

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-

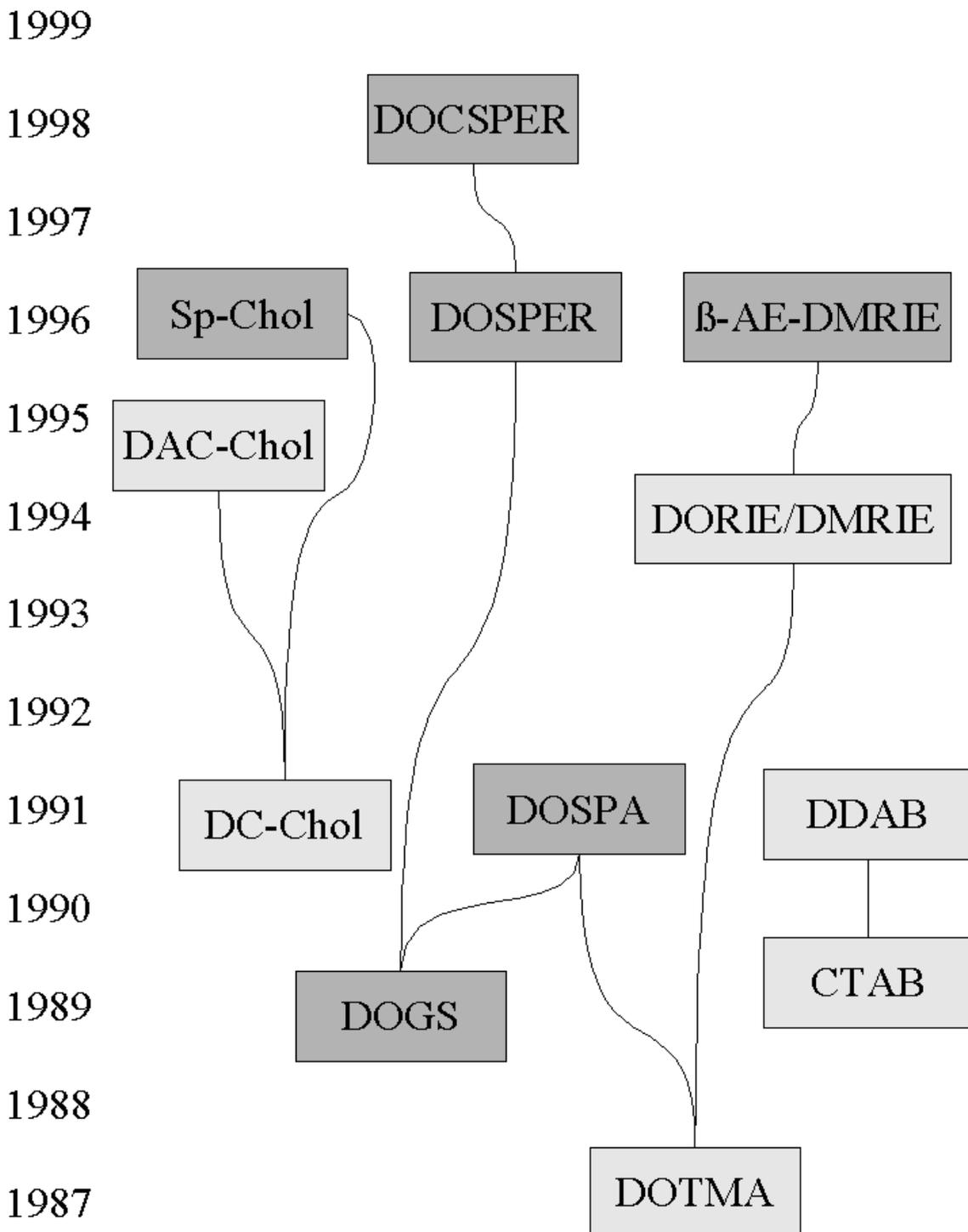


Abbildung 4.1: Entwicklungslinien kationischer Lipide

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-

