

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 Gentransfervektikel. 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).

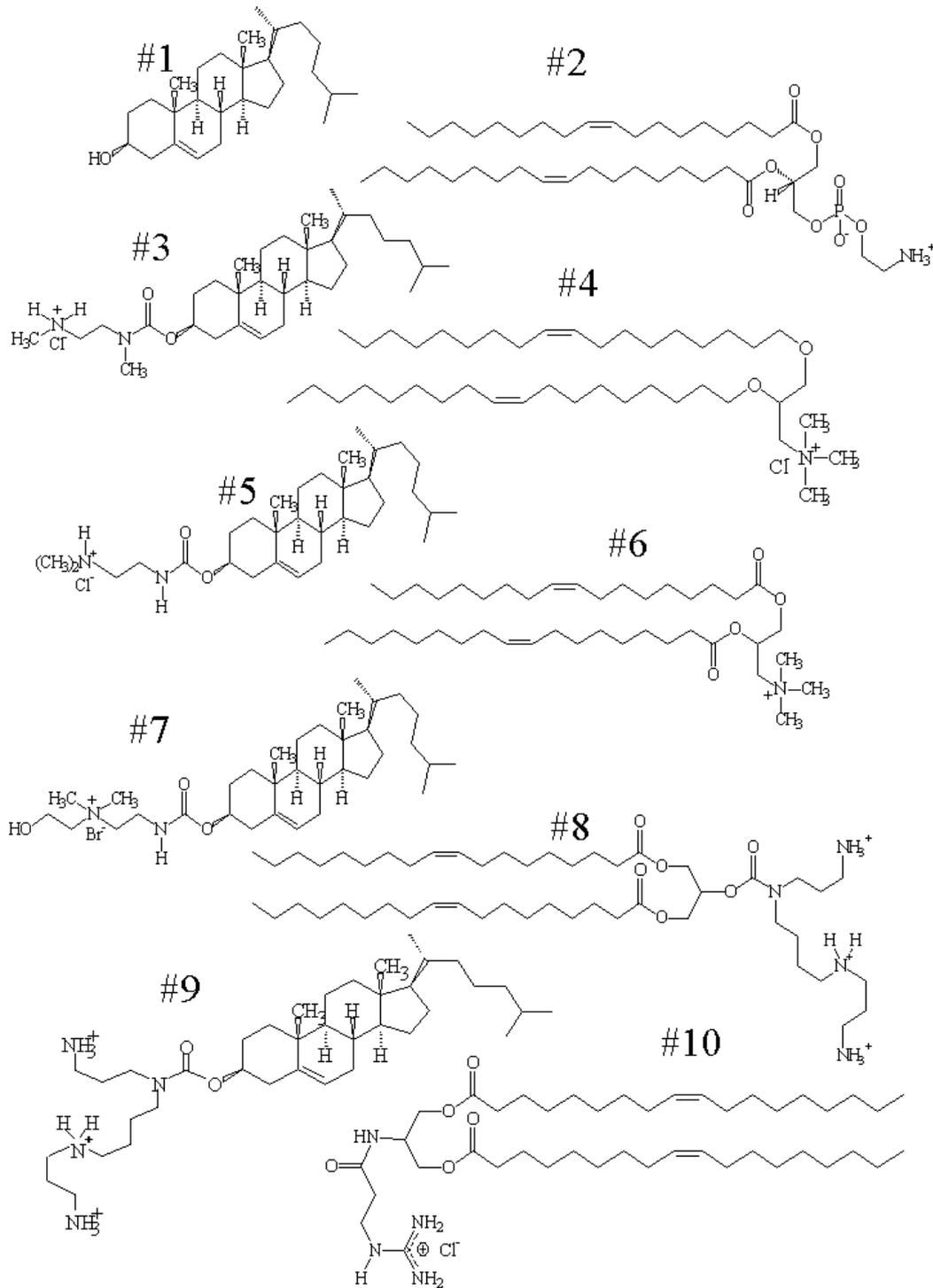


Abbildung 1.1: **Struktur verschiedener kationischer und neutraler Lipide**

#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 Strukturanalogon 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.

