffizienz von der Größe der DNA beobachtet. So akkumulierten Oligonukleotide im Gegensatz zu Plasmid-DNA relativ schnell im Zellkern [14, 168]. Dies ist durch das Vorhandensein einer Diffusionsbarriere der Kernporen für Moleküle über 40 kDa [86] erklärbar. Statt eines möglichen Transportes der DNA durch die Kernporen weisen Ergebnisse von Friend und Mitarbeitern [49] auch auf eine denkbare Fusion der Lipoplexe mit der Kernmembran hin. Bei dieser Kern-Fusion könnte dann auch die Dissoziation von Lipid und DNA erfolgen. Vielleicht kommt es aber auch erst bei einer Zellteilung zur Aufteilung der sich im Zytoplasma befindenden Plasmid-DNA in die neu entstehenden Zellkerne.

Da der Transport der DNA in den Zellkern offenbar ein großes Problem darstellt, wurden, um auf den Transport der DNA in den Zellkern verzichten zu können, Systeme angewendet, welche die zytoplasmatische Expression der Plasmid-DNA erlauben. So

konnte durch die Transfektion eines rekombinanten Vakziniavirus und der Plasmid-DNA pTM- β Gal - wodurch die Transkription von Plasmid-DNA bereits im Zytosol möglich wird - die Expression des Reportergenens drastisch erhöht werden [52, 125].

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß nach der Bildung der Lipoplexe und dem Erreichen der Zelle drei wichtige Barrieren für die erfolgreiche Transfektion bestehen: Die Zellmembran, die meist durch Endozytose überwunden wird, die Freisetzung der Komplexe bzw. der DNA aus den Endosomen und der Transport der DNA in den Zellkern, wobei die beiden letztgenannten Prozesse die Effizienz besonders limitieren.

1.2.2.5 Weiterentwicklungen der Lipofektion

Trotz der hohen Gentransferraten, die *in vitro* erreicht wurden, ist die Effizienz der kationischen Liposomen *in vivo* bisher zu gering um einen ausreichenden therapeutischen Nutzen bei der Anwendung am Patienten erwarten zu können. Die Ergebnisse von Zellkultur-Untersuchungen sind offenbar nur eingeschränkt auf die Bedingungen im Organismus zu übertragen. Die liposomalen Gentransfervesikel, die sich beim einfachen Mischen von kationischen Liposomen und DNA ergeben, sind wahrscheinlich zu groß, um *in vivo* länger im Blutkreislauf zirkulieren zu können. Größere Gentransfervesikel bleiben zumeist in den Kapillaren der Blutgefäße der Lunge hängen. Desweiteren lagern sich sehr schnell verschiedene Serumproteine an die kationischen Liposomen an [35]. Sowohl die Proteinabsorption als auch die Größe der Lipoplexe führen dann zu einer schnellen Beseitigung der Vesikel durch das retikuloendotheliale System. Bei einem etwaigen Erreichen des Zielgewebes ist dann der Eintritt der Lipoplexe in die Zellen zu langsam und der Durchtritt durch das Lysosom zu ineffizient um eine größere Anzahl an Zellen zu transfizieren. Im Endresultat werden *in vivo* oft nur sehr niedrige Gentransferraten erzielt.

Es ist offensichtlich, daß mit unmodifizierten Lipoplexen lediglich eine lokale Applikation erfolversprechend ist. Um die Effizienz von einfachen Lipid/DNA-Komplexen zu verbessern, sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Modifikationen und Optimierungen der Gentransfervesikel erfolgt. Ziel war es dabei kleinere, stabilere und spezifisch wirksame Gentransfervesikel zu erhalten.

Liganden: So wurde z.B. versucht durch Liganden wie Zuckermoleküle [47, 96, 121], Lektine [74] oder Antikörper [72], die an der Vesikeloberfläche chemisch gekoppelt werden, eine spezifische Zell-Erkennung zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung von Integrin bindenden Peptiden an die Liposomenoberfläche. So fanden Coutelle und Mitarbeiter [64, 65] bei Anwesenheit von speziellen Aminosäuresequenzen (RGD-Sequenz) in den zu koppelnden Peptiden eine erhebliche Steigerung der Gentransferaktivität. Derartige Peptidliganden können auch den Transport aus dem Endosom und den Weg in den Zellkern erleichtern wie Arbeiten von Gottschalk und Mitarbeitern [56] sowie von Lyons und Mitarbeitern [99] zeigten.

DNA-Komplexierung: Eine andere Methode um kleinere und stabilere Gentransfervesikel zu erhalten, besteht in der Komplexierung der DNA durch den Zusatz von Polykationen wie z.B. PLL, Polybren [54], Histonen [50] oder PS [95, 138]. Es wurde angenommen, daß außerdem durch den Zusatz von Polykationen, infolge der verstärkten pH-Wert-Pufferung durch die primären Aminogruppen, ein erleichterter Austritt der DNA aus den Endosomen bzw. den Lysosomen ermöglicht wird.

Die Partikel, die nach dem Mischen von Polykation-DNA-Komplexen und kationi-

schen Liposomen entstehen, erhielten die Bezeichnung Lipid-Polykation-DNA-Partikel (LPD), [43, 89, 90]. Insbesondere bei Verwendung des natürlich vorkommenden Polykations PS sind dabei in der Vergangenheit vielversprechende Ergebnisse *in vivo* erzielt worden [95].

Bei den Protaminen die Ausgangsstoffe zur Herstellung des PS sind, handelt es sich um kleine Peptide (MW 4000-4250) die aufgrund ihres hohen Arginingehaltes sehr basisch reagieren. Sie kommen im Kopf der Spermien vor. Ihre Aufgabe ist es, die Verpackung der DNA und deren Transport in die Eizelle zu gewährleisten.

Die Verkleinerung der Gentransfervesikel durch den Einsatz von Komplexierungsagentien wie PS oder PLL verringert auch die Erkennung und Aufnahme der Vesikel durch das Immunsystem. Die entstehenden Vesikel sind u.a. zu klein um sofort durch die Immunzellen erkannt zu werden.

PEG-Insertion: Dem Ziel die Immunerkennung zu vermindern dient auch die sterische Abschirmung der Liposomen-Oberfläche durch Polyethylenglykol-(PEG)-ketten. Diese führt u.a. zu einer Veränderung der Proteinabsorption. Durch die Insertion PEG-modifizierter Lipide in die Liposomenmembran konnte zum Beispiel eine verlängerte Zirkulation von Doxorubicin-Liposomen und eine selektive Anreicherung der Substanz im Tumorgewebe erreicht werden [105]. Diese zielgerichtete Applikation der Wirksubstanz führte zu einer verminderten Toxizität für den Gesamtorganismus. Die Verwendung von PEG-modifizierten Lipiden scheint auch bei der *in vivo* Applikation von Gentransfervesikeln erfolversprechend zu sein. So wiesen Hong und Mitarbeiter nach , daß bei der Verwendung von kationischen Liposomen mit 5 mol % PEG-PE sowohl die Gentransferrate als auch die Haltbarkeit der Lipoplexe zunahm [71] .

Zusammenfassend zu den in der Praxis bisher angewandten Methoden der Genapplikation ist zu sagen, daß jede Methode Vorteile aber auch Nachteile besitzt. Für die Klinik bedeutet dies, daß es mit großer Wahrscheinlichkeit kein für alle Krankheiten geeignetes Genapplikationsverfahren geben wird. Vielmehr wird es voraussichtlich mehrere der konkreten Situation angepaßte Verfahren mit unterschiedlichen Gentransfervektoren geben. Für einen effizienten liposomalen *in vivo* Gentransfer ist die Verwendung größenreduzierter, sterisch stabilisierter Vesikel eine vielversprechende Strategie.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Da der Einsatz der bisher in der Literatur beschriebenen kationischen Lipide durch hohe Zelltoxizitäten, komplizierte Synthesen und damit hohe Preise limitiert wird, wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Schneider (Wuppertal) eine Reihe von Verbindungen synthetisiert, die sich durch Bioabbaubarkeit, einfache Syntheseverfahren und hohe Transferraten auszeichnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese kationischen Lipide auf ihre Eignung als Gentransfervesikel zu untersuchen. Die Lipide sollten dabei auf ihre Liposomenbildungsfähigkeit, die Komplexierung der DNA und die optimalen Bedingungen für den *in vitro* Gentransfer analysiert werden. Insbesondere der Einfluß solcher Faktoren wie die Notwendigkeit des Zusatzes von Helferlipiden, die Bestimmung der optimalen DNA-Menge, der Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses, die Beschaffenheit des Komplexierungsmediums sowie die Komplexstabilität sollte dabei Gegenstand der Untersuchungen sein.

Für einen möglichen *in vivo* Einsatz der Liposomen sollte weiterhin der Einfluß der Vorkomplexierung der DNA mit polykationischen Peptiden wie PLL und PS auf die Größe und Stabilität der Komplexe und auf die Gentransferrate untersucht werden.

Durch die vorliegende Arbeit wurde die **Herstellung eines synthetischen Gentransfersystems** angestrebt, **welches durch die folgenden Eigenschaften charakterisiert wird:**

- Schutz der DNA
- effiziente Aufnahme der DNA in die Zelle
- untoxisch und nicht immunogen
- bioabbaubar
- einfache Produktion der Einzelkomponenten
- sichere und einfache Applikation

Die Entwicklung eines derartigen Systems verlangt die Untersuchung von Fragestellungen welche in Bezug zu den **direkten Vesikelbestandteilen** stehen. So z.B.:

- Wie muß die Art und die Qualität der zu applizierenden DNA beschaffen sein ?
- Welche chemische Struktur muß das Lipid bzw. das Polymer besitzen, um die DNA effektiv komplexieren zu können ?
- Welchen Einfluß haben Art und Menge des Helferlipides auf die Herstellung effizienter Gentransfervesikel

Weitere Fragen stellen sich in Zusammenhang mit der **Vesikelherstellung** :

- Unter welchen Bedingungen muß die Herstellung der Gentransfervesikel erfolgen ?
- Wie ist die optimale Konzentration der Komponenten, welches Medium ist geeignet ?
- Wie stabil sind diese Vesikel ?

Eine dritte Gruppe von Fragen schließlich stellt sich zu Faktoren, die mit der **Durchführung der Transfektion** zusammenhängen. So z.B.:

- Wie hoch darf die Serumkonzentration während der Transfektion sein ?
- Wie hoch ist die Konzentration der Gentransfervesikel im Kulturmedium ?
- Wie lange dauert die Inkubation der Lipoplexe ?
- Welchen Einfluß haben Zelltyp und Zellbeschaffenheit auf die Effektivität des Gentransfers ?
- Inwiefern, kann man die Daten von den *in vitro* Untersuchungen auf *in vivo* Anwendungen übertragen ?

Auf all diese Fragen soll im weiteren Teil der Arbeit eingegangen werden.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien und Lösungen der Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Ferak (Berlin, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Pharmacia Biotech Europe (Freiburg, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), SERVA (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Alle Lösungen wurden mit 2fach destilliertem bzw. deionisiertem Wasser angesetzt. CPRG wurde von der Fa. Boehringer Mannheim, DDAB, DOPE, pNPP und HC von der Fa. Fluka, β -Gal-Standard, MES, Triton-X-100, poly-L-Lysin (9.6 kDa) und Protaminsulfat wurden von der Fa. Sigma-Aldrich erworben. Die Zellkulturmedien wurden von der Fa. Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. DOTMA war eine freundliche Gabe von R. J. Debs. DOSGA, DOCSPER und DC-Chol wurden von O. Keil (Wuppertal, Deutschland) zur Verfügung gestellt. DOTAP wurde von U. Masing (Freiburg, Deutschland), DAC-Chol, sowie die Lipide Max-1, Max-2, Max-3 und Max-4 wurden von J. Richter (Berlin, Deutschland) synthetisiert bzw. hergestellt. Die Ringerlösung wurde von der Fa. Braun-Melsungen (Melsungen, Deutschland) bezogen. Die Peptide Ncp7 und PTH wurden von der Fa. Biosynthan (Berlin, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Agarose-Gel	1.0 % Agarose	1.0 g (m/V)
	50 x TAE (pH 8.3)	2 ml
	Ethidiumbromidlösung	1 μ l
	H ₂ O	ad 100 ml
Agar-Platten	Agar in LB-Medium	1.5 % (m/V)
	Ampicillin(optional)	100 μ g/ml
	Kanamycin(optional)	50 μ g/ml
D1	NaAcetat-Puffer (pH 5.6)	20 mM
	pNPP	5 mM

	Triton X-100	0.1 %
D2	Tris-HCl (pH 8.0)	0.5 M
D3	CPRG in HBSS	1 mg/ml
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
Fixierlösung	Formaldehyd	4 %
	Glutaraldehyd	0.2 %
	PBS	ad 100 %
HBSS	NaCl	138 mM
	KCl	5 mM
	KH ₂ PO ₄	0.3 mM
	Na ₂ HPO ₄	0.3 mM
	CaCl ₂	1.25 mM
	MgSO ₄	0.08 mM
	NaHCO ₃	4 mM
	D-Glukose	5.6 mM
LB-Medium	Bacto-Trypton	1 % (m/V)
	Hefeextrakt	0.5 % (m/V)
	NaCl	1 % (m/V)
	Ampicillin (optional)	100 µg/ml
	Kanamycin (optional)	50 µg/ml
NaCl-Bicarbonat-Lösung	NaCl	150 mM
	NaHCO ₃	20 mM
P1 (Resuspensionspuffer) Lagerung bei 4 °C	Tris-Cl (pH 8.0)	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
P2 (Lysispuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1.00 %
P3 (Neutralisationspuffer)	KCH ₃ COO (pH 5.5)	3 M
PBS-Puffer (pH 7.3)	NaCl	0.130 M
	KCl	0.002 M
	KH ₂ PO ₄	0.001 M
	Na ₂ HPO ₄	0.008 M
PEG-Fällungslösung	PEG 6000	30 %
	NaCl	1.5 M

Probenpuffer (pH 6.8)	Tris	0.0625 M
	Glycerin	10 % (V/V)
	Bromphenolblau	0.004 % (m/V)
QBT (Equilibrierungspuffer)	NaCl	750 mM
	MOPS (pH 7.0)	50 mM
	Isopropanol	15.0 %
QC (Waschpuffer)	NaCl	1 M
	MOPS (pH 7.0)	50 mM
	Isopropanol	15 %
	Triton X-100	0.15 %
QF (Elutionspuffer)	NaCl	1.25 M
	Tris-HCl (pH 8.5)	50 mM
	Isopropanol	15 %
Ringerlösung nach Fa.Merck	NaCl	147 mM
	KCl	4 mM
	CaCl ₂	2.3 mM
50 x TAE-Puffer (pH 8.3)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	0.05 M
Transformationspuffer	PEG	10 % (m/V)
	MgCl ₂	30 mM
	LB-Medium	ad 100 % (V/V)
Trypsin-Lösung	Trypsin	1.25 g
	Versine/Chelaplex III	0.5 g
	KCl	0.8 g
	Na ₂ CO ₃	0.7 g
	Glucose	1 g
	NaCl	8 g
X-Gal Substratlösung	MgCl ₂ (1.1 mM)	7 ml
	K ₃ [Fe(CN) ₆] (50 mM)	0.5 ml
	K ₄ [Fe(CN) ₆] (50 mM)	0.5 ml
	X-Gal in DMF (2 %)	110 µl

2.1.3 Geräte

- Aga-Gel-Elektrophoreseapparatur von Biometra (Göttingen, Deutschland)
- Eppendorffzentrifuge 5415-C der Fa. Eppendorf (Köln, Deutschland)
- FACS-Scan der Fa. Becton-Dickenson (Erembodegem, Belgien)
- Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader BMG-Fluostar der Fa. SLT-Tecan (Crailsheim, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-70 der Fa. OLYMPUS (Hamburg, Deutschland) mit Bildauswertesystem der Fa. Hamamatsu Photonics (Herrsching, Deutschland)
- Gefriertrocknungsanlage der Fa. Christ (Deutschland)
- Geldokumentationssystem der Fa. Herolab (Wiesloch, Deutschland) mit Kamera 429-K, UV-Transilluminator UVT-28M und Software E.A.S.Y.
- Heraeus-Sepatech-Biofuge-15 der Fa. Kendro-Heraeus (Berlin, Deutschland)
- Heraeus-Sepatech-Megafuge-1.0R der Fa. Kendro-Heraeus
- Heraeus-Sepatech-Varifuge-3.0R der Fa. Kendro-Heraeus
- Ionenaustauschersäulen der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland)
- JEM-100-CX-Transmissionselektronenmikroskop
- LS-50B-Lumineszenz-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer (Überlingen, Deutschland)
- Mikrotiterplatten-Reader der Fa. SLT-Tecan (Crailsheim, Deutschland)
- MLW-Tischzentrifuge T52.1 der Fa. Janetzki (Leipzig-Engelsdorf, Deutschland)
- Photonenkorrelations-Spektrophotometer N4-Plus-MD von Coulter-Electronics (Krefeld, Deutschland)
- Sorvall-Zentrifuge RC-5B von Du Pont Instruments (Bad Homburg, Deutschland)
- Transsonic-570-Ultraschallbad der Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- UV/VIS-Spektrophotometer JASCO-V550 der Fa. Jasco Co. (Japan)
- UNIVAPO-150-H-Vakuumzentrifuge der Fa. Bachhofer (Reutlingen, Deutschland)
- VF-2-Vortexer von Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- Zetapotentialmeßgerät Delsa-440-SX der Fa. Coulter-Electronics (Krefeld, Deutschland)

Plasmid	Größe	regulatorische Sequenz, kodiertes Gen	Referenz bzw. Herkunft
pEGFPC1	4.7 kB	CMV-Promotor, GFP-Gen	Clontech (Heidelberg, Deutschland)
pUT649	6.4 kB	CMV-Promotor, tk-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)
pUT650	5.1 kB	CMV-Promotor, luc-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)
pUT651	6.5 kB	CMV-Promotor, lacZ-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)

Tabelle 2.1: **Übersicht über Eigenschaften und Herkunft der in der Arbeit verwendeten Plasmide.**

2.1.4 Biologische Materialien

2.1.4.1 Plasmide

Die Plasmid-Vektoren pUT649, pUT650 und pUT651 wurden von der Fa. Cayla (Toulouse, Frankreich) erworben. Das Plasmid pEGFPC1 wurde von der Fa. Clontech (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle pUT-Plasmide tragen ein β -Lactamase-Gen zur Selektion rekombinanter Bakterien in *E.coli*. Der Vektor pEGFPC1 enthält ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion der transformierten *E.coli*. Eine Übersicht über die Expressionsvektoren und ihre Eigenschaften enthält die Tabelle 2.1.

Mit Hilfe des Plasmides pEGFPC1 kann die Anzahl transfizierter, das GFP-Protein exprimierender Zellen durch eine FACS-Analyse bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden. Das Genprodukt des lacZ-Genes, die β -Galaktosidase, kann mit Hilfe von Farbreaktionen in transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die exprimierte Thymidinkinase ist ein negativer Selektionsmarker. Durch Zugabe von Ganciclovir können die transfizierten Zellen abgetötet werden.

2.1.4.2 Zelllinien

In Tabelle 2.2 sind die in den Versuchen verwendeten Zelllinien, deren Speziespezifität sowie die Herkunft aufgeführt.

2.1.4.3 Restriktionsenzyme und Puffer

Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firmen Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland), Eurogentec (Seraing, Belgien) und Fermentas (Litauen) mit den dazu gelieferten 10fach Restriktionsendonuklease-Puffern.

Zelllinie	Bemerkungen	Referenz/Herkunft
F98	Rattenglioblastomzelllinie	[80]
N64	humane Glioblastomzelllinie	[156]
U373	humane Glioblastomzelllinie	ATCC:HTB-17
K562	Erythroleukämiezelllinie	[98]
MaTu	humane Mammatumorzelllinie	[158]
MCF7	humane Mammatumorzelllinie	[139]
CC531	Rattenkolonkarzinomzelllinie	[147]
pVSM	glatte Muskelzellen des Schweins	[82]
Mewo	humane Melanomzelle	[128]

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

2.2 Methoden

Einen Überblick über die durchgeführten Prozesse gibt die Abbildung 2.1.

2.2.1 Herstellung der DNA

2.2.1.1 Transformation von E.coli-Zellen

Da die bisher verwendeten Transformationsmethoden wie die Hitzeschocktransformation [63] oder die Elektroporation [20] relativ umständlich sind, wurde durch unsere Arbeitsgruppe ein Verfahren zur chemischen Transformation von E.coli [28] modifiziert, welches eine einfache, schnelle und effiziente Transformation der Bakterien erlaubt [61].

Für die Transformation wurden E.coli-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurde frisches LB-Medium mit den Bakterien aus einer stationären ÜNK im Verhältnis 100:1 angeimpft und die Kultur anschließend etwa 1.5 bis 2 h bei hoher Schüttelfrequenz bis zu einer Zelldichte von etwa 10^8 Zellen/ml ($OD_{600} = 0.2-0.4/cm$) wachsen gelassen. Nach dem Erreichen des Titers wurden die Zellen bei $4^\circ C$ und 2200 rpm für 10 min in einer Heraeus Megafuge zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig und möglichst vollständig dekantiert und das Zellpellet in 0.1 Volumenteilen eisgekühltem Transformationspuffer mit Hilfe einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden nun für weitere 10 bis 20 min auf Eis gestellt. Diese Zellen sind kompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA.

Zur Transformation wurden 100 bis 200 μl kompetente Zellen mit der Plasmid-DNA gemischt und für 10 min in Eis, 10 min bei Raumtemperatur und erneut 10 min in Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit kommt es zum Anheften der DNA an

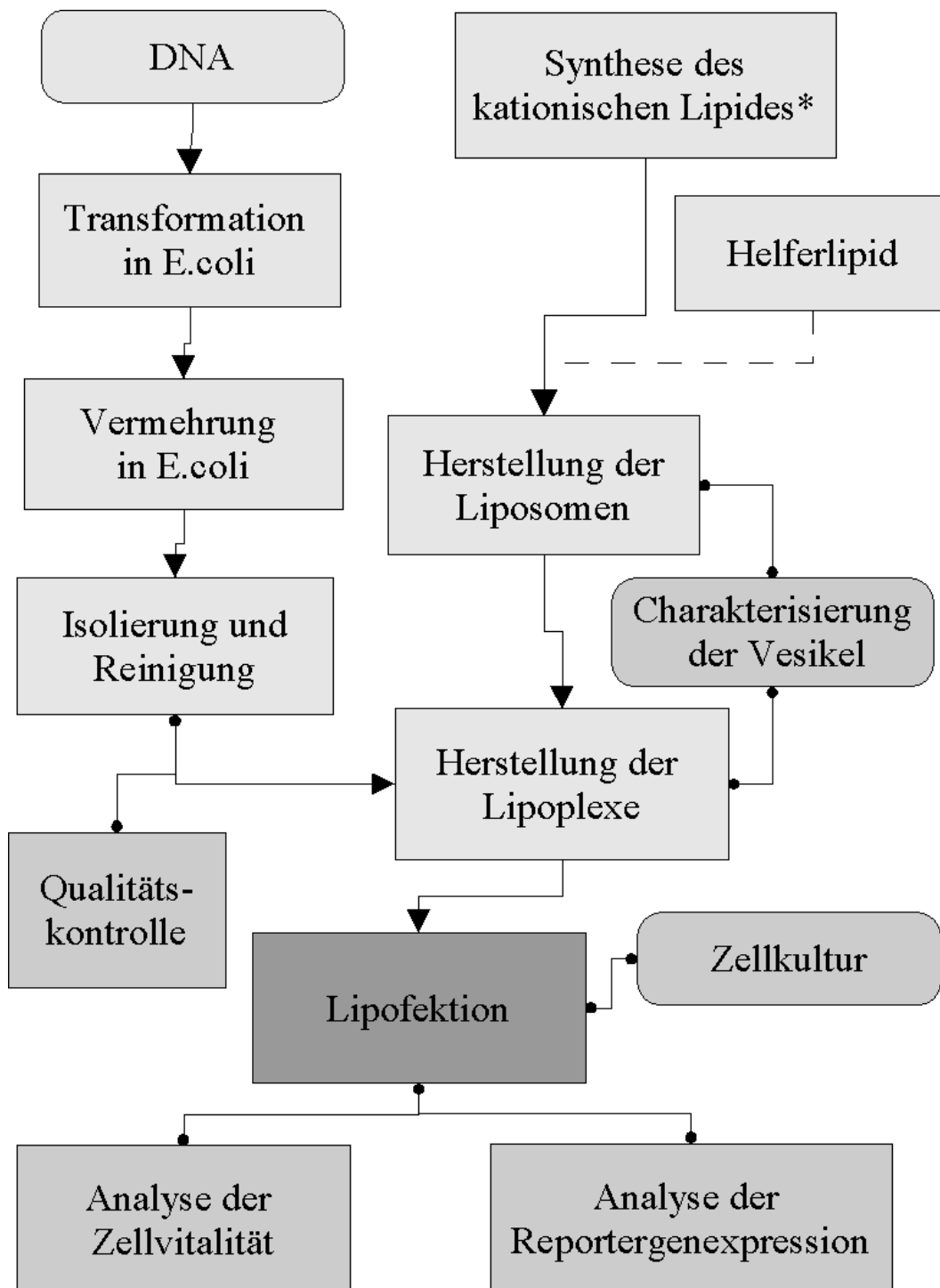


Abbildung 2.1: **Prozeßschema** der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte.

* Wird im Rahmen dieser Untersuchungen nicht beschrieben.

die bakterielle Zellwand und zur Aufnahme in die Bakterien. Zur Expression des transformierten Plasmides wurden die Zellen nach Zugabe von 0.8-0.9 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100-500 μ l dieser Suspensionskultur auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wuchsen nur die gegen das Antibiotikum resistenten transformierten Bakterien.

2.2.1.2 Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse und die Reinigung mit Ionenaustauschersäulen der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland). Zur Freisetzung der DNA wurde die Zellwand der Bakterienzellen zunächst im alkalischen Milieu lysiert. Die Proteine sowie die chromosomale DNA der Bakterien wurden danach durch eine Natriumacetatfällung von der Plasmid-DNA abgetrennt. Die Reinigung der Plasmid-DNA von der bakteriellen RNA und dem restlichen Protein erfolgte anschließend über die Anionenaustauschersäule.

Zur Plasmidamplifikation wurde der Bakterienstamm DH5- α [63] verwendet. Die nachfolgenden Angaben gelten für eine Präparation der DNA aus 500 ml Bakterienkultur bei Verwendung einer Qiagen-Ionenaustauschersäule mit der Kapazität für 500 μ g DNA (Maxi-Säule). Bei Verwendung von Säulen mit einer anderen Kapazität wurden die Mengen der eingesetzten Puffer und Kulturlösungen entsprechend den Herstellerangaben angepaßt.

In einem Kulturröhrchen wurden 5 ml LB-Selektivmedium (100 μ g/ml Ampicillin) mit einer plasmidhaltigen *E. coli* Kolonie von der Agarplatte beimpft (vgl. den vorherigen Abschnitt) und unter Schütteln bei 37°C für 4 bis 16 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml eines LB-Selektivmediums (100 μ g/ml Ampicillin) im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zum stationären Wachstum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde danach 10 min auf Eis gestellt, bei 4000 rpm und 4°C für 10 min in einer Sorvall-Zentrifuge mit dem Rotor SLA-3000 zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und für 10 min bei RT stehengelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte dann durch die Zugabe von 10 ml alkalischer SDS-Lösung (Puffer P2) - und 5 minütiger Inkubation bei RT. Nach der Zugabe von 10 ml eiskalter, saurer Natriumacetatlösung (Puffer P3) wurde die Suspension 30 min auf Eis gehalten und zur Abtrennung des Zelldebris bei 6000 rpm und 4°C für 30 min in einer Sorvall Zentrifuge (SS34-Rotor) zentrifugiert. Zur Entfernung nicht sedimentierter Zelltrümmer wurden diese anschließend mit Hilfe eines autoklavierten Kaffeefilters abgetrennt.

Das Filtrat wurde nun auf eine zuvor mit 10 ml QBT equilibrierte Ionenaustauschersäule gegeben, welche die Plasmid-DNA bindet. Danach erfolgte die Waschung der Säule mit 2 x 50 ml QC zur Entfernung der restlichen RNA und der Proteine. Die DNA wurde anschließend durch die Zugabe von 10 ml QF, einem schwach alkalischen und höherionigen Elutionspuffer, von der Säule eluiert.

Die Fällung der Plasmid-DNA aus dem Eluat erfolgte in einem nächsten Schritt durch die Zugabe von 0.7 Volumenteilen Isopropanol. Nach einer Fällungszeit von 30 min bei RT wurde die gefällte DNA bei 12.000 rpm, 4°C für 30 min (Rotor SS34) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig (!) dekantiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und dann für wenigen Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend erfolgte die Lösung der DNA in 0.5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) über Nacht

bei 4°C.

Alternativ wurde die DNA aus dem Elutionspuffer mit 0.5 Volumenteilen einer PEG-Fällungslösung und einer 1 h Inkubation auf Eis präzipitiert. Die Sedimentierung, Waschung und Resuspension der DNA erfolgte wie bei der Isopropanolfällung angegeben.

Die DNA-Konzentration wurde danach durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm, unter der Annahme das 50 µg/ml DNA eine Absorption von 1 OD/cm [159] haben, ermittelt. Zur Kontrolle auf eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen wurde außerdem die Absorption bei 280 nm gemessen. Die im Verlaufe der Untersuchungen präparierte DNA sollte ein Verhältnis der Absorptionswerte bei 260/280 nm zwischen 1.8 und 2.0 haben.

2.2.1.3 Restriktionsanalytische Kontrolle von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Identität der präparierten Plasmid-DNA wurde diese durch Restriktionsspaltungen untersucht. Eingesetzt wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die abhängig vom Restriktionsenzym innerhalb definierter DNA-Erkennungssequenzen die DNA an einer bestimmten Stelle schneiden.

Spaltansatz:

steriles, destilliertes Wasser	17 µl
Spaltpuffer (10fach)	2 µl
Plasmid-DNA (1.0 µg/µl)	1 µl
Restriktionsenzym (3-20 U/µl)	0.1 µl

Beim Herstellen des Restriktionsspaltansatzes wurde zuerst das Wasser, dann die DNA und der Spaltpuffer sowie zuletzt das Restriktionsenzym zugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C wurden 4 µl Ladepuffer zu den Spaltansätzen zugegeben und es erfolgte die Kontrolle der Spaltung durch eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA-Moleküle wandern in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Gleichspannungsfeld. Durch paralleles Auftragen von DNA-Fragmenten bekannter Länge (Marker) ist ein Abschätzen der Basenpaaranzahl eines DNA-Moleküls möglich. Die DNA-Banden werden durch den Zusatz von Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. Diese Substanz interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung durch UV-Strahlung.

Die in 1 x TAE-Puffer suspendierte Agarose wurde auf einer Heizplatte geschmolzen und auf 60°C abgekühlt. Danach wurde EtBr-Lösung zugesetzt (0.5 µg/ml EtBr im Gel) und die Agarose-Lösung blasenfrei in die vorbereitete Elektrophorese-Gelkammer gegossen. Nach 30 bis 60 min bei RT wurde der Gelkamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA wurde anschließend mit 0.2 Volumenteilen Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Zur Abschätzung der Basenzahl wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Dazu wurden die Produkte der Restriktionsspaltung des Enzyms Hind III mit der DNA des Lambda-Phagen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von etwa 10 V/cm (60-100 V).

Lipid	Molmasse*	Kopfgruppe	Ladung	Ankergruppe
DOTMA	676	Trimethylamin	1	Dioleylether
DDAB	631	quarternäres Amin	1	Diocetylgruppe
DOSGA	770	Guanidin	1	Dioleoylglycerol
DOCSPER	1191	T-Spermin	3	Dioleoyloxyglycerol
A-Chol	494	Alanin	1	Cholesterol
O-Chol	610	Ornithin	1	Cholesterol
Put-Chol	537	Putrescin	2	Cholesterol
DAC-Chol	537	Dimethylamin	1	Cholesterol
DC-Chol	537	Trimethylamin	1	Cholesterol
DCQ-Chol	626	Hydroxyethyl-dimethylamin	1	Cholesterol
Sp-Chol	721	T-Spermin	3	Cholesterol
<i>Neutrallipide</i>				
DOPE	744		0	DOPE
Chol	387		0	Cholesterol

Tabelle 2.3: **Übersicht über die zur Liposomenformulierung verwandten Lipide**

*inklusive Gegenion

Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mit Hilfe eines Herolab Geldokumentationssystems und eines UV-Tisches bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 312 nm.

2.2.2 Herstellung der Liposomen

2.2.2.1 Herstellung des Lipidfilms

Einen Überblick über die Bezeichnung und die Struktur der zur Herstellung der kationischen Liposomen verwandten Lipide gibt die Tabelle 2.3. Die kationischen Lipide und die Helferlipide wurden in Chloroform oder in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1/2; v/v) gelöst. Die Lipidkonzentration betrug 10 mg/ml. Zur Präparation des Lipidfilms wurden Helferlipid und kationisches Lipid in verschiedenen Verhältnissen gemischt und in ein 2 ml Glasprobenröhrchen überführt. Danach wurden die Proben in eine auf -20°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage überführt und dort für etwa 10 min zur Abkühlung belassen. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte anschließend über Nacht bei -20°C und einem Druck von 0.94 mBar. Am darauffolgenden Tag wurden die Probenröhrchen nach der vorsichtigen Belüftung der Gefriertrocknungsanlage entnommen und unter einer Laminarbox für etwa 10 min getrocknet. Die verschlossenen Probenröhrchen wurden dann bis zur Herstellung der Liposomen bei -20°C gelagert.

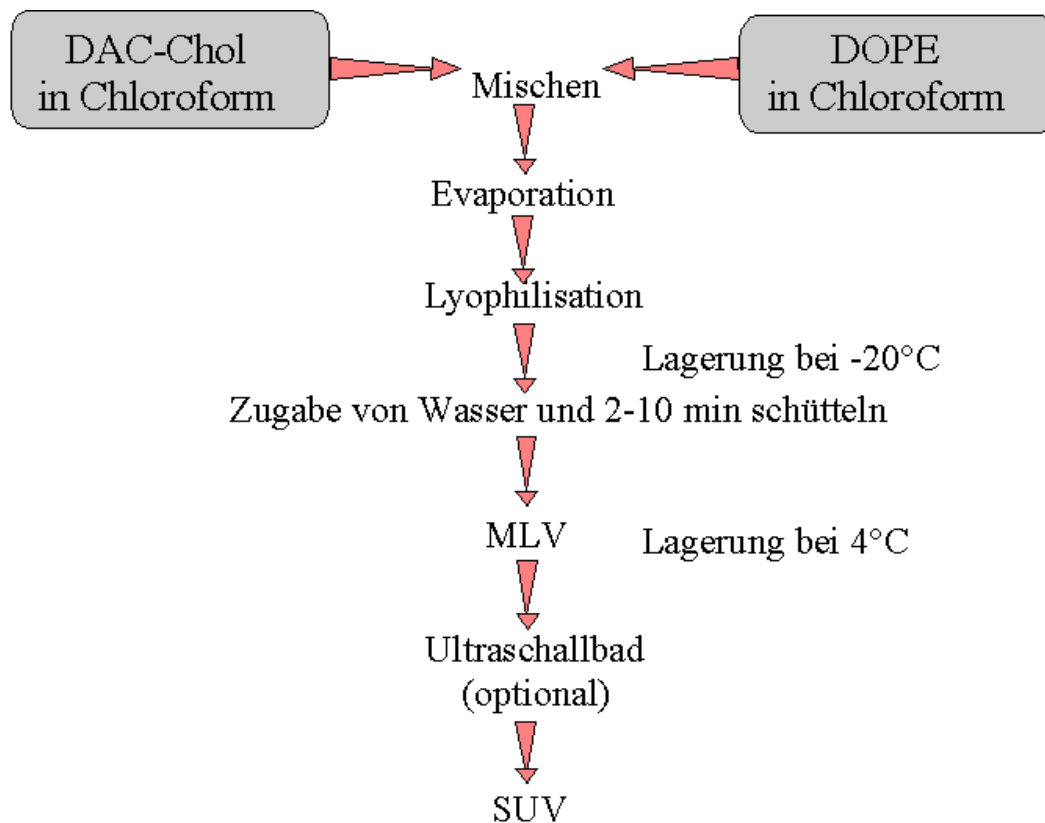


Abbildung 2.2: Schema zur Herstellung von DAC-Chol-Liposomen

2.2.2.2 Herstellung der Liposomen aus dem Lipidfilm

Zur Herstellung von Multischichtliposomen (MLV's) wurde deionisiertes Wasser zu den Lipidfilmen gegeben, die Glasprobenröhrchen fest verschlossen und die Vesikelbildung durch starkes Schütteln für 2 bis 10 min auf einem VF-2-Vortexer eingeleitet. Die Vesikelbildung wurde anhand des Vorhandenseins einer homogenen teilweise leicht opaleszierenden oder getrübbten Lösung und der vollständigen Emulgierung des Lipides bei Fehlen des Lipidfilmes beurteilt. Das Schütteln auf dem Vortexer erfolgte mindestens für 2, maximal für 10 min. Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV's) wurden die Liposomen anschließend für 10 min in einem Transsonic-570-Ultraschallbad bei 35 kHz inkubiert. Zum Ablauf der Liposomenbildung vergleiche auch die Abbildung 2.2.

Es wurden verschiedene liposomale Formulierungen jedes einzelnen kationischen Lipides hergestellt. Dabei wurden unterschiedliche Verhältnisse von kationischem Lipid und Helferlipid verwandt. Die Bezeichnung der Liposomen in der vorliegenden Arbeit folgt dabei der folgenden Regel:

Lipidkürzel^{*1}-Mengenanteil des kat. Lipides^{*2}-Helferlipidart/Mengenart^{*3} ¹

Dabei ist:

^{*1} der Kurzname des kationischen Lipides

¹Bsp.:

DAC-30 bedeutet 30 % DAC-Chol, 70 % DOPE (w/w),
 DOTAP-75M bedeutet 75 % Mol % DOTAP, 25 % Mol % DOPE und
 DOTAP-75C ist 75 % Mol % DOTAP und 25 % Mol % Cholesterol.



Abbildung 2.3: Zusammenhang von Masse und Mol % bei DAC-Chol- bzw. DC-Chol-(MW=537), DCQ-Chol-(MW=626), DOTMA-(MW=676) und DOCSPER-(MW=1191)Liposomen.

Als Helferlipid zur Liposomenformulierung wurde DOPE (MW=744) verwendet. Das Diagramm ist wie folgt zu interpretieren: wenn z.B. DAC-30-Liposomen mit 30 Masse % DAC-Chol (x-Achse) und 70 Masse % DOPE hergestellt werden, betragen die molaren Verhältnisse etwa 37 % DAC-Chol (y-Achse) und 63 % DOPE.

*² der Anteil am Gesamtlipid in %.

*³ (optional) Zusatz bei Verwendung molarer Verhältnisse (M), bzw. bei Einsatz von Cholesterin (C) als Helferlipid.

Zum Zusammenhang von Masse und Mol % bei der Herstellung der unterschiedlichen Mischungen von kationischem und Helferlipid vergleiche auch die Abbildung 2.3.

2.2.3 Herstellung der Lipoplexe

Beim Mischen von DNA und kationischen Liposomen im wässrigen Medium entstehen aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen spontan Komplexe zwischen der infolge der Phosphatbrücken negativ geladenen DNA und den durch die Aminogruppen positiv geladenen Liposomen.

Die Herstellung der Lipoplexe für die Transfektion der Zellen erfolgte nach einem von Felgner und Mitarbeitern [44] entwickelten Verfahren zur Testung kationischer Liposomen auf ihre Gentransfereigenschaften (vgl. Abb. 2.4). Sowohl die Liposomen als auch die DNA wurden dazu separat in zwei 96er Zellkulturschalen verdünnt. Die Standardkonzentrationen waren dabei 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 und 0,3 μg Lipid je 50 μl Verdünnungsmedium sowie 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06, 0,3 oder 0 μg DNA je 50 μl Verdünnungsmedium. Als Verdünnungsmedium wurde dabei entweder serum- und antibiotikafreies Zellkulturmedium oder Ringerlösung oder isotonische NaCl-Lösung verwendet. Nach der Verdünnung von Liposomen und DNA wurde die DNA-Lösung zu den Liposomen gegeben und die Mischung zur Lipoplexbildung für 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Abweichungen zu den hier beschriebenen Standardbedingungen wird im Ergebnisteil hingewiesen.

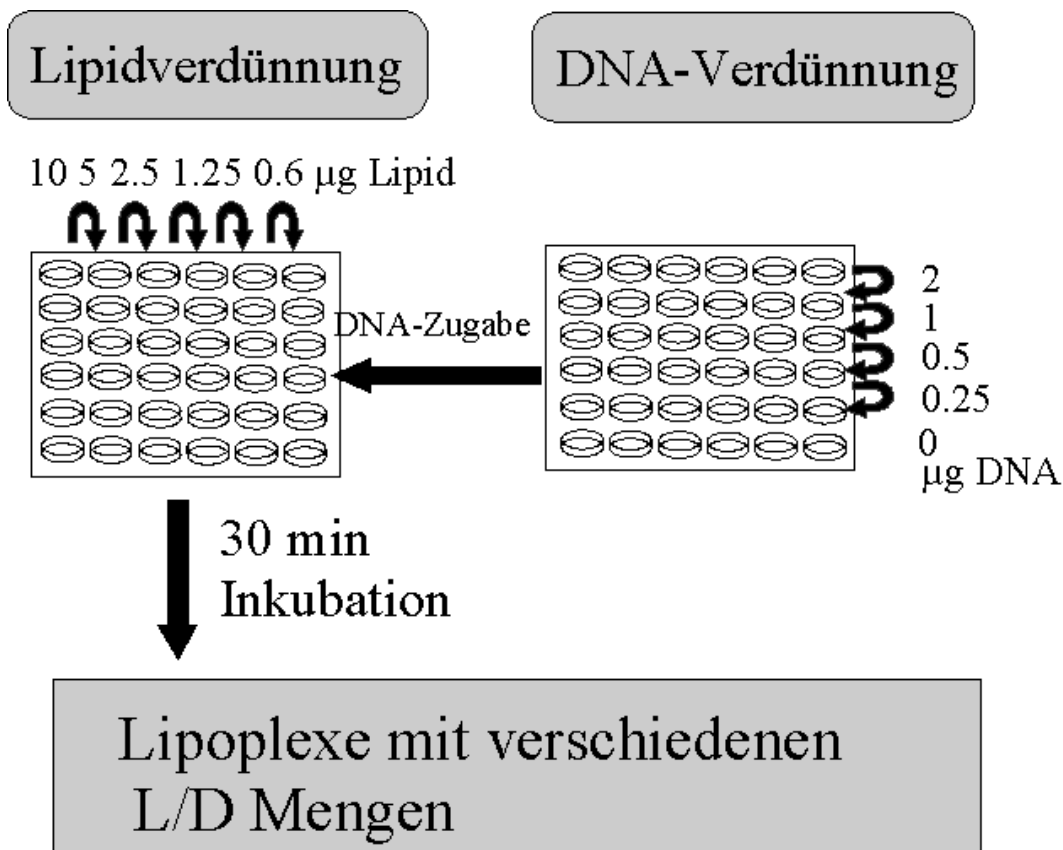


Abbildung 2.4: Schema zur Herstellung von Lipoplexen

2.2.4 Herstellung der Lipopolyplexe

Die Komplexierung der DNA vor der Liposomenzugabe mit Polykationen wie PS und PLL führt zur Bildung von Vesikeln, die auch als Lipid-Polykation-DNA-Partikel (LPD-Partikel) bezeichnet werden. In dieser Arbeit werden diese Gentransfervesikel in Anlehnung an die von Felgner und Mitarbeitern [45] vorgeschlagenen Nomenklatur auch als Lipopolyplexe bezeichnet (vgl. Abb. 1.2).

Zur Herstellung solcher Vesikel wurde die DNA in Ringerlösung auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und anschließend mit dem gleichfalls in Ringerlösung auf Konzentrationen von 2.5 bis 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnten PS oder PLL vermischt. Nach 5-10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe der Polyplexe zu den bereits vorher in Medium verdünnten Liposomen. Zur Bildung der Lipopolyplexe wurde die Mischung weitere 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Biophysikalische Untersuchungen

2.2.5.1 Bestimmung der statischen und der dynamischen Lichtstreuung

Die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung mit Hilfe der Photonenkorrelationspektroskopie dient der Größenbestimmung und der Analyse der Größenverteilung von Partikeln [30, 31]. Das Meßprinzip beruht auf der Tatsache, daß kleinere Partikeln schneller als größere diffundieren. Dies führt bei kleineren Partikel zu kürzeren zeitlichen Abständen bei der Veränderung des Streulichtes eines durch die Probe gehenden

Laserstrahles als bei größeren Partikeln. Diese Schwankungen der Streulichtintensität werden zur Bestimmung der Teilchengröße herangezogen. Die statische Lichtstreuung charakterisiert demgegenüber die nicht zeitabhängige Lichtstreuung (Trübung). Diese kann eingeschränkt zur Abschätzung der Größe von Partikeln bzw. zur Detektion von Größenveränderungen, z.B. nach der Zugabe von DNA, genutzt werden. Die Trübung des Mediums durch die Liposomen bzw. die entstehenden Lipoplexe deutet auf die Anwesenheit von Partikeln mit Durchmessern im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes hin. Eine Zunahme der Trübung des Komplexierungsmediums ist daher ein Hinweis auf eine Vergrößerung des Anteils an Gentransfervesikeln im Größenbereich von mehreren hundert nm.