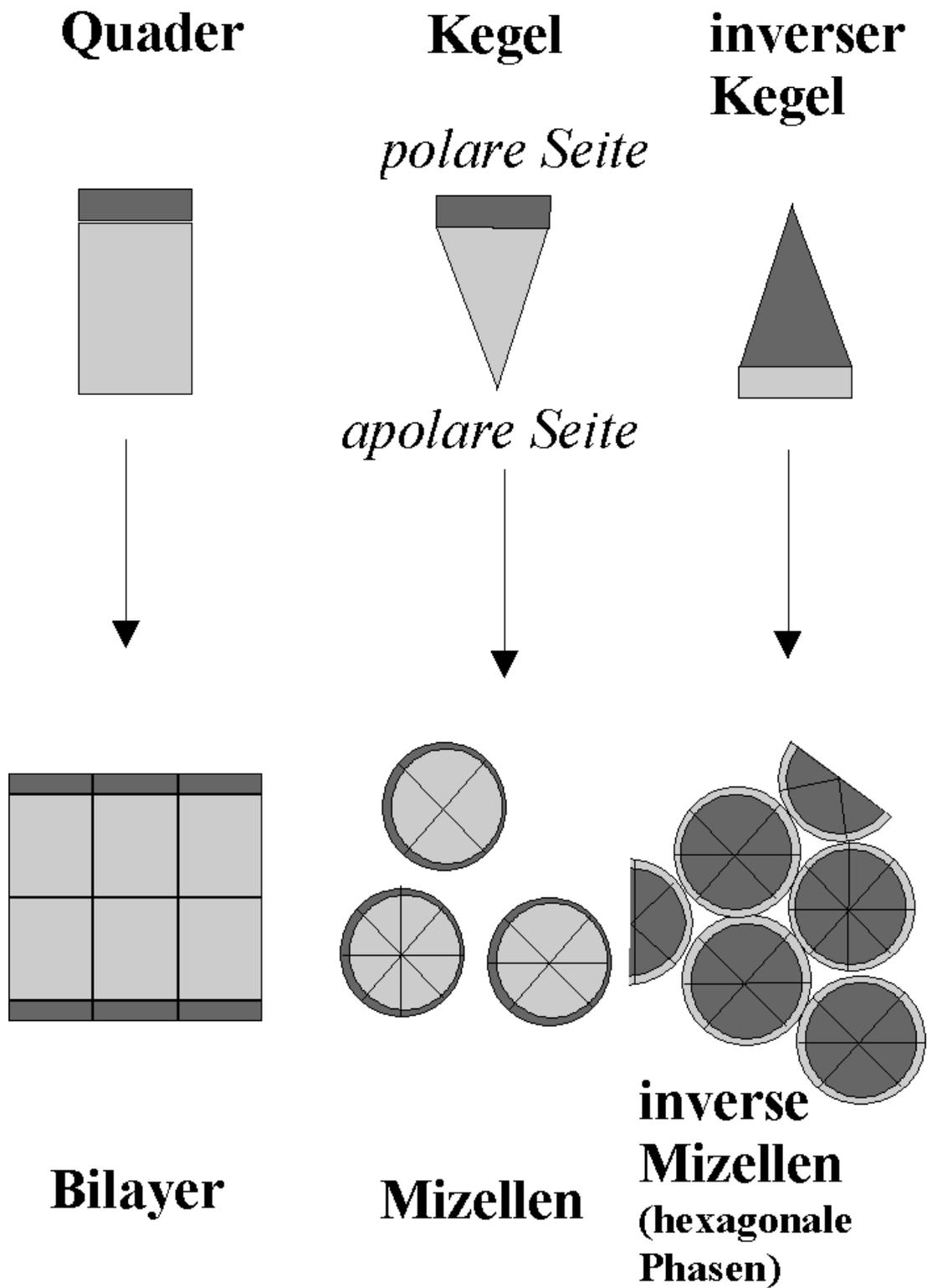


Abbildung 4.2: Anordnungsmuster von Amphiphilen

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 DMRIE (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.