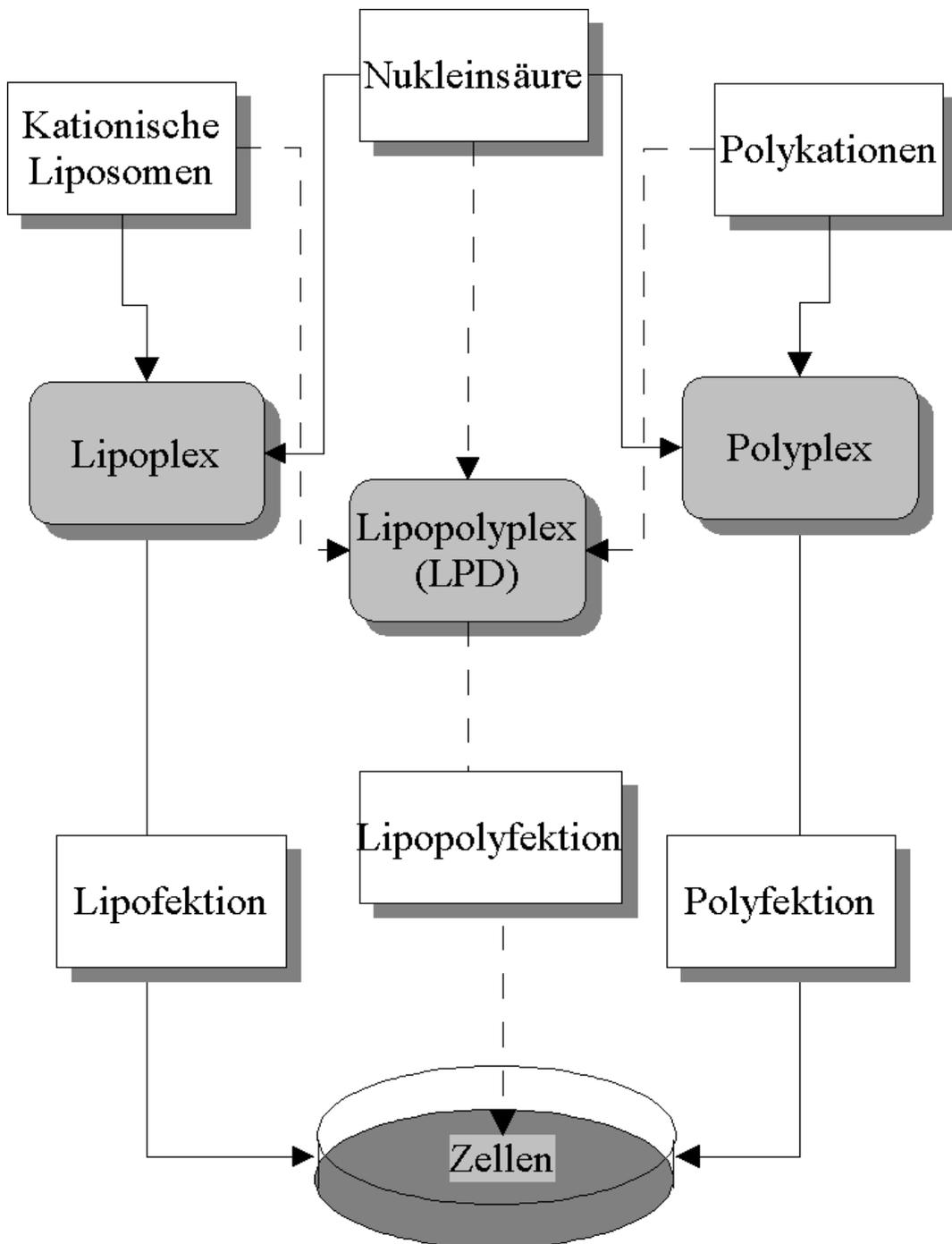


Abbildung 1.2: Herstellung und Bezeichnung der in der Arbeit beschriebenen Gentransfervesikel