Für die Bestimmung der Trübung, d.h. der statischen Lichtstreuung wurde der Mikrotiterplatten-Reader der Fa. SLT-Tecan verwendet. Die Liposomen wurden in Ringerlösung verdünnt und in eine 96-MTP-Platte pipettiert. Die Bestimmung der Lichtstreuung erfolgte bei Wellenlängen von 405 und 690 nm. Auch die Bildung der Lipoplexe und der Lipopolyplexe wurde direkt in den Wells der 96er-Mikrotiterplatte vor und nach der Mischung der Komponenten durch Messen der Lichtstreuung bei 405 oder 690 nm kontrolliert. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung zur Größencharakterisierung erfolgte an einem N4-Plus-Partikelmeßgerät der Fa. Coulter-Electronics. Dazu wurden die Liposomen in einer 3 ml Küvette mit 1.7 ml sterilem, filtriertem Wasser soweit verdünnt, daß das Meßsignal zwischen 0.5×10^4 und 1×10^6 Partikeln/s betrug. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Partikelgrößen mit Hilfe der Mehrwinkelanalyse. Es wurde jede Probe zweifach vermessen um Meßungenauigkeiten durch Systeminstabilitäten auszuschließen. Die Messung erfolgte für 2×120 s bei Meßwinkeln von 15, 23, 30, 61 und 90 Grad. Der Wert für den Meßwinkel von 90 Grad, der bei Annahme einer unimodalen Verteilung errechnet wurde, wurde als ein relatives Maß für die durchschnittliche Größe aller Liposomen der Gesamtpopulation gewertet. Bei kleineren Meßwinkeln dominiert dagegen das Streulichtsignal der größeren Partikel. Aus der Differenz der Meßwerte bei den verschiedenen Meßwinkeln, lassen sich Rückschlüsse über die Anteile und die Breite der Verteilung der einzelnen Liposomengrößen ziehen [132].

2.2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese der Lipoplexe

Die Darstellung der Oberflächenladung der Lipoplexe erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der Ladung bzw. dem Komplexierungsgrad durch die Liposomen, wandert die DNA im elektrischen Feld. Die Lipoplexe wurden in isotonischer NaCl-Lösung präpariert (vgl. Abschnitt 2.2.3). Ein konstanter Betrag an Plasmid-DNA wurde dabei mit verschiedenen Mengen an kationischen Liposomen gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0.2 Volumenteile Ladepuffer hinzugegeben und die Ansätze gemischt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Analyse der Lipoplexe in einem 1 % Agarose-Gel mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ EtBr in TAE-Puffer. Die EtBr markierte DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators und des Geldokumentationssystems der Fa. Herolab sichtbar gemacht und dokumentiert.

pH	0.2 M CH ₃ COOH	0.2 M NaCH ₃ COO	0.2 M Na ₂ HPO ₄	0.2 M NaH ₂ PO ₄	0.1 M NaHCO ₃	0.1 M Na ₂ CO ₃	0.2 M NaOH
4	90	10					
4.5	57	43					
5	30	70					
5.5	12	88					
6			12	88			
6.5			30	70			
7			60	40			
7.4			80	20			
8			94	6			
9.2					10	90	
10					60	40	
10.8					90	10	
12							100

Tabelle 2.4: **Mischungsschema zur Herstellung der verschiedenen Stammpuffer für die HC-Fluoreszenzuntersuchungen**

(nach Müller [111]) Bsp.: Zur Herstellung von 1 l eines 0.02 M NaAcetat-Puffers (pH 4.5) wurden 57 ml 0.2 M CH₃COOH und 43 ml NaCH₃COO gemischt und anschließend mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

2.2.5.3 Fluoreszenzuntersuchungen mit Hilfe des pH-abhängigen Fluorophores 4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Liposomeneigenschaften erfolgte mit Hilfe des pH-sensitiven Fluorophores HC. Dieses wird in die Liposomenmembran eingelagert und erlaubt die Bestimmung von Liposomeneigenschaften der Membranoberfläche [172]. Es handelt sich bei der fluoreszierenden Kopfgruppe des HC's, dem Hydroxycoumarin, um eine schwache Base. Bei pH-Werten unter dem pKa-Wert der Kopfgruppe beträgt die maximale Anregungswellenlänge etwa 320 nm, bei pH-Werten die größer als der pKa-Wert sind, ist das Anregungsmaximum auf 380 nm verschoben. Die Anregungswellenlänge von etwa 330 nm ist der sogenannte isobestische Punkt an welchem

die Fluoreszenz unabhängig vom pH-Wert ist. Der Wert repräsentiert demzufolge die absolute Menge an Fluorophor in der Membran und kann zur Normierung der Messung genutzt werden. Die elektrostatischen Eigenschaften des Fluorophores erlauben es, den Dissoziationsgrad des in der Liposomenmembran inserierten HC's anhand des Verhältnisses der Lichtemission bei Anregungswellenlängen von 380 und 330 nm zu bestimmen und aus diesen Daten können Rückschlüsse auf den pH-Wert an der Liposomenoberfläche gezogen werden.

Die Formulierung der Liposomen erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2 (S. 42ff) beschrieben. Zu den in Chloroform gelösten Lipiden wurde jedoch vor der Evaporation bzw. Lyophilisation des Lösungsmittels außerdem 1×10^{-8} M HC, gelöst ebenfalls in Chloroform, zu je 10^{-6} M Gesamtlipid hinzugegeben.

Nach der Herstellung der Liposomen durch Zugabe von 1 ml deionisiertem Wasser wurden sie in 20 mM Pufferlösung (pH 3.7-12.0; vgl. Tab. 2.4) auf eine Lipid-Konzentration von 1×10^{-13} M verdünnt. Nach 20 min Inkubation erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz des in die Membran inserierten Fluorophores bei Anregungswellenlängen von 330 und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Dazu wurden 15 μ l des Lipides in 3 ml Puffer verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Dann erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz am LS-50B-Lumineszenz-Spektrometer. Der Anteil an protonisiertem HC wurde näherungsweise durch die Bestimmung des Verhältnisses der Emissionen bei den unterschiedlichen pH-Werten nach folgender Formel bestimmt.

$$P = \frac{Em_{pH12}}{Em_{pH7.4}} \quad (1)$$

Dabei drückt „P“ die HC-Protonisierung in % aus und „Em“ das Verhältnis der Lichtemissionen bei den Anregungswellenlängen 380 und 330 nm. Der pH-Wert auf der Liposomenoberfläche wurde näherungsweise durch den Vergleich mit der HC-Protonisierung von neutralen DOPC-Liposomen bei verschiedenen pH-Werten bestimmt.

2.2.5.4 Messung des Ausschlusses von Ethidiumbromid

Die Komplexierung der DNA durch kationische Liposomen bzw. kationische Polymere verhindert das Interkalieren des Fluoreszenzmarkers EtBr in den DNA-Doppelstrang. Das Messen der EtBr/DNA-Fluoreszenz kann daher als Maß der DNA-Komplexierung bzw. zur Bestimmung der Stärke der Interaktion zwischen DNA und dem kationischen Komplexierungsagents genutzt werden.

Zur Untersuchung des EtBr-Ausschlusses wurde nach der Herstellung der Lipoplexe ein Aliquot (100 μ l Medium mit 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 und 0 μ g Lipid bzw. 1, 0.33 und 0.1 μ g DNA) mit jeweils 100 μ l EtBr-Lösung (1 μ g/ml EtBr in 150 mM NaCl) gemischt. Etwa 20 min später wurde die Fluoreszenz an dem BMG-Fluostar der Fa. SLT-Tecan bei einer Wellenlänge von 590 nm (Anregungswellenlänge 540 nm; Anregungstärke 100) bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der SLT-Software EASY-BASE.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Cathleen Lehmann, einer Doktorandin in unserer Gruppe, durchgeführt. Die Liposomen bzw. die Lipoplexe wurden

auf ein mit Kohle beschichtetes Kupfergitter aufgetropft, für etwa 15 Minuten getrocknet und anschließend durch Zugabe von 2 % wässriger Uranylacetatlösung fixiert. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Proben an einem JEM-100-CX-Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

2.2.7 Zellkultur

Die Zellen wurden in Medien kultiviert, welche Salze, Aminosäuren, Vitamine und Kohlenhydrate entsprechend den extrazellulären physiologischen Bedingungen enthielten. Die pH-Wert-Stabilisierung der Zellkultur erfolgte durch ein HEPES- oder ein Karbonatpuffersystem. Als Quelle von Wachstumsfaktoren wurde fötales Kälberserum (FKS) und zur Vermeidung bakterieller Infektionen wurden Antibiotika zugesetzt. Mewo, MCF7, K562 und CC531-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, MaTu, F98-Zellen in DMEM sowie N64-Zellen in MEM kultiviert. Alle Medien enthielten 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycinsulfat und 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin. Die Zellen wurden bei 5 % $\text{CO}_2/95$ % Luft und 37°C im Zellkulturinkubator kultiviert. Zur Subkultivierung adhärent wachsender Zellen wurden diese mit PBS-Puffer gewaschen und mit 0.05 % Trypsin-Medium für 2-5 min bedeckt. Danach wurde die Trypsin-Lösung abgegossen, frisches Medium zugegeben und die sich langsam ablösenden Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Anschließend wurde frisches Medium mit 10 % FKS zugesetzt. Die nicht adhärent wachsenden K562-Zellen wurden aller 2-3 Tage in einem 15 ml Polypropylenröhrchen bei 800 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge sedimentiert und in frischem RPMI-Medium aufgenommen.

Nach der Trypsinierung, bzw. der Zentrifugation und Resuspendierung, wurde ein Aliquot der Zellen mit 0.1 Volumenteilen Trypanblau-Lösung versetzt und die lebenden, nicht blau gefärbten Zellen, unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden anschließend auf eine Zellzahl von etwa 0.1 Mio/ml, bzw. 0.5 Mio/ml bei K562-Zellen, verdünnt und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Alternativ erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch eine Trübungsmessung am SLT-MTP-Photometer bei 690 nm (vgl. [110]). Dazu wurden 300 μl der Zellsuspension in ein Well einer 96er MTP pipetiert und die Lichtstreuung gemessen. Nach Abzug des Blindwertes wurden die Zellen auf eine optische Dichte von 0.02 per 300 μl und Well verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche umgesetzt.

2.2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dabei gibt es zwei prinzipielle Formen: Bei der *transienten* Transfektion wird das Plasmid in den Zellkern gebracht und dort extrachromosomal transkribiert. Nach 24 bis 72 h wird die Genaktivität bestimmt. Die Plasmid-DNA wird bei der Zellteilung nicht vermehrt und deswegen sinkt die Genexpression des applizierten Genes kontinuierlich. Bei einer *stabilen* Transfektion hingegen wird das Plasmid in das Wirtsgenom integriert bzw. im Zellkern episomal vermehrt und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Die transfizierten Zellen können hierbei auch über ein Resistenzgen selektiert werden.

Die Höhe bzw. die Regulierung der Genexpression nach einem Gentransfer kann am einfachsten durch die Kopplung von Promotoren bzw. Enhancern mit sogenann-

ten Reporterengen, deren Expressionsrate leicht zu bestimmen ist, untersucht werden. Außerdem ist es möglich durch Färbungsreaktionen bzw. durch die Expression fluoreszierender Proteine die transfizierten Zellen und damit die Transfektionsrate zu bestimmen.

Für die Gentransferuntersuchungen wurden 96-Well-Flachbodenzellkulturplatten genutzt. Am Tag 0 wurden etwa 10.000 bis 20.000 Zellen in 100 μl Medium mit 10 % FKS je Well ausgesät. Am Tag 1 erfolgte die Präparation der Lipoplexe entsprechend dem Mischungsschema von Felgner und Mitarbeitern [44]: Das Lipid wurde in einer separaten Platte in serumfreiem Medium zweifach verdünnt; von 10 μl Lipid per Well beginnend bis zu 0.31 μg Lipid per Well in einem Gesamtvolumen von 50 μl . Anschließend wurde die DNA separat auf einer anderen 96-Well-Platte ebenfalls zweifach verdünnt; von 2 bis zu 0.03 μg in 50 μl serumfreiem Medium (vgl. Abb. 2.4). Nach der Zugabe der DNA zu den Liposomen wurde das Gemisch für etwa 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Komplexe zu den Zellen. Die resultierende Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 %. Nach einer Inkubation von 3 bis 5 h wurden entweder 100 μl Medium mit 20 % FKS zugegeben oder es erfolgte ein Mediumwechsel durch das Entfernen des Transfektionsmediums und die Zugabe frischen 10 % FKS enthaltenden Mediums. Danach wurden die Zellen für 24 bis 72 h zur Expression des applizierten Gens im Brutschrank inkubiert. Der schematische Ablauf der Transfektion und der nachfolgenden Bestimmung von Reporterengenexpression und Zellvitalität ist in der Abb. 2.5 dargestellt.

2.2.9 Bestimmung von Reporterengenaktivität und Zellvitalität

Die meisten Methoden der Genapplikation sind von Schädigungen der Zielzellen begleitet. Die bisher für die Untersuchung des Gentransfers eingesetzten Verfahren erlaubten entweder die Bestimmung der Toxizität der Transfektionsmethode oder die Bestimmung der Effizienz der Transfektion durch das Messen der Reporterengenexpression. Mit Hilfe eines in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Testverfahrens [60, 59] konnte die Bestimmung der Zellvitalität und die Bestimmung der Reporterengenexpression nacheinander direkt in der Zellkulturschale durchgeführt werden. Die Zellvitalität wurde anhand der in der Zelle vorhandenen sauren Phosphatase und die Reporterengenexpression anhand der Aktivität des nach der Transfektion exprimierten β -Gal-Enzymes bestimmt. Dabei wurde das unterschiedliche Absorptionsspektrum der Reaktionsprodukte der Enzymreaktionen, p-Nitrophenol (gelb) und Chlorphenolrot (rot) genutzt.

24 bis 72 h nach Transfektion des lacZ-Reportergenkonstruktes erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität bzw. der Toxizität der Lipoplexe sowie der Reporterengenexpression. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen wurden nachfolgend einmalig mit 100 μl HBSS-Lösung gewaschen. Danach wurden 80 μl des sauren Phosphatase-Testpuffers (D1), mit dem Substrat pNPP und mit dem Detergenz Triton X-100 für die Zell-Lyse, hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die saure Phosphatasereaktion durch die Zugabe von 20 μl schwach basischem Puffer D2 abgestoppt. Die Zellzahl wurde dann im Vergleich von transfizierten und nicht transfizierten Kontrollzellen anhand der p-Nitrophenolabsorption bei 405 nm kalkuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl des β -Gal-Testpuffers (D3) mit dem Substrat CPRG. 2 min bis 24 h nach der Zugabe des Puffers D3, je nach Höhe der Genexpression, wurde die β -Gal-Expression mit Hilfe der Messung der optischen Ab-

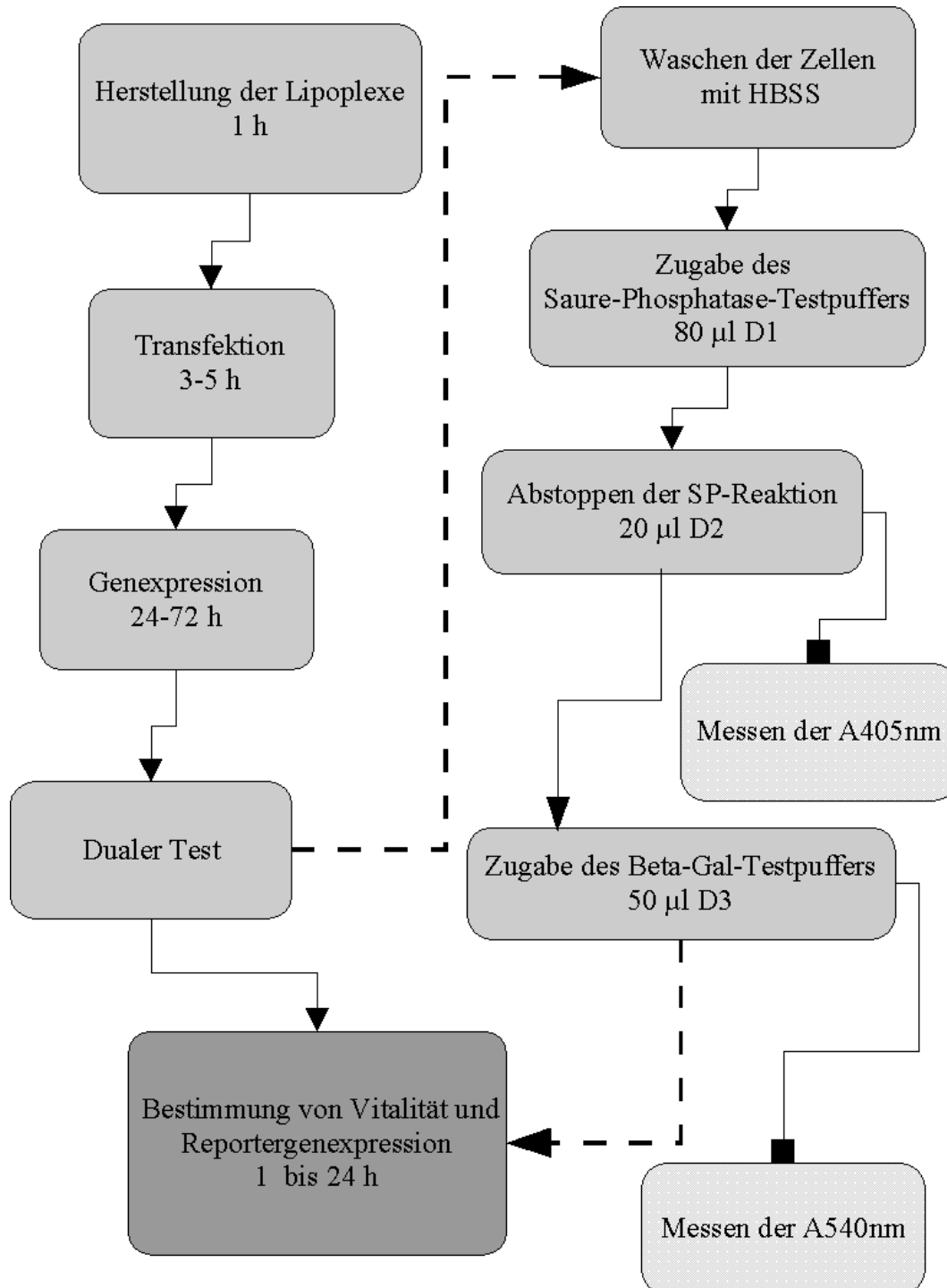


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Transfektionsverfahrens und des dualen Testes zur Bestimmung von Reporterexpression und Zellvitalität

sorption bei 540 nm bestimmt. Die Gesamthöhe der Expression wurde auf Werte einer β -Gal-Eichkurve bezogen, welche in der gleichen Weise wie die Zellen behandelt worden waren. Eine schematische Darstellung des Ablaufes des Assays ist im rechten Teil der Abbildung 2.5 dargestellt.

2.2.10 Bestimmung der Anzahl der transfizierten Zellen

2.2.10.1 X-Gal-Färbemethode

Die Expression des Enzymes β -Gal kann auch zum Sichtbarmachen einzelner transfizierter Zellen durch eine Färbereaktion ausgenutzt werden. Das Substrat X-Gal wird dabei innerhalb der Zelle durch das Expressionsprodukt des lacZ-Reportergens, β -Gal, in ein wasserunlösliches, blaugefärbtes Produkt umgewandelt.

Etwa 48 bis 72 h nach der Transfektion des pUT651-Plasmides wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Fixierlösung überschichtet und für 4 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und die X-Gal-Substratlösung hinzugegeben. Nach etwa 2-3 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf ihre β -Gal-Expression untersucht. Zur Ermittlung der Transfektionsrate wurden sowohl die transfizierten als auch die nicht transfizierten Zellen in 3 bis 5 zufällig ausgewählten Feldern ausgezählt. Um die Zellen für eine längere Zeit aufzubewahren, wurde danach die Substratlösung entfernt und die Zellen in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.10.2 Analyse der GFP-Reportergenexpression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die Expression des Reportergens für das grün-fluoreszierende Protein kann zur Sichtbarmachung transfizierter Zellen ohne den Zusatz von Substraten mittels der Analyse der Zellfluoreszenz direkt in der Zellkulturschale genutzt werden.

Etwa 48 bis 72 h nach der Transfektion des pEGFPC1-Plasmides wurde zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und darin bis zur Analyse der Genexpression aufbewahrt. Die Bestimmung der Transfektionsrate erfolgte an einem Olympus IX-70-Fluoreszenzmikroskop. Zur Anregung der Grünfluoreszenz wurde blaues Licht verwendet. Die Ermittlung der Anzahl der transfizierten Zellen erfolgte durch die Auszählung sowohl von transfizierten als auch von nicht transfizierten Zellen in 3 bis 5 zufällig ausgewählten Feldern.

2.2.10.3 Untersuchung der GFP-Reportergenexpression mit Hilfe der FACS-Analyse

Etwa 500.000 K562-Zellen wurden mit Lipoplexen bestehend aus der Plasmid-DNA pEGFPC1 und verschiedenen liposomalen Formulierungen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die K562-Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 800 rpm in der Varifuge-3.0R bei 150 g sedimentiert und anschließend zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300 μ l PBS aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und bis zur Analyse der Reportergenexpression auf Eis gelagert.

Für die FACS-Analyse wurden 200 μl der Zellen mit 200 μl einer FACS-Rinse-Lösung der Fa. Becton-Dickenson verdünnt und es wurde 1 μl Propidiumiodid-Lösung (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Analyse der Zellvitalität zugesetzt. Nach einer einminütigen Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen am FACS-Scan auf ihre Lichtstreuung sowie auf die GFP- und die PI-Fluoreszenz untersucht. Die Analyse der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der FACS-Software WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, <http://scripps.edu/>).

Kapitel 3

Ergebnisse

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden die Resultate der Untersuchungen zur Größe und Struktur sowie zu den biophysikalischen Eigenschaften der Liposomen bzw. der aus ihnen hergestellten Gentransfervesikel vorgestellt. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Transfektionsversuche präsentiert und ihre Beziehungen zur Biophysik der Transfervesikel und zu den Versuchsbedingungen dargelegt.

3.1 Biophysik der Gentransfervesikel

3.1.1 Eigenschaften der Liposomen

3.1.1.1 Größe und Struktur der kationischen Liposomen

Nach der Lyophilisierung der in Chloroform gelösten Lipide und der Zugabe von deionisiertem Wasser entstanden nach 2-10 min starkem Schütteln multilamellare Vesikel verschiedener Größenklassen oder auch mizellare Strukturen. Die untersuchten kationischen Lipide unterschieden sich dabei in Abhängigkeit von der chemischen Struktur hinsichtlich ihrer Liposomenbildungsfähigkeit.

Wie die optische Analyse, PCS-Untersuchungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, genügte bei den meisten der untersuchten kationischen Lipide eine Formulierung mit dem Helferlipid DOPE und die Zugabe von Wasser zum getrockneten Lipidfilm, um durch starkes Schütteln multilamellare Vesikel im Größenbereich von etwa 200 bis 1000 nm herzustellen. Wurde auf den Zusatz eines Helferlipides verzichtet, bildeten die kationischen Lipide DOTAP, DCQ-Chol und DOCSPER sehr kleine Liposomen (<100 nm), das Lipid Sp-Chol dagegen mizellare Strukturen aus. Im Gegensatz dazu entstanden bei Verwendung der Lipide DOTMA und DAC-Chol Liposomen die etwa 500 bzw. fast 1000 nm groß waren. Aus den kationischen Lipiden DC-Chol und DDAB entstanden dagegen ohne den Zusatz von Helferlipiden keine stabilen Vesikel (vgl. Tab. 3.1). Diese Lipide bildeten nach dem Lyophilisieren auch keinen Lipidfilm aus. Bei DC-Chol wurde das Auftreten eines öligen Tropfens und bei dem Lipid DDAB die Bildung eines kristallinen Pulvers beobachtet. Während der Herstellung von Liposomen aus diesen beiden Lipiden wurden nach dem Schütteln des Lipidfilmes mit deionisiertem Wasser größere Präzipitate beobachtet. Diese lösten sich auch nach einer Ultraschallbehandlung nicht auf.

Zur genaueren Untersuchung der Größe der Liposomen wurde im weiteren die Mehr-

	Mol %			
	100	75	50	25
DAC-Chol	L	L	L	L
DC-Chol	P	L	L	L
DCQ-Chol	M	L	L	L
Sp-Chol	M	M	M	L
DOTMA	L	L	L	L
DOTAP	M	L	L	L
DDAB	P	P	L	L
DOCSPER	M	L	L	L

Tabelle 3.1: **Einfluß des Helferlipidanteils auf die Vesikelbildung**

L=Liposomen; P=Präzipitate; M=Mizellen. Bei Vorliegen einer schwach trüben bzw. opaleszierenden Lösung wurde davon ausgegangen, daß liposomale Strukturen, bei einer klaren Lösung mit Detergenzeigenschaften, daß Mizellen vorhanden sind. Sichtbare Agglomerate, die sich auch durch Ultraschall nicht entfernen ließen, führten zur Einstufung der Vesikelbildung als Präzipitat.

winkelanalyse der PCS angewandt. Diese Technik erlaubt die Detektion weniger großer Partikel und ein Abschätzen der Größenverteilung in einer Gesamtpopulation [132].

Bei einem Zusatz des Helferlipides DOPE zu den kationischen Lipiden nahm die Größe der aus den polykationischen Lipiden Sp-Chol oder DOCSPER präparierten Liposomen mit steigendem Gehalt an Helferlipid zu. Wenn z.B. bei Sp-Chol-Liposomen der Gehalt an Helferlipid von 50 auf 90 % (w/w) erhöht wurde, stieg die mittlere Größe der Liposomen von etwa 200 nm auf über 600 nm an (vgl. Abb. 3.1). Die Ergebnisse zeigen weiter, daß Sp-Chol-Liposomen mit 10 % (w/w) kationischem Lipid eine recht homogene Größenverteilung bei 600-800 nm haben. Bei Liposomen mit 20 % Sp-Chol hat der überwiegende Teil der Liposomen dagegen eine mittlere Größe von etwa 400-600 nm, es kommen aber auch wenige Liposomen mit 750 bis 1000 nm Durchmesser vor. Der sigmoidale Anstieg der Größenwerte für die niedrigeren Meßwinkel läßt auf einen geringen Anteil an größeren Liposomen schließen. Bei Sp-Chol-Liposomen mit 50 % Helferlipidanteil sinkt die mittlere Größe auf etwa 100 nm ab und es gibt nur wenige Liposomen die größer als 250 nm sind. Eine Formulierung des Sp-Chol's ohne Helferlipid führte dagegen zur Bildung von Mizellen die mit Hilfe der PCS-Methode nicht vermessen werden konnten.

Bei Liposomen, die aus dem Glycerolderivat DOCSPER und den monokationischen Lipiden DAC-Chol, DC-Chol, DCQ-Chol, DOTMA, DOTAP und dem Helferlipid DOPE hergestellt worden waren, bildeten sich wie die Ergebnisse der PCS zeigten, größere Liposomen mit Durchmessern von mehreren 100 nm. Diese relativ großen Vesikel wurden durch eine 10 min Inkubation der Liposomen in einem Ultraschallbad, in Abhängigkeit von der Intensität der Beschallung, auf etwa 100 bis 200 nm, DOTAP-

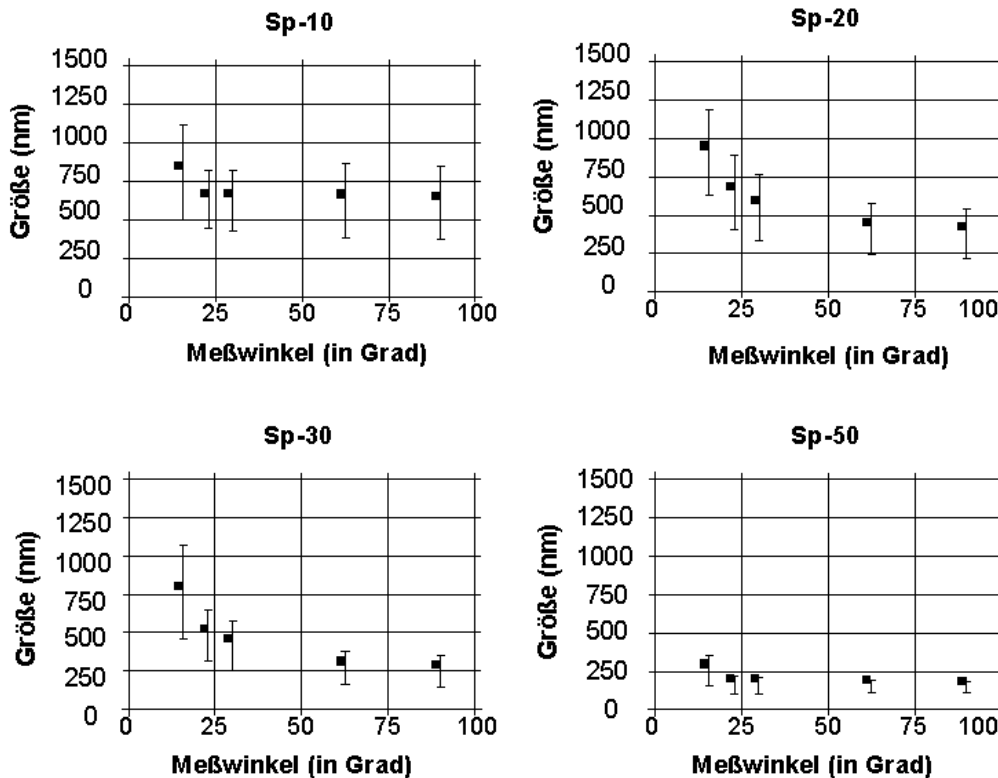


Abbildung 3.1: Einfluß des DOPE-Anteiles auf die Größe von Sp-Chol-Liposomen

Sp-Chol-Liposomen wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen von kationischem zu Helferlipid hergestellt. Die Anteile an Sp-Chol betragen 10, 20, 30 oder 50 % (w/w).

Liposomen sogar auf weniger als 100 nm, verkleinert. Nach einer mehrtägigen Lagerung der Liposomen bei 4°C wurden keine nennenswerten Größenveränderungen festgestellt.

Bei Liposomen die aus DC-Chol oder DAC-Chol sowie DOPE hergestellt wurden, nahm mit zunehmendem Anteil an Helferlipid die Liposomengröße von >1000 nm, bei DAC-Chol ohne Helferlipid, auf etwa 300-400 nm bei 25 Mol % ab. Bei der Beschallung sank die Liposomengröße bei allen untersuchten liposomalen Formulierungen dann auf etwa 125 nm. Nur DAC-Chol-Liposomen die mit 50 % Helferlipid formuliert worden waren, blieben auch nach der Ultraschallbehandlung etwa 500 nm groß.

Die exakten Größen der Liposomen schwankten erheblich in Abhängigkeit von der Stärke und Dauer der Ultraschallbehandlung bzw. des Schüttelns. Generell wurde beobachtet, daß bei höherem Energieeintrag in das System die Größe der Liposomen abnahm. Aus diesem Grunde wird an dieser Stelle auf eine Auflistung der Meßwerte der PCS-Untersuchungen für die einzelnen liposomalen Formulierungen verzichtet.

Im Gegensatz zu den anderen kationischen Liposomen bildete das doppelkettige Lipid DDAB wenn es mit DOPE hergestellt worden war, auch nach einer Ultraschallbehandlung von über 20 min keine stabilen Liposomen aus. Die sichtbaren Präzipitate verblieben auch bei intensiver Beschallung in der Suspension. Eine alternative Herstellung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, die zu einem dünneren Lipidfilm führt, ergab dagegen bei einem Masseverhältnis von 30 % DDAB und 70 % DOPE eine Formulierung ohne sichtbare Präzipitate.

Es ist festzustellen, daß es bei den polykationischen Liposomen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Helferlipidanteil und der Liposomengröße gab. Bei den Cholesterolderivaten DAC-Chol und DC-Chol nahm hingegen die Größe der Liposomen mit einem zunehmenden Anteil des Helferlipides ab. Bei den übrigen monokationischen Lipiden war hingegen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Menge an Helferlipid und der Vesikelgröße festzustellen. Die Lipide DC-Chol und insbesondere DDAB zeigten im Vergleich zu den anderen Lipiden schlechtere Liposomenbildungseigenschaften, wobei DDAB sich nur bei der Herstellung des Lipidfilmes in Rundkolben mit großer Oberfläche in liposomale Vesikel einbinden ließ.

3.1.1.2 Bestimmung elektrostatischer Parameter mittels 4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin

Wie die durchgeführten Untersuchungen beweisen, ist die Höhe des Verhältnisses der Lichtemission bei den Anregungswellenlängen 380 bzw. 330 nm abhängig vom pH-Wert des Dispersionsmediums (vgl. Abb. 3.2A): Je höher der pH-Wert, desto höher die Lichtemission bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Dagegen ist die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm relativ konstant. Dies entspricht dem isobestischen Punkt des Fluorophores.

Außerdem ist die Höhe der HC-Protonisierung, d.h. der pH-Wert auf der Vesikeloberfläche bei physiologischem pH-Wert im Dispersionsmedium, abhängig vom Anteil des kationischen Lipides in der Membran. So stieg bei einem pH-Wert von 7.4 im Umgebungsmedium mit der Zunahme des Anteils an kationischem Lipid die Fluoreszenz bei 380 nm und damit das Verhältnis der Lichtemissionen bei einer Anregung von 380 bzw. 330 nm (im folgenden als 380/330er Wert bezeichnet) stark an (Abb. 3.2B). Bei 50 und 25 Mol % kationischem Lipid waren dabei zwischen DOTAP, DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol nur geringe Unterschiede im elektrostatischen Verhalten der Liposomen festzustellen. Bei 75 und 100 Mol % kationischem Lipid war dagegen bei DCQ-Chol-Liposomen die HC-Protonisierung besonders hoch, während sie bei DOCSPER-Liposomen bei allen Mol-Verhältnissen unter den Werten der anderen liposomalen Formulierungen lag.

In weiteren Untersuchungen wurde bei DOTAP-Liposomen mit unterschiedlichem Anteil an Helferlipid der Einfluß des pH-Wertes auf die HC-Protonisierung untersucht (Abb. 3.2C). Bei allen untersuchten Liposomen stieg der Anteil des protonisierten HC in der Membran bei einer Erhöhung des pH-Wertes im Umgebungsmediums an. Dabei erfolgte bei Liposomen mit hohem Anteil an kationischem Lipid die HC-Protonisierung bei einem niedrigeren pH-Wert als bei Liposomen mit geringerem Anteil an kationischem Lipid. So war bei Liposomen mit 100 Mol % DOTAP bei pH 7.4 das HC zu fast 100 % protonisiert, während bei DOTAP-Liposomen mit 25 Mol % und 50 Mol % DOTAP bei pH 7.4 weniger als 50 % der HC-Moleküle protonisiert waren. Die Liposomen mit 25 Mol % DOTAP erreichten erst bei einem pH-Wert von 9.2 eine vollständige Protonisierung des Fluorophores.

Weiterhin hatte auch die Art des zugesetzten Helferlipides Einfluß auf die Höhe der HC-Protonisierung. Bei DOTAP- (Abb. 3.2D) und bei DOCSPER-Liposomen (nicht gezeigt) die mit Cholesterol als Helferlipid hergestellt wurden, war der Grad der HC-Protonisierung größer als bei Liposomen die mit DOPE hergestellt worden waren.

Um den Einfluß der Ionenkonzentration und des Puffersystems auf die HC-Pro-

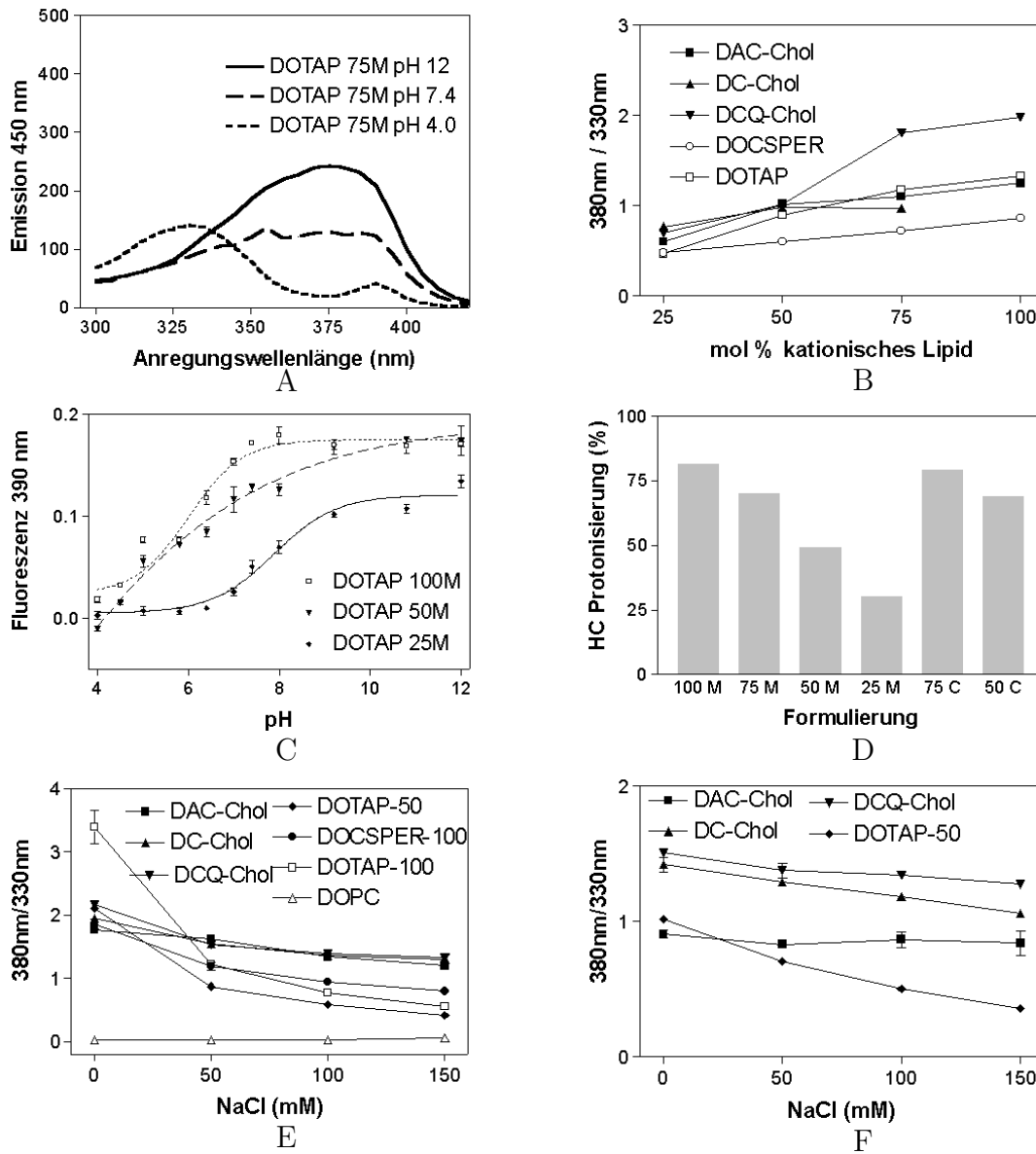


Abbildung 3.2: Elektrostatische Eigenschaften von HC-markierten kationischen Liposomen

A) Spektrum der Anregungswellenlänge für DOTAP-75M-Liposomen markiert mit HC bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm und bei verschiedenen pH-Werten.

B) Verhältnis der Lichtemission (450 nm) bei Anregungswellenlängen von 380 und 330 nm verschiedener kationischer Liposomen mit 100, 75, 50 und 25 Mol % Helferlipidanteil (pH 7.4).

C) Lichtemission von DOTAP-Liposomen mit unterschiedlichem Anteil an Helferlipid bei verschiedenen pH-Werten. Die Anregungswellenlänge betrug 390 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm.

D) Anteil an protonisiertem HC in DOTAP-Liposomen in Abhängigkeit von Anteil und Art des Helferlipides berechnet nach Gleichung (1) (Seite 48) bei pH 7.4.

E+F) Einfluß der NaCl-Ionenkonzentration und des Mediums (E: 0.02 M HEPES-Puffer; F: 0.02 M Phosphatpuffer, jeweils pH 7.4) auf die HC-Protonisierung an der Liposomenoberfläche der verschiedenen Liposomen. Die Cholesterolderivate enthielten 50 Mol % kationisches Lipid.

tonisierung zu untersuchen, wurden anschließend die Fluoreszenzuntersuchungen in verschiedenen Medien durchgeführt. Dazu wurde 0.02 M Phosphat- oder HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 0, 50, 100 oder 150 mM NaCl verwandt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.2E+F zeigen, nahm mit zunehmender Ionenkonzentration der Grad der gemessenen Protonisierung des Fluorophores bei allen untersuchten Liposomen ab. Dieser Abfall war besonders ausgeprägt bei DOTAP-100-Liposomen, welche z.B. in 20 mM HEPES-Puffer ohne NaCl den höchsten Wert des 380/330-Verhältnisses aufwiesen. Mit der Erhöhung der NaCl-Konzentration jedoch sank dieser Wert unter den der anderen Liposomen ab. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit DOTAP-50-Liposomen erzielt. Die Cholesterolderivate unterschieden sich in HEPES-Puffer voneinander kaum in ihrem Protonisierungsprofil. In Phosphatpuffer dagegen war eine deutliche Abstufung der Fluorophor-Protonisierung in der Reihung DCQ-Chol>DC-Chol>DAC-Chol zu beobachten. Die HC-Protonisierung von DOCSPER-100-Liposomen lag auch in HEPES-Puffer niedriger als die der Cholesterolderivate.

Zusammenfassend ist aus den vorliegenden Ergebnissen zu schlußfolgern, daß die Höhe der HC-Protonisierung abhängig ist von der Struktur des kationischen Lipides, von der Art und der Menge des zugesetzten Helferlipides, der Ionenkonzentration und der Art der Gegenionen im Dispersionsmedium sowie von dessen pH-Wert. Cholesterol als Helferlipid bzw. als lipophiler Anker des kationischen Lipides erhöht, eine große Menge an Helferlipid sowie eine hohe Ionenkonzentration im Medium dagegen verringern die Protonisierung der HC-Moleküle.

3.1.2 Eigenschaften der Lipoplexe

3.1.2.1 Größe, Trübung und Stabilität

Der Verlauf der Lipoplexbildung nach dem Mischen von DNA und Liposomen kann durch die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung oder durch das photometrische Messen der Trübung, d.h. der statischen Lichtstreuung, verfolgt werden. Neben der Analyse der Größenveränderungen, welche mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht wurden, erfolgten auch PCS-Messungen, die eine exaktere Bestimmung der Vesikelgrößen erlauben.

Für die Untersuchung der Lichtstreuung wurden die Lipoplexe wie im Abschnitt 2.2.3 (S. 44) beschrieben in 96-Well-Zellkulturschalen hergestellt und anschließend die Lichtstreuung an einem Spectra-Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Dabei wurde ein konstanter Betrag an DNA mit steigenden Mengen an kationischen Liposomen gemischt.

Chemie und Zusammensetzung: In Abhängigkeit von der chemischen Struktur und dem Mischungsverhältnis zwischen kationischem Lipid und Helferlipid zeigten die liposomalen Formulierungen ein unterschiedliches Trübungsverhalten. DOCSPER-100-Liposomen verursachten hingegen ohne den Zusatz von DNA wegen ihrer geringen Größe keine Streuung des Lichtes im sichtbaren Bereich. Wenn DNA zugesetzt wurde war eine starke Zunahme der Lichtstreuung bei der Lipoplexbildung zu beobachten. Dies läßt auf eine erhebliche Größenveränderung der Vesikel nach der Zugabe der DNA schließen (vgl. Abb. 3.3).