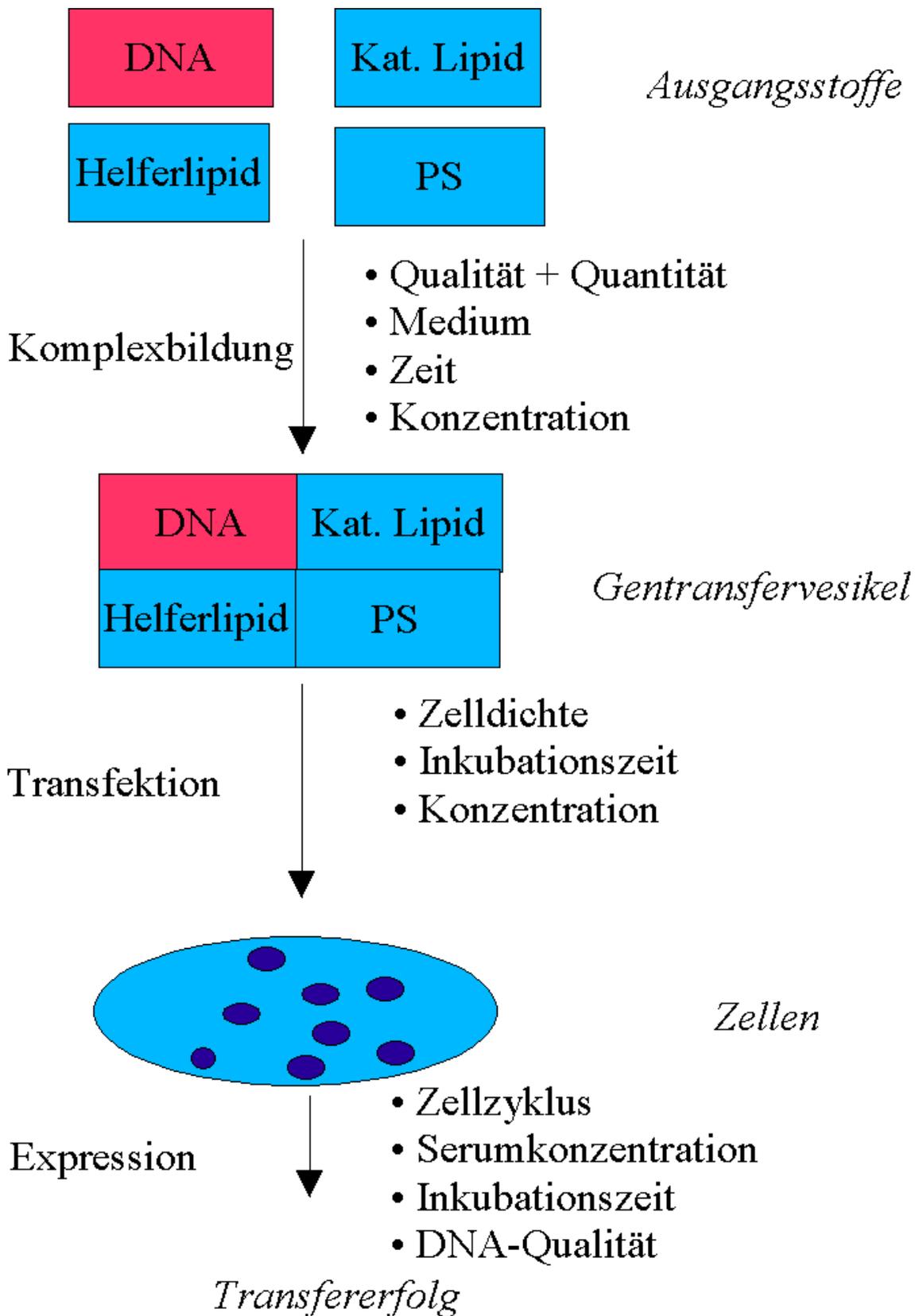


Abbildung 4.3: Einflußfaktoren auf Komplexbildung, Transfektion und Expression

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 (LipofectAMINE™) 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. 88). 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.