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 Cholesterolanter. 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

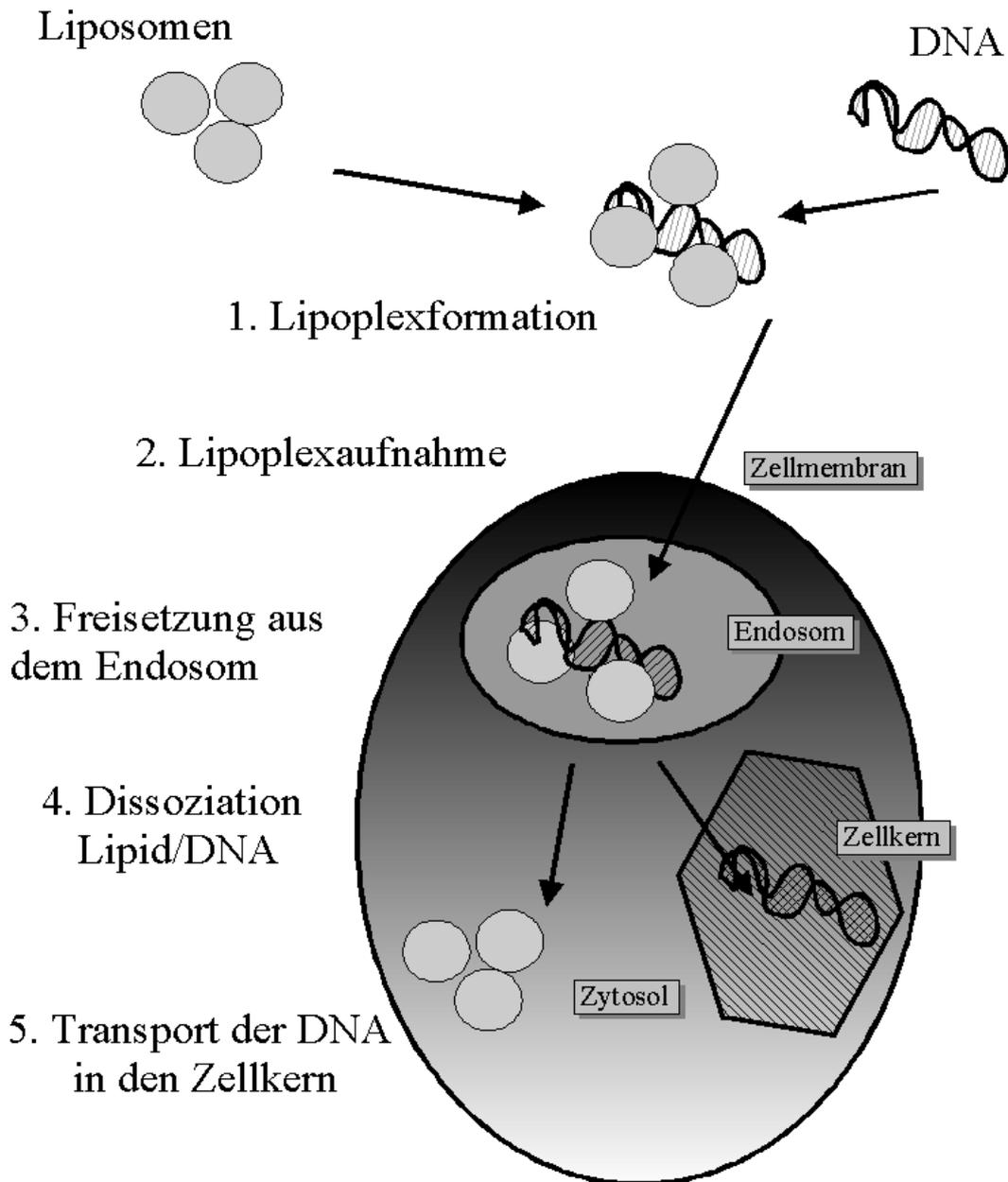


Abbildung 1.3: Postulierter Mechanismus des Gentransfers mit Lipoplexen

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.