Mit zunehmender Lipidmenge nahm die Lichtstreuung der Lipoplexe zu, erreichte dann bei etwa 5 μg Lipid je μg DNA ein Maximum und nahm bei 10 μg Lipid je μg DNA

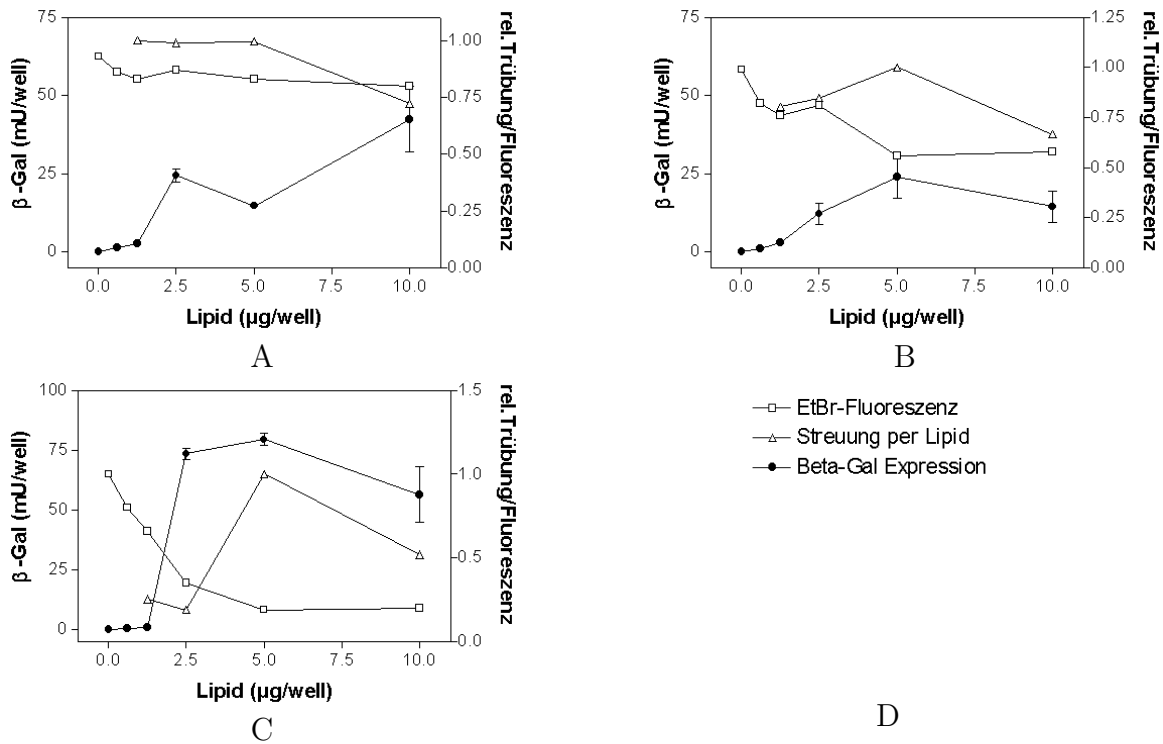


Abbildung 3.3: Einfluß der Lipidkonzentration auf den EtBr-Ausschluß, die Licht-Streuung und die β -Gal-Expression.

Von unterschiedlichen liposomalen Formulierungen wurde der EtBr/DNA-Ausschluß, die Streuung und die Gentransfereffizienz von F98-Zellen bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte von 2-3 Bestimmungen (\pm SD). **A:** DAC-30-Liposomen; **B:** DAC-40-Liposomen; **C:** DOCSPER-100-Liposomen

wiederum ab. Somit scheinen die Lipoplexe bei einem Überschuß an kationischem Lipid wieder kleiner zu werden. Diese Beobachtungen wurden in geringerem Umfang auch für DAC-30 und DAC-40-Liposomen gemacht. Bei diesen Liposomen, die auch ohne den Zusatz von DNA wegen ihrer Größe über eine starke Eigenstreuung verfügen, war keine bzw. nur eine schwache Zunahme der Trübung festzustellen. So blieb bei DAC-30-Liposomen die Trübung der Lipoplexe zwischen 1.25 und 5 µg Lipid je µg DNA konstant und sank dann bei 10 µg Lipid leicht ab, während bei DAC-40-Liposomen die Trübung nur leicht anstieg und bei 5 µg Lipid je µg DNA der höchste Wert der Lichtstreuung bezogen auf die Gesamtmenge an Lipid beobachtet wurde.

Konzentration: Größe und Stabilität der hergestellten Lipoplexe waren außerdem abhängig von der Konzentration der Einzelkomponenten, dem Mengenverhältnis zwischen den kationischen Liposomen und der DNA sowie der Art des Mediums, in dem die Herstellung der Komplexe erfolgte.

Es wurde festgestellt, daß die Größe von Lipoplexen, die bei hoher Konzentration und neutralen Mischungsverhältnissen zwischen Liposomen und DNA hergestellt worden waren, sehr rasch zunahm und Präzipitate zu beobachten waren. Somit war die Stabilität unter diesen Bedingungen sehr gering. Im Gegensatz dazu war die Vesikelgröße bei Lipoplexen mit stark positiven Mischungsverhältnissen und einer niedrigen Konzentration der Einzelkomponenten geringer und die Stabilität größer. So kam es bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 (w/w) bei DAC-30/DNA-Komplexen mit Lipidkon-

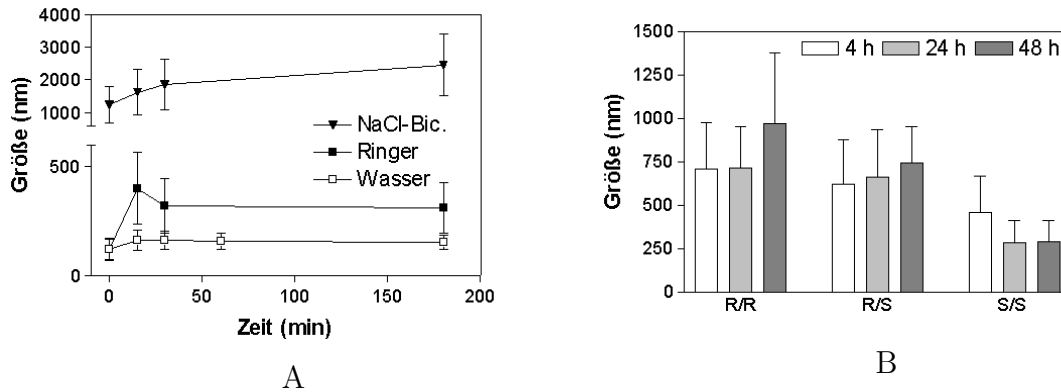


Abbildung 3.4: Einfluß des Mediums auf die Lipoplexgröße

A: 100 μl DOCSPER-100-Liposomen wurden in 3 ml Wasser, Ringerlösung oder 150 mM NaCl/20 mM NaHCO_3 verdünnt. Die Größenbestimmung erfolgte mittels PCS am N4-Plus bei einem Meßwinkel von 90 Grad. Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmung bei Annahme einer unimodalen Verteilung (\pm SD). Nach der ersten Messung wurden 10 μg DNA zugegeben und die Messungen wurden nach 5, 10, 30 und 180 min wiederholt.

B: 500 μg DAC-40-Liposomen und 100 μg PS wurden in 500 μl Ringerlösung (R) oder Saccharose (S) verdünnt und mit 50 μg Plasmid-DNA pUT651, verdünnt in 500 μl Ringerlösung oder Saccharose, gemischt und für 4, 24 oder 48 h bei RT inkubiert. Die Untersuchung der Größenverteilung erfolgte wie unter Abb. A beschrieben.

zentrationen von 1mg/ml innerhalb weniger Minuten zum Präzipitieren der Komplexe, während Lipoplexe mit einem Mischungsverhältnis von 10:1 bei gleicher Lipidkonzentration über einen Zeitraum von mehreren Tagen stabil blieben.

Medium: In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß des Mediums auf die Größenveränderung von DOCSPER-100/DNA- und DAC-30/PS/DNA-Komplexen über eine Zeit von wenigen Minuten bis zu 48 h analysiert. Dazu wurden die Liposomen in Medien mit hoher Ionenkonzentration, wie Ringerlösung bzw. isotonischer NaCl-Lösung mit Bicarbonatpuffer, oder in Medien ohne zugesetzte Ionen, wie Wasser bzw. 10 %-Saccharoselösung, mit der Plasmid-DNA gemischt.

Kurzzeitstabilität: Bei den Kurzzeitstabilitätsuntersuchungen mit DOCSPER-100/DNA-Lipoplexen wurde festgestellt, daß diese bei der Verwendung von Wasser über einen Zeitraum von 3 h mit etwa 150-200 nm sehr klein blieben. Wurde Ringerlösung für die Komplexherstellung verwandt, stieg die Größe sehr schnell auf etwa 300 nm an, blieb dann aber konstant. Wenn hingegen 20 mM Bicarbonat zum Medium hinzugesetzt wurden, waren die Liposomen ohne DNA mehrere hundert nm bis zu 1 μm groß und bei der DNA-Zugabe stieg die Lipoplexgröße kontinuierlich auf mehrere μm an (vgl. Abb. 3.4A).

Langzeitstabilität: Auch bei Langzeitstabilitäts-Untersuchungen mit DAC-30/PS/DNA-Komplexen zeigte sich, daß bei der Verwendung von Medien mit einer hohen Ionenkonzentration die Größe der Lipoplexe ständig zunimmt, während bei der Verwendung von Medien ohne zugesetzte Ionen, wie Saccharoselösung, die Komplexgröße über mehr als 48 h konstant blieb (vgl. Abb. 3.4B). So betrug die Größe von DAC-30/PS/DNA-Komplexen anfänglich etwa 750 nm und stieg innerhalb von 48 h auf 1000 nm an. Das optische Erscheinungsbild der Lipoplexe veränderte sich dabei von opaleszierend zu trüb, was ebenfalls auf eine Größenzunahme schließen ließ. Teilweise wurden

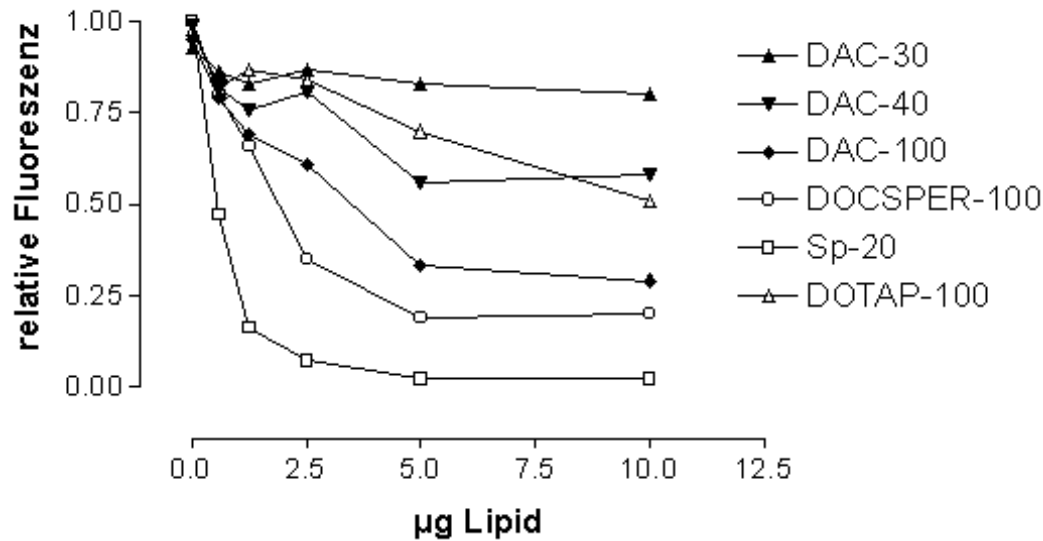


Abbildung 3.5: Einfluß der Lipidmenge auf die Fluoreszenz von EtBr/DNA-Komplexen

Die Lipoplexe wurden in isotonischer NaCl-Lösung aus 0,6, 1,25, 2,5, 5 oder 10 μg Lipid und 1 μg Plasmid-DNA hergestellt. Nach etwa 30 min erfolgte die Zugabe von EtBr zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Anschließend wurde bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm die Fluoreszenz bestimmt.

nach 48 h auch kleine Präzipitate in der Suspension beobachtet. Demgegenüber wurden bei Komplexen die in Saccharoselösung bzw. Wasser hergestellt worden waren, keine Größen- bzw. Strukturveränderungen beobachtet. Wurden die Lipopolyplexe in einem Gemisch von Ringerlösung und Saccharoselösung hergestellt, d.h. 50 % Ringerlösung und 5 % Saccharose, so lagen das Erscheinungsbild und die Größe der entstehenden Lipoplexe zwischen der Größe der in Ringerlösung bzw. 10 % Saccharose hergestellten Vesikel.

Die Größe der Lipoplexe und deren Stabilität wird somit maßgeblich vom Mischungsverhältnis des kationischen Lipides und Helferlipides, von der Konzentration der Einzelkomponenten, also der Liposomen und der DNA, sowie von der Ionenkonzentration des umgebenden Mediums bestimmt. Eine hohe Ionen- bzw. Komponentenkonzentration und ein neutrales Ladungsverhältnis zwischen den kationischen Liposomen und der DNA beeinflussen die Lipoplexstabilität negativ, während niedrige Ionen- und Komponentenkonzentrationen und ein stark positives Ladungsverhältnis die Stabilität der Lipoplexe vergrößern.

3.1.2.2 Elektrophoretische Mobilität und DNA/EtBr-Interkalation

Eine weitere Möglichkeit die Lipid/DNA-Komplexe zu charakterisieren, besteht in der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität bzw. in der Untersuchung des EtBr-Ausschlusses auf DNA-Ebene nach der Zugabe der kationischen Liposomen zur DNA. Nach Zusatz des fluoreszierenden EtBr-Moleküls interkaliert dieses in die DNA-Doppelhelix (ein EtBr-Molekül je 4-5 DNA-Basenpaaren). Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von etwa 500 bis 540 nm, wird im Bereich von ca. 590 bis 610 nm längerwelliges Licht emittiert. Die Fluoreszenz des interkalierten EtBr-Moleküls ist dabei 20-30fach

höher als die Fluoreszenz des freien EtBr [66].

Nach der Zugabe der kationischen Liposomen korreliert der Grad der Packung der DNA [55, 162] mit der Abschirmung gegen das interkalierende EtBr. Je geringer die Fluoreszenz, desto stärker die Packung der DNA bzw. die Ummantelung durch das Lipid.

Lipoplexe: Für die Fluoreszenzstudien wurden Lipoplexe in isotonischer NaCl-Lösung durch Mischen von unterschiedlichen Mengen kationischer Liposomen mit einer konstanten Menge DNA hergestellt. Etwa 30 min nach dem Mischen der kationischen Liposomen mit der DNA wurde EtBr zugesetzt und die Fluoreszenz bestimmt.

Bei den untersuchten DAC-30, DAC-40, DAC-100, DOCSPER-100, Sp-20 und DOTAP-100-Liposomen nahm mit einer zunehmenden Menge an Liposomen die EtBr/DNA-Fluoreszenz ab (vgl. Abb. 3.5). Dieser Abfall der Fluoreszenz war besonders ausgeprägt bei Liposomen die polykationische Lipide enthielten. So sank bei Sp-20-Liposomen die Fluoreszenz auf weniger als 10 % des Ausgangswertes ab wenn $\geq 2.5 \mu\text{g}$ Lipid zu $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA zugesetzt wurden. Bei DOCSPER-Liposomen sank die Fluoreszenz auf weniger als 25 % des Ausgangswertes ab wenn $\geq 5 \mu\text{g}$ Lipid verwandt wurden. Sowohl bei Sp-20- als auch bei DOCSPER-100-Liposomen sank die EtBr-Fluoreszenz bei einer Lipidmenge von mehr als $5 \mu\text{g}$ per μg DNA nicht weiter ab.

Bei DOCSPER-100-Liposomen wurde außerdem der Grad der Mobilität der Lipoplexe in einem Agarose-Gel untersucht. Dabei war festzustellen, daß mit einer zunehmenden Lipidmenge die DNA immobilisiert wurde, bzw. es zu einem vollständigen Auslöschen der Fluoreszenz kam und die DNA nicht mehr beobachtet werden konnte. Der Grad dieser Immobilisierung war weiterhin von der Art des Mediums, in dem die Lipoplexe hergestellt wurden, abhängig: In DMEM-Medium war die Immobilisierung am schwächsten, in Wasser oder in niedrigioniger Kochsalzlösung stärker.

Bei der DNA-Komplexierung mittels DAC-Chol-Liposomen war die EtBr/DNA-Fluoreszenz sowohl von der Menge an Liposomen als auch vom Anteil des DAC-Chol's in den Liposomen abhängig. War der Anteil des kationischen Lipides in den Liposomen gering, wie z.B. bei DAC-30-Liposomen, wurde das EtBr nicht oder kaum ausgeschlossen. Im Vergleich dazu sank bei DAC-40- und DAC-100-Liposomen die Fluoreszenz in stärkerem Maße ab. Die Fluoreszenz verringerte sich hier bis zu einer Menge von $5 \mu\text{g}$ Lipid je μg DNA etwa proportional mit der Menge an zugesetzten Liposomen. Trotz seiner quarternären Aminokopfgruppe war die Stärke der Komplexierung der DNA durch das monokationische Lipid DOTAP niedriger als bei den DAC-100-Liposomen.

Polykationen: Im weiteren wurde auch der Einfluß von Polykationen wie PS und PLL auf die DNA-Komplexierung untersucht. Bei der Vorkomplexierung der DNA mit diesen Polykationen kam es bei Überschreiten eines bestimmten Peptid/DNA-Verhältnisses zu einem vollständigen Abfall der Fluoreszenz. Auf diese Ergebnisse wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden (vgl. Abschnitt 3.2.3, S. 73).

Trübung, EtBr-Ausschluß und Gentransfer: Im Zusammenhang mit der Möglichkeit die Gentransfereffizienz von kationischen Liposomen durch den Zusatz von Polykationen zu erhöhen, wurde auch versucht den Grad der Packung der DNA mit der Trübung der Lipoplexe und diese mit den erzielten Gentransferresultaten zu korrelieren (vgl. Abb. 3.3). Dazu wurde die EtBr/DNA-Fluoreszenz mit dem Grad der Trübung je Lipideinheit und der β -Gal-Expression verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß sowohl Lipide, die die DNA fast vollständig gegen EtBr abschirmen (DOCSPER-100), als auch Liposomen mit nur schwach komplexierenden Eigenschaften (DAC-30,

DAC-40) *in vitro* wirksame Gentransfersysteme darstellen. Somit scheint eine starke Komplexierung keine notwendige Voraussetzung für den Gentransfer *in vitro* zu sein.

Bei der Bestimmung der Lipoplextrübung ließ sich hingegen ein Zusammenhang zur Gentransfereffizienz herstellen. Die auf die Menge an Liposomen normierte Trübung von DOCSPER-100 und DAC-40-Liposomen nahm mit der Lipidmenge bis 5 μg Lipid zu und sank dann bei 10 μg Lipid wieder ab. Anstieg und Abfall der Trübung korrelierte mit der erreichten Reportergenexpression. Bei DAC-30-Liposomen blieb von 1.25 μg bis 5 μg Lipid die Trübung konstant und sank bei 10 μg Lipid leicht ab. Die Reportergenexpression der DAC-30/pUT651-Lipoplexe stieg dagegen von 0.06 μg Lipid bis zu 10 μg Lipid kontinuierlich an. Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die Lichtstreuung der Lipoplexe die Fluoreszenz der EtBr/DNA-Komplexe schwächt. Die erhaltenen Daten sind deswegen nur unter Vorbehalt zu interpretieren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Grad der DNA-Komplexierung wesentlich von der Ladung der kationischen Kopfgruppe, vom Anteil des Helferlipides in den kationischen Liposomen und vom Medium in dem die Lipoplexherstellung erfolgt abhängt. In Medien mit hoher Ionenkonzentration kam es zu einer schwächeren Komplexierung der DNA, während in deionisiertem Wasser die stärkste Komplexierung erreicht wurde.

3.2 Transfektionsergebnisse

In diesem Abschnitt werden zuerst die Gentransfereigenschaften der verschiedenen kationischen Lipide miteinander verglichen und anschließend wird der Einfluß der Komplexbestandteile, wie des Helferlipides, der DNA-Qualität und des Zusatzes von Polykationen auf die Generierung effizienter Gentransfervesikel untersucht. Im weiteren werden die Faktoren, welche die Komplexbildung beeinflussen wie Komplexkonzentration und Medium untersucht. Abschließend werden einige der Einflußfaktoren die zum Transfektionsverfahren gehören analysiert.

3.2.1 Gentransfereigenschaften verschiedener kationischer Lipide

Untersucht werden sollte zuerst, inwiefern sich die Gentransfereffizienzen der verschiedenen kationischen Lipide auf den Zelllinien unterscheiden und ob bestimmte chemische Strukturen für den Gentransfer besonders geeignet sind.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Gentransfereffizienz der Lipoplexe von der chemischen Struktur des kationischen Amphiphiles wurden die Rattenglioblastomzelllinie F98, die Rattenkolonkarzinomzelllinie CC531, die humane Mammatumorzelllinie MaTu und MCF7 sowie die humane Glioblastomzelllinie N64 mit verschiedenen liposomalen Formulierungen und der Plasmid-DNA pUT651 transfiziert. Verwendet wurden dabei verschiedene liposomale Formulierungen eines jeden kationischen Lipides mit dem Helferlipid DOPE, aber auch Liposomen, die ohne Helferlipid hergestellt worden waren. Folgende Lipide wurden für die Herstellung der kationischen Liposomen verwandt (vgl. auch Tab. 2.3, S. 42 sowie Abb. 1.4, S. 22):

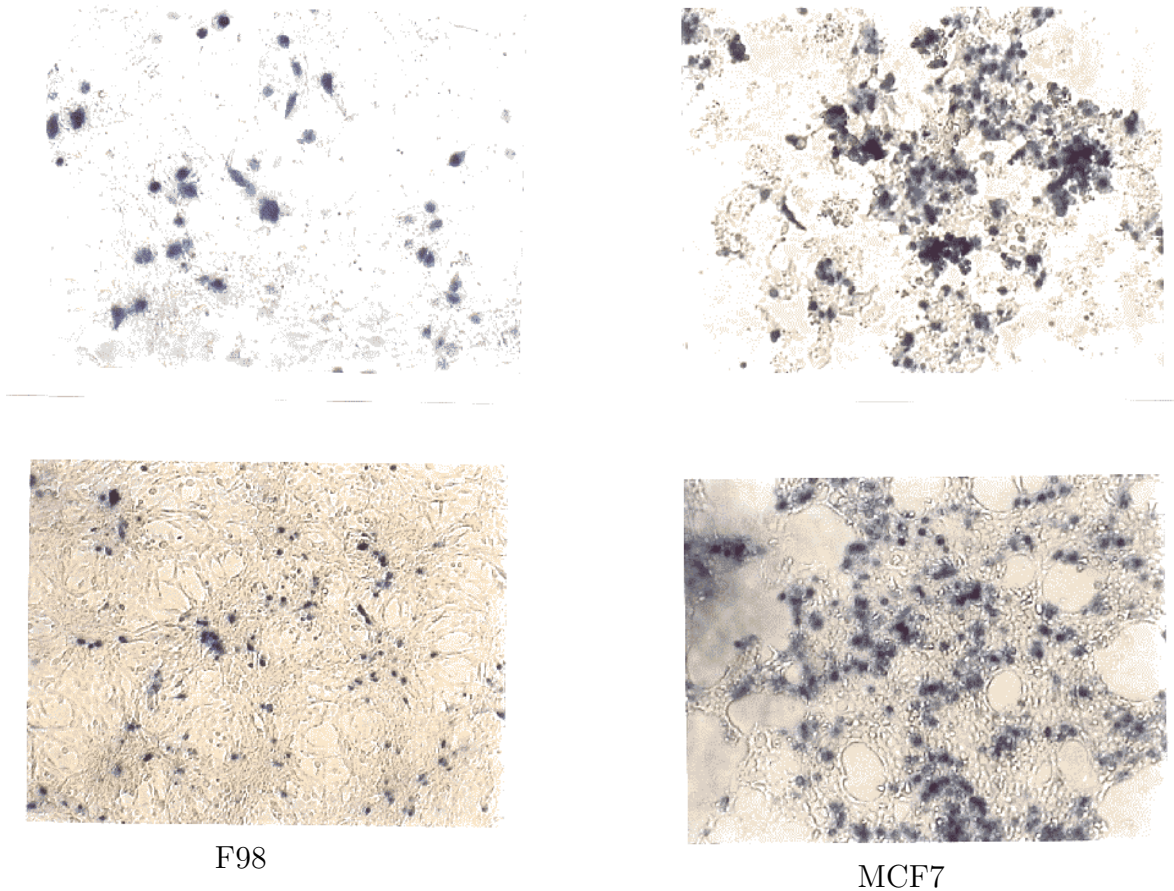


Abbildung 3.6: **X-Gal-Färbung von F98 und MCF7-Zellen nach Transfektion mit DAC-Chol-Liposomen und pUT651-Plasmid-DNA.**

48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen mittels X-Gal Färbung sichtbar gemacht.

- Doppelkettige Amphiphile: Das Etherlipid DOTMA und das Detergenz DDAB - zwei Lipide mit quarternären Stickstoffatom als kationischer Kopfgruppe; außerdem die Glycerollipide DOSGA, welches eine Guanidinokopfgruppe enthält, sowie DOCSPER mit einer Sperminkopfgruppe.
- Cholesterolderivate: Die monokationischen Lipide DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol als Lipide mit sekundärer, tertiärer bzw. quarternärer Aminogruppe; die Lipide mit veresterten Aminosäurekopfgruppen A-Chol, O-Chol und Put-Chol sowie das Cholesterolderivat Sp-Chol mit einer Sperminkopfgruppe auch bekannt unter dem Namen Lipid #67 [89].

Die Struktur des Lipides DCQ-Chol entspricht weitgehend der von DC-Chol. Es enthält jedoch eine Hydroxyethylgruppe am Stickstoffatom der kationischen Kopfgruppe statt des Wasserstoffatoms. Die kationische Kopfgruppe bei diesem Lipid ist demzufolge eine quarternäre Aminogruppe.

Aus den aufgeführten Lipiden und DOPE wurden multilamellare kationische Liposomen hergestellt. Der Anteil des kationischen Lipides an der Lipidgesamtmenge betrug

dabei entweder 100, 50 oder 20 % (w/w) und der Anteil des Helferlipides dementsprechend 0, 50 oder 80 %. Aus den Liposomen und der Plasmid-DNA wurden Lipoplexe mit 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid sowie 1, 0.3 oder 0.1 μg Plasmid-DNA pUT651 hergestellt. Mit diesen Komplexen wurden etwa 10.000 F98, N64, CC531, MCF7 oder MaTu-Zellen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die Gesamtgenexpression bestimmt. Demzufolge wurde jede Zelllinie mit 18 verschiedenen Lipid/DNA-Mischungen der entsprechenden liposomalen Formulierung transfiziert. Für die Beurteilung der Transfereigenschaften wurde für jede liposomale Formulierung die jeweils maximal erreichte Genexpression herangezogen.

Generell war die Höhe der β -Gal-Expression abhängig von der transfizierten Zelllinie. Diese folgte bei den untersuchten Zelllinien der Reihung:

MCF7 > MaTu > F98 > N64 > CC531.

D.h. die Genexpression der MCF7-Zellen war wesentlich höher als die der CC531. Die Gesamtgenexpression korrelierte gut mit den Ergebnissen, die bei einer X-Gal-Färbung der transfizierten Zellen festgestellt wurden. Die Anzahl der transfizierten Zellen betrug bei den Zelllinien MaTu und MCF7 etwa 40-80 %, bei der F98 etwa 10 bis 30 % und bei CC531 etwa 5 % (s. Abb. 3.6).

Der Einfluß der chemischen Struktur der kationischen Lipide auf die erreichten Genexpressionsraten war vergleichsweise gering (vgl. Abb. 3.7). Die meisten der untersuchten kationischen Lipide erwiesen sich prinzipiell als für den Gentransfer geeignet. So ergaben Transfektionen mit DOTMA-, DDAB-, DOSGA- und DOCSPER-Liposomen, bei einer optimalen Formulierung mit dem Helferlipid DOPE, β -Gal-Expressionen, die sich um weniger als eine Größenordnung voneinander unterschieden. Bei den untersuchten Cholesterolderivaten gab es dagegen größere Unterschiede hinsichtlich ihrer Eignung als Gentransfervektoren. So schwankte die Genexpression, die mit den Lipiden A-Chol, O-Chol und Put-Chol erzielt wurde, in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie. Die Ergebnisse der Lipide DAC-Chol und Sp-Chol waren relativ konstant, lagen jedoch bei der Zelllinie MaTu unter den Ergebnissen, die mit den doppelkettigen Amphiphilen erzielt wurden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine zellspezifische Besonderheit.

In Abbildung 3.8 sind für jede liposomale Formulierung die Werte der einzelnen Lipid/DNA-Mischungen dargestellt. Dabei sind Bereiche hoher Genexpression dunkel und Bereiche niedriger Genexpression hell dargestellt. Diese Darstellungsform ermöglicht für jede liposomale Formulierung die Auswahl der effektivsten Lipid/DNA-Konzentration. Die Ergebnisse sind sehr stark von der Art der transfizierten Zellen, der Zellkonfluenz und der Transfektionszeit abhängig. Trotz dieser Einschränkungen können Aussagen zu den Transfereigenschaften der Liposomen und zu zelltypspezifischen Besonderheiten gemacht werden.

Betrachtet man die Einzelwerte der β -Gal-Expression für jede einzelne Lipid/DNA-Mischung, so fällt auf, daß die doppelkettigen Amphiphile DOTMA, DDAB und DOCSPER nur bei höheren DNA-Konzentrationen gute Transfektionsergebnisse erzielten, während DOSGA und DAC-Chol-Liposomen auch bei niedrigen DNA-Konzentrationen von 0.1 $\mu\text{g}/\text{Well}$ noch sehr hohe Transfektionsraten erreichten. Der Bereich wirksamer Lipid/DNA-Mischungen war bei DOCSPER-, DOTMA- und DDAB-Liposomen wesentlich geringer als bei Liposomen, die mit Hilfe des kationischen Lipides DOSGA hergestellt worden waren.

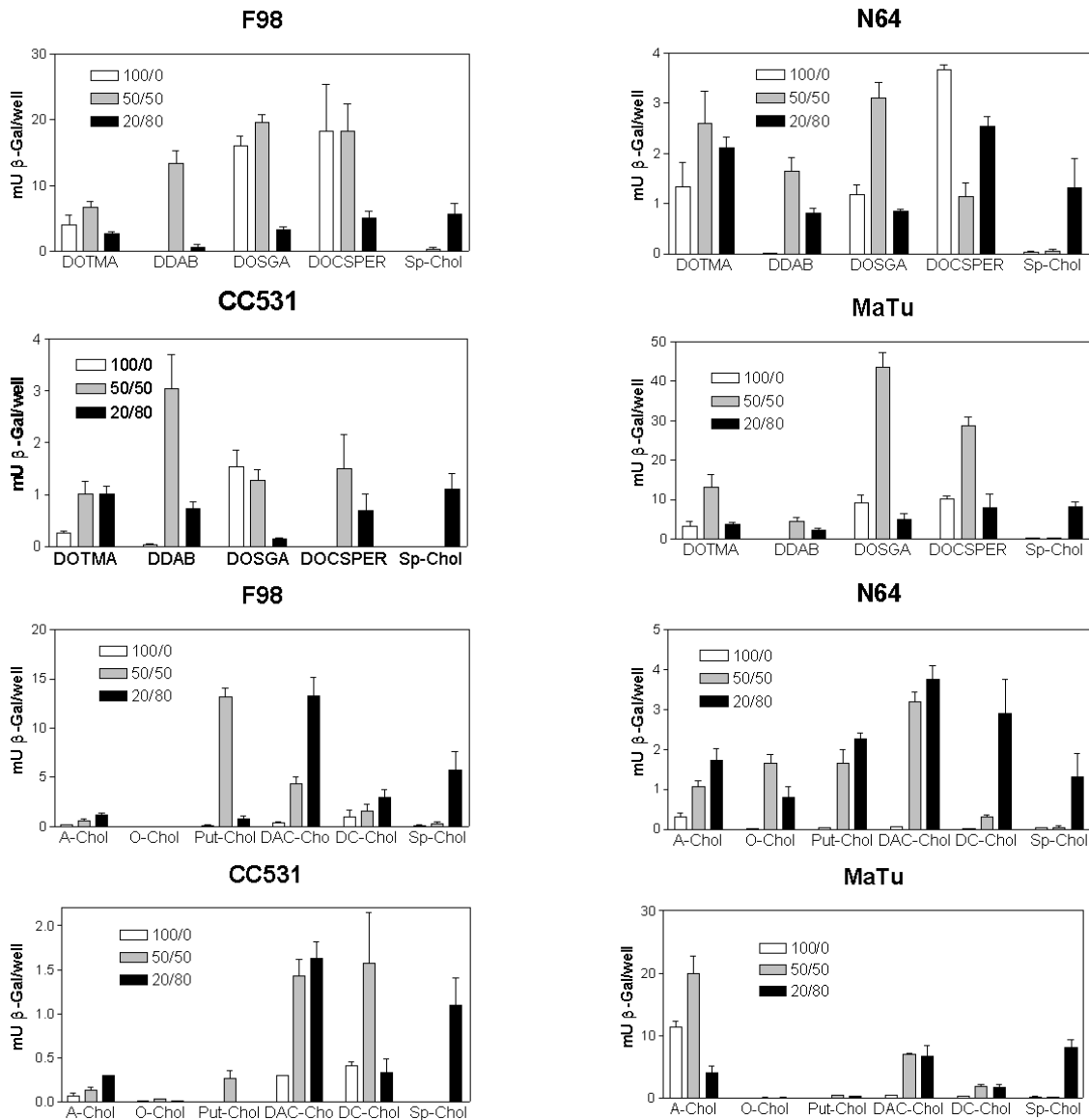


Abbildung 3.7: Einfluß der chemischen Struktur und des Anteils an Helferlipid auf die Gentransfereigenschaften von verschiedenen kationischen Lipiden.

Verschiedene Mengen an kationischen Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 μg) wurden mit verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA pUT651 (1, 0.33 oder 0.1 μg) komplexiert. Mit den Lipoplexen wurden F98, CC531, N64 und MaTu-Zellen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Das Mischungsverhältnis von kationischem Lipid zu Helferlipid betrug jeweils 100:0, 50:50 oder 20:80 (w/w). Angegeben sind jeweils die 3 maximalen β -Gal-Expressionswerte (\pm SEM).

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, daß sich die Gentransfereffizienzen der einzelnen kationischen Liposomen bei einer optimierten Formulierung und einem geeigneten Lipid/DNA-Verhältnis zumeist nur wenig unterscheiden. Lediglich die Cholesterolderivate mit Esterbindungen erwiesen sich als kaum geeignet für den Gentransfer.

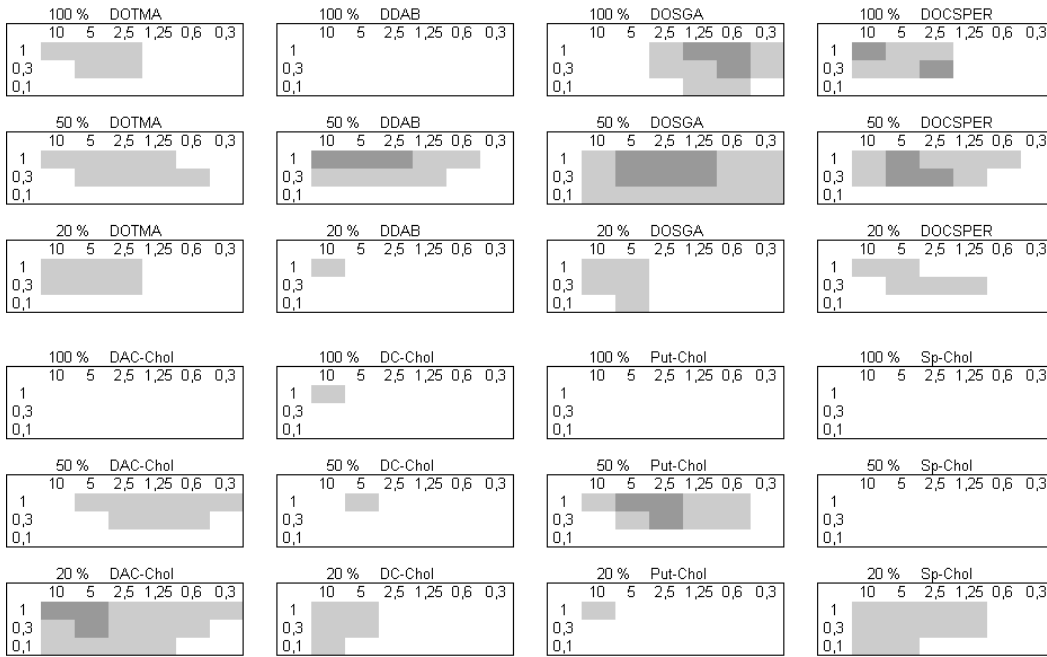
3.2.2 Einfluß des Helferlipides auf die Gentransferrate

Die Ergebnisse unserer und die Resultate anderer Arbeitsgruppen zeigen, daß eine Abhängigkeit der Gentransfereffizienz kationischer Liposomen vom Helferlipidanteil besteht. Zumeist wurde bei diesen Untersuchungen das fusogene Helferlipid DOPE verwandt, welches die Transfektionseigenschaften vieler kationischer Lipide verbessert. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß der Anteil dieses Helferlipides auf die Gentransfereigenschaften der kationischen Lipide hat und welche Mischungsverhältnisse für die verschiedenen Zelllinien geeignet sind. Auch die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnittes wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von kationischem zu Helferlipid erzielt und lassen somit ebenfalls Rückschlüsse auf eine effiziente Liposomen-Formulierung zu.

Die Untersuchungen erfolgten mit Formulierungen bestehend aus 100, 50 oder 20 % kationischem Lipid und 0, 50 oder 80 % Helferlipid. Die einzelnen Zelllinien verhielten sich unterschiedlich in Bezug auf die Menge an Helferlipid, die für eine gute Transfektion notwendig war. Es war nicht möglich eine Aussage zu einem optimalen Mischungsverhältnis von kationischem Lipid und Helferlipid zu machen da dieses, in Abhängigkeit von der Zelllinie, unterschiedlich war. DDAB sowie die Cholesterolderivate benötigen in jedem Fall den Zusatz eines Helferlipides für eine effiziente Transfektion. Wie bereits im Abschnitt 3.1.1.1 (S. 55) ausgeführt, konnten bei DDAB und DC-Chol ohne den Zusatz von Helferlipid keine stabilen Liposomen hergestellt werden. Die doppelkettigen Amphiphile DOCSPER, DOSGA und DOTMA bildeten dagegen auch ohne Helferlipid Liposomen und transfizierten teilweise besser, als bei einer Formulierung mit DOPE. So wies z.B. DOCSPER-100 bei Genapplikation in die Glioblastomzelllinien N64 und F98 wesentlich bessere Transfereigenschaften auf, als die Formulierungen DOCSPER-50 und DOCSPER-20. Diese Ergebnisse sind allerdings zellspezifisch. So war DOCSPER ohne Helferlipid bei den Rattenkolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531 nicht für den Gentransfer geeignet. Im Gegensatz dazu waren die doppelkettigen Amphiphile DOSGA, DOTMA und DDAB bei 3 von 4 Zelllinien in einer 50 zu 50 Mischung (w/w) von Helferlipid und kationischen Lipid am effektivsten.

Eine genauere Bestimmung des Optimums für die jeweilige Zelllinie erfolgte anschließend durch die Herstellung einer Anzahl weiterer liposomaler Formulierungen mit verschiedenen Verhältnissen von kationischem zu Helferlipid. Wegen der guten Transfereigenschaften und ihrer ausreichenden Verfügbarkeit wurden dazu die kationischen Lipide DOTMA, DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol ausgewählt. Es wurden liposomale Formulierungen mit 100, 75, 50 und 25 % Massenanteilen an kationischem Lipid hergestellt.

Zur Genapplikation wurden F98-, MaTu- und CC531-Zellen mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μg DNA transfiziert. Bei Transfektionsergebnissen zeigte sich eine deutliche Veränderung des optimalen Verhältnisses von kationischem Lipid und Helferlipid in Abhängigkeit von der Zelllinie und der liposomalen Formulierung. Die Abbildung 3.9



A: F98-Zellen



B: MaTu-Zellen

Abbildung 3.8: β -Gal-Expression von F98- und MaTu-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen Lipoplexpräparationen

Bereiche mit Genexpressionen kleiner als 1 mU per Well sind weiß, Bereiche zwischen 1 und 10 mU sind hellgrau, Bereiche zwischen 10 und 100 mU/Well sind dunkelgrau dargestellt. Die Lipidkonzentrationen (10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 μg per Well) sind horizontal, die DNA-Konzentrationen (1, 0.3 und 0.1 μg per Well) sind vertikal aufgetragen.

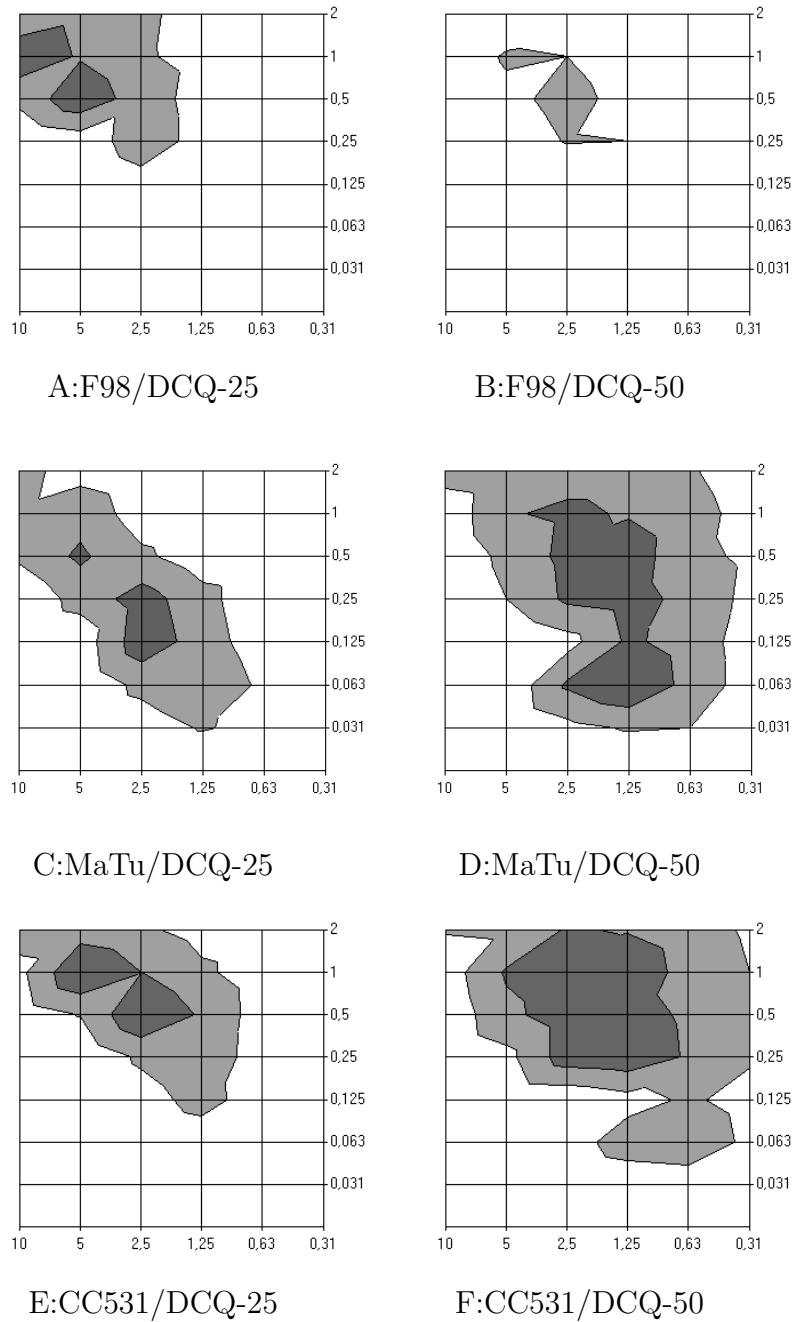


Abbildung 3.9: **Einfluß des Helferlipides auf die Transfektion mit DCQ-Chol-Liposomen**

Die Mengen an DNA sind auf der y-Achse, die Liposomenmenge auf der x-Achse aufgetragen. Dunkelgrau sind Bereiche von 66-100 %, hellgrau Bereiche von 33-66 % und weiß Bereiche mit <33 % der maximalen Genexpression dargestellt. Mit DCQ-75 und DCQ-100-Liposomen wurden nur Gentransferraten die unter 33 % des Maximalwertes lagen erreicht.

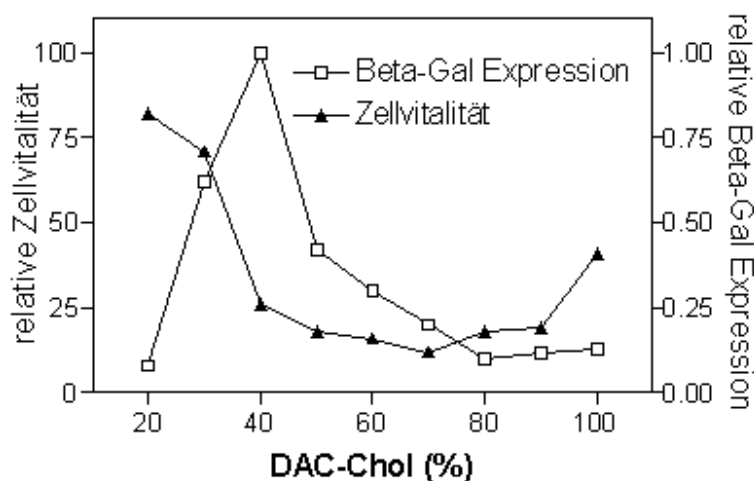


Abbildung 3.10: **Einfluß des Anteils DOPE-Anteils auf die Transfektion von F98-Zellen mit DAC-Chol-Liposomen.**

F98-Zellen in 96-Well Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DAC-Chol/DOPE-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 μg per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.3 μg per Well) transfiziert. Der Anteil an DAC-Chol in den Liposomen betrug 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte für β -Gal-Expression und Vitalität ($n=6$).

zeigt die Ergebnisse, die mit DCQ-Chol-Liposomen mit 25 und 50 % DCQ-Chol (w/w) erhalten wurden. Bei F98-Rattenglioblastomzellen waren Liposomen mit einem niedrigen Anteil an kationischem Lipid effektiver (Abb. 3.9A+B), während bei MaTu-Zellen (Abb. 3.9C+D), CC531-Zellen (Abb. 3.9E+F) und bei der Suspensionszelllinie K562 Liposomen mit höherem Anteil an kationischem Lipid besser transfizierten (nicht gezeigt). Außerdem kam es zu einer Verschiebung der optimalen Lipoplexkonzentration zu niedrigeren Werten, wenn eine größere Menge kationischen Lipides in den Lipoplexen vorhanden war. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Art des kationischen Lipides da ähnliche Ergebnisse auch mit DAC-Chol- und DC-Chol-Liposomen erzielt wurden.

In einer Reihe von weiteren Untersuchungen wurde versucht, die optimale Zusammensetzung von DAC-Chol-Liposomen für die Transfektion von F98-Zellen festzustellen. Dazu wurden Liposomen mit 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 100 % (w/w) kationischem Lipid hergestellt und die F98-Zellen mit jeweils 6 verschiedenen Lipid/DNA-Mischungen transfiziert. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.10 zeigen, war unter diesen Versuchsbedingungen ein Anteil des kationischen Lipides von 30-40 % optimal für die Transfektion der F98-Zellen. Bei einem Anteil von 20 % DAC-Chol war die Toxizität der Liposomen für die Zellen sehr gering, aber die Gentransferrate niedrig. Bei Liposomen mit ≥ 50 % DAC-Chol nahm dagegen die Toxizität der Lipoplexe zu und die Gentransferrate ab.

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt lassen schlußfolgern, daß bei dem Detergenz DDAB sowie bei den Cholesterolderivaten der Zusatz von DOPE in allen Fällen vorteilhaft für die Transfektion der untersuchten Zelllinien ist. Bei den Lipiden DOTMA

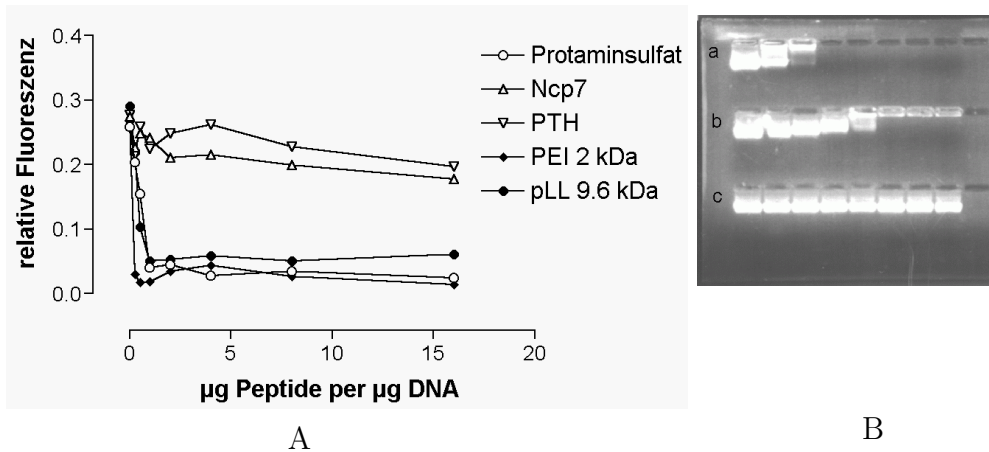


Abbildung 3.11: **Einfluß verschiedener Peptide auf die Fluoreszenz von DNA/EtBr-Komplexen bzw. auf die DNA-Mobilität im Agarose-Gel.**

Je Well einer 96er Zellkulturschale wurden 2 µg Plasmid-DNA pUT651 in 50 µl Ringerlösung verdünnt. Anschließend wurden 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 µg Peptid, verdünnt in 50 µl Ringerlösung zugesetzt. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz und die DNA-Mobilität im Agarose-Gel bestimmt.

A: Ergebnisse der EtBr-Fluoreszenzuntersuchungen

B: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese

a) Protaminsulfat/pUT651

b) Ncp7/pUT651

c) PTH/pUT651

mit jeweils 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 µg Peptid/Protein je µg DNA.

und DOSGA führte das Helferlipid zu verbesserten Transfektionseigenschaften der Liposomen und bei den Cholesterolderivaten ist es Voraussetzung für die Generierung effektiver Gentransfervesikel. Das Optimum für das Mischungsverhältnis von kationischem Lipid und Helferlipid ist abhängig von der untersuchten Zelllinie. Die Versuchsergebnisse können deswegen nicht von einer Zelllinie auf eine andere übertragen werden.

3.2.3 Steigerung der Genexpression mit Hilfe kationischer Polymere

Ausgehend von den Untersuchungen Gao und Huang [54] werden zunehmend kationische Peptide, Proteine und Polymerverbindungen für die DNA-Komplexierung bei der Herstellung liposomaler Gentransferkomplexe eingesetzt [95, 138]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welches die optimalen Bedingungen für die Herstellung der Gentransfervesikel sind.

DNA-Bindung: Zu diesem Zwecke kamen Polyplexe, bestehend aus den Polykationen PLL, PS, Polyethylenimin (PEI), dem HIV-Kapsidprotein Ncp7 [171] oder dem neutralen Peptid Parathormon (PTH) sowie Plasmid-DNA zur Anwendung. Diese Komplexe wurden hinsichtlich ihrer Ladung in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht und die Stärke der DNA-Bindung mittels Bestimmung der DNA/EtBr-Fluoreszenz analysiert.

Wie die Abb. 3.11 zeigt, ist die Bindung der DNA durch Polykationen mit einer hohen positiven Ladung wie PS, PLL und PEI am stärksten. So war bei PLL und PS nach

Zugabe von 1 μg Polykation zu 1 μg Plasmid-DNA die DNA/EtBr-Fluoreszenz fast vollständig reduziert. Dagegen führte bei PEI bereits die Zugabe von 0.25 μg Polykation je μg DNA zu einem starken Abfall der Fluoreszenz. Ncp7 bewirkte demgegenüber nur eine schwache DNA-Bindung, d.h. nur einen geringen Abfall der Fluoreszenz und das neutrale PTH band die DNA überhaupt nicht.

PLL vs. PS: Im weiteren wurde neben den biophysikalischen Eigenschaften auch der Einfluß von PLL und PS auf die Transfektion von F98- und N64-Zellen untersucht. Dazu wurden eine konstante Menge an Plasmid-DNA mit steigenden Mengen an PS bzw. PLL komplexiert und anschließend unterschiedliche Mengen an DAC-30- bzw. DAC-40-Liposomen zugesetzt. Mit diesen Komplexen wurden danach F98- und N64-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 3.12A+B zu sehen ist, konnte durch die Komplexierung der Plasmid-DNA mit PLL oder PS in Abhängigkeit von der Lipidmenge bei F98-Zellen eine 2-3fache Steigerung der β -Gal-Expression erreicht werden. Bei Überschreiten eines PLL/DNA-Verhältnisses von 1 (Abb. 3.12B) kam es jedoch zu einem Abfall der Genexpression unter das Niveau, das ohne Vorkomplexierung mit PLL erreicht wurde. Im Vergleich dazu war der Abfall der Genexpression bei höheren Mengen an PS weniger ausgeprägt und die Genexpression blieb auch bei einem Zusatz von 16 μg PS je μg DNA über den Werten, die ohne die Zugabe von PS erreicht wurden. Bei der Zelllinie N64 war die Steigerung der Genexpression durch den Zusatz von PS höher als bei F98-Zellen. Es wurde eine mehr als 10fache Steigerung der Genexpression sowohl nach der Transfektion mit DAC-40- als auch mit DOTMA-50-Liposomen erzielt (Abb. 3.12C-F).

Neben PLL und PS wurden auch das retrovirale Kapsidprotein Ncp7 [171] sowie das neutrale PTH auf die Beeinflussung des Gentransfers untersucht. Es konnte im Falle von Ncp7 ebenfalls eine, allerdings wesentlich geringere, Steigerung der Genexpression erzielt werden. Diese nur niedrige Steigerung der Genexpression ist vermutlich auf die schwächere Komplexierung der DNA zurückzuführen zu (vgl. Abb. 3.11). Das neutrale, die DNA nicht bindende PTH beeinflusste hatte dagegen keinen Einfluß auf die Gentransferergebnisse.

Bei der Verwendung von PS konnte neben der höheren Reporterexpression auch eine etwas höhere Zellvitalität nach dem Gentransfer mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen festgestellt werden. Dies war nicht, wie von Sorgi und Mitarbeitern [138] postuliert, auf die für eine optimale Transfektion notwendige geringere Lipidkonzentration zurückzuführen. Auch bei gleichen Lipidkonzentrationen wurden etwas bessere Zellvitalitäten bestimmt. Da bei der Verwendung von PS die erreichte Genexpression geringfügig höher war als bei der Verwendung von PLL und es sich bei PS um eine klinisch zugelassene Substanz handelt, wurde in den weiteren Untersuchungen hauptsächlich PS für die Herstellung von Lipopolyplexen verwendet.

Komplexpräparation: Die Komplexierung der DNA durch das PS kann sowohl durch eine Vorinkubation der DNA mit dem Polykation als auch eines Liposomen/PS-Gemisches zur DNA erreicht werden. Es wurde untersucht, welches der beiden Verfahren günstiger für das Erreichen einer hohen Genexpression ist. Bei der Transfektion von F98- und N64-Zellen konnten etwa gleich hohe Genexpressionen mit beiden Verfahren erreicht werden. Wie aus der Abbildung 3.13 ersichtlich ist, wurde in beiden Fällen eine deutliche Erhöhung der Genexpression gegenüber Gentransferkomplexen, die ohne PS hergestellt worden waren, erreicht. Dabei war festzustellen, daß bei höheren Lipidkonzentrationen niedrige PS-Mengen und bei niedrigen Lipidmengen höhere PS-Mengen in

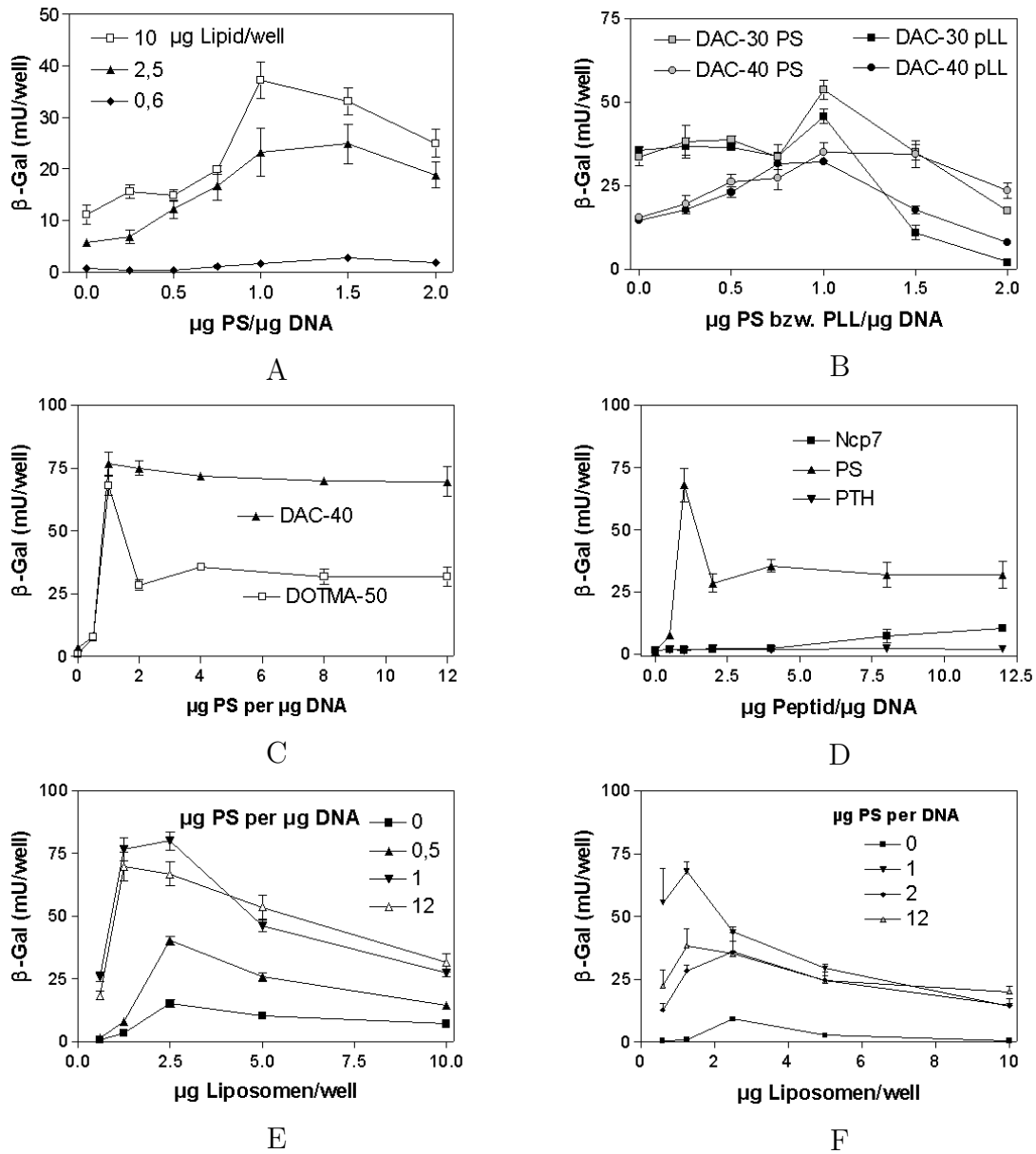


Abbildung 3.12: Einfluß von PS und PLL auf die Transfektion von F98- und N64-Zellen mit DAC-Chol- und DOTMA-Liposomen.

F98- und N64-Zellen in 96-Well-Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DOTMA-50, DAC-40 oder DAC-30-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μ g per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.33 μ g per Well) mit verschiedenen Mengen an PS bzw. PLL vorkomplexiert - transfiziert. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 % FKS (Abb. A+B) bzw. 10 % (Abb. C-F). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der β -Gal-Expression und der Zellvitalität ($n=3$, \pm SEM). Die Abb. zeigen:

A: Einfluß der Lipidkonzentration und der Menge an PS auf die Transfektion von F98-Zellen mit DAC-40-Liposomen. Ohne Lipid wurde keine Genexpression gemessen.

B: Vergleich von DAC-30 bzw. DAC-40-Liposomen (jeweils 5 μ g Lipid) bei der Transfektion von F98-Zellen, bei DNA-Komplexierung mit PLL oder PS.

C: Einfluß von PS auf die Transfektion von N64-Zellen mit jeweils 1.25 μ g DAC-40 oder DOTMA-50 Liposomen.

D: DOTMA-50-Ergebnisse mit verschiedenen Komplexierungsagentien (N64-Zellen).

E+F: Einfluß der Lipidkonzentration (E: DAC-40, F: DOTMA-50) und der PS-Menge auf die Transfektion von N64-Zellen.

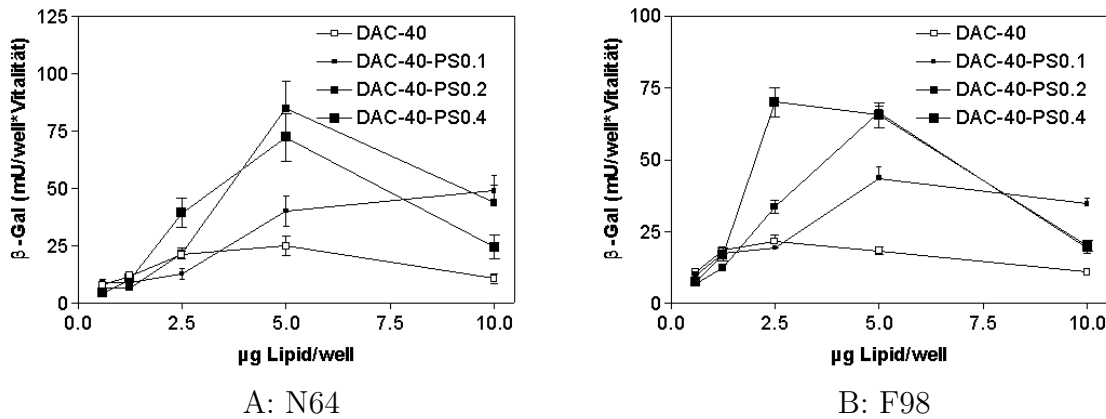


Abbildung 3.13: **Transfektion mit DAC-40/PS-Formulierungen**

Die Zellen wurden mit Gentransfervesikeln bestehend aus DAC-40-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg per Well), PS und der Plasmid-DNA pUT651 (0.33 μg per Well) transfiziert. Dabei wurden je 0, 0.1, 0.2 oder 0.4 mg PS zu je 1 mg DAC-40-Liposomen zugesetzt*. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 % FKS. Nach 4 h wurde das Medium von den Zellen entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen anschließend für weitere 48 h bis zur Bestimmung von Vitalität und β -Gal-Expression kultiviert.

A: Einfluß des PS auf die Transfektion von N64-Zellen

B: Einfluß des PS auf die Transfektion von F98-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der β -Gal-Expression, normalisiert mit der entsprechenden Zellvitalität für 3 Einzelbestimmungen (\pm SD).

* Es bedeutet z.B. DAC-40-PS0.2 = 0.2 mg PS je mg DAC-40.

der liposomalen Formulierung notwendig waren um die Gentransfereffizienz zu steigern. Die jeweils benötigte Menge an PS je DNA blieb also etwa konstant.

Da die Transfektion von Suspensionszellen besonderes problematisch ist, sollte außerdem der Gentransfer in humane Erythroleukämiezellen der Linie K562 untersucht werden. Unsere Transfektionsexperimente mit diesen Zellen zeigen, daß Lipoplexe hergestellt aus DAC-Chol-Liposomen, PS und Plasmid-DNA auch für den Gentransfer in Suspensionszellen geeignet sind (Abb. 3.14). So betrug die Transfektionsrate der Zellen mit DAC-30-Liposomen und pEGFPC1-Plasmid-DNA, vorkomplexiert mit Protaminsulfat, etwa 15 %. Es wurde nachgewiesen, daß bei der Transfektion von Suspensionszellen wesentlich größere Zellzahlen je eingesetzter Lipoplexmenge erforderlich sind als bei der Transfektion von adhären Zellen. So mußten zur Transfektion der K562-Zellen etwa 100.000 Zellen statt der 10-20.000 bei adhären Zellen in den 96-Well-Zellkultur-schalen ausplattiert und transfiziert werden. Bei niedrigeren Zellzahlen traten toxische Effekte der Lipoplexe auf welche sich in einer verringerten Reportergenexpression niederschlugen. Wie Transfektionsexperimente mit anderen Suspensionszelllinien zeigten, gibt es große Unterschiede in der Transfizierbarkeit der verschiedenen Suspensionzelllinien: Es konnte z.B. eine hohe Reportergenexpression bei der T-Zelllinie Jurkat, eine nur niedrige bei einer B-Zelllinie aber keine bei den humanen monozytären Zellen der Linie HL-60 erreicht werden.

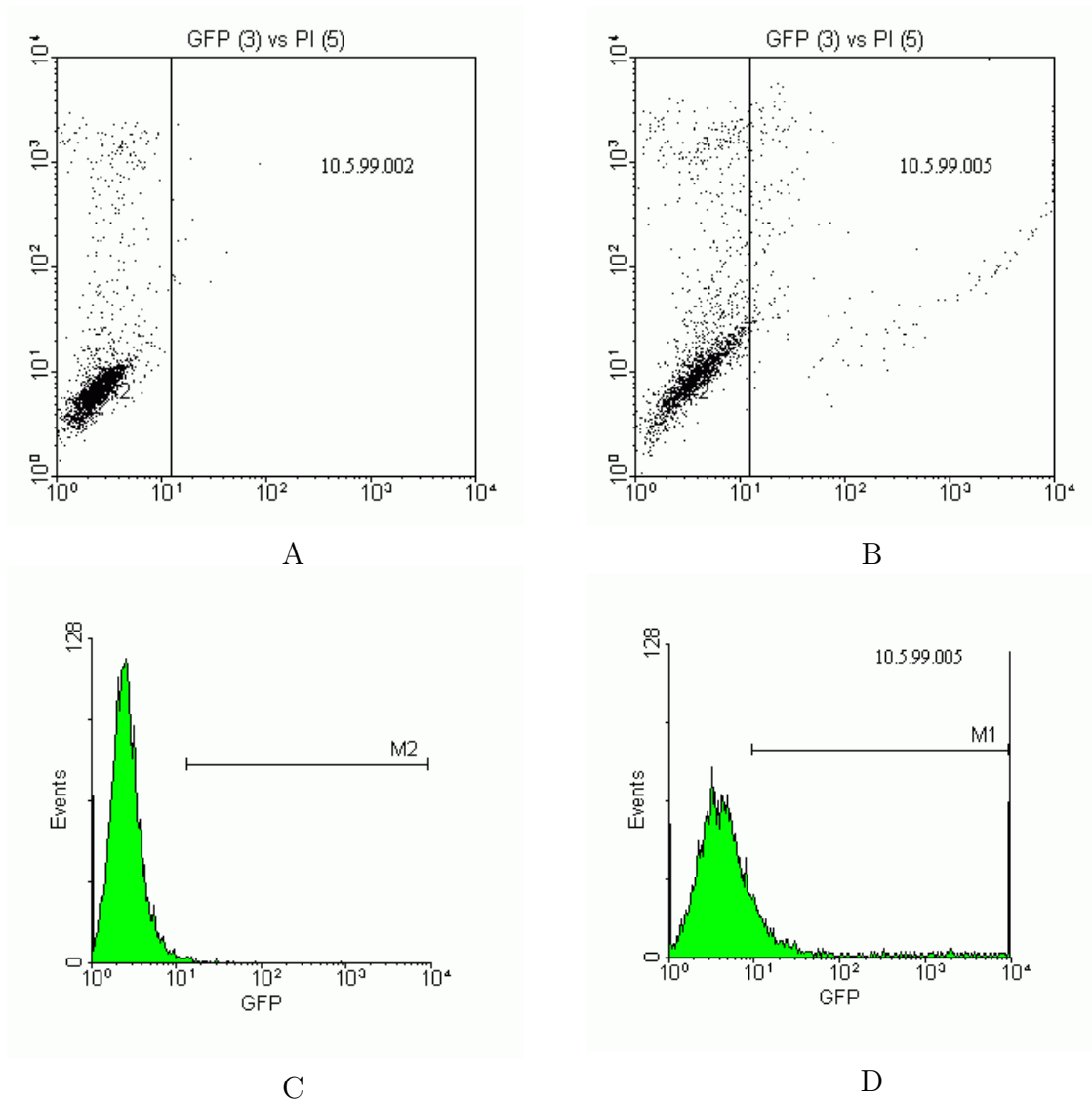


Abbildung 3.14: **FACS-Analyse von GFP-transfizierten K562-Zellen**

K562-Zellen wurden mit DAC-30/PS/pEGFPC1-Komplexen transfiziert und nach 72 h wurden Reporterexpression und Zellvitalität mit Hilfe eines Becton-Dickenson FACS-Scans analysiert.

A: DOT-Plot der Reporterexpression (x-Achse) vs. PI-Aufnahme (y-Achse) als Maß für die Toxizität der Kontrollzellen.

B: DOT-Plot der Reporterexpression (x-Achse) vs. PI-Aufnahme (y-Achse) als Maß für die Toxizität der transfizierten Zellen.

C: Histogramm der GFP-Expression für die Kontrollzellen (M2=0.8 %).

D: Histogramm der GFP-Expression für die transfizierten Zellen (M1=15 %).

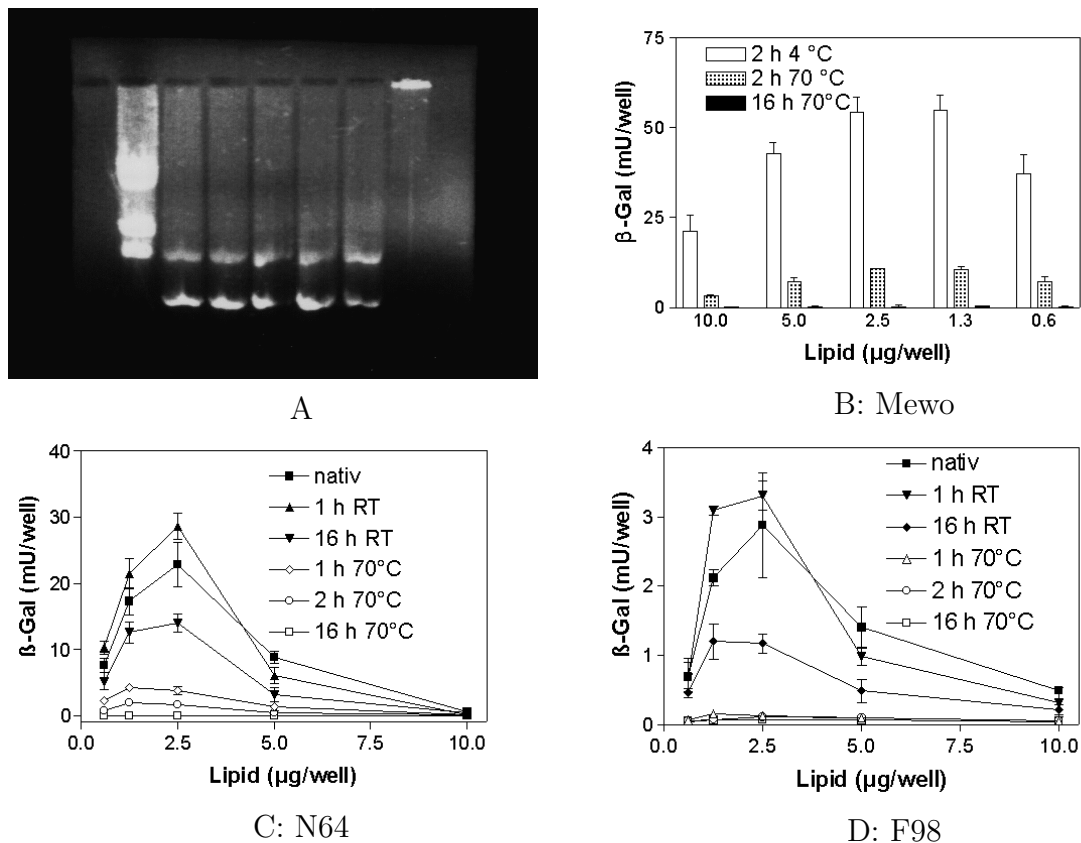


Abbildung 3.15: Einfluß der DNA-Qualität auf die Reporterexpression

Die Plasmid-DNA pUT651 wurde für 1 bis 16 h bei RT bzw. bei 70 °C inkubiert. F98 und Mewo-Zellen wurden dann mit Lipoplexen, hergestellt aus 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 µg Lipid sowie 0.25 µg von dieser DNA, transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Einzelbestimmungen für Vitalität und Reporterexpression (\pm SD).

A: Ergebniss der Agarose-Gelelektrophorese (von links nach rechts)

Bahn 1: Marker λ -DNA Hind-III-verdaut

Bahn 2: Plasmid-DNA pUT651 nativ

Bahn 3: Plasmid-DNA pUT651 nach 1 h Inkubation bei RT

Bahn 4: Plasmid-DNA pUT651 nach 16 h Inkubation bei RT

Bahn 5: Plasmid-DNA pUT651 nach 1 h Inkubation bei 70 °C

Bahn 6: Plasmid-DNA pUT651 nach 2 h Inkubation bei 70 °C

Bahn 7: Plasmid-DNA pUT651 nach 16 h Inkubation bei 70 °C

B: β -Gal-Expression von Mewo-Zellen nach Transfektion mit DAC-30-Liposomen

C: β -Gal-Expression von N64-Zellen nach Transfektion mit dem Max2-Lipid

D: β -Gal-Expression von F98-Zellen nach Transfektion mit dem Max2-Lipid

3.2.4 Einfluß der Qualität der Plasmid-DNA

Die DNA ist der wirksame Bestandteil des Gentransfervesikels, dessen Applikations in die Zelle das eigentliche Ziel der Transfektion ist. In diesem Abschnitt sollte deswegen untersucht werden, welchen Einfluß die DNA-Qualität auf das Transfektionsverfahren bzw. auf die Reporterexpression hat.

Nach der Präparation wurde die Qualität der Plasmid-DNA durch eine Restriktionsspaltung mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und auf ihre Iden-

tität sowie den Anteil an superhelikaler Plasmid-DNA untersucht. Die Kontrolle des Anteils an superhelikaler DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese ergab einen Anteil von über 90 %. Um den Einfluß der DNA-Qualität auf die zu erreichende Genexpression zu untersuchen, wurde die DNA für 1, 2 oder 16 h bei RT, bzw. für 1, 2 oder 16 h bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe bzw. ihrer Konformation aufgetrennt.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.15A zeigen, konnte anhand der Gelelektrophorese keinerlei Veränderung der DNA-Struktur festgestellt werden. Lediglich bei einer Übernachtinkubation der Plasmid-DNA war ein Gelieren der DNA und eine Immobilisierung im Agarose-Gel festzustellen. Die DNA, die für 2 h bei 70°C inkubiert worden war, unterschied sich hinsichtlich ihres Laufverhaltens im Agarosegel kaum von der Ausgangs-DNA.

Trotz des gleichen Trennungsmusters der verschiedenen DNA-Proben im Agarose-Gel zeigten die Ergebnisse der Transfektionsversuche, daß sich die Reporterexpression in Abhängigkeit von der Länge der Inkubation und der Höhe der Inkubationstemperatur, stark unterscheidet. So nahm bei einer Inkubation der DNA bei RT die Reporterexpression langsam ab und betrug nach 16 h nur noch etwa 1/3 der Expression, die mit der originalen, unbehandelten Plasmid-DNA erreicht wurde. Bei einer 70°C-Inkubation war die Abnahme der β -Gal-Expression noch stärker. Bereits nach 1 h sank sie auf unter 10 % im Vergleich zur Reporterexpression der Kontroll-DNA und nach einer 2 h-Inkubation war fast keine Reporterexpression in den Zellen mehr nachweisbar.

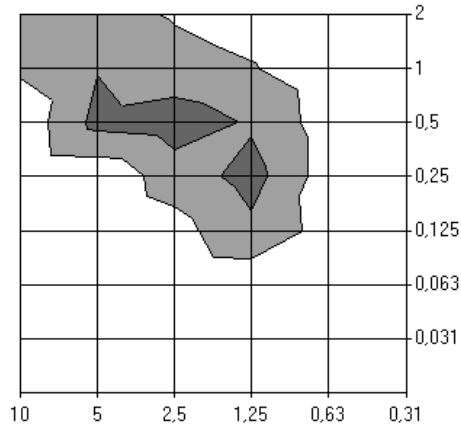
Die Inkubation der DNA bei RT bzw. bei 70°C führt offenbar zu strukturellen Veränderungen, welche mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nicht nachweisbar sind. Diese Veränderungen wirkten sich jedoch stark auf die Reporterexpression aus.

3.2.5 Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses

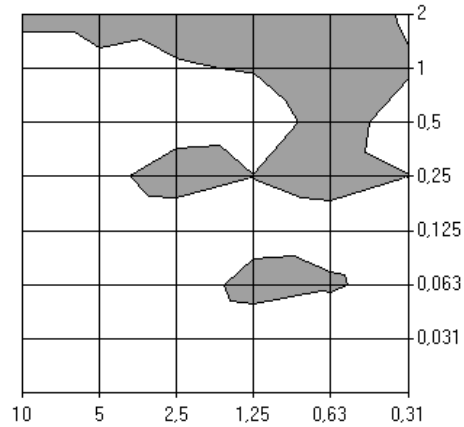
Wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, ist für die Gentransfereffizienz neben der Menge an Lipid und DNA auch das Mischungsverhältnis beider Komponenten von Bedeutung. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden F98, MaTu und CC531-Zellen mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μ g Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μ g DNA transfiziert. Als Liposomen wurden dabei DOCSPER-100, DOCSPER-75, DOCSPER-50 und DOCSPER-25 sowie DAC-50, DAC-25, DC-50 und DC-25-Liposomen verwandt.

Bei den Ergebnissen war festzustellen, daß sich das optimale L/D-Verhältnis in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, der chemischen Struktur des kationischen Lipides, der Dauer der Inkubation und der Menge an Helferlipid unterschied. Bei Liposomen mit polykationischen Lipiden wie DOCSPER-100, war außerdem das verwendete Medium von großer Bedeutung für eine optimale Lipoplex-Formulierung. So war der Bereich wirksamer L/D-Verhältnisse bei Medien ohne Natriumbicarbonatzusatz wesentlich kleiner als bei Medien, die diese Puffersubstanz enthielten. Auf diese Untersuchungen wird in einem späteren Teil der Arbeit noch ausführlich eingegangen werden.

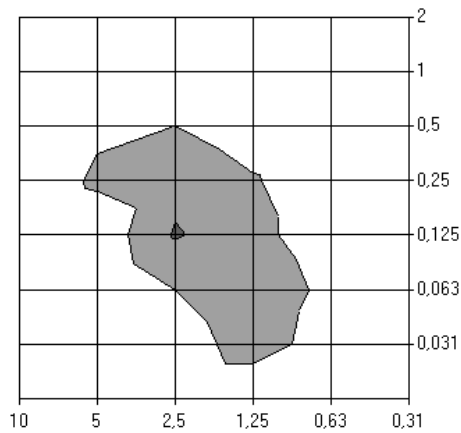
Bei der Transfektion von CC531- und MaTu-Zellen ließ sich zum Beispiel feststellen, daß bei Liposomen mit einem niedrigem Anteil an Helferlipid das optimale L/D-Verhältnis größer war als bei Liposomen mit einem hohem Helferlipidanteil (Abb. 3.16).



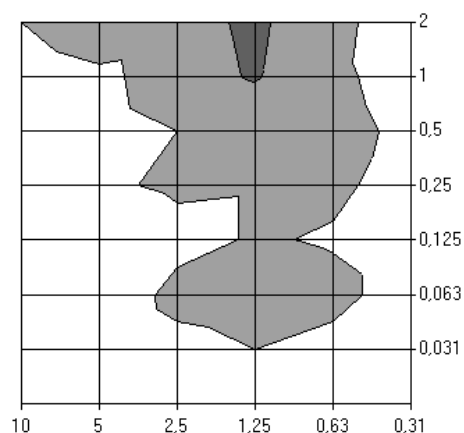
A: DC-25/CC531



B: DC-50/CC531



C: DC-25/MaTu



D: DC-50/MaTu

Abbildung 3.16: **Einfluß des L/D-Verhältnisses auf den Gentransfer mit DC-Chol-Liposomen**

MaTu- und CC531-Zellen wurden mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μg DNA transfiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der β -Gal-Expressionen für DC-25 und DC-50-Liposomen. Die Mengen an DNA sind auf der y-Achse, die Menge an Liposomen auf der x-Achse aufgetragen. Dunkelgrau sind Bereiche von 66-100 %, hellgrau Bereiche von 33-66 % und weiß Bereiche <33 % der maximalen Genexpression dargestellt.

So betrug bei DC-25-Liposomen dieses L/D-Verhältnis bei der Transfektion von CC531-Zellen etwa 5:1 bis 10:1, während es bei DC-50-Liposomen zu niedrigeren Verhältnissen von etwa 2:1 bis 1:1 verschoben war. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Transfektion von MaTu-Zellen und auch mit den anderen Liposomen erzielt.

Wie die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, kann neben dem Zusatz von PS auch ein höherer Anteil des kationischen Lipides in den Liposomen zu einer Verschiebung des optimalen L/D-Verhältnisses zu niedrigeren Werten führen. Dieses Verhältnis ist aber außerdem von Einflußfaktoren wie der Art des verwendeten Lipides, der transfizierten Zelllinie, dem verwendeten Komplexierungsmedium oder der Inkubationszeit abhängig.

3.2.6 Einfluß des Komplexierungsmediums

Die enorm schwankenden Ergebnisse, die mit dem kommerziell erhältlichen kationischem Lipid DOSPERTM und den von uns hergestellten DOCSPER-Liposomen bei der Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien für die Herstellung der Lipoplexe erzielt wurden, warfen die Frage nach dem Einfluß der Zusammensetzung des Mediums auf die Effektivität der Lipoplexbildung auf. Da Untersuchungen in ausreichendem Umfang mit DOSPERTM nicht durchführbar waren, wurde hierzu das chemisch verwandte Lipid DOCSPER verwendet. Dieses enthält nur drei mögliche positive Ladungen statt der vier bei DOSPERTM, zeigte jedoch vergleichbare oder etwas höhere Transfektionsraten.

In einer ersten Versuchsreihe wurden Lipoplexe aus DOCSPER-100-Liposomen und der Plasmid-DNA pUT651 in Medien mit unterschiedlicher Ionenstärke von 0 bis 200 mM NaCl oder in DMEM hergestellt. Bei den Lipoplexen wurden sowohl Lichtstreuung, EtBr-Ausschluß, Wanderungsverhalten im Agarose-Gel und Transfektionseigenschaften untersucht.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.17 zeigen, nahm bei DOCSPER-100-Liposomen mit zunehmender NaCl-Konzentration sowohl die Trübung der Lipoplexe als auch die β -Gal-Expression zu. Insbesondere verbreiterte sich die Spannweite geeigneter L/D-Verhältnisse bei der Erhöhung der Ionenkonzentration. Wurden dagegen DOCSPER-50 Liposomen verwendet, war der Einfluß des Komplexierungsmediums weniger drastisch. Noch besser geeignet für die Generierung effizienter Gentransferkomplexe als 200 mM NaCl erwies sich das Zellkulturmedium DMEM. Wie die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese und des EtBr-Ausschlusses zeigten, kam es in diesem Medium zu einer verringerten Bindung der DNA an die Liposomen. Den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach zu urteilen veränderten sich die Liposomen in Abhängigkeit von dem Medium in dem sie verdünnt wurden (Abb. 3.18). So wurden in Wasser sehr kleine Liposomen beobachtet, während es in DMEM offenbar in Folge von elektrostatischen und osmotischen Veränderungen zu einer erheblichen Vergrößerung der Liposomen kam.

Da es sich bei DMEM-Medium um ein sehr komplexes Gemisch von verschiedenen Komponenten wie Salzen, Aminosäuren, Vitaminen, Glukose und Puffersubstanzen handelt, wurde im weiteren untersucht, welche Bestandteile des Mediums für die verbesserten Gentransfereigenschaften und die verringerte Bindung der DNA an die Liposomen verantwortlich sind.

Dazu wurden DOCSPER/DNA-Lipoplexe in Wasser, Ringerlösung oder in NaCl/Bicarbonatlösung hergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die Größe der in Bicar-

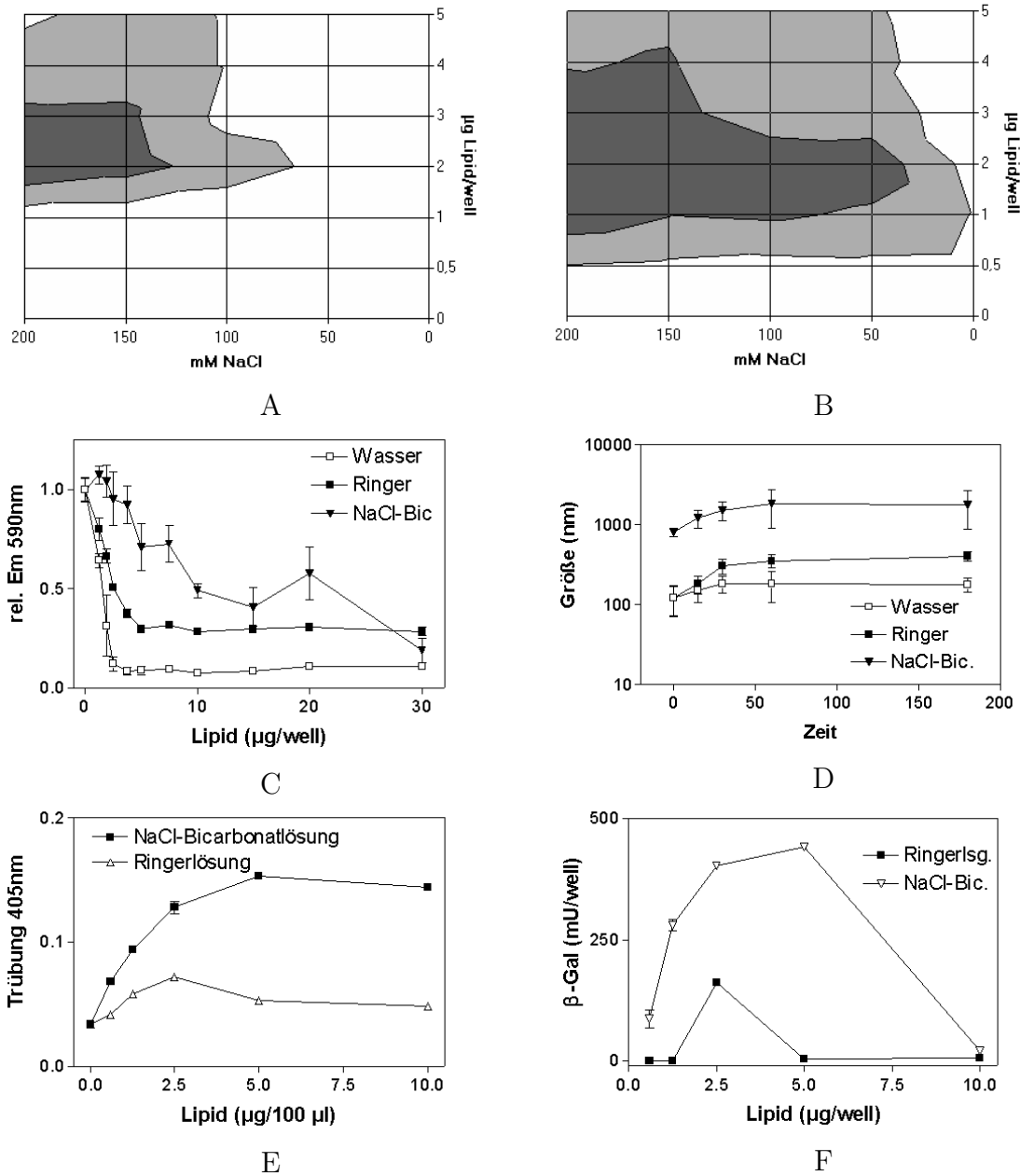


Abbildung 3.17: Einfluß des Mediums auf die biophysikalischen Eigenschaften und die Transfektion mit DOCSPER-100/DNA-Lipoplexen.

A: Relative Streuung von Lipoplexen, hergestellt aus DOCSPER-100-Liposomen und der Plasmid-DNA pUT651 in Medien mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Bereiche hoher Lichtstreuung sind dunkel, Bereiche niedriger Lichtstreuung hell dargestellt. Die Lichtstreuung wurde auf die Menge an Lipid normalisiert.

B: Relative Werte der β -Gal-Expressionen dieser Lipoplexe bei Transfektion von F98-Zellen.

C: EtBr-Ausschluß bei DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen in Abhängigkeit von dem verwendeten Komplexierungsmedium. 3 μ g DNA wurden mit unterschiedlichen Mengen an DOCSPER-100-Liposomen komplexiert. Nach etwa 10 min wurde die EtBr/DNA-Fluoreszenz bestimmt.

D: Ergebnisse der Größenbestimmung von DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen, bestehend aus 100 μ g DOCSPER und 10 μ g DNA, hergestellt in verschiedenen Komplexierungsmedien.

E: Relative Lichtstreuung von DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen mit 0.33 μ g Plasmid-DNA und 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μ g Lipid je 100 μ g Medium. Die Lipoplexe wurden in Ringerlösung oder in 150 mM NaCl mit 20 mM Bicarbonat hergestellt.

F: β -Gal-Expression der entsprechenden DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexe 48 h nach der Transfektion von F98-Zellen.

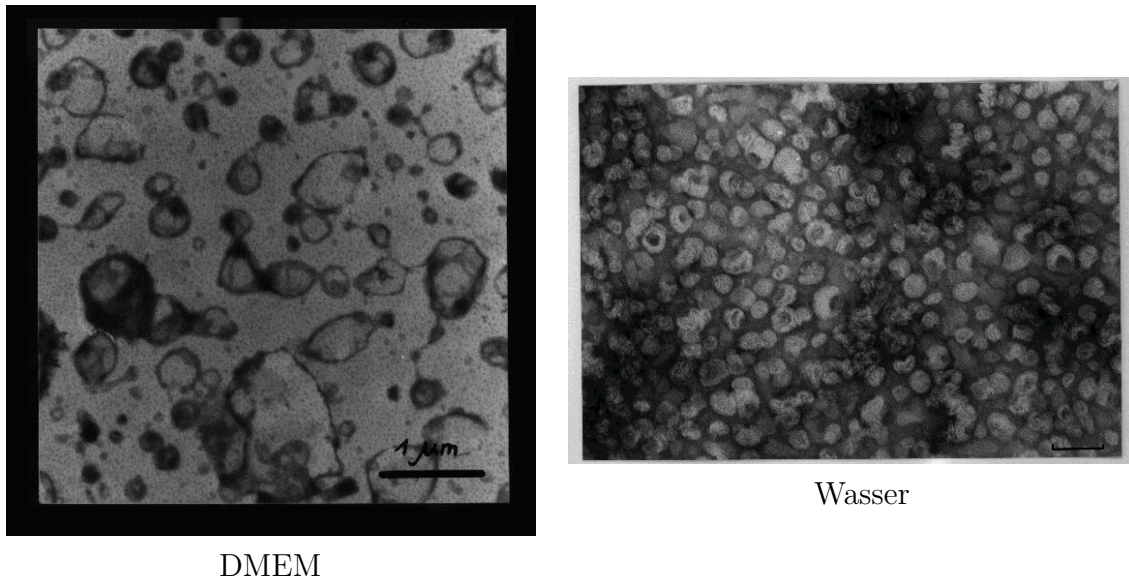


Abbildung 3.18: **Einfluß des Mediums auf Größe und Beschaffenheit von DOCSPER-100-Liposomen**

DOCSPER-100-Liposomen wurden in DMEM oder in Wasser verdünnt und mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Ein Balken entspricht 1000 (links) bzw. 100 nm.

bonatmedium formulierten Lipoplexe gegenüber in Wasser oder in Ringerlösung hergestellten, zunahm und das die DOCSPER-100/DNA-Bindung in Bicarbonatlösung schwächer wurde (Abb. 3.17C-E). Weiterhin konnte durch den Zusatz des Bicarbonats die Transfektionsrate erheblich erhöht werden. Dabei war festzustellen, daß sich das relativ schmale Fenster des optimalen L/D-Verhältnisses, bei dem die Lipoplexe gentransferaktiv sind, verbreiterte (Abb. 3.17F). Im Gegensatz zu DOCSPER- und auch zu LipofectAMINETM-Liposomen war bei monokationischen Liposomen, die das Helferlipid DOPE enthielten, wie z.B. bei LipofectinTM, keine Steigerung sondern teilweise sogar eine Verminderung der Genexpression zu beobachten, wenn die Lipoplexe in bicarbonathaltigem Medium hergestellt wurden (vgl. Abb. 3.19).

Es ist festzustellen, daß das Medium, in dem die Herstellung der Gentransfervesikel erfolgt, einen sehr großen Einfluß auf das Erscheinungsbild und die Effizienz der Vesikel hat. Für Liposomen, die aus polykationischen Lipiden hergestellt werden, ist die Verwendung von bicarbonathaltigen Medien wie DMEM oder NaCl-Lösung mit Bicarbonat günstig für das Erreichen hoher Gentransfereffizienzen in *in vitro* Untersuchungen. Dagegen war bei Liposomen die aus monokationischen Lipiden formuliert worden waren, eher ein hemmender Einfluß des Bicarbonats auf die Gentransfereffizienz festzustellen.

3.2.7 Einfluß der Komplexbildungszeit auf die Stabilität der Vesikel

Für eine klinisch sichere Anwendung von kationischen Liposomen ist die zeitliche Stabilität der hergestellten Gentransfervesikel von besonderer Bedeutung. Deswegen wurden Untersuchungen zu Stabilität, Lagerbarkeit und zum Einfrieren bzw. Lyophilisieren der Komplexe durchgeführt.

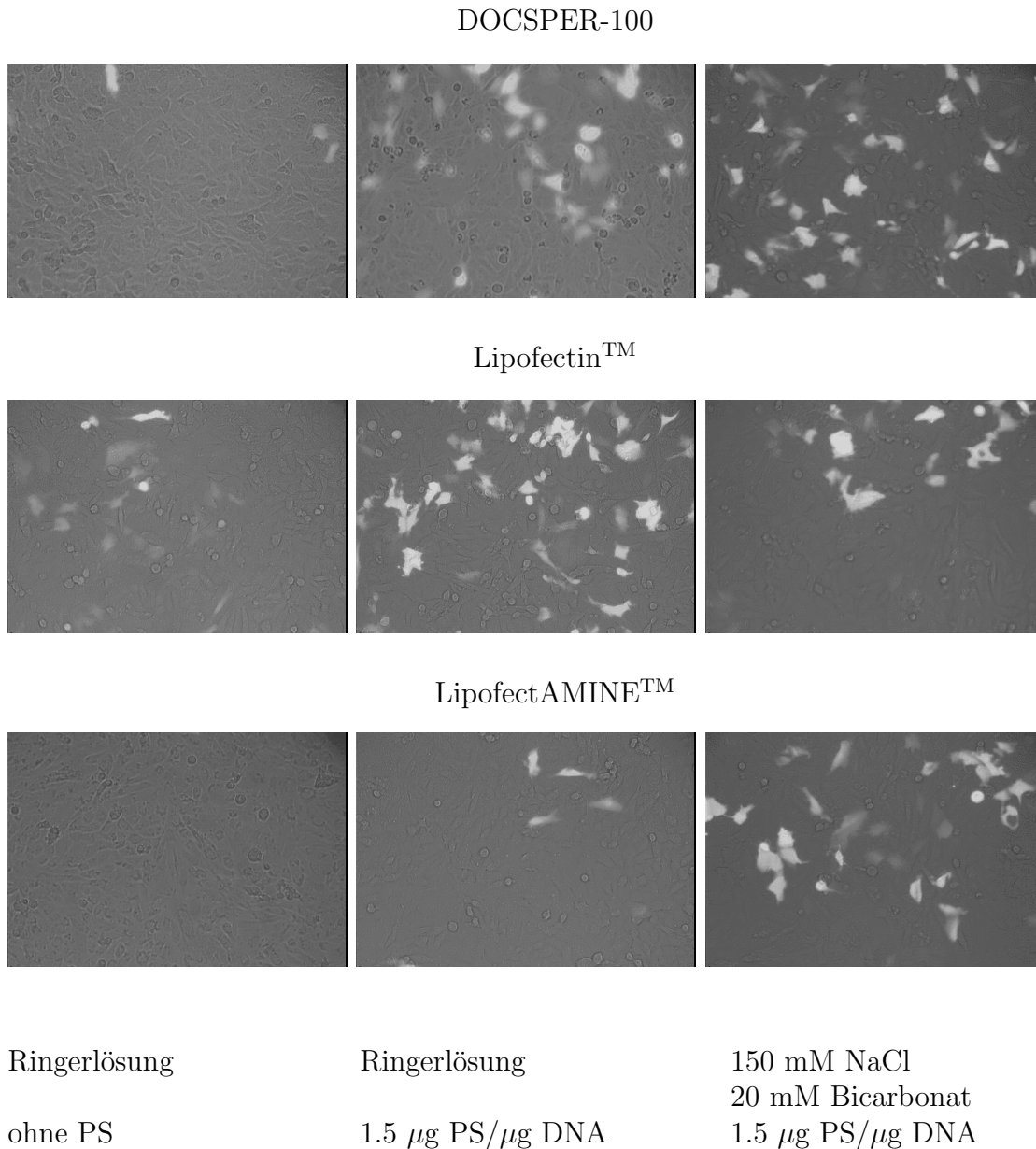


Abbildung 3.19: Einfluß von Medium und PS auf die Effizienz der Lipoplexherstellung

Transfiziert wurden N64-Zellen mit Lipoplexen, hergestellt aus 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 µg Lipid sowie 0.3 µg DNA (1/5 pEGFPC1, 4/5 pUT651) - teilweise vorkomplexiert mit 1.5 µg PS je µg DNA. Die Lipoplexe wurden in 100 µl Ringerlösung bzw. 150 mM NaCl mit 20 mM Bicarbonat hergestellt, die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 %. 4 h nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurde frisches Medium hinzugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes auf die Expression des GFP's untersucht. Dargestellt sind die Wells mit der für das jeweilige Lipid maximalen Anzahl transfizierter Zellen.

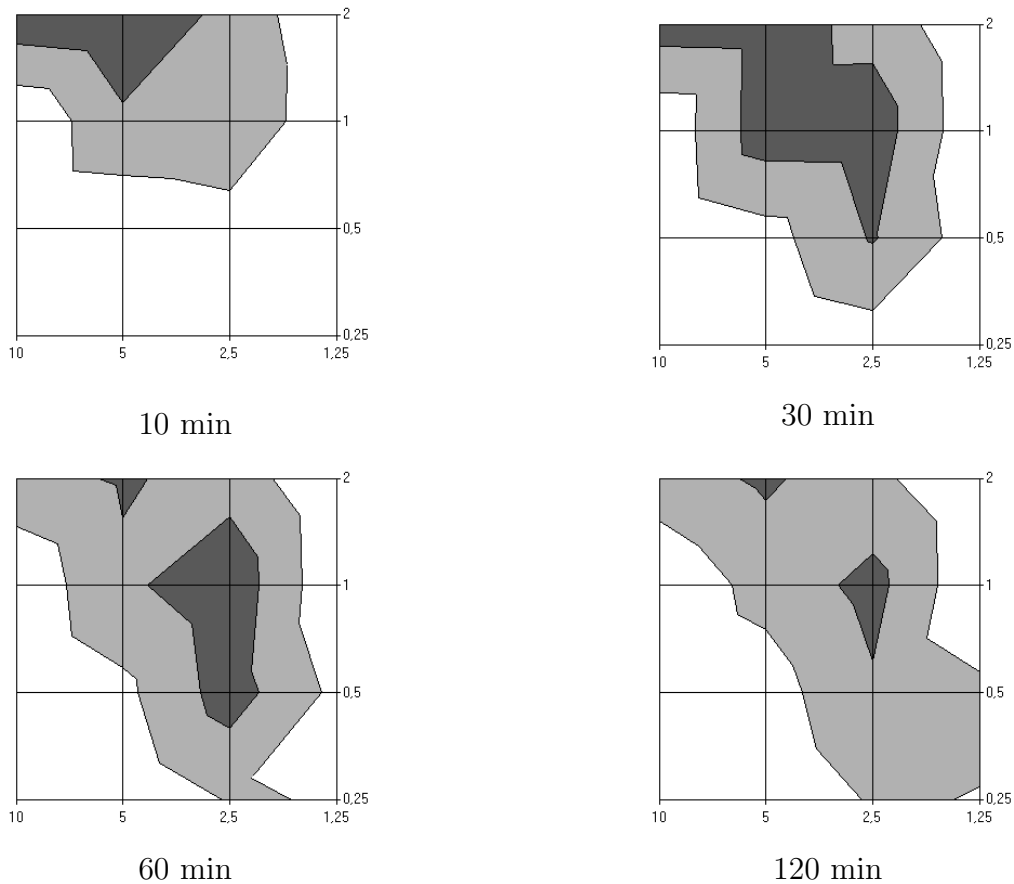


Abbildung 3.20: **Einfluß der Komplexbildungszeit auf den Gentransfer mit DOCSPER-50-Liposomen**

DOCSPER-50/pUT651-DNA-Lipoplexe wurden in 100 μl serumfreiem DMEM-Medium hergestellt. Die Liposomenmengen betragen 10, 5, 2,5 und 1,25 μg , die DNA-Mengen betragen 2, 1, 0,5 und 0,25 μg . Nach 10, 30, 60 und 120 min wurden die Lipoplexe auf MaTu-Zellen pipettiert und für 4 h zur Transfektion auf den Zellen belassen. Anschließend erfolgte die Zugabe frischen Zellkulturmediums und nach weiteren 44 h die Bestimmung der Reportergenexpression.

Lipoplexe, hergestellt aus unterschiedlichen Mengen an DOCSPER-50- und DOCSPER-100-Liposomen sowie Plasmid-DNA, wurden 10, 30, 60 und 120 min nach dem Mischen der Einzelkomponenten auf die Zellen gegeben. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluß der Komplexkonzentration auf die Vesikelstabilität. Höher konzentrierte Komplexe mit 100 μg Lipid und 20 μg DNA erreichten schon nach 10 Minuten Inkubation ihre maximale Gentransferaktivität, wogegen weniger konzentrierte Lipoplexe diese erst später erreichten (vgl. Abb. 3.20). Dagegen nahm die Transfereffizienz der höher konzentrierten Lipoplexe nach 60 min schon wieder leicht ab. Auch bei Sp-Chol-Liposomen nahm die Gentransferaktivität der aus ihnen hergestellten Lipoplexe nach etwa 30 min Inkubation langsam ab, während monokationische Lipide wie DOTMA und DAC-Chol Komplexe ausbildeten die über längere Zeit stabil blieben (vgl. Abb. 3.21).

DAC-Chol wurde wegen der guten Kurzzeitstabilität der mit diesem Lipid hergestellten Lipoplexe als Modell-Lipid für die Präparation langfristig stabiler, hochkonzentrierter Lipoplexe ausgewählt. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität, wurden

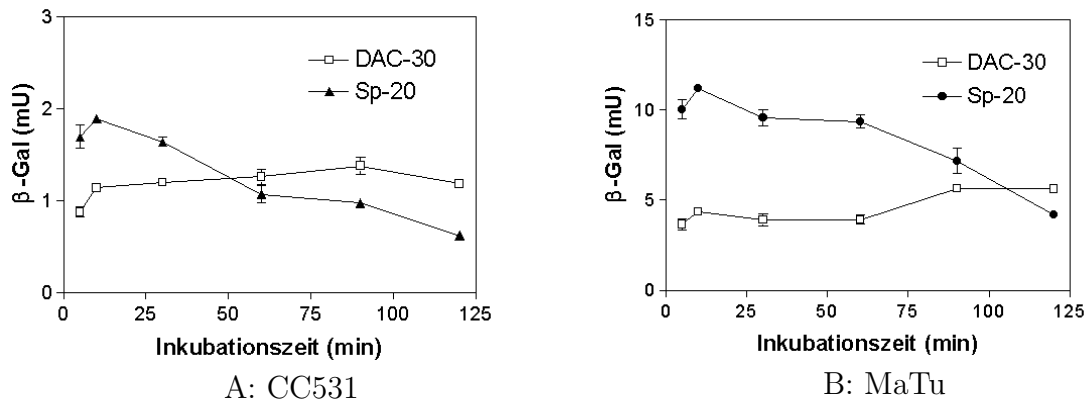


Abbildung 3.21: **Kurzzeitstabilität von DAC-30/pUT651- und Sp-20/pUT651-Komplexen.**

50.000 CC531 und MaTu-Zellen je 24-Well Schale, in 500 μ l Medium kultiviert, wurden mit Lipoplexen bestehend aus 10 μ g Lipid und 2 μ g Plasmid-DNA pUT651, hergestellt in 100 μ l Opti-MEM-Medium, nach 5, 10, 30, 60 und 120 min Inkubation transfiziert. 44 h nach der Zugabe der Lipoplexe wurden die Zellen auf ihre β -Gal Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen (\pm SD).

unterschiedliche Mengen an DAC-Chol-Liposomen, mit oder ohne PS-Zusatz, mit verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA pUT651 in Ringerlösung komplexiert. 1, 24, 48 und 72 h nach der Herstellung wurden mit diesen Lipoplexen F98 und N64-Zellen transfiziert. Wie die Abbildung 3.22 zeigt, sank die Transferaktivität der Vesikel bei der Rattenglioblastomzelllinie F98 schneller als bei der humanen Glioblastomzelllinie N64 ab. Nach 72 h Komplexinkubation betrug die Gentransfereffektivität bei der N64-Zelllinie noch etwa 50 % der Ausgangsaktivität, während es bei der F98-Zelllinie nur noch etwa 1/3 bei DAC-40/DNA-Lipoplexen bzw. weniger als 10 % bei DAC-40/PS/DNA-Komplexen waren. Bei den DAC-40/DNA-Lipoplexen war schon nach wenigen Stunden das Auftreten von kleineren Präzipitaten zu beobachten. Im Gegensatz dazu traten Präzipitate bei Komplexen die mit PS hergestellt worden waren, erst nach mehr als 24 h auf. Diese Präzipitate und die Uneinheitlichkeit der Lipoplexe in Größe und Struktur führten häufig zu stark schwankenden Ergebnissen bei der Transfektion bzw. bei der Reportergenexpression.

Die geringere Präzipitatbildung der Gentransferkomplexe, die mit PS hergestellt worden waren, führte offenbar auch zu einer verlängerten Transferfähigkeit der Vesikel. So verloren bei Untersuchungen zur Stabilität von DAC-40/DNA- und DAC-40/PS/DNA-Komplexen letztere nach Inkubation bei 37°C in einem Zeitraum von 72 h nur etwa 50 % ihrer Gentransferaktivität (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu sank bei DAC-40/DNA-Komplexen, die ohne PS hergestellt worden waren, die Gentransferaktivität von einem niedrigeren Ausgangsniveau ausgehend wesentlich stärker ab.

Es wurde weiterhin versucht durch die Variation der Mediumbeschaffenheit eine längere Stabilität der Lipoplexe zu erreichen. Wie die Ergebnisse der PCS-Messungen im Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt haben, waren die in Saccharose gebildeten Gentransferkomplexe besonders stabil und veränderten ihre Größe auch über einen Zeitraum von 48 h kaum. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.23 zeigen, waren aber in Ringerlösung hergestellte Lipoplexe wesentlich gentransferaktiver als Komplexe, die in Saccharose-Lösung oder Wasser hergestellt worden waren. Komplexe, die in Mischungen aus Rin-

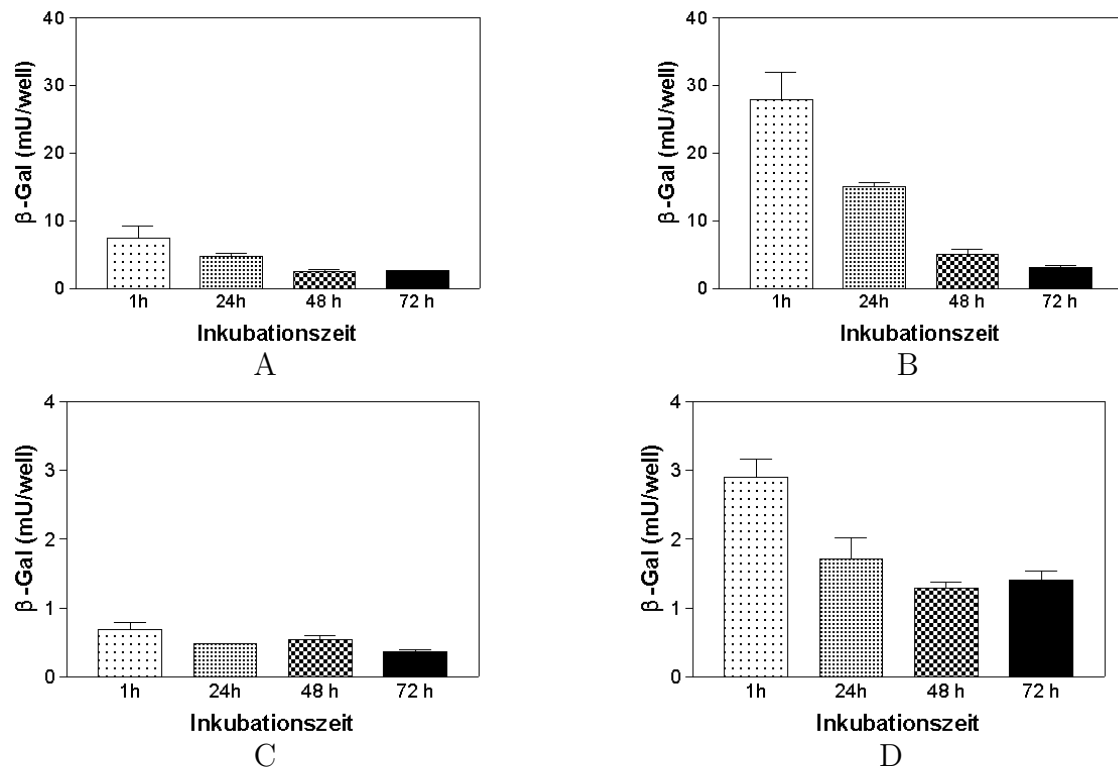


Abbildung 3.22: Langzeitstabilität von DAC-40/DNA und DAC-40/PS/DNA-Komplexen

In einem Glasröhrchen wurden Lipoplexe in einem Volumen von 3 ml Ringerlösung, bestehend aus 100 μg DAC-40-Liposomen mit oder ohne 20 μg PS und 20 μg pUT651-Plasmid-DNA hergestellt. Nach 1, 24, 48 und 72 h wurden 50 μl der Komplexe auf F98- und N64-Zellen in ein Well einer 96er Zellkulturplatte pipettiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach 72 h wurde die Reporterexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 3 Bestimmungen (\pm SD) für:

- A: F98-Zellen transfiziert mit DAC-40/DNA-Komplexen
- B: F98-Zellen transfiziert mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen
- C: N64-Zellen transfiziert mit DAC-40/DNA-Komplexen
- D: N64-Zellen transfiziert mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen.

gerlösung und Saccharose-Lösung oder Wasser hergestellt worden waren, waren nur etwas weniger gentransferaktiv als die in 100 % Ringerlösung hergestellten Vesikel. Wie Untersuchungen zur Lyophilisierbarkeit der fertig formulierten Gentransfervesikel zeigten, war für eine Langzeitlagerung der Zusatz von mindestens 2 % Saccharose notwendig um beim Wiederauflösen ein Präzipitieren der Komplexe zu vermeiden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß aus DAC-Chol-Liposomen, PS und Plasmid-DNA Komplexe hergestellt werden können, die über mehrere Tage einen Großteil ihrer Gentransferaktivität behalten. Dabei erwies sich Ringerlösung als ein geeignetes Komplexierungsmedium wenn eine hohe Gentransferrate als Beurteilungsparameter herangezogen wurde. In Medien mit Saccharose waren die Vesikel zwar stabiler und auch wesentlich kleiner, wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt haben, aber ihre Gentransferaktivität lag erheblich unter den Lipoplexen, die in Medien mit einem 50 oder 100 % Anteil an Ringerlösung hergestellt worden waren.

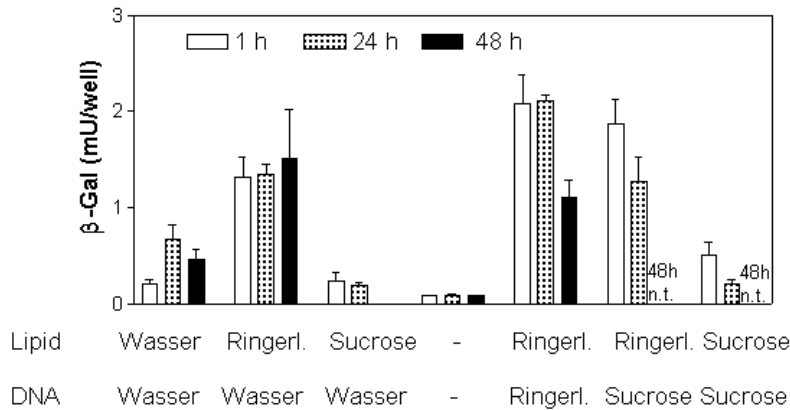


Abbildung 3.23: **Einfluß des Mediums auf die Stabilität von DAC-30/PS/DNA-Komplexen**

Lipoplexe bestehend aus 500 μg DAC-30-Liposomen mit 100 μg PS und 50 μg Plasmid-DNA, separat verdünnt in jeweils 500 μl Wasser, Ringerlösung oder 10 %-Saccharose und anschließend gemischt wurden zur Transfektion von F98-Zellen eingesetzt. Nach einer Inkubationzeit von 1, 24 oder 48 h wurden 5 μl der Lipoplexe, verdünnt in 50 μl serumfreiem Medium auf die Zellen in 96er MTP pipettiert. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 h wurden β -Gal-Expression und Zellvitalität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3-5 Einzelbestimmungen (\pm SD).

3.2.8 Einfluß der Serumkonzentration

Für eine Vielzahl von kationischen Liposomen wurde beschrieben, daß die Anwesenheit von Serumproteinen während der Transfektion die Effektivität des Transfers der DNA in die Zielzellen bzw. die Transfektionsrate stark verringert. Wir untersuchten daher den Einfluß von Serumproteinen auf die Transfektion von DAC-40 und von DOTMA-50-Liposomen. Wie die Ergebnisse der Abbildung 3.24 zeigen, waren DAC-40/PS/DNA-Lipoplexe resistent gegen die Anwesenheit von Serumproteinen während der Transfektion. Es war keine Verringerung der Genexpression zu beobachten wenn die Serumkonzentration von 5 auf 20 % erhöht wurde. Bei der humanen Glioblastomzelllinie N64 wurde bei einer Erhöhung der FKS-Konzentration sogar eine leichte Steigerung der Genexpression festgestellt. Wie die Abbildung 3.24E+F zeigt, ist dies vor allem auf die dadurch erhöhte Zellvitalität zurückzuführen. Während bei einer Konzentration von 20 % FKS die Zellvitalität nicht unter 90 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen sank, verringerte sich bei einer Anwesenheit von nur 5 % Serum bei einigen Lipopolyplexformulierungen die Vitalität der Zellen auf unter 75 %.

Im Gegensatz zu den bei Verwendung von DAC-40-Liposomen erzielten Ergebnissen, die eher einen positiven Einfluß des Serums auf den Verlauf der Transfektion zeigten, war bei der Transfektion mit DOTMA-50-Liposomen ein negativer Einfluß der Serumkonzentration auf die Gentransferrate festzustellen. So sank bei DOTMA-50-Liposomen mit der Erhöhung der Serumkonzentration im Zellkulturmedium sowohl bei der Zelllinie N64 (Abb. 3.24B) als auch bei der humanen Melanomzelllinie Mewo (Abb. 3.24D) die Genexpression stark ab. Die bei 20 % Serumkonzentration erreichte maximale Genexpression betrug nur noch etwa 1/3 der bei 5 % erreichten Genexpression.

Die Versuchsergebnisse lassen schlußfolgern, daß es zwischen den einzelnen kationischen Liposomen Unterschiede in der Serumstabilität der aus ihnen hergestellten

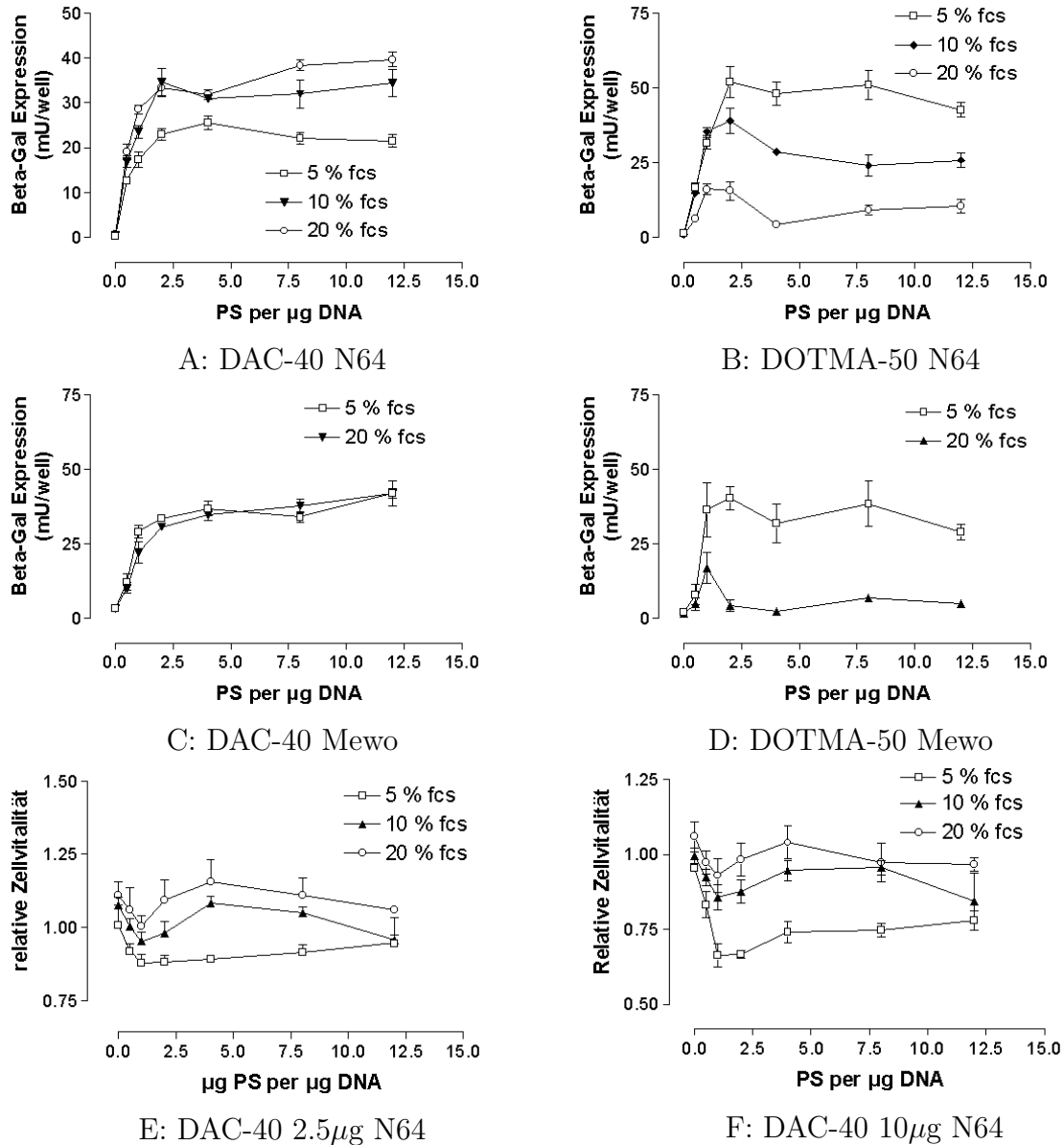


Abbildung 3.24: Einfluß von Serum und PS auf die β -Gal Expression und die Zellvitalität

N64- und Mewo-Zellen in 96-Well-Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DAC-40 bzw. DOTMA-50-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.3 μg per Well), mit verschiedenen Mengen an PS vorkomplexiert, transfiziert. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5, 10 oder 20 % FKS. Nach 4 h wurde das Medium von den Zellen entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für weitere 48 h zur Expression des Reportergens kultiviert. Dargestellt sind die β -Gal-Expressionen ($n=3 \pm \text{SD}$) der als optimal gefundenen Lipidkonzentration (2.5 μg DOTMA, 5 μg DAC per Well für die N64 bzw. 1.25 μg DOTMA und 2.5 μg und für die Zelllinie Mewo).

Gentransfervesikel gibt. Bei den Vesikeln, die aus DAC-Chol-Liposomen hergestellt wurden, kam es durch die Anwesenheit von Serum zu keiner Verminderung der Reporterexpression während Gentransferkomplexe, die aus DOTMA-Liposomen hergestellt wurden, bei höherer Serumkonzentration deutlich schlechter transfizierten.

3.2.9 Einfluß von Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentration

Neben den Einflußfaktoren welche die direkten Bestandteile der Gentransfervesikel wie DNA, kationisches Lipid, Helferlipid sowie Polykation betreffen und den Faktoren, die die Komplexherstellung beeinflussen, bestimmt auch das methodische Vorgehen bei der Transfektion den Erfolg des Gentransfers. So sind z.B. die Dauer der Inkubation der Lipoplexe auf den Zellen, die Zelldichte und die verwendete Lipoplexkonzentration von großer Bedeutung für die Vitalität und die Reporterexpression der transfizierten Zellen.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden F98-Zellen mit verschiedenen Lipoplexmischungen aus DAC-30-Liposomen sowie der Plasmid-DNA pUT651 für 1, 2, 4 und 16 h inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel zur Entfernung der Lipoplexe vorgenommen. Nach weiteren 48 h erfolgte die Bestimmung der Toxizität und der Reporterexpression.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.25¹ zeigen, war die Genexpression bei einer kurzzeitigen Inkubation bei größeren Lipoplexkonzentrationen am höchsten, bei längeren Inkubationen verlagerte sich dieses Expressionsmaximum zu niedrigeren Konzentrationen.

Eine Ursache für diesen Befund ist die verringerte Zellvitalität bei einer längeren Inkubation mit hohen Lipoplexkonzentrationen. Die Zellvitalität sank z.B. bei 10 μg DAC-30 und 2 μg Plasmid-DNA bereits nach 2 h Inkubation auf unter 50 % ab, während bei 2.5 μg Lipid und 0.5 μg Plasmid-DNA erst nach 16 h eine Zellvitalität von unter 50 % gemessen wurde. Dementsprechend verlagerte sich die maximale β -Gal-Expression zu niedrigeren Lipoplexkonzentrationen, da im Bereich höherer Konzentrationen die Zellvitalität deutlich zurückging.

Der beobachtete Einfluß der Inkubationszeit war außerdem abhängig von den Zellzahlen, die in die Wells der Zellkulturschalen ausgesät worden waren. Bei niedrigeren Zellzahlen, bzw. weniger konfluenten Kulturen, trat die Toxizität eher und bei niedrigeren Lipoplexkonzentrationen auf. Dementsprechend verringerte sich auch die β -Gal-Expression bereits nach kürzeren Transfektionszeiten (Daten nicht gezeigt).

Die Konzentration der Lipoplexe, die Zelldichte und die optimale Transfektionszeit stehen demzufolge in direktem Zusammenhang mit der Höhe der Genexpression.

¹Text zur Abb. 3.25, S. 91:

F98-Zellen wurden mit DAC-30/pUT651-Lipoplexen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Die Mengen an DNA (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 und 0 μg) sind auf der y-Achse, die Mengen an DAC-30 (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg) auf der x-Achse dargestellt. 1, 2, 4 und 16 h nach der Zugabe der Lipoplexe zu den Zellen wurde das Medium entfernt und durch 150 μl frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen auf die Reporterexpression und die Zellvitalität untersucht. Die Graustufungen bei der β -Gal-Expression bedeuten:

weiß=0-25 %, hellgrau=25-50 %, grau=50-75 %, dunkelgrau=75-100 % der maximalen Expression; bei der Zellvitalität hellgrau=0-50 %, grau=50-100 %, dunkelgrau=>100 % der Zellvitalität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.)

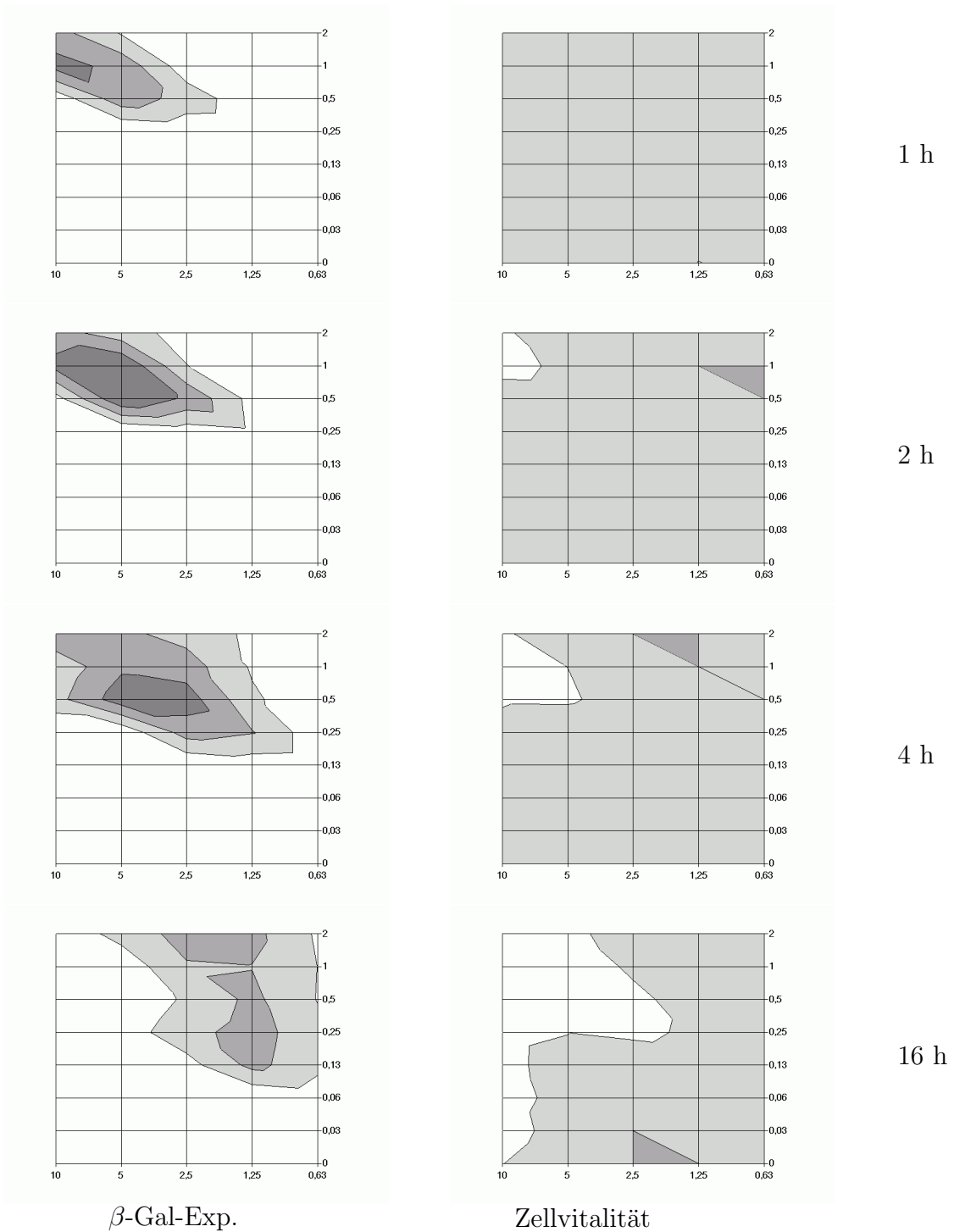


Abbildung 3.25: Einfluß der Inkubationszeit auf Reportergenexpression und Zellvitalität.

Bildunterschrift vgl. vorhergehende Seite.

Bei einer höheren Zellzahl ist der Einsatz von höheren Lipoplexkonzentration bzw. eine längere Inkubationszeit günstig, während bei geringerer Zelldichte niedrige Lipoplexkonzentrationen oder eine verkürzte Transfektionszeit vorteilhaft für das Erreichen einer hohen Genexpression sind.

Kapitel 4

Diskussion

Der Transfer von Genen in eukaryontische Zellen zur Therapie von Erkrankungen und zum Studium der Funktion der exprimierten Proteine erfordert Transfersysteme die sicher, reproduzierbar und einfach einzusetzen sind. Wegen der bekannten Mängel der viralen Verfahren gewinnen Methoden, die sich synthetisch hergestellter Komponenten bedienen, zunehmend an Bedeutung. Die entscheidenden Vorteile von Vektoren wie Liposomen und Polymeren liegen in der definierten Zusammensetzung der Transfervesikel, der infolge der niedrigen Immunogenität wiederholbaren Anwendbarkeit sowie in dem vergleichsweise niedrigen Risiko für den Anwender und den Patienten.

Das wachsende Interesse an diesen Gentransfervesikeln verlangt jedoch die weitergehende Untersuchung von geeigneten Herstellungsverfahren und effizienten Applikationsformen. Derzeit sind die synthetischen im Vergleich zu den viralen Vektorsystemen noch nicht effizient genug. So können 100 virale Partikel im günstigen Fall bis zu 100 Zellen transfizieren, wogegen bei den synthetischen Vektorsystemen etwa 100 Millionen Plasmidmoleküle notwendig sind um eine gleiche Anzahl von Zellen zu transfizieren [124]. In den letzten Jahren sind jedoch eine ganze Reihe von Weiterentwicklungen der synthetischen Transfersysteme erfolgt, die vielversprechende Perspektiven für die unterschiedlichsten Anwendungen in Medizin und Forschung eröffnen.

Bevor die Ergebnisse im einzelnen diskutiert werden, müssen noch einige grundsätzliche Anmerkungen zur Bewertung der Ergebnisse, die bei den Transfektionsversuchen erzielt wurden, gemacht werden. Bei der Optimierung von Gentransfervektoren in Zellkulturexperimenten ist zu berücksichtigen, daß es sich bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen um ein hochdynamisches Verfahren handelt. Dieses ist von einer Vielzahl von Einflußfaktoren abhängig. Die Bewertung von Versuchsergebnissen ist demzufolge nur unter Berücksichtigung des Gesamtzusammenhanges des Experimentes möglich. Ein prinzipielles Verständnis der Transfektion ist wichtiger als eine Aussage-Reduktion auf den gerade untersuchten Faktor, so z.B. auf die Eignung einer bestimmten chemischen Struktur für den Gentransfer. Die Veränderung des Versuchsdesigns, beispielsweise durch die Auswahl eines anderen Komplexierungsmediums, kann zu völlig veränderten Versuchsergebnissen führen. Desweiteren ist die Übertragbarkeit der *in vitro* Daten auf die *in vivo* Anwendung begrenzt, häufig ist sogar eine Umkehrung der Ergebnisse beim *in vivo* Gentransfer zu beobachten. Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden auf der Basis von *in vitro* Untersuchungen gewonnen und Schlußfolgerungen für die *in vivo* Anwendbarkeit der untersuchten Gentransfervesikel können demzufolge nur unter Einschränkungen gemacht werden.

4.1 Lipidchemie

4.1.1 Kationisches Lipid

Ausgehend von dem durch Felgner und Mitarbeiter [46] beschriebenen Befund, daß kationische Lipide und Liposomen für den Gentransfer von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen geeignet sind, kam es zu der Entwicklung einer Vielzahl weiterer kationischer Lipide. Diese zeichneten sich gegenüber dem von Felgner und Mitarbeitern synthetisierten Lipid DOTMA durch eine verminderte Zelltoxizität und höhere Transferergebnisse aus [44, 51, 58, 89, 97, 157].

Bei der Optimierung der chemischen Struktur wurden alle Bestandteile des kationischen Amphiphiles, die kationische Kopfgruppe, der Spacer und auch die hydrophobe Ankergruppe variiert. Im Ergebnis dieser Untersuchungen entstand eine Vielfalt chemischer Strukturen (vgl. Tab. 1.4, S. 22) von denen sehr viele für den Gentransfer geeignet sind. Diese kationischen Amphiphile besitzen chemisch nur zwei Gemeinsamkeiten: eine kationische Kopfgruppe und einen hydrophoben Teil, der für eine stabile Verankerung des kationischen Lipides in der Membran von Liposomen bzw. in Mizellen sorgt. Ein Spacer, der die hydrophobe Ankergruppe mit der kationischen Kopfgruppe verbindet, scheint wie die Ergebnisse mit dem Lipid DDAB zeigen, nicht unbedingt notwendig zu sein.

Chemisch gesehen handelt es sich bei den kationischen Lipiden vor allem um Amphiphile mit einer quarternären Aminostickstoff-Kopfgruppe oder mit einer vom Polyamin Spermin abgeleiteten Kopfgruppe. Der hydrophobe Teil wird zumeist entweder von veresterten oder veretherten Carbonylverbindungen oder von Cholesterolgrundgerüsten gebildet.

Die Arbeitsgruppe von Felgner und Mitarbeitern synthetisierte, vom Etherlipid DOTMA ausgehend, eine ganze Reihe weiterer Verbindungen. So wurde aus der Trimethylaminkopfgruppe des DOTMA [46] eine Hydroxyethylmethylaminkopfgruppe im Falle des DORIE und aus den Ölsäureseitenketten des DORIE wurden Myristylsäureseitenketten beim DMRIE [44]. Die Hydroxyethylgruppe wurde dann beim β -AE-DMRIE in eine Aminoethylgruppe umgewandelt [157] (vgl. Abb. 4.1). Durch diese Veränderung der Kopfgruppe nahm die Notwendigkeit das Helferlipid DOPE zuzusetzen drastisch ab und der Bereich wirksamer Lipid/DNA-Verhältnisse zu. Ein weiterer Abkömmling des DOTMA ist das Lipid DOSPA, welches in der kommerziellen Formulierung LipofectAMINETM neben dem Helferlipid DOPE enthalten ist [67]. An Stelle der Trimethylaminygruppe beim DOTMA wird die kationische Kopfgruppe hier durch das Polykation Spermin gebildet. Auch andere doppelkettige kationische Lipide, Lipide mit Spermin- oder Aminostickstoffkopfgruppen und Cholesterolderivate haben sich in der Vergangenheit als sehr effizient im Gentransfer erwiesen [58, 89, 97].

Neben der Struktur der Kopfgruppe wurde die notwendige Beschaffenheit der hydrophoben Ankergruppe analysiert. Als besonders geeignet für die Membranverankerung und den Gentransfer erwiesen sich das Cholesterol sowie Ölsäure- oder Myristinsäureseitenketten. Nach den Ergebnissen unserer eigenen Untersuchungen sind kürzere Seitenketten, mit weniger als 14 Kohlenstoffatomen, wegen der höheren Zelltoxizität und der schlechteren Liposomenbildungsfähigkeit nicht für den Gentransfer geeignet. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, daß in natürlichen Systemen höherer Organismen kaum Fettsäuren mit weniger als 16 Kohlenstoffatomen in den Membranen ge-

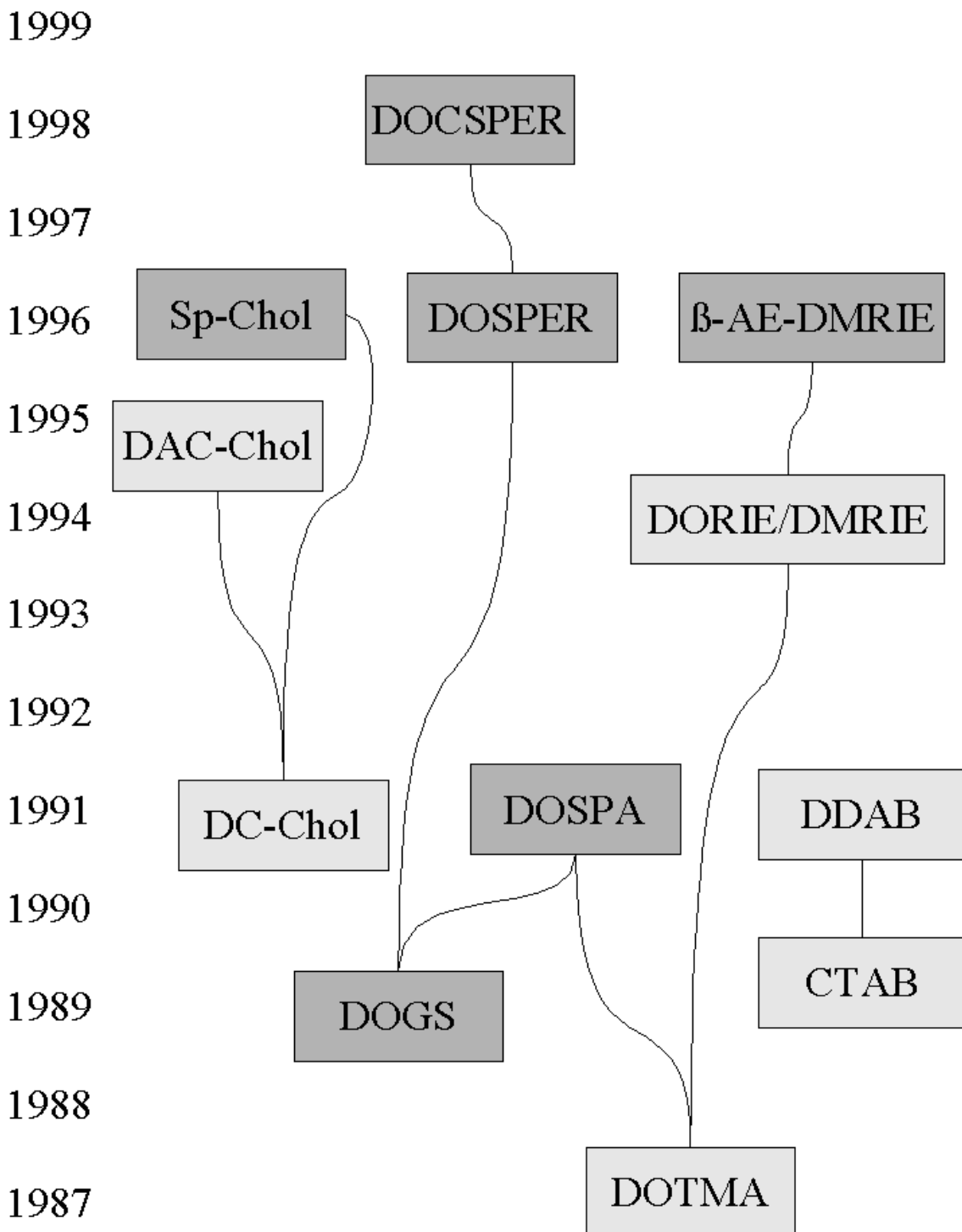


Abbildung 4.1: Entwicklungslinien kationischer Lipide

monokationische Lipide sind hellgrau, polykationische Lipide dunkelgrau dargestellt.

funden werden. Als gut geeignet erwiesen sich vor allem Lipide mit zwei Ölsäureseitenketten. Bei längeren ungesättigten Seitenketten wirkt sich dagegen offenbar die erhöhte Phasenübergangstemperatur negativ auf die Liposomenbildung und das Gentransferverhalten der Lipoplexe aus. So liegt z.B. die Phasenübergangstemperatur für den Übergang vom kristallinen, gelartigen zum flüssigen Zustand für Diacylphosphoethanolaminlipide mit 2 C16:0-Seitenketten bei etwa 65°C, während für das entsprechende PE mit 2 C16:1-Seitenketten, d.h. bei 2 Seitenketten mit 16 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung, die Phasenübergangstemperatur bei etwa -30°C liegt [112]. Eine Verlängerung der Seitenkette um 2 Kohlenstoffatome führt im allgemeinen zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur um etwa 15-30 Grad.

Die schlechtere Liposomenbildungsfähigkeit von kationischen Lipiden mit ungesättigten bzw. länger-kettigen Seitenketten war insbesondere bei den von uns untersuchten DOTAP-Strukturanaloga festzustellen. In der Praxis unterscheiden sich die Eigenschaften von Liposomen, die aus verwandten Lipiden, z.B. von DMRIE, ein Lipid mit Myristylsäureseitenketten und DORIE, ein Lipid mit Ölsäureseitenketten (C18:1), allerdings weniger als es von den Phasenübergangstemperaturen zu erwarten wäre [44]. Offenbar minimiert der Zusatz des Helferlipides DOPE die Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften der hergestellten Liposomen.

Von den u.a. in Zusammenarbeit mit M. Schneider und O. Keil (Wuppertal, Deutschland) synthetisierten Verbindungen wurden für diese Arbeit die Lipide DAC-Chol, Sp-Chol, DOTAP und DOCSPER ausgewählt und umfassend untersucht. Bei den Verbindungen DAC-Chol und Sp-Chol handelt es sich um Cholesterolderivate, während das kommerziell erhältliche DOTAP und das von Schneider und Mitarbeitern [58, 131] synthetisierte DOCSPER doppelkettige kationische Amphiphile sind. Die beiden letztgenannten Verbindungen bilden auch ohne den Zusatz von Helferlipiden gentransferwirksame Strukturen aus. DOCSPER und Sp-Chol sind polykationische Lipide mit maximal drei positiven Ladungen [58, 89]. Die kationische Kopfgruppe wird bei diesen Verbindungen durch das natürlich vorkommende Polykation Spermin gebildet. Die Bindung an den lipophilen Anker erfolgt über ein sekundäres Amin der Sperminkopfgruppe, so daß sich eine sogenannte T-Spermin-Kopfgruppe ergibt [89] (vgl. Abb. 1.1, S. 20).

Aus den von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen gewonnenen Ergebnissen wurde versucht chemische Strukturen abzuleiten, die für den Gentransfer besonders geeignet sind [44, 51, 157]. Die Beobachtung, daß einzelnen kationischen Lipiden liposomale Formulierungen hergestellt werden können mit denen besser als mit anderen transfiziert werden kann, ist jedoch offenbar nur unter den jeweils gegebenen Versuchsbedingungen gültig. Eine Veränderung der Bedingungen während der Komplexbildung oder im Verlaufe der Transfektion z.B. durch die Anwesenheit von Serum bzw. die Erhöhung der Serumkonzentration während der Inkubation der Lipoplexe auf den Zellen, eine veränderte Zelldichte, die Verwendung eines anderen Komplexierungsmediums, die Veränderung der Konzentration von Liposomen und DNA, die Veränderung der Inkubationszeit usw. führen in unterschiedlichem Ausmaße zu einer Veränderung in der Effizienz des Gentransfers bei Einsatz der verschiedenen Lipide.

Wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.2.1 zeigten, variiert die Effizienz der einzelnen Lipide bei identischen Versuchsbedingungen zumeist um weniger als eine Größenordnung. Wenig geeignet für den Gentransfer waren nur die Cholesterolderivate mit Aminosäurekopfgruppen. Dies liegt jedoch eher in der schnellen Hydrolyse der Esterbindung

zwischen Cholesterolanckergruppe und Aminokopfgruppe und nicht in einer mangelnden Eignung der Kopfgruppe begründet. Für diesen Befund sprechen die sehr schwankenden Resulte mit diesen Lipiden auf den verschiedenen Zelllinien und der Verlust der Gentransferaktivität bei einer längeren Lagerung der Liposomen bei 4°C. Besonders geeignet waren demgegenüber DAC-Chol-Liposomen, die sehr gute Gentransfereigenschaften auf einer Vielzahl der untersuchten Zelllinien und auch gute Liposomenbildungseigenschaften aufwiesen. Auch DOCSPER-Liposomen und DOSGA-Liposomen erwiesen sich bei vielen Zelllinien in unterschiedlichen Formulierungen als geeignete Gentransfervesikel. Die drei letztgenannten Lipide waren außerdem infolge der stabileren Carbamoylbindung zwischen kationischer Kopf- und lipophiler Ankergruppe bei 4°C längere Zeit chemisch stabil. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Gao [51] und Loeffler [97], die ebenfalls eine schnelle Hydrolyse bei der Verwendung von Esterbindungen und eine größere Stabilität von Carbamoylverbindungen nachwiesen. Die Instabilität der Esterverbindungen limitierte die zeitliche Verwendbarkeit der hergestellten Liposomen.

Die untersuchten kommerziell verfügbaren kationischen Lipide DOTAP, DOTMA, DDAB und DC-Chol waren ebenfalls für den Gentransfer geeignet. Im Vergleich zu DAC-Chol, DOCSPER und DOSGA waren sie aber weniger gentransferaktiv. Bei der Interpretation dieser Versuchsergebnisse ist aber, wie bereits erwähnt, zu berücksichtigen, daß die liposomalen Formulierungen unterschiedliche Anforderungen an die optimalen Bedingungen für die Komplexbildung haben und das Aussagen zur möglichen Gentransferaktivität des einzelnen Lipides nur bei Berücksichtigung der Versuchsbedingungen möglich sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Gentransferergebnisse für die kationischen Liposomen können mit Sicherheit bei einer Optimierung der Versuchsparameter weiter verbessert werden.

4.1.2 Helferlipid

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Untersuchung des Einflusses der Seitenketten des kationischen Lipides auf die Transfereigenschaften der entsprechenden Liposomen wurden auch bei der Analyse des Einflusses der chemischen Struktur des Helferlipides auf die Gentransferfähigkeit der Liposomen beobachtet. Wie die Arbeiten mehrerer Autoren zeigten, ist das Helferlipid DOPE, welches 2 Ölsäureketten enthält, wegen seiner biophysikalischen und Gentransfereigenschaften offenbar am besten für die Herstellung kationischer Liposomen geeignet [41, 44, 73]. Interessant sind in diesem Zusammenhang Arbeiten von Fasbender und Mitarbeitern [42], die auch Lipide mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Seitenkette für die Formulierung von kationischen Liposomen einsetzten. Die Autoren stellten dabei sehr spezifische Mischungsverhältnisse für die einzelnen Lipide als optimal fest. Die geeigneten Verhältnisse der Helferlipide waren dann für jedes kationische Lipid wiederum unterschiedlich. Problematisch bei der Verwendung solcher mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist vor allem die schnelle Oxidation der Doppelbindungen, welche eine reproduzierbare Anwendung einschränken. Insbesondere eine mögliche Zerstörung der DNA durch die Oxidationsprodukte beim Fettsäureabbau läßt die Anwendung derartiger Helferlipide als fragwürdig erscheinen. Auch aus diesem Grunde wird vor allem DOPE, dessen Doppelbindungen in den Ölsäureseitenketten relativ langsam oxidiert werden, aber auch Cholesterol für die Herstellung von kationischen Liposomen verwendet.

Unsere eigenen Arbeiten wurden vor allem mit dem Helferlipid DOPE durchgeführt. Liposomen mit DOPE ergaben in den *in vitro* Untersuchungen gleich gute bzw. bessere Transfereffizienzen als die Helferlipide Cholesterol und Palmitoyl-oleoylphosphatidylethanolamin. Außerdem war die Liposomenbildungsfähigkeit erleichtert und die Liposomen wiesen eine größere physikalische Stabilität auf. Bei der Verwendung von Cholesterol kam es hingegen häufig zu einer Bildung größerer Vesikel.

Als Schlußfolgerung aus den Versuchsergebnissen ist festzustellen, daß die chemische Struktur des kationischen Lipides weniger wichtig ist als dessen optimale Formulierung z.B. mit einem Helferlipid oder die Wahl eines geeigneten Komplexierungsmediums für die Lipoplexherstellung. Aus diesen Gründen sollte in dieser Arbeit darauf verzichtet werden, kationische Lipide miteinander zu vergleichen und eine Wertung zur generellen Eignung des Lipides für den Gentransfer wegen der immer willkürlich ausgewählten Versuchsbedingungen unterbleiben. Im Mittelpunkt der Arbeit stand deswegen die Untersuchung der biophysikalischen und der verfahrenstechnischen Grundlagen für die effektive Anwendung der Gentransferkomplexe.

4.2 Liposomen

Ziel der Untersuchungen zu Struktur und Eigenschaften der Liposomen war es festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Chemie der Lipide, der Liposomenbildung sowie der Biophysik und den Gentransfereigenschaften gibt. Dazu wurden Bildung und Größe sowie die elektrostatischen Eigenschaften der Liposomen untersucht.

4.2.1 Bildung und Größe der Liposomen

Liposomen im klassischen Sinne sind einfache Vesikel bei welchen ein wässriges Volumen von einer Membran aus Phospholipiden eingeschlossen ist. Zur Liposomenbildung kommt es spontan, wenn die Amphiphile in wässrigen Medien dispergiert werden [9, 10]. Auch kationische Liposomen werden in wässrigen Phasen spontan aus Lipidfilmen nach Schütteln bzw. dem Beschallen der Dispersion gebildet. Die kationischen Kopfgruppen der Lipide orientieren sich dabei zur wässrigen Phase und sorgen durch die gegenseitige Abstoßung der positiven Ladungen für die Krümmung der Membran. Die Beobachtung, daß die Ladung der Liposomenoberfläche die Größe der Liposomen bestimmt, wurde durch Kraayenhoof und Mitarbeiter [81] bei negativ geladenen Liposomen beschrieben. Ein anderer Erklärungsansatz für die Größenveränderungen geht von der konischen Struktur der Moleküle mit polykationischen Kopfgruppen aus. Diese konische Struktur ergibt sich aus der im Vergleich zum lipophilen Anker größeren kationischen Kopfgruppe und führt zur Bildung von Mizellen (vgl. Abb. 4.2).

Wie unsere Versuchsergebnisse zeigen, gelten die Beobachtungen von Kraayenhoof und Mitarbeitern auch für Liposomen die positive Ladungen auf ihrer Oberfläche tragen. Die Abhängigkeit der Liposomengröße von der Ladung des kationischen Lipides war besonders ausgeprägt bei Liposomen, die polykationische Lipide wie DOCSPER und Sp-Chol enthielten. Bei diesen Lipiden war ein eindeutiger Einfluß der Menge an Helferlipid auf die Vesikelgröße festzustellen. So waren DOCSPER- bzw. Sp-Chol-Liposomen, wenn sie ohne den Zusatz eines Helferlipids hergestellt wurden, wesentlich kleiner als 100 nm. Im Falle des Sp-Chol's handelte es sich dabei um mizellare Struktu-

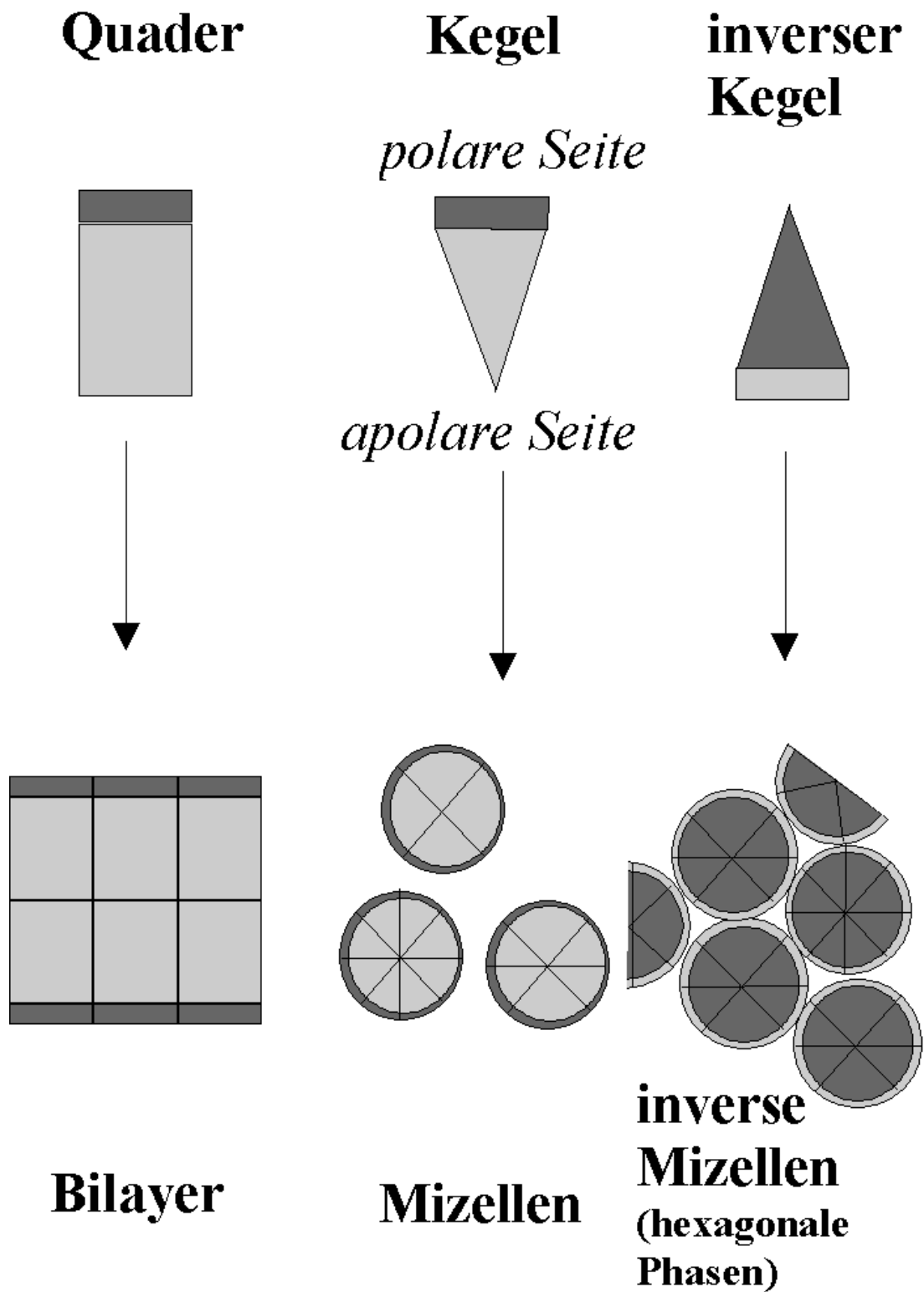


Abbildung 4.2: Anordnungsmuster von Amphiphilen

nach Cullis [29] und New [112]

ren wie unsere elektronenmikroskopischen Aufnahmen [92] und die Tatsache, daß keine PCS-Messungen durchgeführt werden konnten beweisen. Mit einem zunehmendem Anteil an Helferlipid nahm bei diesen Vesikeln die Größe zu (vgl. Abb. 3.1, S. 57).

Weniger ausgeprägt war der Zusammenhang zwischen Ladung und Größe bei den monokationischen Lipiden. So lag bei DOTMA- und DOTAP-Liposomen die Vesikelgröße unabhängig vom Anteil des Helferlipides zwischen 300 und 600 nm. Bei DAC-Chol- und DC-Chol-Liposomen nahm demgegenüber die Größe der Liposomen mit einem größeren Anteil des Helferlipides ab. Sie betrug bei DAC-100-Liposomen etwa 1 μm und bei DAC-25-Liposomen etwa 400 nm. Offenbar ist die Erhöhung der Phasenübergangstemperatur durch den Cholesterolanker des kationischen Lipides für diese Zunahme der Liposomengröße bei steigendem Anteil an DAC-Chol verantwortlich. Bei einer Inkubation der Liposomen in einem Ultraschallbad nahm deren Größe auf etwa 100 bis 200 nm ab. Lediglich bei Liposomen mit einem mittlerem Gehalt an DAC-Chol, wie DAC-40 und DAC-50-Liposomen, blieb auch nach einer Beschallung die Liposomengröße mit etwa 400 bis 600 nm unverändert. Es ist anzunehmen, daß bei diesen Liposomen die Oberflächenladung zu gering ist um eine größere Membrankrümmung zu erzeugen. Außerdem ist die Menge an Helferlipid zu niedrig, um die Phasenübergangstemperatur herabzusetzen. Bei Liposomen mit einem höheren Anteil an DOPE wie bei DAC-30-Liposomen war demgegenüber die Fluidität der Liposomenmembran groß genug um kleinere Vesikel auszubilden.

Die Resultate der Liposomenbildung korrelierten bei den Cholesterolderivaten sehr gut mit den Transfektionsergebnissen. So bildete DCQ-Chol bei einer Formulierung mit DOPE bei allen Mischungsverhältnissen Liposomen, jedoch ohne Helferlipid (DCQ-Chol-100) mizellare Strukturen aus. Auch bei Sp-Chol-Liposomen wurden bei höheren Anteilen an kationischem Lipid mizellare Strukturen mit detergentartigen Eigenschaften beobachtet. Diese mizellaren Strukturen von DCQ-Chol und Sp-Chol-Lipiden waren nicht gentransferaktiv.

Im Gegensatz dazu bildeten DCQ-Chol und Sp-Chol mit mindestens 50 % DOPE sowie die Lipide DAC-Chol und DC-Chol mit einem Anteil von mindestens 25 % DOPE, multilamellare, liposomale Vesikel aus, welche gentransferaktiv waren. Somit scheint das Vorliegen von Liposomen Voraussetzung für den Gentransfer mit den Cholesterolderivaten zu sein.

Bei den doppelkettigen Amphiphilen war kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Struktur und Gentransferaktivität festzustellen. So waren die sehr kleinen DOCSPER-Liposomen ohne Helferlipid ebenso gentransferaktiv wie DOCSPER-Liposomen mit Helferlipid. Allerdings mußten bei DOCSPER-Liposomen ohne Helferlipid sehr spezifische Medienbedingungen für die Lipoplexherstellung vorliegen um wirksame Gentransferkomplexe herstellen zu können.

4.2.2 Elektrostatische Eigenschaften

Neben der Bestimmung der Größe der Liposomen ist die Bestimmung der Oberflächenladung ein weiteres biophysikalisches Untersuchungsverfahren um Aufschluß über die elektrostatischen Eigenschaften der Liposomen zu erhalten. Zwei wichtige Methoden sind hierbei das Messen des Zetapotentials [36, 137, 141] und die Untersuchung des pH-Wertes an der Liposomenoberfläche mit Hilfe pH-sensitiver Fluorophore [37, 69, 172].

Zetapotential: Die Zetapotentialuntersuchungen von Eastman und Mitarbeitern [36]

ergaben keinen Zusammenhang zwischen der theoretischen Ladung der Liposomen und der Höhe ihres Zetapotentials. Liposomen, die aus den kationischen Lipiden DMRPE (monokationisch) oder DOSPA (polykationisch) sowie DOPE (neutral) hergestellt worden waren, besaßen in Leitfähigkeitswasser trotz ihrer unterschiedlichen Ladung ein identisches Zetapotential. In Zellkulturmedium war das Zetapotential für beide liposomalen Formulierungen durch die erhöhte Konzentration der Gegenionen in gleichem Maße vermindert. Unterschiede zwischen beiden Liposomen fanden sich erst bei einem Zusatz von DNA, bei dem sich das Zetapotential entsprechend der theoretischen Ladung veränderte. Wie aber die Arbeiten von Stegmann und Mitarbeitern [141] gezeigt haben, hat das gemessene Zetapotential keine Beziehung zu der Transfereffektivität der Vesikel.

HC-Fluoreszenz: Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Bestimmung der Oberflächeneigenschaften durch das pH-sensitive Fluorophor HC nach der Methode von Zuidam und Barenholz [172] besondere Aufmerksamkeit zugewendet.

Ziel unserer Untersuchungen war es festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Struktur, den elektrostatischen Eigenschaften und den Gentransfereigenschaften gibt.

Auch bei der Messung der HC-Fluoreszenz gilt, daß die Stärke der Ionisation des Fluorophores bzw. der bestimmte pH-Wert von den Umgebungsbedingungen abhängig ist. Da die Fluoreszenz von HC unabhängig von der Temperatur und dem physikalischen Zustand des Lipides ist [116], ist dieses sehr gut für die Bestimmung elektrostatischer Membraneigenschaften geeignet. Durch seine niedrige kritische Aggregationskonzentration liegt HC praktisch nicht in monomerer Form in Lösung vor. In der Liposomenmembran dagegen liegt das HC-Molekül infolge seiner großen Verdünnung, 1 HC-Molekül auf 100 Lipidmoleküle, in seiner fluoreszierenden, monomeren Form vor. Die bei Austritt des HC's aus der Liposomenmembran sich bildenden Aggregate quenchen die Fluoreszenz dieser nichtliposomalen HC-Moleküle vollständig. Der Verlust an HC durch Entmischung in der Liposomenmembran äußert sich also in einer verringerten Fluoreszenz bei Anregung durch Licht der Wellenlänge von 330 und auch 380 nm, verändert also nicht das Verhältnis der Fluoreszenzen bei den Anregungswellenlängen von 380 zu 330 nm, da beide in gleichem Maße beeinflußt werden. Die Meßwerte sind somit nur abhängig von den elektrostatischen Parametern der Liposomenmembran. Die Ergebnisse von Zuidam und Barenholz zeigen, daß die Oberflächenladung des HC-Moleküls bei Vorhandensein eines tertiären Stickstoff-Atoms beim kationischen Lipid DC-Chol abhängig vom umgebenden pH ist. So war das HC bei DC-Chol/DOPE-Liposomen bei physiologischen pH-Werten nur zu 50 % protonisiert. Dies gibt den Autoren zufolge Rückschluß auf einen niedrigeren pH-Wert an der Liposomenoberfläche im Vergleich zu Lipiden mit quarternären Stickstoffatomen wie DOTMA und DOTAP. Zuidam und Barenholz vermuteten, daß diese schwächere Protonisierung des DC-Chol's im Endosom zu einer erleichterten Dissoziation des Lipides von der DNA und somit zur besseren Freisetzung in das Zytosol der Zelle führt. Aus diesem Grunde sollte nach Ansicht der Autoren DC-Chol besser als Lipide mit quarternären Ammoniumgruppen für den Gentransfer geeignet sein.

Unsere mit dem HC-Fluorophor durchgeführten Arbeiten beinhalteten Untersuchungen zum Einfluß des Helferlipidanteiles, der Struktur der kationischen Kopfgruppe und der Medienzusammensetzung auf die elektrostatischen Eigenschaften.

Ausgehend von der Arbeit von Zuidam und Barenholz war ein direkter Zusammen-

hang zwischen der Ladung des kationischen Lipides, seinem Anteil am Gesamtlipid und der korrespondierenden HC-Fluoreszenz erwartet worden. Wie jedoch die Ergebnisse im Abschnitt 3.1.1.2 zeigen, muß der Einfluß der Kopfgruppe des kationischen Lipides anders diskutiert werden. Wie die HC-Fluoreszenzdaten erkennen lassen, verfügte das polykationische Lipid DOCSPER an seiner Liposomenoberfläche über einen niedrigeren pH-Wert als die monokationischen Lipide. Dies könnte durch die größere Ausdehnung der Sperminkopfgruppe bedingt sein, welche möglicherweise über die HC-Kopfgruppe hinausragt. So erfolgt die Bestimmung des pH-Wertes dicht an der Liposomenoberfläche, während die Spermingruppe weiter entfernt von der Membran OH-Ionen attrahiert.

Die monokationischen Lipide DOTAP, DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol erzeugen dagegen an der Membranoberfläche offenbar einen höheren pH-Wert als DOCSPER-Liposomen. Bei einem molaren Anteil an kationischem Lipid von 25 bzw. 50 Mol % unterschieden sich die Cholesterolderivate nur unwesentlich in ihren elektrostatischen und auch in ihren Gentransfer-Eigenschaften. Bei einem höheren molaren Anteil des kationischen Lipides von 75 bzw. 100 % führte die Ersetzung eines Wasserstoffatoms an der Dimethylaminogruppe des DC-Chol's durch eine Hydroxyethylgruppe beim DCQ-Chol (vgl. Abb. 1.1, S.20) zu einer drastischen Erhöhung des pH-Wertes an der Liposomenoberfläche. Wie die Untersuchungen mit den DCQ-100M und DCQ-75M-Liposomen zeigen, können mit ihnen keine Zellen transfiziert werden. Bei allen anderen Lipiden die in der Abbildung 3.2C, S. 59) aufgeführt sind, war auch bei höherem molaren Anteil des kationischen Lipides in den Liposomen ein Gentransfer möglich.

Mediumeinfluß auf die elektrostatischen Eigenschaften: Neben der Struktur des kationischen Lipides bzw. der Art des Helferlipides beeinflusst auch die Zusammensetzung des Mediums in dem die Liposomen verdünnt werden, die Höhe der HC-Protonisierung. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß die aus den Cholesterolderivaten hergestellten Liposomen bei einer veränderten Mediumzusammensetzung ihre elektrostatischen Eigenschaften weniger ändern als Liposomen, die aus dem kationischen Lipid DOTAP hergestellt wurden.

Zuidam und Barenholz [172] führten ihre Untersuchungen in 20 mM HEPES-Pufferlösung in einem pH-Bereich von 2-13, also teilweise weit außerhalb des Pufferbereiches des HEPES-Puffers, durch. Die zur Einstellung des pH-Wertes notwendige Menge an HCl bzw. NaOH variiert dabei sehr erheblich, so daß die Autoren stark unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Medium verwandt haben müssen. Diese Tatsache wurde bei der Erklärung des Abfalls des 380/330er-Verhältnisses der Fluoreszenzwerte bei einem höheren pH-Wert zwar berücksichtigt, es kann aber nichts über die Verhältnisse bei konstanter Ionenkonzentration und konstanter Pufferkonzentration ausgesagt werden. Desweiteren ist die Verwendung von 20 mM HEPES-Puffer ohne den Zusatz weiterer Ionen problematisch, da in der Praxis zumeist höhere Ionenkonzentrationen für die Lipoplexbildung verwandt werden.

Wir untersuchten deswegen den Einfluß der Ionenkonzentration und beobachteten, daß bei niedriger NaCl-Konzentration, wie von Zuidam und Barenholz festgestellt, die HC-Protonisierung bei DOTAP-100- und DOTAP-50-Liposomen höher war als bei Liposomen die aus DC-Chol und DOPE hergestellt wurden. Wenn jedoch die NaCl-Konzentration erhöht wurde, sank der durch die HC-Protonisierung bestimmte pH-Wert auf der Liposomenoberfläche bei den DOTAP-Liposomen stärker ab, als es bei den DC-Chol/DOPE-Liposomen der Fall war (vgl. Abb. 3.2, S. 59). Ähnliche

Ergebnisse wie mit DC-Chol wurden auch mit den anderen Cholesterolderivaten und bei der Verwendung von Phosphatpuffer erhalten. Bei DOTAP-50 und DOTAP-100-Liposomen nahm die HC-Protonisierung bei einer Anwesenheit von Phosphatpuffer vergleichsweise stärker ab als bei den Cholesterolderivaten. Offenbar ist hierfür das Cholesterol in der Seitenkette des kationischen Amphiphiles verantwortlich. Die Ergebnisse mit DOTAP/Chol-Liposomen lassen schlußfolgern (vgl. Abb. 3.2D, S. 59D), daß das Cholesterol auch als Helferlipid die HC-Protonisierung an der Membranoberfläche heraufsetzt.

Ob sich allerdings die anderen Eigenschaften der Liposomen im gleichen Maße ändern wie die HC-Protonisierung bei veränderter Ionenkonzentration ist fraglich.

Diese Tatsache wird noch unterstrichen durch die Beobachtung, daß die Gentransfereigenschaften von DOCSPER-Liposomen sehr abhängig von der NaCl-Konzentration im Lipoplexherstellungsmedium oder von einem Bicarbonatzusatz sind (vgl. Abschnitt 3.2.6, S. 81). Die dramatischen Unterschiede bei der Reportergenexpression finden aber in den mittels der HC-Fluoreszenz bestimmten elektrostatischen Eigenschaften der DOCSPER-Liposomen keinen Niederschlag. Demzufolge ist kein direkter Zusammenhang zwischen den elektrostatischen Eigenschaften der Liposomenoberfläche und den Gentransferkapazitäten der Liposomen feststellbar. Die Werte der HC-Protonisierung hängen zu sehr von der spezifischen Struktur der kationischen Kopfgruppe und vom Umgebungsmedium ab, als das eine zweifelsfreie Interpretation der Meßwerte und Schlußfolgerungen zur Eignung der Vesikel für den Gentransfer möglich sind.

Ob es Zusammenhänge zwischen der Größe der Vesikel bei Verwendung unterschiedlicher Komplexierungsmedien und der Gentransferrate der entsprechenden Komplexe gibt, soll in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

4.3 Lipoplexbildung

Die Art der Strukturen, die beim Mischen von kationischen Lipiden bzw. Liposomen und Plasmid-DNA entstehen, sind entscheidend für Transfereffektivität, Stabilität, Pharmakokinetik und Wirkung bei einer möglichen klinischen Anwendung. Neben kationischen Liposomen wurden in der Vergangenheit auch konventionelle Liposomen zur Applikation von DNA eingesetzt. So konnte hochmolekulare, gelöste DNA sehr effektiv mittels Hydratisierung eines Phosphatidylcholinfilmes in die dabei entstehenden Liposomen verkapselt werden [70]. Auch Methoden mit Phasenumkehr [113, 129] oder verschiedene Frier/Tau-Methoden [13] wurden zur Verkapselung der DNA eingesetzt. Allerdings führten diese Verfahren nur zur Herstellung größerer, multilamellarer Vesikel, welche für eine Anwendung am Patienten wegen der raschen Eliminierung durch das Immunsystem nur bedingt einsetzbar sind. Eine mögliche Verkleinerung der Liposomen verringert wiederum die Menge an einschließbarer Substanz, so daß dies für eine wirksame Applikation offenbar kein geeigneter Weg ist.

Größe und Strukturen: Auch das einfache Zusammenmischen von positiv geladenen Liposomen und negativ geladener DNA führt zumeist zur Bildung recht großer Komplexe. Die Transfektionseigenschaften dieser Vesikel können bei einer Anwendung *in vitro* völlig verschieden von den Gentransfereigenschaften *in vivo* sein. So ist bei *in vitro* Untersuchungen die Lipoplexgröße, die für eine Zellaufnahme geeignet ist, lediglich begrenzt durch die Partikelgröße, welche die Zelle aufnehmen kann, während

in vivo das Immunsystem bzw. die Kapillaren der Blutgefäße, hier insbesondere der Lunge, der limitierende Faktor für die Größe der Vesikel sind. Somit können die Anforderungen an die Gentransfervesikel *in vitro* und *in vivo* sehr unterschiedlich sein. Diese Überlegungen sollen bei den nachfolgenden Ausführungen zu den Gesetzmäßigkeiten der Lipoplexbildung berücksichtigt werden.

Nach der Zugabe der DNA zu den Liposomen kommt es zu einer Reihe von erheblichen Veränderungen sowohl in der Struktur der DNA als auch der Liposomen. Infolge der elektrostatischen Wechselwirkungen bilden sich spontan Komplexe aus der durch die Phosphatgruppen negativ geladenen DNA und den kationischen Liposomen aus. Die Komplexbildung erfolgt dabei in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis zwischen DNA und Lipid in einem mehrstufigen Prozeß. Die DNA wird bei Zugabe des Lipides schrittweise gepackt und verringert ihre Ausdehnung [120, 142, 117]. In Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Lipide und den Bedingungen unter denen die Vesikelherstellung erfolgt, entstehen von Spaghetti-ähnlichen [142] bis zu Nucleosomen-ähnlichen Komplexen [117] die verschiedensten Strukturen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen ist es wesentlich zu berücksichtigen, daß die Bestimmung der biophysikalischen Eigenschaften durch PCS-Messungen bzw. durch die Elektronenmikroskopie häufig unter Bedingungen stattfindet, die verschieden von denen einer Anwendung in der Praxis sind. So werden z.B. die PCS-Messungen zumeist in deionisiertem Wasser durchgeführt und die Kontrastierung der Lipoplexe in der Elektronenmikroskopie erfordert die Zugabe stark sauren Mediums in dem sich die Lipoplexeigenschaften mit Sicherheit stark verändern.

Ob es beim Mischen der beiden Komponenten DNA und Liposomen zu einer losen Aneinanderbindung oder zu einem Einpacken der DNA in die Liposomen kommt, war der Inhalt von Untersuchungen verschiedener Autoren. Die Vermutung daß die DNA durch die Liposomen direkt überzogen wird, wurde bisher vor allem durch Arbeiten von Mitarbeitern Behrs [12, 97, 122, 133] und durch die Untersuchungen von Gershon und Mitarbeitern [55] unterstützt. So konnte Gershon die kompakte Struktur der Lipoplexe bei Überschreiten eines kritischen Verhältnisses von DOTMA-Liposomen zu DNA zeigen. Seine Untersuchungen wurden allerdings in einer 20 mM NaCl-Lösung durchgeführt und es nicht klar, ob die Analysen mit DOTMA/DOPE oder mit DOTMA-Liposomen ohne Helferlipid durchgeführt wurden. Es wird in dieser Arbeit weiterhin kein Bezug zur Transferrate hergestellt. Somit kann nicht festgestellt werden, ob die von Gershon und Mitarbeitern analysierten Vesikel überhaupt gentransferaktiv sind.

Auch Loeffler und Behr postulierten, daß DOGS-Liposomen DNA packen und überziehen können, zeigten jedoch nicht, daß diese Komplexe transferaktiv sind [97]. Spätere elektronenmikroskopische Untersuchungen [84] zeigen, daß die DOGS/DNA-Vesikel eine Größe von 0.5 und 1 μm haben. Auch die Tatsache, daß für eine *in vivo* Applikation DOGS/DOPE-Liposomen besser geeignet sind als DOGS-Liposomen ohne Helferlipid spricht gegen die Hypothese, daß durch kleine und stark gepackte Vesikel, d.h. durch einen Überzug der DNA durch das Lipid, wirksame Gentransfervesikel hergestellt werden können. DOGS/DOPE-Liposomen sollten eher größere und weniger stark gepackte Lipoplexe bilden. Blessing und Mitarbeiter beschrieben erst kürzlich die Herstellung von sehr kleinen virusartigen-Partikeln aus Lipid und DNA, welche jedoch offensichtlich trotz ihrer geringen Größe von weniger als 30 nm keine Gentransfereigenschaften mehr besitzen [15].

Wie die Untersuchungen zur Vesikelstruktur mit DOCSPER-Lipoplexen, die in Me-

dien mit unterschiedlicher Ionenzusammensetzung hergestellt wurden, zeigen, ist *in vitro* für die Generierung effizienter Gentransfervesikel ein loses Aneinanderbinden von Liposomen und DNA ausreichend. Bei geringer Ionenkonzentration, in Wasser oder in 50 mM NaCl kam es dagegen zu einer engen Lipid/DNA-Bindung. Diese Vesikel waren aber nicht gentransferaktiv. Im Gegensatz dazu war die DNA in DMEM oder in höherionischen Medien nur sehr lose gebunden, die Komplexe besaßen aber eine sehr hohe Gentransferaktivität.

In Übereinstimmung zu diesen Befunden die mit DOCSPER-Liposomen erhalten wurden, befindet sich die Tatsache, daß mit DAC-30-Liposomen trotz ihrer schlechten DNA-Packungsfähigkeiten sehr hohe Gentransfereffizienzen erzielt werden konnten.

Lipoplex-Stabilität: Die Bildung der Lipoplexe ist ein dynamischer, zeitlich abhängiger Prozeß. Durch Zugabe der DNA zu den Liposomen werden die Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Liposomen schwächer, es kommt zu Fusionsereignissen und in deren Folge zu einer langsamen Aggregation der Lipoplexe. Die entstehenden Lipoplex-Strukturen sind demzufolge bezogen auf ihre Größenzusammensetzung außerordentlich heterogen und instabil.

Wie unsere Arbeiten zeigten, beschleunigt eine hohe Konzentration der Einzelkomponenten die Lipoplexbildung und führt zu einer kürzeren Inkubationszeit die bis zum Entstehen effektiver Gentransfervesikel vergeht (vgl. Abb. 3.20 und Abb. 3.22) [58]. Diese hohe Geschwindigkeit der Lipoplexbildung geht jedoch zu Lasten der Stabilität. Bereits kurze Zeit nach dem Mischen von DNA und Liposomen verlieren die hochkonzentrierten Vesikel einen großen Teil ihrer Gentransferaktivität.

Dies trifft insbesondere für polykationische Lipide enthaltende Liposomen zu (vgl. Abschnitt 3.2.7). Bei DOCSPER-100/DNA-Lipoplexen wurden z.B. nach einer 12 h-Inkubation große Aggregate von über 1 μm Durchmesser beobachtet und auch Sp-Chol-Liposomen verloren schon wenige Minuten nach ihrer Herstellung einen Großteil ihrer Gentransferaktivität (Abb. 3.21). Ähnliche Beobachtungen beschrieben Barthel und Mitarbeiter [12] die eine höhere Transfektionsrate mit DOGS/DNA-Lipoplexen erhielten wenn sie diese nur wenige Minuten inkubierten.

Im Gegensatz zu der *in vitro* Anwendung ist für eine klinische Anwendung von Lipoplexen das Verhindern von Aggregatbildungen von entscheidender Bedeutung um schwerwiegende Nebenwirkungen beim Patienten, z.B. durch Gefäßverschlüsse, zu vermeiden. Für die Geschwindigkeit einer möglichen Aggregation sind vor allem folgende Faktoren ausschlaggebend: Die Konzentration der Liposomen und der DNA, die Ionenkonzentration des Mediums und der Grad der Oberflächenladung bzw. der Membranzusammensetzung der Liposomen.

Wie Zelphati und Mitarbeiter [169] beschrieben, ist eine Aggregation der Lipoplexe vor allem bei neutralen Ladungsverhältnissen feststellbar. Außerdem beeinflußt auch die Art des Mischens und das Medium, in dem die Komplexbildung stattfindet, die Lipoplexeigenschaften. Die Autoren konnten stabile Vesikel herstellen, wenn sie bei positiven Ladungsverhältnissen die DNA zu den Liposomen und bei negativen Ladungsverhältnissen die Liposomen zur DNA pipettierten, d.h. ein Zustand bei dem kurzzeitig ein neutrales Ladungsverhältnis zu erwarten gewesen wäre, wurde vermieden. So kam es z.B. zu einer Aggregation, wenn ein Überschuß an DNA zu den Liposomen gegeben wurde, d.h. die Ladung der Lipoplexe ging von positiven Werten zu neutralen und schließlich zu negativen Werten über. Schon ein kurzzeitiges Auftreten von neutralen Ladungsverhältnissen war für das Entstehen größerer Aggregate ausreichend. Zelpha-

ti und Mitarbeiter erreichten die Herstellung kleinerer Lipoplexe durch eine vorherige Extrusion der Liposomen. Die Verwendung von DMRIE/DOPE-Liposomen die durch 100 nm Filter extrudiert worden waren, führte zu Lipoplexen die wesentlich kleiner waren als wenn MLV-Liposomen zur Lipoplexherstellung verwandt wurden. Die Autoren fanden bei den aus extrudierten Liposomen hergestellten Lipoplexen keine Vesikel die größer als 1000 nm waren. Diese hatten bei den aus MLV's hergestellten Lipoplexen noch einen großen Anteil dargestellt. Für das Herstellen derartiger kleiner Komplexe war eine niedrige DNA-Konzentration (≤ 0.5 mM) notwendig. Solche niedrigen Konzentrationen sind für eine *in vivo*-Anwendung sicherlich kaum ausreichend.

Da die im Medium vorhandenen Gegenionen zur Schwächung der elektrostatischen Abstoßung und somit zur verminderten Stabilität beitragen, untersuchten wir die Lipoplexbildung in Medien mit sehr geringen Ionenkonzentrationen. Dabei konnten wir stabile DAC-30/pUT651-Lipoplexe noch bei DNA-Konzentrationen von 200 $\mu\text{g/ml}$ ($=0.66$ mM) bei Verwendung von 10 % Saccharose-Lösung als Komplexierungsmedium herstellen. Unsere Untersuchungen bestätigten, daß die Lipoplexstabilität bei neutralen Ladungsverhältnissen am geringsten und bei stark positiven Ladungsverhältnissen am höchsten ist. Das Erreichen von höheren Lipoplexkonzentrationen unter Beibehaltung einer längerfristigen Stabilität ist das Ziel unserer gegenwärtigen Untersuchungen. Ein möglicher Weg dazu besteht in der von Zelphati und Mitarbeitern beschriebenen Extrusion der hergestellten MLV's sowie in der weiteren Optimierung des Komplexierungsmediums.

Eine weitere vielversprechende Methode Lipoplexe klein und stabil zu formulieren, besteht in der Vorkomplexierung der DNA mit Polykationen wie PLL und PS [95, 138]. Li und Mitarbeiter konnten z.B. sehr kleine Komplexe von 130 nm Durchmesser herstellen, wenn sie die DNA mit PS komplexierten bevor sie die Liposomen hinzugaben [94]. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Größe der Komplexe aus PS und DNA, wie auch schon für die Lipoplexgröße festgestellt wurde, abhängig ist von dem Medium in dem die Komplexbildung erfolgt. In Ringerlösung hergestellte PS/DNA-Polyplexe nahmen sehr schnell an Größe zu und erreichten teilweise Größen von über 1 μm , während Polyplexe, die in Saccharoselösung hergestellt worden waren, auch bei längerer Inkubation kleiner als 500 nm blieben.

Ähnliche Beobachtungen zum Einfluß des Mediums auf Größe und Stabilität der Gentransfervesikel wie bei den Polyplexen wurden für Gentransfervesikel aus Liposomen, DNA und PS gemacht. Auch bei diesen Vesikeln war die Komplexstabilität in Medien mit einer niedrigen Ionenkonzentration größer als in Medien mit einer hohen Ionenkonzentration. Die Größe von DAC-30/PS/DNA-Lipoplexen lag so z.B. in 10 % Saccharose-Lösung über zwei Tage konstant bei etwa 250 nm, während die Größe dieser Komplexe in Ringerlösung, d.h. in einem Medium mit hoher Ionenkonzentration auf über 1 μm zunahm (vgl. Abb. 3.4, S. 62). Desweiteren waren die Komplexe, die PS enthielten, kleiner als Vesikel, die nur aus Liposomen und DNA gebildet worden waren. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte darin bestehen, daß die Oberflächenladung der LPD-Komplexe durch den Zusatz des kationischen PS's höher ist als die der einfachen Lipoplexe. Dadurch ist die Abstoßung der Vesikel untereinander größer, es kommt seltener zu Fusionsereignissen und somit nicht zur Aggregation der Komplexe (vgl. Abb. 3.22, S. 87).

PEG-Liposomen: Neben der Verwendung von Polykationen wie PS und PLL kann man eine bessere Stabilität der Gentransfervesikel durch die sterische Abschirmung

der Lipoplexe erreichen. Dazu werden Lipide mit Polyethylenglykolketten verwendet. Es gelang z.B. durch den Zusatz von PEG-PE Vesikel kleiner Größe (100-130 nm) herzustellen, die auch bei einer mehrwöchigen Lagerung stabil waren [71, 108]. Ein weiterer positiver Effekt *in vivo* ist die veränderte Proteinabsorption der Vesikel durch die in die Membran inserierten PEG-Ketten. Dies trägt zu einer verlängerten Zirkulation *in vivo* bei.

Neben einer derartigen Maskierung der Oberfläche von kationischen Liposomen, konnte *in vitro* auch die immunologische Erkennung von Adenoviren durch einen Überzug der negativ geladenen Virushülle mit Liposomen aus Sp-Chol und DOPE sowie PEG-PE verhindert werden [27]. Diese Vesikel waren bei der Transfektion effektiver als Adenoviren denen das liposomale „Schutzschild“ fehlte.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß die Zugabe der DNA zu den kationischen Liposomen zur Bildung von Komplexen bestehend aus beiden Komponenten führt. Die Definition der exakten Struktur der entstehenden Lipoplexe ist schwierig, da es sich um sehr heterogene Mischungen unterschiedlicher Vesikel handelt und die zum Einsatz gebrachten Methoden der Vesikelcharakterisierung andere Versuchsbedingungen als bei den Transfektionsversuchen verlangen. Ein besonderes Problem bei der Vesikelbildung stellt die Verminderung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den einzelnen Liposomen bzw. der Lipoplexe dar. Diese führt zu einer Destabilisierung des Systems welche eine längeren Haltbarkeit der Komplexe Grenzen setzt..

Möglichkeiten zur Stabilisierung der entstehenden Gentransfervesikel bestehen:

- in der Vermeidung instabiler Zwischenzustände durch die richtige Reihenfolge beim Mischen der Einzelkomponenten d.h. durch das Vermeiden kurzzeitiger neutraler Ladungsverhältnisse
- in einer vorherigen Verkleinerung der Liposomen
- in der Verwendung niedrigioniger Komplexierungsmedien
- in der Aufrechterhaltung eines hohen Oberflächenpotentials durch den Einsatz DNA-kondensierender Polykationen
- in der sterischen Hinderung der Aggregation durch die Membraninsertion hydrophober längerkettiger Moleküle wie z.B. PEG-PE

Warum das Erreichen einer hohen Vesikelstabilität nicht konform mit dem Erreichen hoher Effizienzen bei der DNA-Applikation *in vitro* sein muß, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.4 Gentransfer

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt auf die Bedeutung der chemischen Struktur des kationischen Lipides, des Helferlipidanteiles und der konkreten Bedingungen der Komplexbildung für die biophysikalischen Eigenschaften und die Stabilität von Liposomen bzw. Lipoplexen eingegangen wurde, sollen im folgenden Teil verschiedene Faktoren diskutiert werden, die die Effizienz des Gentransfers unter *in vitro* Bedingungen beeinflussen können. Dabei sollen die Gentransferergebnisse der liposomalen Formulierungen unter Berücksichtigung der *in vitro* und *in vivo* Anforderungen interpretiert werden.

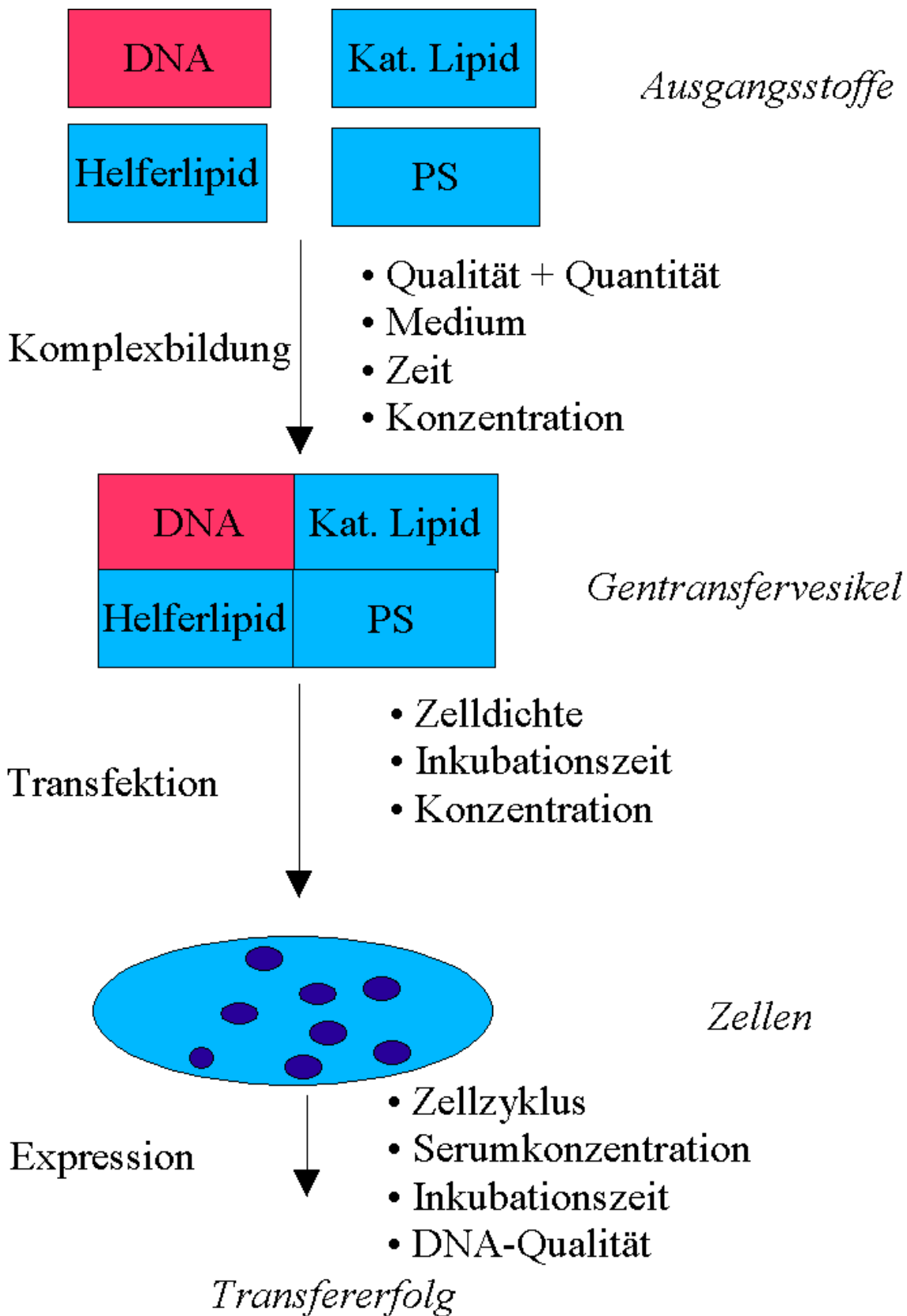


Abbildung 4.3: Einflußfaktoren auf Komplexbildung, Transfektion und Expression

Zu den Einflußfaktoren, welche die effiziente Herstellung der Gentransfervesikel und die nachfolgende Transfektion betreffen, kann man zählen:

- Faktoren, die direkt Bestandteil der Gentransfervesikel sind: d.h. das kationischen Lipid, das Helferlipid, die DNA und die Polykationen
- Faktoren, welche die Komplexbildung betreffen: der Einfluß des Mediums auf die Komplexbildung, die Konzentration der Einzelkomponenten und die Dauer der Lipoplexinkubation
- sowie Faktoren, die die Transfektionstechnik an sich betreffen: die Zellen bzw. deren Kulturbedingungen so z.B die Serumkonzentration

Eine schematische Übersicht zu den einzelnen Einflußfaktoren, enthält die Abb. 4.3. Die nach der Transfektion und der Expression des transfizierten Genes letztendlich bestimmte Reporterexpression ist unbedingt zu unterscheiden von dem Begriff der Transfer- bzw. der Transfektionseffizienz. Die Reporterexpression hängt zum einen von der Transfektionseffizienz ab, zum anderen ist sie beeinflusst von der Qualität der eingesetzten DNA, der Expressionsstärke des gewählten Promotors, der Stoffwechsellaktivität der Zellen unter den konkreten Versuchsbedingungen und von der Dauer der Inkubation der Zellen nach der Transfektion. Bei dem zuletzt genannten Faktor ist z.B. die Stabilität des Reporterproduktes von Bedeutung für die Höhe der gemessenen Expression. Das Enzym β -Galaktosidase ist z.B. wesentlich stabiler als das Enzym Luziferase und akkumuliert nach der Transfektion über mehrere Tage in der Zelle, so daß man bei einer verlängerten Inkubationszeit in diesem Falle höhere Expressionsraten erreicht. Bei der Luziferase kommt es dagegen auf den genauen Zeitpunkt der Bestimmung der Reporterexpression an, da die Luziferase nur eine Halbwertszeit von etwa 3 h in der Zelle hat.

In dieser Arbeit soll vor allem auf die Faktoren eingegangen werden, die die Transfektionseffizienz nicht aber auf die Faktoren, die die Höhe der Genexpression beeinflussen. Als eine Ausnahme wird hier die Qualität der Plasmid-DNA behandelt, da diese bisher trotz ihrer großen Wichtigkeit nur unzureichend als Einflußfaktor untersucht wurde.

4.4.1 Struktur des kationischen Lipides und Anteil des Helferlipides

Es sollte untersucht werden ob es zwischen den einzelnen kationischen Lipiden Unterschiede in der Effizienz des Gentransfers gibt, welche auf chemische Strukturmerkmale zurückzuführen sind. Desweiteren sollte die Notwendigkeit des Zusatzes eines Helferlipides für die einzelnen kationischen Lipide analysiert werden.

Wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 zeigen, ist ohne Berücksichtigung der konkreten Versuchsbedingungen weder eine Aussage zur optimalen chemischen Struktur noch dazu, welches Verhältnis von kationischem Lipid zu Helferlipid günstig ist, möglich.

Die erreichbare Gentransferrate hängt weniger von der chemischen Struktur des kationischen Lipides als vielmehr von der Auswahl der Bedingungen unter denen die Lipoplexbildung und die Transfektion der Zellen erfolgt ab: So z.B. von dem verwendeten

Komplexierungsmedium, der Konzentration der Einzelkomponenten und der Inkubationszeit sowie von den Eigenschaften der Zielzelle selbst. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Unterschiede in den Gentransfereffizienzen zwischen den einzelnen doppelkettigen Amphiphilen geringer waren als die Unterschiede zwischen der Transfektionsrate der einzelnen Zelllinien.

Bedeutsamer als die chemische Struktur des kationischen Lipides waren für die meisten der untersuchten kationischen Liposomen die Art und die Menge des zugesetzten Helferlipides. Die Notwendigkeit das Helferlipid für eine effiziente Liposomen-Formulierung hinzusetzen, war dabei insbesondere bei den Lipiden mit quarternären Aminen und bei den Cholesterolderivaten gegeben. Doppelkettige Amphiphile, die auch über primäre Amine verfügen wie DOCSPER, DOSPER, DOSGA, β -AE-DMRIE, benötigen dagegen keinen Zusatz eines Helferlipides.

Wheeler und Mitarbeiter [157] stellten außerdem fest, daß die Umwandlung der Hydroxyethylgruppe des kationischen Lipides DMRIE in eine Aminoethylgruppe (β -AE-DMRIE) zu einer verringerten Notwendigkeit des Helferlipidzusatzes führte. In 7 von 10 untersuchten Zelllinien transfizierte β -AE-DMRIE ohne Helferlipid gleich gut oder besser als mit dem Helferlipid DOPE. β -AE-DMRIE hat durch den quarternären Stickstoff und die primäre Aminogruppe unter physiologischen Bedingungen 1.5 positive Ladungen gegenüber einer positiven Ladung beim DMRIE. Bei den doppelkettigen Amphiphilen führt das Vorhandensein von primären Aminogruppen zu einer verringerten Notwendigkeit das Helferlipid DOPE zusetzen zu müssen. Die primäre Aminogruppe des DOPE's scheint nach den Arbeiten von verschiedenen Autoren verantwortlich für die fusogenen Eigenschaften der Gentransfervesikel zu sein [40, 44, 170] und ihre Funktion kann also offenbar auch durch primäre Aminogruppen des kationischen Lipides ersetzt werden. Dies erklärt die guten Gentransfereigenschaften der Lipopolyamine, die über 2 primäre, 1-2 sekundäre und eventuell über 1 tertiäre Aminogruppe verfügen. Die primäre Aminogruppe der Liposomen kann vom Helferlipid oder von einem doppelkettigen kationischen Lipid stammen. Ihre Wirkung ist sowohl durch die stärkere Hydratation der Liposomenoberfläche als auch durch die veränderten Puffereigenschaften erklärbar. Letztere könnten das Überwinden der Lysosomen- bzw. der Endosomenmembran innerhalb der Zelle ermöglichen.

Die Untersuchungen, die mit DOCSPER-Liposomen durchgeführt wurden, zeigten außerdem, daß der Zusatz des Helferlipides zu einer deutlichen Vergrößerung der Liposomen führt [58]. Während die Liposomen ohne Helferlipid sehr klein waren, erreichten sie mit dem Zusatz des Helferlipides eine Größe von mehreren hundert nm. Diese Größe entspricht in etwa den Ausmaßen, welche ungepackte Plasmid-DNA erreicht. Vermutlich kommt es durch die gleichen Größen zu einer erleichterten Lipoplexbildung. Dafür spricht auch die Tatsache, daß bei DOCSPER-Liposomen ohne DOPE die Komplexbildung langsamer verlief als bei DOCSPER-Liposomen, welche mit DOPE hergestellt worden waren [58]. Gestützt wird diese Hypothese auch durch den Befund, daß Puffersubstanzen welche die Größe der Liposomen erhöhten ebenfalls zu einer besseren Transfektion führten (vgl. Abb. 3.17, S. 82).

Die Herstellung gentransferfähiger Liposomen die keinen Zusatz eines Helferlipides benötigen, ist das Ziel unserer derzeitigen Untersuchungen. Solche Vesikel bieten den Vorteil einer leichteren Formulierung der Liposomen und der Vermeidung ungewollter biologischer Nebenwirkungen durch eine mögliche Bildung von Lyso-Verbindungen des DOPE's [40, 135].

Da der Einfluß der chemischen Struktur des kationischen Lipides auf die Effizienz des Gentransfers zu vernachlässigen ist, wurde in dieser Arbeit versucht für ausgewählte kationische Lipide die Formulierung der Gentransferkomplexe zu optimieren. Die Lipide DOCSPER und DAC-Chol zeigten auf einer Vielzahl von verschiedenen Zellen gute Ergebnisse bei der Transfektion und es lag eine ausreichende Menge an Versuchsmaterial vor. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Untersuchungen der Schwerpunkt auf die Arbeit mit diesen beiden Lipiden gelegt.

4.4.2 DNA-Qualität

Im Gegensatz zum Einfluß der Lipidchemie auf die liposomalen Gentransfereigenschaften, wurde der Einfluß der DNA-Qualität auf die Reporterexpression bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen untersucht. Die Ergebnisse von Cherng und Mitarbeitern zur Transfektion von Zellen mit Polyplexen, die aus dem synthetischen Polymer pDMAEMA und unterschiedlich vorbehandelter DNA hergestellt worden waren, zeigen, daß es bei einer Linearisierung der DNA zu einem Abfall in der Effizienz des Gentransfers kommt [24].

Die DNA-Qualitätskontrolle zur Untersuchung auf Anwesenheit von Proteinen, RNA und von genomischer DNA sowie zum Anteil der zirkulären DNA, die Anwesenheit von RNA und genomischer DNA wird derzeit zumeist mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die hier vorgelegten Versuchsergebnisse zeigen, daß dieses Verfahren für eine Aussage zur Eignung der DNA für den Gentransfer nicht geeignet ist.

In unseren Untersuchungen wurde die DNA für mehrere Stunden entweder bei Raumtemperatur oder bei 70°C gelagert. Es ergaben sich nach einer 1 bis 2 h Inkubation der DNA bei 70°C bzw. nach einer Übernachtinkubation bei Raumtemperatur keinerlei Unterschiede im Laufverhalten der DNA im Agarose-Gel im Vergleich zu unbehandelter Kontroll-DNA. Nach Auswertung der Gelelektrophorese muß angenommen werden, daß der Anteil linearisierter DNA durch die Inkubation bei höheren Temperaturen nicht wesentlich erhöht war. Trotz dieses identischen Laufverhaltens der DNA-Moleküle im Agarose-Gel wiesen die Ergebnisse der Reporterexpression gravierende Unterschiede auf (vgl. Abb. 3.15, S. 78). Diese können mit Hilfe der üblichen Strukturuntersuchungsmethoden nicht erklärt werden. Hier sind weitergehende Analysen der Veränderungen der DNA durch Methoden wie die Aufnahmen von Circular-Dichroismus-Spektren der DNA und elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendig.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen, daß der molekularen Qualität der DNA ein größerer Stellenwert zukommt, als bisher angenommen wird. Die üblichen Analysemethoden wie die Strukturkontrolle der DNA durch eine Gelelektrophorese sind nicht ausreichend für eine Beurteilung der Transferfähigkeit der DNA.

4.4.3 DNA-Komplexierung mit Polykationen

Wie die Größenuntersuchungen und die EtBr/DNA-Fluoreszenz-Messungen zeigten, bilden sich bei der Herstellung von Komplexen aus kationischen Liposomen und DNA zumeist relative große Vesikel mit einer breiten Größenverteilung und schwacher DNA-Komplexierung. Für eine *in vivo* bzw. eine klinischen Anwendung ist es jedoch notwendig, Vesikel von definierter Größe und Zusammensetzung herzustellen. Da die aus

DNA und Liposomen entstehenden Komplexe wegen ihrer Größe für eine *in vivo* Anwendung relativ ungeeignet sind, wurde versucht durch den Zusatz von Polykationen die DNA dichter zu packen und nach der Zugabe der Liposomen kleinere und stabilere Gentransfervesikel zu erhalten.

Dazu wurden verschiedene synthetische Polymerpartikel [25, 145] aber auch natürlich vorkommende kationische Polymere wie Polyethylenimin [1, 18, 48] für die Herstellung von Gentransfervesikeln verwandt.

Gao und Huang wiesen erstmals die Möglichkeit nach, daß durch eine Vorkomplexierung der DNA mit Polykationen eine Erhöhung der Effizienz liposomaler Gentransfervesikel bei der Transfektion eukaryontischer Zellen zu erreichen ist [54]. Sie verwendeten dabei unterschiedliche Polykationen wie PLL, Protamin, Polybren oder Spermin. Die Herstellung der Gentransfervesikel erfolgte somit aus dem kationischen Polymer, der Plasmid-DNA und den kationischen Liposomen. Die Polykationen konnten dabei zur separaten Vorkomplexierung der DNA genutzt oder direkt zu den Liposomen hinzugegeben werden. Für die entstehenden Gentransfervesikel wurde später der Name Lipid/Polykation/DNA (LPD) -Partikel eingeführt [90, 94].

Bei ihren Untersuchungen verwendeten Gao und Huang Protamin als freie Base statt des später häufig eingesetzten Sulfatsalzes [54]. Dabei erwies sich Protamin als nur bedingt für die Steigerung der Genexpression geeignet. Bessere Gentransfereffizienzen beobachteten Gao und Huang bei Verwendung von PLL, Poly-Ornithin oder Polybren. Die Steigerung der Genexpression durch den Zusatz der Polykationen erklärten die Autoren mit einer höheren Nukleaseresistenz der hergestellten Gentransfervesikel, wie auch durch die bessere Zellaufnahme infolge einer geringeren Größe und einer größeren Oberflächenladung der Komplexe.

Die Komplexe aus den Polykationen und der DNA transfizierten die Zellen ohne den Zusatz des Lipides nur in sehr geringem Maße während bei einem nachträglichen Zusatz von nicht DNA gebundenen kationischen Liposomen zu lipidfreien PLL/DNA-Komplexen sehr effiziente Transfektionen beobachtet wurden. Da die PS/DNA-Polyplexe und die Liposomen das Endosom getrennt voneinander erreichten, vermuteten Gao und Huang eine notwendige Helferrolle der Liposomen bei der Freisetzung der DNA aus den Endosomen.

In Weiterführung der Arbeiten von Gao und Huang verglichen Sorgi und Mitarbeiter die verschiedenen Salze des Protamins und stellten fest, daß sich insbesondere das Chlorid- und das Sulfat-, weniger jedoch das Phosphatsalz sowie die freie Base für den Gentransfer eignen [138]. Sie führten diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Salzen und der freien Base auf einen veränderten Lysingehalt zurück. Die Autoren wiesen nach, daß Salzformen mit hohem Lysingehalt die DNA schlechter komplexierten und weniger für den Gentransfer geeignet waren. Die Nettoladung der Protaminsalze hatte dagegen keinen Einfluß auf die erzielten Gentransferergebnisse.

Die bei der Komplexierung der DNA mit PS stattfindenden strukturellen Veränderungen wurden bereits im Abschnitt 4.3 diskutiert. Wie dort ausgeführt bilden sich aufgrund der natürlichen Affinität der Polykationen zur DNA wesentlich kleinere und stabilere Komplexe aus als bei der alleinigen Komplexierung mit kationischen Liposomen (vgl. Abschnitt 3.1.2.1, S. 60). An die nach der Vorkomplexierung mit Polykationen verbleibende Restladung der DNA werden dann die kationischen Lipide angelagert. Diese sind vermutlich für die Aufnahme der DNA in die Zelle notwendig. Wie unsere Ergebnisse und Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen nachweisen, ist die

Gentransfereffizienz der Komplexe aus PS und DNA ohne den nachfolgenden Zusatz der kationischen Liposomen sehr gering (Abb. 3.12, S. 75)[54, 152]. In dieser Arbeit wurde bestätigt, daß sowohl PLL als auch PS geeignet für die Erhöhung der Gentransfereffizienz sind. Mit dem stärker positiv geladenen PEI konnte keine Steigerung der Reporterexpression erreicht werden. Es wurde sogar ein hemmender Einfluß auf die Transfektion beobachtet. Offenbar kommt es bei dieser Polykation zu einer Ladungsumkehr der Polyplexe. An die dann positiv geladenen Vesikel können sich keine Liposomen mehr anlagern und die Gentransfereffizienz ist demzufolge gering. Diese Hypothese unterstützen Untersuchungen von Baker und Mitarbeitern, die negativ geladene Adenovirushüllen an PEI/DNA-Komplexe ankoppeln konnten und mit diesen Vesikeln sehr hohe Gentransferraten erzielten [7]. Die besten Ergebnisse wurden bei Ladungsverhältnissen zwischen PEI und DNA von 9-13 erzielt, also bei stark positiven Werten, bei denen eine Bindung der Virushüllen an die Polyplexe ermöglicht wird.

Im Gegensatz zu den Polymeren mit einer mittelstarken Ladung, PS und PLL, war das schwächer positiv geladene Viruskapsidprotein Ncp7 nur bedingt für die Herstellung von Gentransfervesikeln geeignet. Unter den für die Versuche gewählten Standardbedingungen erfolgte durch Ncp7 nur eine sehr schwache DNA-Komplexierung wie die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese und des EtBr-Ausschlusses zeigten (vgl. Abb. 3.11, S. 73). Auch Dathe und Mitarbeiter wiesen in Circular-Dicroismus-Untersuchungen nur eine schwache Wechselwirkung zwischen dem Peptid Ncp7 und der DNA nach [33]. Möglicherweise ist jedoch durch die Optimierung der Komplexbildungsbedingungen, z.B. durch die Wahl eines niedrigeren pH-Wertes, eine bessere DNA-Komplexierung/Transfektion erreichbar [171].

Die Polykationen PLL und PS waren etwa gleich gut für eine Herstellung von Gentransfervesikeln geeignet. Im Gegensatz zu PLL wird PS derzeit auch klinisch, in großem Umfang zur Behandlung des Diabetes, bzw. als Antagonist des Heparins eingesetzt. Da PS somit eine klinisch erprobte und zugelassene Substanz ist, wurde in Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung der Gentransfervesikel für die weiteren Untersuchungen ausschließlich PS eingesetzt.

Wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.2.3 (S. 73) bei der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien belegen, wurde durch den Einsatz des PS die Gentransfereffizienz um das 2-10 fache gesteigert. Lediglich bei den CC531-Zellen wurde durch den Zusatz von PS die Effizienz der Transfektion herabgesetzt. Hier scheint eine zellspezifische Besonderheit vorzuliegen, da dieser Befund nur bei dieser einen von den etwa 20 verschiedenen untersuchten Zelllinien bzw. Primärzellarten festgestellt wurde.

Die Steigerung der Genexpression bei den übrigen Zellarten wurde sowohl durch den Zusatz des PS zu der DNA wie auch durch den Zusatz des PS zu den Liposomen erreicht. Der letztgenannte Ansatz hat den Vorteil einer einfacheren Herstellung der Gentransfervesikel, da ein Formulierungsschritt weniger zur Komplexherstellung notwendig ist. Das PS kann somit unmittelbar nach der Herstellung der Liposomen zu diesen hinzugegeben und das Gemische längere Zeit aufbewahrt werden. Dagegen ist die PS-Zugabe zur DNA ein zeitkritisches Verfahren. Hier kann es bei längerer Inkubation zu einer erheblichen Vergrößerung der PS/DNA-Komplexe kommen. Diese sind dann *in vivo* nicht mehr transferaktiv. Auf den zeitlichen Verlauf der Polyplexbildung und den Einfluß des Mediums wird später noch eingegangen werden.

Bei den Untersuchungen zur Langzeitstabilität von DAC-40/DNA- und DAC-40/PS/DNA-Komplexen wurde eine deutlich größere physikalische Stabilität der Komple-

xe mit PS gefunden. Ursachen dafür sind eine bessere Packung der DNA und eine infolge des größeren Oberflächenpotentials verstärkte Abschirmung der Komplexe. Letztere schützt die einzelnen Vesikel vor gegenseitigen Fusionen und führt somit zur Bildung kleinerer Gentransfervesikel.

Diese Komplexe aus PS, DNA und Liposomen behielten neben ihrer höheren Stabilität auch über einen längeren Zeitraum ihre Transferfähigkeit (vgl. Abb. 3.22, S. 87). So sank die Gentransfereffizienz bei der Transfektion von N64-Zellen nach 72 h nur auf etwa 50 % des Ausgangswertes ab. Dagegen kam es bei Komplexen ohne PS bei niedrigerem Ausgangsniveau zu einem stärkeren Abfall der Transfereffizienz auf etwa 1/3 bis 1/5. Weiterhin konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, daß der Zusatz des PS insbesondere die Transfektionsergebnisse bei Anwesenheit von Serum und *in vivo* verbessert [54, 95, 94, 138].

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Verwendung von PS ein vielversprechender Ansatz zur Herstellung von homogenen, stabilen und hocheffizienten Gentransfervesikeln ist. Die verstärkte Komplexierung der DNA durch das natürliche Gegenion Protamin führt zur Bildung kleinerer Vesikel, höherer Serumstabilität und Nuklease-Resistenz sowie zu einer längeren Haltbarkeit der Komplexe.

4.4.4 Einfluß von Medium, Konzentration und Komplexbildungszeit

Neben den Vesikelbestandteilen, der DNA als der zu applizierenden Substanz, sowie den Trägermaterialien, dem kationischen Lipid, dem Helferlipid und den Polykationen, beeinflussen weitere Faktoren die Gentransfereffizienz. Zum ersten findet das Mischen der Einzelkomponenten in einem bestimmten Medium statt, dessen Beschaffenheit bedeutsam für die entstehenden Strukturen und für die Transferaktivität der Vesikel ist. Zum anderen ist die Konzentration der Einzelkomponenten und die Dauer der Inkubation entscheidend für die Geschwindigkeit der Komplexbildung und für die Stabilität der entstehenden Vesikel. Die Wirkung dieser Faktoren soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Pitard [117] sowie Escriou [39] und Mitarbeiter untersuchten den Einfluß des Mediums auf die Größe von Lipoplexen, die aus Lipopolyaminen und Plasmid-DNA hergestellt worden waren und welche Transfektionsergebnisse *in vitro* mit ihnen erzielt werden können. Wie die Ergebnisse dieser Autoren zeigen, kann durch die Verwendung von unterschiedlichen Medien die Größe der Lipoplexe in erheblichem Ausmaß beeinflußt werden. Escriou und Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, daß die Herstellung der Lipoplexe in isotonischer NaCl-Lösung zu sehr kleinen und in isotonischer NaCl mit zugesetztem Bicarbonatpuffer zu sehr großen Komplexen führt.

Die Effizienz bei der Transfektion von Zellen mit beiden Arten von Lipoplexen wurde wesentlich von der Anwesenheit von Serum im Zellkulturmedium beeinflußt. Bei den in isotonischer NaCl hergestellten Lipoplexen war die Transfereffizienz relativ niedrig wenn die Transfektion in serumhaltigem Medium durchgeführt wurde. Escriou und Mitarbeiter beobachteten dann im Zellkulturmedium keinerlei Größenveränderungen der Lipoplexe mehr. Wurde dagegen die Transfektion in serumfreiem Medium durchgeführt, setzte sich im DMEM-Medium die Komplexbildung fort und es kam zur Bildung größerer, aggregatähnlicher Komplexe. Diese wiesen sehr gute Transfektionseigenschaften auf. Da die Autoren die Bildung dieser größeren Komplexe auf die Anwesenheit von

Bicarbonat im Zellkulturmedium zurückführten, versuchten sie Lipoplexe in 150 mM NaCl mit 20 mM Bicarbonat-Lösung herzustellen und erhielten dadurch über 2 μm große Komplexe. Diese Komplexe transfizierten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Serum sehr gut. Ihre Versuchsergebnisse interpretierten Escriou und Mitarbeiter damit, daß der hemmende Effekt des Serums auch auf die verhinderte Aggregatbildung der Lipoplexe zurückzuführen ist. Wurde die Aggregatbildung vor der Zugabe zu den Zellen abgeschlossen, d.h. in Bicarbonatmedium durchgeführt, war die Hemmung der Transfektion durch das im Zellkulturmedium vorhandene Serum wesentlich geringer.

Auch Kawaura und Mitarbeiter [77] zeigten, daß *in vitro* größere Partikel oft bessere Transfereigenschaften aufweisen als kleinere. Sie wiesen mittels Atomabsorptions-Untersuchungen nach, daß Lipoplexe mit der Größe von 400 bis 1400 nm die effizientesten der von ihnen untersuchten Gentransfervesikel darstellten. Dagegen transfizierten kleinere Vesikel schlechter. Die Autoren verglichen jedoch unterschiedliche kationische Cholesterolderivate die verschieden große Vesikel ausbildeten. Ob die chemische Struktur oder tatsächlich wie postuliert die unterschiedliche Größe für die Gentransfereigenschaften ausschlaggebend war, kann auf der Basis ihrer Ergebnisse nicht zweifelsfrei beurteilt werden.

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Escriou und Mitarbeitern wurde im Rahmen unserer Experimente untersucht, ob für andere Liposomen ähnliche Zusammenhänge bestehen und welche Medien für eine verbesserte Transfektion im Vergleich zu Bicarbonatmedium noch geeignet sind. Wir untersuchten für DAC-Chol- und DOCSPER-Liposomen den Zusammenhang von Lipoplex-Größe und Gentransferrate bei Verwendung verschiedener L/D-Verhältnisse und bei der Herstellung in unterschiedlichen Puffern. Wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.2.6 (S. 81ff) zeigen, erhöhte sich bei DOCSPER-Liposomen ohne Helferlipid die Gentransferrate, wenn die Lipoplexbildung in bicarbonathaltigem Medium statt in Ringerlösung, Wasser oder Kochsalzlösungen erfolgte. Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten 4.3 und 4.2 diskutiert, vergrößerten sich die Liposomen in bicarbonathaltigen Medium schon vor der Zugabe der DNA auf über 500 nm. Nach der Zugabe der DNA entstanden Lipoplexe von mehr als 1 μm Größe (vgl. Abb. 3.4, S. 62) deren Größe außerdem ständig zunahm. Diese Lipoplexe transfizierten die Zellen wesentlich besser als kleinere, welche in Ringerlösung oder in Wasser hergestellt worden waren. Es bestand sogar ein direkter Zusammenhang zwischen der NaCl-Konzentration, der Lipoplexgröße und der Reporterexpression (vgl. Abb. 3.17, S. 82). Mit steigender NaCl-Konzentration kam es nach den Ergebnissen der Trübungsmessungen und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen [91] zur Bildung größerer Komplexe und zu einer starken Erhöhung der Reporterexpression nach der Transfektion. Die Frage, ob es dabei Unterschiede in der Zellaufnahme der Gentransfervesikel zwischen den einzelnen Lipoplexformulierungen gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Ergebnisse von Escriou und Mitarbeitern [39] deuten allerdings darauf hin, daß es bei der Transfektion mit den Lipopolyamin/DNA-Komplexen, die in isotonischer NaCl-Lösung oder in NaCl-Lösung mit 20 mM Bicarbonat hergestellt wurden, keine signifikanten Unterschiede bei der Aufnahme in die Zellen gibt. Somit scheint *in vitro* die Größe der Lipoplexe kein limitierender Faktor für die Zellaufnahme zu sein. Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen allerdings, daß es zwischen verschiedenen Zelllinien Unterschiede gibt. So liessen sich N64-Zellen besser mit größeren Gentransfervesikeln transfizieren als F98-Zellen (vgl. Abb. 3.22, S. 87). Da Escriou und Mitarbeiter ihre Untersuchungen nur an 2 Zelllinien durchgeführt haben,

sind hierzu weitere Experimente notwendig.

Bei kationischen Liposomen, die das Helferlipid DOPE enthielten, war keine Steigerung der Genexpression durch die Anwesenheit von Bicarbonat im Komplexierungsmedium feststellbar. Generell war der Einfluß des Mediums auf die Transfereffizienz bei diesen Liposomen geringer (vgl. Abb. 3.19, S. 84) und teilweise wurde die Gentransfereffizienz durch das Bicarbonat sogar vermindert.

Wie bereits erwähnt sind für eine klinische Anwendung bzw. für den *in vivo* Gentransfer nur Vesikel geeignet, die eine geringe Größe besitzen. Da das kationische Lipid DAC-Chol Gentransferkomplexe bildet, welche über längere Zeit physikalisch stabil sind und das Lipopolyamin DOCSPER offenbar nur bei Vorhandensein größerer Vesikel gut transfiziert, wurden mit dem Lipid DAC-Chol weitergehende Untersuchungen zur Rolle des Mediums bei der Stabilisierung der Lipoplexe durchgeführt.

Da die Untersuchungen ergeben hatten, daß höherionige Medien wie Ringerlösung die Komplexstabilität verringern und Medien mit einer niedrigen Ionenkonzentration wie Wasser bzw. 10 % Saccharose-Lösung die Stabilität heraufsetzen, wurde im weiteren untersucht, wie sich Gentransferkomplexe die in diesen Medien hergestellt wurden, in Transfektionsuntersuchungen verhalten (vgl. Abschnitte 3.1.2.1, S. 60ff. und 3.2.6, S. 81ff).

Es zeigte sich, daß die stabilen Lipoplexe, die in Saccharose-Lösung bzw. Wasser hergestellt worden waren, wesentlich weniger transferaktiv waren als in Ringerlösung hergestellte (vgl. Abb. 3.23, S. 88). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Herstellung von Polyplexen aus PS und DNA erhalten. Wurden die Polyplexe in Saccharose-Lösung oder in Wasser hergestellt, d.h. in Abwesenheit von Gegenionen die um die Bindungsplätze an der DNA konkurrieren, waren sie sehr klein, aber die erreichten Gentransferraten nach der Zugabe der kationischen Liposomen waren nur niedrig. Bei Herstellung der Polyplexe in Ringerlösung nahm ihre Größe innerhalb weniger Minuten stark zu und es wurden mit den LPD-Partikeln hohe Gentransferraten erreicht. Offenbar ist *in vitro* eine schwächere Bindung zwischen den Liposomen und der DNA bzw. zwischen dem Polykation und der DNA günstiger für das Erreichen hoher Gentransferraten. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte in der bei einer starken Bindung erschwerten Dissoziation von DNA und Liposomen bzw. Polykationen innerhalb der Zelle begründet liegen.

In engem Zusammenhang mit der Stabilität und der Effektivität der hergestellten Gentransfervesikel steht neben der Zusammensetzung des Mediums, in dem die Komplexbildung erfolgt, auch die Konzentration der Komponenten und die Dauer der Inkubation. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, daß bei einer hohen Konzentration der Einzelkomponenten eine kürzere Inkubationszeit günstig ist und das eine hohe Ionenkonzentration im Medium den Prozeß der Komplexbildung beschleunigen, aber auch zu einer schnelleren Aggregation der Gentransfervesikel führen kann. So ergaben die Untersuchungen mit DOCSPER-50-Liposomen, daß bei einer 10 min-Inkubation des Lipid/DNA-Gemisches eine etwa 2-4fach höhere Konzentration als bei einer 60 min-Inkubation optimal war. Bei den höheren Konzentrationen nahm dagegen nach 60 min die Gentransfereffizienz der Lipoplexe bereits wieder ab.

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der optimalen Konzentration der Einzelkomponenten und der Ionenkonzentration im Komplexierungsmedium. Bei steigender Konzentration der Gegenionen nimmt die Stärke der Abstoßung zwischen den einzelnen Liposomen/Lipoplexen ab und es kommt häufiger zu Fusionsereignissen. Wie

die Ergebnisse mit DAC-Chol- und DOCSPER-Gentransfervesikeln zeigten, nahmen mit steigender Ionenkonzentration im Medium Komplexbildungszeit und Komplexstabilität ab (vgl. Abb. 3.17, S. 82).

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu schlußfolgern, daß eine Formulierung wirksamer Lipoplexe für eine kurzfristige Stabilität bei einer hohen Konzentration der Einzelkomponenten und in höherionigem Medium erfolgen muß, während für Die Herstellung von langfristig stabilen Komplexen eine geringe Komplex- und Ionenkonzentration im Medium günstig ist.

4.4.5 Serumeinfluß

Neben den bereits diskutierten Faktoren, die mit den Bestandteilen der Gentransfervesikel und mit der Komplexbildung zusammenhängen, gibt es eine weitere Einflußfaktoren, welche die Transfektion an sich betreffen. Dazu gehören u.a. zellspezifische Besonderheiten, die Lipoplexmenge, die Zelldichte und die Anwesenheit von Serumproteinen während der Transfektion. Es muß berücksichtigt werden, daß *in vivo* verschiedene Mechanismen zur Abwehr von fremden Organismen bzw. von Fremdmaterial vorhanden sind. Bei der systemischen Applikation der Gentransferkomplexe kommt es zu einer Anlagerung von Serumproteinen, z.B. des Komplementsystemes, die zur Opsonisierung und zur Beseitigung der Vesikel durch das Immunsystem führen.

Auch bei *in vitro* Untersuchungen ist durch die Anlagerung der Serumproteine und die Maskierung der Oberflächenladung der Lipoplexe eine verringerte Effizienz der Transfektion zu beobachten. Da die Anwesenheit von Serumproteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eher der Normal- als der Ausnahmefall ist, kommt der Optimierung des Gentransfers unter diesen Bedingungen besondere Bedeutung zu.

Wie die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zeigen, ist z.B. bei Liposomen mit einer hohen kationischen Ladung auf der Membranoberfläche eine verstärkte Anlagerung von Serumproteinen zu erwarten. Dies scheint die Zellaufnahme zu erschweren und die Gentransfereigenschaften negativ zu beeinflussen. Untersuchungen mit DOTMA-Liposomen, die wegen des quarternären Stickstoffatoms eine wesentlich höhere Oberflächenladung besitzen sowie insbesondere die mit dem polykationischen Lipid DOSPA (LipofectAMINETM) erzielten Ergebnisse zeigen, daß mit steigendem Serumgehalt Lipoplexe die aus diesen Liposomen hergestellt werden schlechter transfizieren [152, 163].

Wie im vorherigen Abschnitt 4.4.4 ausgeführt, besteht unter den Bedingungen der *in vitro* Transfektion für Lipopolyamine die Möglichkeit durch die Verwendung bicarbonathaltiger Medien Lipoplexe herzustellen, die auch bei Serumanwesenheit ihre Transfektionsfähigkeit behalten. Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte in der Entstehung von relativ großen Gentransfervesikeln liegen, welche im Endosom bzw. Lysosom nicht mehr degradiert werden können. Diese Generierung von sehr großen Komplexen führt jedoch bereits nach sehr kurzer Zeit zum Verlust ihrer Transferfähigkeit und *in vivo* zur raschen Eliminierung der Komplexe durch das Immunsystem. Aus diesem Grunde stellt diese Möglichkeit wahrscheinlich kein wirksames Verfahren für den Gentransfer *in vivo* dar.

Eine andere Möglichkeit, die Transfektion bei Serum-Anwesenheit zu optimieren, besteht darin, das L/D-Verhältnis zu verändern. So erreichten Yang und Huang [163] bei Anwesenheit von Serum eine bessere Transfektion durch eine Erhöhung des L/D-

Verhältnisses im Vergleich zu dem Verhältnis welches unter serumfreien Bedingungen als optimal bestimmt wurde. Möglicherweise trägt das stärker positive Ladungsverhältnis auf der Liposomenoberfläche zu einer verbesserten Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen mit ihrer negativ geladenen Membran bei.

Da die Herstellung serumstabiler Lipoplexe für deren *in vivo*-Anwendbarkeit Voraussetzung ist, wurde die Eignung der verschiedenen kationischen Liposomen für die Transfektion unter Serumeinfluß untersucht. Die Transfektionen erfolgten zumeist bei einem Serumgehalt von 5 %.

Für einen Vergleich der Serumstabilität von Lipoplexen, die aus den kationischen Liposomen DAC-Chol und DOTMA hergestellt worden waren, wurden die Transfektionen jedoch bei 5, 10 und 20 % Serum durchgeführt. Wie die Ergebnisse zeigen, lag bei DAC-Chol-Liposomen kein negativer Einfluß einer höheren Serumkonzentration auf die Gentransfereffizienz vor (vgl. Abschnitt 3.2.8, S. 87). Teilweise wurden sogar höhere Genexpressionen bestimmt, was wahrscheinlich auf die bessere Vitalität der Zellen bei einer erhöhten Serumkonzentration zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu sank bei den untersuchten DOTMA-Liposomen die Gentransferaktivität mit der Zunahme der Serumkonzentration drastisch ab. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen liegt in der höheren Oberflächenladung durch die quarternäre Ammoniumgruppe des DOTMA begründet. Dies führt wie erwähnt zu einer verstärkten Adsorption von Serumproteinen. Eine unterschiedliche Lipoplexgröße als Ursache für die schlechteren Transferergebnisse mit DOTMA-Liposomen war nicht festzustellen.

Wahrscheinlich war neben der geringeren Oberflächenladung auch die Verwendung des Cholesterols als lipophile Ankergruppe für die bessere Gentransfereffizienz des DAC-Chol's verantwortlich. Darauf deuten Untersuchungen hin bei denen Cholesterol als Helferlipid für den *in vivo* Gentransfer eingesetzt wurde und wo sich dieses als besonders geeignet erwiesen hat [11, 95]. Im DAC-Chol war Cholesterol als Bestandteil des kationischen Lipides bereits enthalten, während die DOTMA-Liposomen mit dem Helferlipid DOPE hergestellt worden waren. Ob DOTMA-Liposomen mit Cholesterol als Helferlipid bessere Transfektionseigenschaften ergeben, ist in diesem Zusammenhang ein interessanter Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen. Eigene Experimente mit dem verwandten Lipid DOTAP scheinen diese Frage im Gegensatz zu den Resultaten von Li und Mitarbeiter [95] jedoch zu verneinen.

Möglicherweise ist die chemische Struktur der kationischen Kopfgruppe für das unterschiedliche Verhalten der Komplexe beim Gentransfer mitverantwortlich. Das diese zu unterschiedlichen Anlagerungsmustern von Serumproteinen und damit auch zu einem veränderten Transfektionsverhalten der Komplexe *in vitro* und *in vivo* führen kann, wurde durch Arbeiten von Diederichs und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gezeigt [35]. Sie stellten fest, daß sich die Serum-Adsorptionmuster von Lipoplexen, die aus DAC-Chol und DC-Chol-Liposomen hergestellt worden waren, erheblich unterschieden. Dies wurde durch das Vorhandensein unterschiedlicher Aminokopfgruppen bei den beiden Cholesterolderivaten, eines sekundären Amines beim DAC-Chol und eines tertiären Amines beim DC-Chol, erklärt. Die Tatsache, daß sich bei beiden Liposomenarten verschiedene Serumproteine anlagern, ist eine mögliche Erklärung für unterschiedliche Verteilungsmuster der Lipoplexe im Organismus. Eine gezielte Ausnutzung derartiger Verteilungsmuster z.B durch eine Vorinkubation mit bestimmten Serumproteinen könnte für ein zielgerichtetes Applizieren der DNA ausgenutzt wer-

den.

Insgesamt bleibt festzustellen, daß dem Einfluß des Serums auf die Lipofektion wegen der allgegenwärtigen Anwesenheit von Proteinen im Blut und in den anderen Körperflüssigkeiten besondere Bedeutung zukommt. Die Entwicklung von Gentransfervesikeln hat zu berücksichtigen, daß *in vivo* völlig andere Bedingungen vorliegen als sie in der Zellkultur simuliert werden können. Hierbei ist insbesondere auf die fehlende Anwesenheit von Immunzellen und von Komplementproteinen, die in der Zellkultur inaktiviert werden müssen, hinzuweisen. Das die Herstellung serumresistenter Gentransfervesikel möglich ist, beweisen die Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit DAC-Chol/PS-DNA-Komplexen erzielt worden sind. Bei einer Berücksichtigung der spezifischen Adsorptionsmuster der einzelnen kationischen Lipide und der Verwendung von Polykation-komplexierter DNA könnten effiziente und zielgerichtete Gen-Applikationen auch *in vivo* möglich werden.

4.4.6 Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentration

Das Einbringen der Lipoplexe in die Zelle ist begleitet von einer dosisabhängigen Toxizität. Diese hat ihre Ursache sowohl in der Menge an kationischer Ladung, die zu einer Membranschädigung führt, als auch in dem massiven Eindringen von Fremd-DNA in die Zelle. Je länger die Transfektionszeit, umso größer müßte infolge der verstärkten Wechselwirkung von Zellen und Lipoplexen die Toxizität und damit auch eine Verringerung der Reportergenexpression zu beobachten sein. Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurde die Inkubationsdauer der Lipoplexe auf den Zellen in ihrem Einfluß auf die Transfektionsergebnisse untersucht.

Die Autoren, welche die Bedeutung der Dauer der Transfektionszeit für das Erreichen einer hohen Reportergenexpression untersucht haben, erzielten teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. So stellten Loeffler und Behr [97] fest, daß Inkubationen von etwa 1 h ausreichend für die optimale Transfektion der untersuchten Zelllinie sind. Auch Oler und Schenborn [114] erreichten für das Reagenz TransFastTM sehr hohe Transfektionsraten bei kurzen Inkubationszeiten. Sie variierten dabei unter anderem die Art des Mediumwechsels nach der Transfektion. Wenn sie das Medium komplett nach der Transfektion entfernten, waren zumeist längere Transfektionszeiten günstig. Bei einer Zugabe frischen, höher serumhaltigen Mediums, also ohne Entfernung der im Medium befindlichen Lipoplexe, waren kürzere Transfektionszeiten vorteilhaft. Zwischen den untersuchten Zelllinien gab es dabei gravierende Unterschiede. So war z.B. bei HeLa- und NIH-3T3-Zellen schon eine Inkubationszeit von 1 h ausreichend für das Erreichen der maximalen Genexpression, während andere Zellen längere Inkubationszeiten benötigten. Bei einer noch längeren Inkubationszeit sank dagegen die Genexpression wieder kontinuierlich ab. Es ist bei der Beurteilung der Untersuchungen von Oler und Schenborn zu berücksichtigen, daß die Lagerung des TransFastTM-Reagenzes bei -20°C erfolgte, einer Temperatur, bei der die liposomale Struktur zum großen Teil zerstört wird. Wie unsere Untersuchungen bewiesen, handelte es sich bei den eingesetzten Vesikeln um sehr große Partikel. Offenbar ist deren schnelle Sedimentation Ursache für die kurzen Transfektionszeiten. Trotz dieser Einschränkungen bzw. Unterschiede zu unseren Transfektionsreagenzien waren bei den von uns durchgeführten Experimenten ähnliche Beobachtungen festzustellen. Die Zellen verhielten sich sehr unterschiedlich was die Zeitdauer der Lipoplexinkubation und die maximale Genexpression betraf. Im

allgemeinen benötigten Rattenzelllinien längere Inkubationszeiten als humane Zelllinien. Dies deutet auf eine speziespezifisch größere Sensitivität humaner Zellen hin. Zwischen den einzelnen Zelllinien einer Spezies gab es ebenfalls größere Unterschiede.

Wie die Ergebnisse weiter zeigen, besteht zwischen der optimalen Transfektionszeit, der Lipoplexkonzentration und der Zelldichte ein direkter Zusammenhang (vgl. Abb. 3.25, S. 91). Bei hohen Lipoplexkonzentrationen ist nur eine kurze Inkubationszeit für das Erreichen einer hohen Reportergenexpression notwendig. Bei längeren Inkubationszeiten verlagert sich die optimale Lipoplexkonzentration zu niedrigeren Werten. Dagegen tritt dann bei den höheren Lipoplexkonzentrationen bereits Zelltoxizität auf und die β -Gal-Expression verringert sich. Die Geschwindigkeit, bei der dieser Übergang erfolgt, hängt sowohl von der Sensitivität der Zellen als auch von der Zelldichte ab. Bei einer höheren Zelldichte ist die Toxizität niedriger, da in der gleichen Zeit weniger Lipoplexe je Zelle einwirken. Durch die Anwesenheit von Serum wird die Interaktion der Lipoplexe mit den Zellen vermindert bzw. zeitlich verlangsamt. Das hat notwendigerweise längere Inkubationszeiten zur Folge. Zu diesen rein statistischen Effekten der Wechselwirkung kommen natürlich noch die bereits diskutierten Veränderungen der Liposomen im Zellkulturmedium hinzu, die unter Umständen das Transfektionsergebnis erheblich beeinflussen können.

Zusammenfassend zu den hier beschriebenen Einflußfaktoren Transfektionszeit, Lipoplexkonzentration und Zelldichte ist festzustellen, daß es für eine optimale Transfektion auf das sorgfältige Ausbalancieren der einzelnen Parameter ankommt. So sind bei höheren Konzentrationen der Lipoplexe kürzere Inkubationszeiten günstig und umgekehrt. Zum anderen gibt es bedeutsame spezies- und zellspezifische Unterschiede, die die Durchführung der Transfektion zu einem dynamischen Verfahren machen, bei dem die Versuchsbedingungen in Abhängigkeit vom Verlauf der Transfektion unter Umständen auch variiert werden müssen. Bei einer geringeren Zelldichte muß die Transfektionszeit wegen der früher auftretenden Toxizität verkürzt werden. Schwierig ist eine Übertragung dieser Erkenntnisse für die *in vivo*-Anwendung, da dort toxische Effekte durch eine Überdosierung unwahrscheinlich bzw. eher durch Immunreaktionen des Organismus zu erwarten sind. Die hier beschriebenen Schlußfolgerungen lassen sich deswegen kaum auf eine *in vivo* Anwendung übertragen.

4.5 Ausblick

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit und die Beiträge anderer Arbeitsgruppen zeigen, ist die Herstellung wirksamer und stabiler Gentransfervesikel für *in vitro*, *in vivo* und für klinische Anwendungen, eine schwierige Aufgabe.

Die Anforderungen an die Gentransfervesikel, die sich aus einem klinischem Einsatz ergeben, wie hohe Wirksamkeit, Homogenität und Stabilität sowie eine geringe Größe lassen nur einen kleinen Spielraum für den Herstellungsprozeß. Nachdem in einer ersten Phase der Entwicklung von Gentransfersystemen auf liposomaler Grundlage funktionelle Aspekte im Vordergrund standen, sollen die Lipide der 2. Generation sowohl effizient als auch bioabbaubar sein um toxische Nebenwirkungen bei der Anwendung zu minimieren. Dabei werden die Gentransfervesikel immer mehr für konkrete Zielorgane oder bestimmte Erkrankungen optimiert. Die Herstellung der Vesikel erfolgt nicht nur aus Liposomen sondern auch in Kombination verschiedener Gentransfersysteme wie von Polymeren, Liposomen oder Viren.

Die hier vorgestellten Resultate zeigen, daß die Herstellung von relativ kleinen und stabilen Vesikeln auf liposomaler Grundlage häufig zu Lasten der Effektivität beim Gentransfer geht. Wie die Diskussion zum Einfluß des Mediums und des Serums (vgl. Abschnitte 4.4.5 und 4.4.4) außerdem verdeutlicht hat, muß bei der Optimierung der einzelnen Parameter vor allem die Rückwirkung auf das Gesamtsystem berücksichtigt werden. Beispielsweise kann bei der Transfektion im Serum ein anderes Puffersystem geeignet sein als bei der Transfektion in Serumabwesenheit. Die Verwendung von Saccharose-Lösung als Komplexierungsmedium erlaubt z.B. die Herstellung von kleinen und stabilen Gentransfervesikeln die *in vitro* jedoch schlechtere Gentransfer-eigenschaften aufweisen als in Ringerlösung hergestellte instabile, teilweise über 1 μm große Vesikel. Soll eine längerfristige Stabilität der Vesikel erreicht werden, ist die Herstellung in Saccharose-Lösung also günstiger. Diese hier aufgeführten Beispiele machen deutlich, daß es zur Beantwortung der Frage, welches Gentransfersystem für eine bestimmte Anwendung geeignet ist, auf die konkret vorliegende Zielstellung ankommt.

Zu den Ansätzen, die für eine *in vivo* Anwendung synthetischer Gentransferkomplexe bedeutsam werden können, zählen der Zusatz von PS zu den kationischen Liposomen um die DNA besser zu komplexieren und die Insertion von PEG-Ketten zur sterischen Abschirmung der Gentransfervesikel vor Fusionen, Immunzellen und vor Serumproteinen. Die Zugabe des PS zur DNA ist als ein relativ zeitkritischer Prozeß wohl nur für eine *in vitro* Anwendung geeignet. Demgegenüber ist der Zusatz des PS zu den Liposomen und die anschließende DNA-Komplexierung eher für die Herstellung stabiler Vesikel zu empfehlen. Weiterhin bietet die Verwendung von Medien ohne Ionenzusatz, wie z.B. von Saccharose-Lösung, die Möglichkeit einer längerfristigen Stabilisierung der Gentransferkomplexe durch das Verhindern von Vesikelfusionen. Der Zuckerezusatz erlaubt außerdem die Lyophilisation und Lagerung der fertig vorformulierten Gentransferkomplexe. Dieses Verfahren wäre für eine klinische Anwendung von großer Bedeutung. Erste Arbeiten, auf die hier nicht eingegangen werden kann, sind dazu in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt worden und zeigen vielversprechende Resultate. Eine klinische Studie zum Suizidgentransfer mittels DAC-Chol-Liposomen zur Behandlung des Glioblastoms ist in Vorbereitung.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J.P. Behr und B.A. Demeneix. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther*, 7(16):1947–54, 1996.
- [2] T. Akao, T. Nakayama, K. Takeshia und A. Ito. Design of a new cationic amphiphile with efficient DNA-transfection ability. *Biochem Mol Biol Int*, 34(5):915–20, 1994.
- [3] W. Anderson. Human gene therapy. *Nature*, 392:25–30, 1998.
- [4] C.V. Arancibia-Carcamo, H.B. Oral, D.O. Haskard, D.F. Larkin und A.J.T. George. Lipoadenofection-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplant*, 65:62–67.1998.
- [5] S.M. Arcasoy, J.D. Latoche, M. Gondor, B.R. Pitt und J.M. Pilewski. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene. *Gene Ther*, 4:32–38, 1997.
- [6] G. Ascadi, S.S. Jiao, A. Jani, D. Duke, P. Williams, W. Chon und J.A. Wolff. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol*, 3:71–81, 1991.
- [7] A. Baker, M. Saltik, H. Lehrmann, I. Killisch, V. Mautner, G. Lamm, G. Christofori und M. Cotten. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid-DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther*, 4:773–782.1997.
- [8] R.P. Balasubramaniam, M.J. Bennett, A.M. Aberle, J.G. Malone, M.H. Nantz und R.W. Malone. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain. *Gene Ther*, 3:163–172, 1996.
- [9] A.D. Bangham und R.W. Horne. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, 8:660–668, 1964.
- [10] A.D. Bangham, M.M. Standish und J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 13:238–252, 1965.
- [11] L.G. Barron, K.B. Meyer und F.C. Jr Szoka. Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther*, 9(3):315–23, 1998.

- [12] F. Barthel, J.S. Remy, J.P. Loeffler und J.P. Behr. Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol*, 12(6):553–60, 1993.
- [13] M. Baru, J.H. Axelrod und I. Nur. Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene*, 161(2):143–50, 1995.
- [14] C. F. Bennett, M. Y. Chiang, H. Chan, J. E. Shoemaker und C. Mirabelli. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, 41(6):1023–33, 1992.
- [15] T. Blessing, J.S. Remy und J.P. Behr. Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(4):1427–31, 1998.
- [16] R.C. Boucher. *Harrisons Innere Medizin. (K.J.K. Schmailzl Hrsg.)*, Zystische Fibrose.S. 1404–07. Blackwell Wissenschafts Verlag, Berlin, Wien.1995.
- [17] T. Boulikas. Status of gene therapy in 1997: molecular mechanism, disease targets, and clinical applications. *Gene Ther Mol Biol*, 1:1–172, 1998.
- [18] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, und J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(16):7297–301, 1995.
- [19] B. Buchberger, E. Fernholz, H. vd Eltz und M. Hinzpeter. DOSPER Liposomal Transfection Reagent: A Reagent with unique Transfection Properties. *Biochem Inf*, 98:27–29, 1996.
- [20] N.M. Calvin und P.C. Hanawalt. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 170:2796–801, 1988.
- [21] MR Capecchi. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22:479–488, 1980.
- [22] N.J. Caplen, E. Kinrade, F. Sorgi, X. Gao, D. Gruenert, D. Geddes, C. Coutelle, L. Huang, E.W. Alton und R. Williamson. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther*, 2(9):603–13, 1995.
- [23] C. P. Chang, C. S. Lazar, B. J. Walsh, M. Komuro, J. F. Collawn, L. A. Kuhn, J. A. Tainer, I. S. Trowbridge, M. G. Farquhar, M. G. Rosenfeld und et Al. Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *J Biol Chem*, 268(26):19312–20, 1993.
- [24] J.Y. Cherng. *Pharmaceutical aspects of polymer-based gene delivery systems. Preparation, characterisation and stabilisation*. PhD thesis, Utrecht University, Faculty of Pharmacy, 1999.
- [25] J.Y. Cherng, P. Vandewetering, H. Talsma und D.J.A. Crommelin. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency. *Pharm Res*, 13:1038–1042, 1996.

- [26] M. Y. Chiang, H. Chan, M. A. Zounes, S. M. Freier, W. F. Lima und C. Bennett. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 266(27):18162–71, 1991.
- [27] M. Chillón, J.H. Lee, A. Fasbender und M.J. Welsh. Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies in vitro. *Gene Ther*, 5(7):995–1002, 1998.
- [28] C.T.Chung und R.H. Miller. Preparation and Storage of Competent Escherichia Coli Cells. *Meth Enzymol*, 218:621–7, 1993.
- [29] P.R. Cullis und B. de Kruijff. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, 559:399–420, 1979.
- [30] H.Z. Cummins und E.R. Pike. *Photon Correlations Spectroscopy and Light Beating Spectroscopy*. Plenum Press, New York. NATO Advanced Study Institutes. Series B, Vol 3.1974.
- [31] H.Z. Cummins und E.R. Pike. *Photon Correlations Spectroscopy and Velocimetry*. Plenum Press, New York. NATO Advanced Study Institutes. Series B, Vol 23.1977.
- [32] D.T. Curiel, S. Agarwal, E. Wagner und M. Cotten. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:8850–4, 1991.
- [33] A. Dathe. Circular dichroismus-Untersuchungen von Ncp7/DNA-Komplexen. Persönliche Mitteilung.
- [34] R. J. Debs, L. P. Freedman, S. Edmunds, K. L. Gaensler, N. Duzgunes und K. R. Yamamoto. Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. *J Biol Chem*, 265(18):10189–92, 1990.
- [35] J.E. Diederichs, D. Groth und R. Reszka. Plasma protein adsorption patterns onto cationic liposomes and lipoplexes - influence of cationic lipid head group. *J Lipos Res*, 8:52–53, 1998.
- [36] S.J. Eastman, C. Siegel, J. Tousignant, A.E. Smith, S.H. Cheng und R.K. Scheule. Biophysical characterisation of cationic lipid:DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1325:41–62, 1997.
- [37] R.F. Epanand, R. Kraayenhof, G.J. Sterk, Fong Sang H.W. Wong und R.M. Epanand. Fluorescent probes of membrane surface properties. *Biochim Biophys Acta*, 1284(2):191–5, 1996.
- [38] V. Escriou, C. Ciolina, Leclerc A. Helbling, P. Wils und D. Scherman. Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol*, 14(2):95–104, 1998.

- [39] V. Escriou, C. Ciolina, F. Lacroix, G. Byk, D. Scherman und P. Wils. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta.*, 1368(2):276–88, 1998.
- [40] H. Farhood, R. Bottega, R.M. Epanand und L. Huang. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta*, 1111(2):239–46, 1992.
- [41] H. Farhood, N. Serbina und L. Huang. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1235(2):289–95, 1995.
- [42] A. Fasbender, J. Marshall, T.O. Moninger, T. Grunst, S. Cheng und M.J. Welsh. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 4:716–25, 1997.
- [43] W.G. Feero, S. Li, J.D. Rosenblatt, N. Sirianni, J.E. Morgan, T.A. Partridge, L. Huang und E.P. Hoffman. Selection and use of ligands for receptor-mediated gene delivery to myogenic cells. *Gene Ther*, 4(7):664–74, 1997.
- [44] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin und P.L. Felgner. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*, 269(4):2550–61, 1994.
- [45] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner und G. Wu. Nomenclature for synthetic gene delivery systems [editorial]. *Hum Gene Ther*, 8(5):511–2, 1997.
- [46] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold und M. Danielsen. Lipofection: a highly efficient and lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:7413–7, 1987.
- [47] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo und R.W. Hanson. Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:101–105, 1996.
- [48] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zacchello und M. Scarpa. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 4(10):1100–6, 1997.
- [49] D. S. Friend, D. Papahadjopoulos und R. Debs. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1278(1):41–50, 1996.
- [50] J.D. Fritz, H. Herweijer, G. Zhang und J.A. Wolff. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid-DNA. *Hum Gene Ther*, 7:1395–1404, 1996.
- [51] X. Gao und L. Huang. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 179:280–5, 1991.

- [52] X. Gao und L. Huang. Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. *Nucleic Acids Res*, 21(12):2867–72, 1993.
- [53] X. Gao und L. Huang. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 2:710–722, 1995.
- [54] X. Gao und L. Huang. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 35(3):1027–36, 1996.
- [55] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman und A. Minsky. Mode of formation of and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 32:7143–7151, 1993.
- [56] S. Gottschalk, J.T. Sparrow, J. Hauer, M.P. Mims, F.E. Leland S.L. Woo und L.C. Smith. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, 3:448–457, 1996.
- [57] F.L. Graham und A.J. van der Eb. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52:456–467, 1973.
- [58] D. Groth, O. Keil, C. Lehmann, M. Schneider, M. Rudolph und R. Reszka. Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *Int J Pharm*, 162:143–157, 1998a.
- [59] D. Groth, O. Keil, M. Schneider und R. Reszka. Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal Biochem*, 258:141–143, 1998.
- [60] D. Groth und R. Reszka. Verfahren zur dualen Bestimmung von Zellvitalität und Effizienz nach Gentransfer in eukaryontische Zellen. *Deut Pat Applik*, S. 197–50–790, 1997.
- [61] D. Groth, R. Reszka und J.A.Schenk. PEG mediated transformation of E. coli is increased by room temperature incubation,. *Anal Bioch*, 240:302–304, 1996.
- [62] J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson und M. Almgren. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim Biophys Acta*, 1235:305–12, 1995.
- [63] D. Hanahan. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557–80, 1983.
- [64] R.P. Harbottle, R.G. Cooper, S.L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A.M. Knight, E. Wagner, A.D. Miller und C. Coutelle. An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery [see comments]. *Hum Gene Ther*, 9(7):1037–47, 1998.
- [65] S.L. Hart, E. Mayall, M. Stern, F.M. Munkonge, A. Frost, L. Huang, M. Vasilliou, R. Williamson, E.W. Alton und C. Coutelle. The introduction of two silent mutations into a CFTR cDNA construct allows improved detection of exogenous mRNA in gene transfer experiments. *Hum Mol Gen*, 4(9):1597–602, 1995.

- [66] R. P. Haugland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.*, Nucleic acid stains.S. 144–156. M.T.Z. Spence. Molecular Probes, Inc.1996.
- [67] P. Hawley-Nelson, V. Cicarrone, G. Gebeyehu und J. Jessee. LipofectAMINE reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus*, 15:73–79, 1993.
- [68] T. Heath. Covalent attachment of proteins to liposomes. *Meth Enzymol*, 149:111–9, 1987.
- [69] D. Hirsch-Lerner und Y. Barenholz. Probing DNA-cationic lipid interactions with the fluorophore trimethylammonium diphenyl-hexatriene (TMADPH). *Biochim Biophys Acta*, 1370(1):17–30, 1998.
- [70] R.M. Hoffmann, L.B. Margolis und L.D. Bergelson. Binding and Entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes. *FEBS Lett*, 93:229–232, 1978.
- [71] K. Hong, W. Zheng, A. Baker und D. Papahadjopoulos. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and polyethyleneglycol-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett*, 400(2):233–7, 1997.
- [72] L. Huang, A.L. Klivanov, A. Mori und X. Gao. Targeted delivery of drugs and DNA with liposomes. *J Lipos Res*, 3:505–515, 1993.
- [73] S.W. Hui, M. Langner, Y.L. Zhao, P. Ross, E. Hurley und K. Chan. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J*, 71(2):590–9, 1996.
- [74] S.E. Jones, J.D. McHugh, C. Jomary, A. Shallal und M.J. Neal. Assessment of liposomal transfection of ocular tissues in vivo. *Gene Ther*, 1 Suppl 1:S61, 1994.
- [75] Y. Kaneda, K. Iwai und T. Uchida. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem*, 264:12126–9, 1989.
- [76] Y. Kaneda, K. Kato, M. Nakanishi und T. Uchida. Introduction of plasmid DNA and nuclear protein into cells by using erythrocyte ghosts, liposomes and Sendai virus. *Meth Enzymol*, 221:317–27, 1993.
- [77] C. Kawaura, A. Noguchi, T. Furuno und M. Nakanashi. Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *FEBS Lett*, 421:69–72, 1998.
- [78] A. Kichler, W. Zauner, M. Ogris und E. Wagner. Influence of the DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA particles. *Gene Ther*, 5:855–860, 1998.
- [79] R. Kircheis, A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger und E. Wagner. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*, 4:409–18, 1997.

- [80] L. Ko, A. Koestner und W. Wechsler. Characterisation of cell cycle and biological parameters of transplantation glioma cell clones. *Acta Neuropathol*, 51:107–111, 1980.
- [81] R. Kraayenhof, G.J. Sterk und H.W. Sang. Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. *Biochemistry*, 32(38):10057–66, 1993.
- [82] E. Krauss, D. Groth, S. Armeanu, R. Curth, J. Pelisek, O. Keil, B. Höfling, R. Reszka und S. Nikol. Optimization of non-viral gene transfer into vascular smooth muscle cells in vitro. *in preparation*, 1999.
- [83] J.F. Kukowska-Latallo, A.U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D.A. Tomalia, und J.R. Baker. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4897–4902, 1996.
- [84] F. Labat-Moleur, A.M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla und J.P. Behr. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther*, 3(11):1010–7, 1996.
- [85] R.A. Lake und M.J. Owen. *Gene Transfer and Expression Protocols.*, Transfection of the Chloramphenicol-Acetyltransferase Gene into Eukaryotic cells using Diethyl-Aminoethyl (DEAE)-Dextran., Ed. Murray EJ. The Humana Press Inc. Clifton, NY, USA, 1991.
- [86] I. Lang, M. Scholz und R. Petrs. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol*, 102:1183–1190, 1986.
- [87] D.D. Lasic. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1993.
- [88] D.D. Lasic. *Liposomes: from physics to applications.*, Chemical stability of lipids: Oxidation. S. 35–37. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1993.
- [89] R.J. Lee und L. Huang. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem*, 271(14):8481–7, 1996.
- [90] R.J. Lee und L. Huang. Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carr System*, 14(2):173–206, 1997.
- [91] C. Lehmann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DOCSPER/DNA-Lipoplexen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Persönliche Mitteilung.
- [92] C. Lehmann. Untersuchungen zum Einfluß des Helferlipides auf die Liposomenformulierung mittels der Elektronenmikroskopie. Persönliche Mitteilung.

- [93] R. Leventis und J.R. Silvius. Interactions of mammalian cells with lipids dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1023:124–132, 1990.
- [94] S. Li und L. Huang. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*, 4(9):891–900, 1997.
- [95] S. Li, M.A. Rizzo, S. Bhattacharya und L. Huang. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther*, 5(7):930–7, 1998.
- [96] W.W. Liang, X. Shi, D. Deshpande, C.J. Malanga und Y. Rojanasakul. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1279:227–234, 1996.
- [97] J.P. Loeffler und J.P. Behr. Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA. *Meth Enzymol*, 217:599–618, 1993.
- [98] C.B. Lozzio und B.B. Lozzio. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*, 50:535–8, 1973.
- [99] R.H. Lyons, B.Q. Ferguson und M. Rosenberg. Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol Cell Biol*, 7:2451–2456, 1987.
- [100] R.W. Malone, P.L. Felgner und I. Verma. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:6077–6081, 1989.
- [101] R.J. Mannino und S. Gould-Fogerite. Liposome mediated gene transfer. *Bio-Techniques*, 6:682–690, 1988.
- [102] M. Marquet, N.A. Horn und J.A. Meek. Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. *Pharm*, 4:28–46, 1996.
- [103] F. Martin und T. Boulikas. The challenge of liposomes in gene therapy. *Gene Ther Mol Biol*, 1:173–214, 1998.
- [104] H. Matsui, L.G. Johnson, S.H. Randell und R.C. Boucher. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 272(2):1117–26, 1997.
- [105] L.D. Mayer und L.C.L. Tai ... *Cancer Res*, 49:5922–5930, 1989.
- [106] R.A. McMasters, R.L. Saylor, K.E. Jones, M.E. Hendrix, M.P. Moyer und R.R. Drake. Lack of Bystander Killing in Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase-Transduced Colon Cell Lines Due to Deficient Connexin43 Gap Junction Formation. *Hum Gene Ther*, 9:2253–61, 1998.
- [107] C. Meunier-Durmort, R. Picart, T. Ragot, M. Perricaudet, B. Hainque und C. Forest. Mechanism of adenovirus improvement of cationic liposome-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1330(1):8–16, 1997.

- [108] O. Meyer, D. Kirpotin, K. Hong, B. Sternberg, J.W. Park, M.C. Woodle und D. Papahadjopoulos. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem*, 273(25):15621–7, 1998.
- [109] K.A. Mislick und J.D. Baldeschwieder. Evidence for a role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:12349–12354, 1996.
- [110] W.A. Mohler, C.A. Charlon und H.M. Blau. Spectrophotometric quantitation of tissue culture cell number in any medium. *BioTechniques*, 21:260–266, 1996.
- [111] R.H. Mueller. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Rezepturen Für Pufferlösungen*. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.1996.
- [112] R.R.C. New. Liposomes a Practical Approach. Introduction. *Practical Approach Series*, S. 1–31, 1990.
- [113] C. Nicolau, A. Le-Pape, P. Soriano, F. Fargette und M. F. Juhel. In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(4):1068–1072, 1983.
- [114] B.S. Oler und E. Schenborn. Transfast Transfection Reagent Update. *Promega Notes*, 71:18–21, 1999.
- [115] A. Vaheri J.S. Pagano. *Virology*, 27:434–436, 1965.
- [116] R. Pal, W.A. Petri Jr, V. Ben-Yashar, R.R. Wagner und Y. Barenholz. Characterization of the fluorophore 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin: a probe for the head-group region of lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, 24:573–81, 1985.
- [117] B. Pitard, O. Aguerre, M. Airiau, A.M. Lachages, T. Boukhnikachvili, G. Byk, C. Dubertret, C. Herviou, D. Scherman, J.F. Mayaux und J. Crouzet. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:14412–7, 1997.
- [118] H. Potter. Application of Electroporation in Recombinant DNA Technology. *Meth Enzymol*, 217:561–583, 1993.
- [119] C. Qiu, Young M.B. De, A. Finn und D.A. Dichek. Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the fiber receptor and alpha(v)-integrins. *Hum Gene Ther*, 9(4):507–20, 1998.
- [120] J.O. Raedler, I. Koltover, T. Salditt und Safinya. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275:810–814, 1997.
- [121] J.S. Remy, A. Kichler, V. Mordvinov, F. Schuber und J.P. Behr. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(5):1744–8, 1995.

- [122] J.S. Remy, C. Sirlin, P. Vierling und J.P. Behr. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconj Chem*, 5(6):647–54, 1994.
- [123] R. Reszka, J. Zhu, F. Weber und W. Walther. Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J Liposom Res*, 5:149–167, 1995.
- [124] A.P. Rolland. From genes to gene medicines: Recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carr System*, 15:143–198, 1998.
- [125] J.K. Rose, L. Buonocore und M.A. Whitt. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*, 4:520–525, 1991.
- [126] Y. Saeki, N. Matsumoto, Y. Nakano, M. Mori, K. Awai und Y. Kaneda. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther*, 8(17):2133–41, 1997.
- [127] W.H. Gunzburg B. Salmons. *Genstransfer in Säugetierzellen*. Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg., 1997.
- [128] A. Schadendorf. Humane Melanomzelle Mewo. Persönliche Mitteilung.
- [129] M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P.H. Hofschneider. Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse cells by thymidin kinase gene. *Science*, 215:166–168, 1982.
- [130] K.P. Schifferli und V. Ciccarone. Optimization of cationic lipid reagent-mediated transfection for suspension cell lines. *Focus*, 18:45–47, 1996.
- [131] M. Schneider, R. Reszka, D. Groth und O. Keil. Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Genstransfer. *Deut Pat Applik 196.31.189.6.*, 1996.
- [132] D. Schutt, Schuhmann und R.H. Müller. Genauer durch Mehrwinkelanalyse. Teilchengrößenmessung im Submikronbereich. *Chemie-Technik*, S. 18–20, 1996.
- [133] B. Schwartz, C. Benoist, B. Abdallah, D. Scherman, J.P. Behr und B.A. Demeneix. Lipospermine-based gene transfer into the newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio. *Hum Gene Ther*, 6(12):1515–24, 1995.
- [134] M. Sioud, J.B. Natvig und O. Forre. Preformed ribozyme destroys tumour necrosis factor mRNA in human cells. *J Mol Biol*, 223:831–5, 1992.
- [135] S.J. Slater, M.B. Kelly, F.J. Taddeo, C. Ho, E. Rubin und C.D. Stubbs. The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J Biol Chem*, 269:4866–71, 1994.
- [136] J.G. Smith, R.L. Walzem und J.B. German. Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1154:327–40, 1993.

- [137] J.G. Smith, T. Wedeking, J.H. Vernachio, H. Way und R.W. Niven. Characterization and in vivo testing of a heterogeneous cationic lipid-DNA formulation. *Pharm Res*, 15(9):1356–63, 1998.
- [138] F.L. Sorgi, S. Bhattacharya und L. Huang. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 4(9):961–8, 1997.
- [139] H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*, 51:1409–16, 1973.
- [140] J.C. Stavridis, G. Deliconstantinos, M.C. Psallidopoulos, N.A. Armenakas, D.J. Hadjiminias und J. Hadjiminias. Construction of transferrin-coated liposomes for in vivo transport of exogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. *Exp Cell Res*, 164:568–72, 1986.
- [141] T. Stegmann und J.Y. Legendre. Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochim Biophys Acta*, 1325(1):71–9, 1997.
- [142] B. Sternberg, F.L. Sorgi und L. Huang. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett*, 356:361–366, 1994.
- [143] W.P. Swaney, F.L. Sorgi, A.B. Bahnson und J.A. Barranger. The effect of cationic liposome pretreatment and centrifugation on retrovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 4(12):1379–86, 1997.
- [144] K. Takeuchi, M. Ishihara, C. Kawaura, M. Noji, T. Furuno und M. Nakanishi. Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection. *FEBS Lett*, 397(2-3):207–9, 1996.
- [145] M.X. Tang, C.T. Redemann und F.C. Szoka FC Jr. In vitro gene delivery by degrades polyamidoamine dendrimers. *Bioconj Chem*, 7:703–714, 1996.
- [146] N.R. Taylor, B.E. Kaplan, P. Swiderski, H. Li und J. Rossi. Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo. *Nucleic Acids Res*, 20:4559–65, 1992.
- [147] C.B. Thomas, R. Osieka und K.W. Kohn. DNA cross-linking by in vivo treatment with 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea of sensitive and resistant human colon carcinoma xenografts in nude mice. *Cancer Res*, 38:2448–54, 1978.
- [148] J. Treat, A. Greenspan, D. Forst, J.A. Sanchez, V.J. Ferrans, L.A. Potkul, P.V. Woolley und A. Rahman. Antitumor activity of liposome encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer: phase II study. *J Nat Cancer Inst*, 82:1706–1710, 1990.
- [149] A. Vainstain, A. Razin, A. Graessmann und A. Loyter. Fusogenic reconstituted Sendai virus envelopes as a vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells. *Meth Enzymol*, 101:492–512, 1983.

- [150] I.M. Verma und N. Somia. Gene Therapy - Promises, Problems and Prospects. *Nature*, 389:239–42, 1997.
- [151] R.G. Vile, J.A. Nelson, S. Castleden, H. Chong und I.R. Hart. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res*, 54(23):6228–34, 1994.
- [152] L. Vitiello, A. Chonn, J.D. Wasserman, C. Duff und R.G. Worton. Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells. *Gene Ther*, 3(5):396–404, 1996.
- [153] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten und M.L. Birnstiel. 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 USA*, 89(17):7934–8, 1992.
- [154] J. Wagner, H. Madry und R. Reszka. In Vivo Gene Transfer: Focus on the Kidney. *Nephrol Dial Transplant*, S. 1801–1807, 1995.
- [155] R. Wattiaux, M. Jadot, M.T. Warnier-Pirotte und S. Wattiaux de Coninck. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett*, 417:99–202, 1997.
- [156] M. Westphal, M. Haesel, R. Kunzmann und F. Hoelzel. Karyotype analysis of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir*, 126:17–26, 1993.
- [157] C.J. Wheeler, L. Sukhu, G. Yang, Y. Tsai, C. Bustamente, P. Felgner, J. Norman, und M. Manthorpe. Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytofectin complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1280(1):1–11, 1996.
- [158] R. Widmaier, G.P. Wildner, G. Papsdorf und I. Graffi. A new infinite cell line, MaTu, of human mammary tumor-cells. *Arch Geschwulstforsch*, 44:1–10, 1974.
- [159] S. Wirsal. *Gentechnische Methoden*, Ausbeutebestimmung und analytische Überprüfung der DNA, S. 118–119. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. Bertam und H. G. Gassen (Hrsg), 1991.
- [160] N. Wivel. Human gene transfer trials. *Adv Drug Del Rev*, 17:211–212, 1995.
- [161] J.A. Wolff, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Ascadi, A. Jani und P.L. Felgner. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247:1465–1468, 1990.
- [162] Y. Xu und F.C. Szoka Jr. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 35:5616–5623, 1996.
- [163] J.P. Yang und L. Huang. Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. *Gene Ther*, 5(3):380–7, 1998.

- [164] K. Yang, G.L. Clifton und R.L. Hayes. Gene therapy for central nervous system injury: the use of cationic liposomes: an invited review. *J Neurotrauma*, 14(5):281–97, 1997.
- [165] N.S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell und D. McCabe. In vivo and in vitro gene transfer of mammalian somatic cells by particle bombardement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9568–9572, 1990.
- [166] Y. Yoshikawa, N. Emi, T. Kanbe, K. Yoshikawa und H. Saito. Folding and aggregation of DNA chains induced by complexation with lipospermine formation of a nucleosome-like structure and network assembly. *FEBS Lett*, 397:207–209, 1996.
- [167] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K. Poellinger und M.J. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 270:18997–19007, 1995.
- [168] O. Zelphati und F.C. Szoka Jr. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res*, 13:367–372, 1997.
- [169] O. Zelphati, C. Nguyen, M. Ferrari, J. Felgner, Y. Tsai und P.L. Felgner. Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther*, 5(9):1272–82, 1998.
- [170] X. Zhou und L. Huang. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.*, 1189(2):195–203, 1994.
- [171] J. Zhu, L. Zhang und R. Reszka. Zinc finger motif nucleocapsid protein-facilitated gene transfer with lipoplexes and polyplexes. *submitted*, 1999.
- [172] N.J. Zuidam und Y. Barenholz. Electrostatic parameters of cationic liposomes commonly used for gene delivery as determined by 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin [published erratum appears in *Biochem Biophys Acta* 1998 Jun 24;1372(1):151]. *Biochim Biophys Acta*, 1329(2):211–22, 1997.

Liste der in Zusammenhang mit dieser Arbeit erschienenen Publikationen, Patente und der publizierten Posterabstracts

Publikationen

1. Groth, D., Reszka, R. and Schenk, J.A.,(1996). PEG mediated transformation of *E. coli* is increased by room temperature incubation, *Anal Bioch* 240: 302-304.
2. Groth, D., Keil, O., Lehmann, C., Schneider, M., Rudolph, M., Reszka, R. (1998). Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *Int J Pharm* 162: 143-157.
3. Groth, D., Lehmann, C., Keil, O., Schneider, M., Reszka, R.. (1998). Preparation and characterisation of cationic liposomes for gene transfer. In J.E. Diederichs, R.H. Müller (Eds), *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, medpharm GmbH Scientific Publishers and CRC Press, Stuttgart, pp 132-139.
4. Groth, D., Keil, O., Schneider, M., Reszka, R. (1998). Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal Bioch* 258: 141-143.
5. Lehmann, C., Groth, D., Keil, O., Schneider, M., Rudolph, M. and Reszka, R., Characterization of gene transfer vesicle by electron microscopy in Diederichs, J.E., Müller, R.H. (Eds), *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, medpharm GmbH Scientific Publishers and CRC Press, Stuttgart, 1998, pp 140-145.

Patente

1. Schneider, M., Reszka, R., Groth, D., Keil, O. (1996). Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Gentransfer; *Deut Pat Applik* 196 31 189.6.
2. Groth, D., Reszka, R., (1997). Verfahren zur dualen Bestimmung von Zellvitalität und Effizienz nach Gentransfer in eukaryontische Zellen (eingereicht am 7.11.1997) *Patent Nr.* 197 50 790.

Posterabstracts (nur Erstautorschaften aufgeführt)

1. Groth, D., Keil, O., Lehmann, C., Zhu, J., Zang, L., Schneider, M. and Reszka, R. (1997). Cationic lipid-mediated gene transfer of cytokine and marker genes into rat and human glioblastoma cells. *J Mol Med* 75: B30.
2. Groth, D., Lehmann, K., Keil, O., Schneider, M. and Reszka, R. (1998). Influence of ionic strength on lipoplex formation. *J Mol Med* 76: B55.
3. Groth, D., Zhang, L., Lehmann, C., Zhu, J., Diederichs, J., E., Reszka, R., (1998). DAC-Chol liposomes as efficient vehicles for gene transfer in vitro and in vivo. *J Lipos Res* 8: 60-61.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Burghardt Wittig für die Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau. Dr. Regina Reszka möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit am MDC-Berlin-Buch, die wissenschaftlichen Anregungen und die Hilfestellung bei der Arbeit an der Promotion herzlichst danken.

Prof. Manfred Schneider und Dr. Oliver Keil vom Fachbereich Chemie der Universität Wuppertal möchte für die wirklich interessante und fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit bei der Herstellung und Untersuchung der verschiedenen kationischen Lipide auf diesem Wege von ganzem Herzen danken.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe Drug Targeting möchte ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die stets kooperative Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Jana Richter für die fachliche Unterstützung bei der Liposomenformulierung, Frau Bärbel Pohl für die Hilfe bei der Kultur und der Transfektion der Zellen. Frau Ingrid Berger danke ich für die analytische Betreuung bei der Herstellung der Liposomen und der Lipidanalyse, Frau Dr. Julia Diederichs für die hilfreichen Anmerkungen bei der Anfertigung der Dissertation und für die Ermutigungen und Hinweise bei den biophysikalischen Untersuchungen. Stefanie Seemann danke ich für die interessanten Diskussionen und Hinweise zu Fragen der DNA-Aufreinigung und Klonierung und Frau Antje Berndt sowie Herrn Oliver Braun für die tierexperimentellen Hinweise und Kommentare.

Ausdrücklich danken möchte ich auch Frau Sinaida Rink für die abschließende Korrektur der Arbeit und Herrn Felix Engel für die Hilfe bei der Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen. Herrn Dr. Reiner Zeisig danke ich für die Hilfestellungen bei der Durchführung der PCS-Messungen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Frau, Julia Stoy, deren große Geduld und Hilfe eine unerläßliche Voraussetzung für die Erstellung der Arbeit gewesen sind.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name	Detlef Groth
geb.	26. 06. 1965 in Berlin-Weissensee
wohnhaft in	Neue Scheune 5, 14548 Ferch
Beruf	Dipl. Biochemiker und Chemielaborant
Familienstand	ledig
Lebenspartnerin	seit 1992 Dr. Julia Stoy, tätig als Ärztin
Kinder	Paul Stoy, geb. 24.01.1997

Schulbildung

1972-1982	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Berlin-Weißensee
1982	Abschluß der 10. Klasse mit dem Prädikat „mit Auszeichnung“

Beruf

1982-1985	Absolvierung der Berufsausbildung zum Chemielaboranten mit Abitur an der Berufsschule des VEB-Berlin-Chemie in Berlin-Treptow
Reifeprüfung	abgelegt 1985 mit dem Prädikat „sehr gut“
Facharbeiterprüfg.	abgelegt 1985 mit dem Prädikat „gut“
1985-1989	Wehrdienst bei der NVA

Studium

1989-1994	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin, Fachbereich Biochemie
1992-1993	Tätigkeit als Tutor im Fachbereich Ökologie der Humboldt-Universität zu Berlin
1993-1994	Anfertigung und Verteidigung der Diplomarbeit zum Thema : „Einfluß des Nef-Proteins von HIV auf die Stimulierung des Haupt-HCMV-Promotors durch Cytokine“ am Institut für Medizinische Virologie der Charite, Berlin
1994	Diplomprüfung mit dem Prädikat „gut“ bestanden

Beruf

- 1.1.95-30.6.95 Tätigkeit als Gastwissenschaftler in der Arbeitsgruppe Drug Targeting am Max-Delbrück-Centrum (MDC) in Berlin-Buch
- 1.7.95-30.6.98 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Drug Targeting am MDC im Rahmen des DFG geförderten Sonderforschungsbereiches 507: „Die Bedeutung nichtneuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen“
- 1.7.98-30.10.99 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Drug Targeting“ am MDC im Rahmen des von der Fa.Schering geförderten Forschungsvorhabens „Liposomale in vivo Gentherapie des malignen Glioblastoms mit dem HSVtk-Gen-Ganciclovir System“
- 1.11.99 -15.8.2000 Weiterbildung am Institut für Managementberatung GmbH Potsdam zum IT-Consultant durch die Firma Future Information Systems GmbH
- seit 16.8.2000 Tätigkeit als Programmierer bei der Firma Mediacs AG in Potsdam-Babelsberg