

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

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

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

3.2 Transfektionsergebnisse

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

3.2.1 Gentransfereigenschaften verschiedener kationischer Lipide

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

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

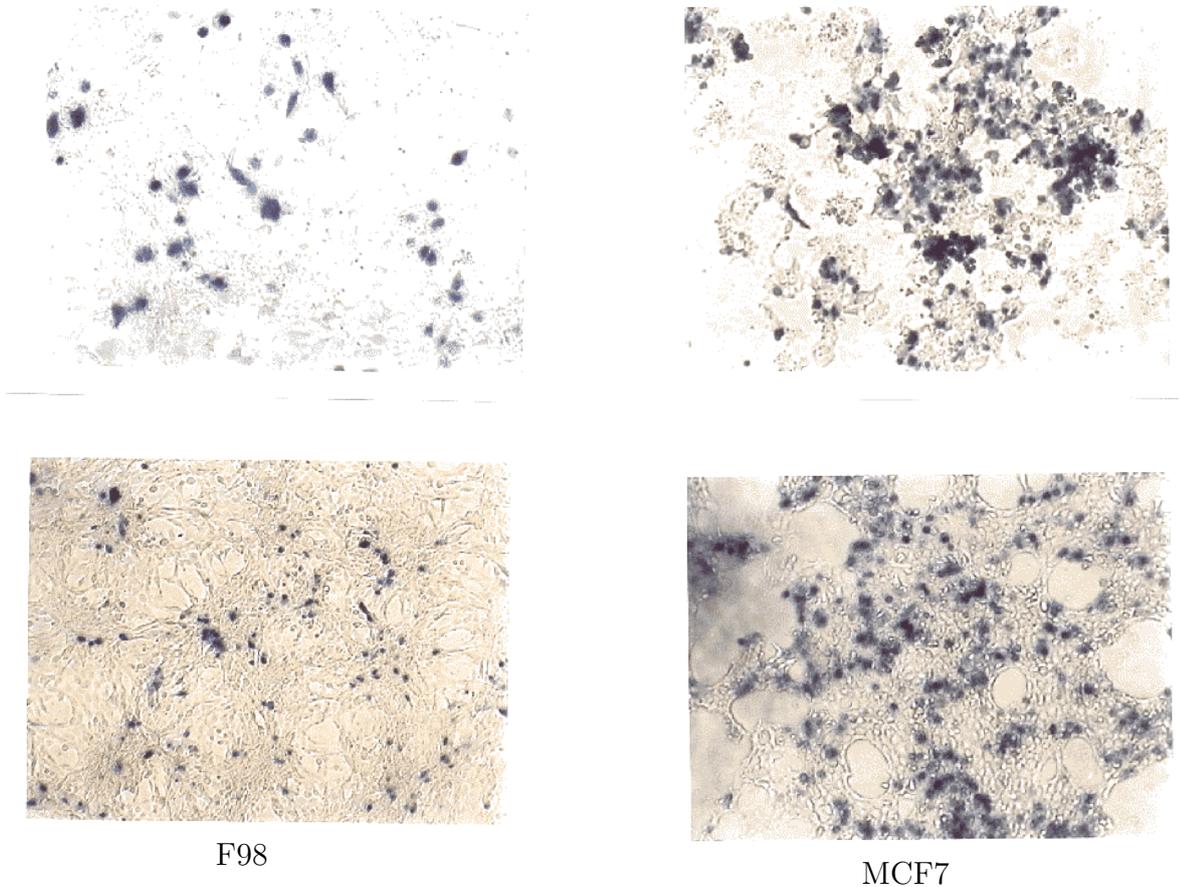


Abbildung 3.6: **X-Gal-Färbung von F98 und MCF7-Zellen nach Transfektion mit DAC-Chol-Liposomen und pUT651-Plasmid-DNA.**

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

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

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

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

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

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

MCF7 > MaTu > F98 > N64 > CC531.

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

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

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

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

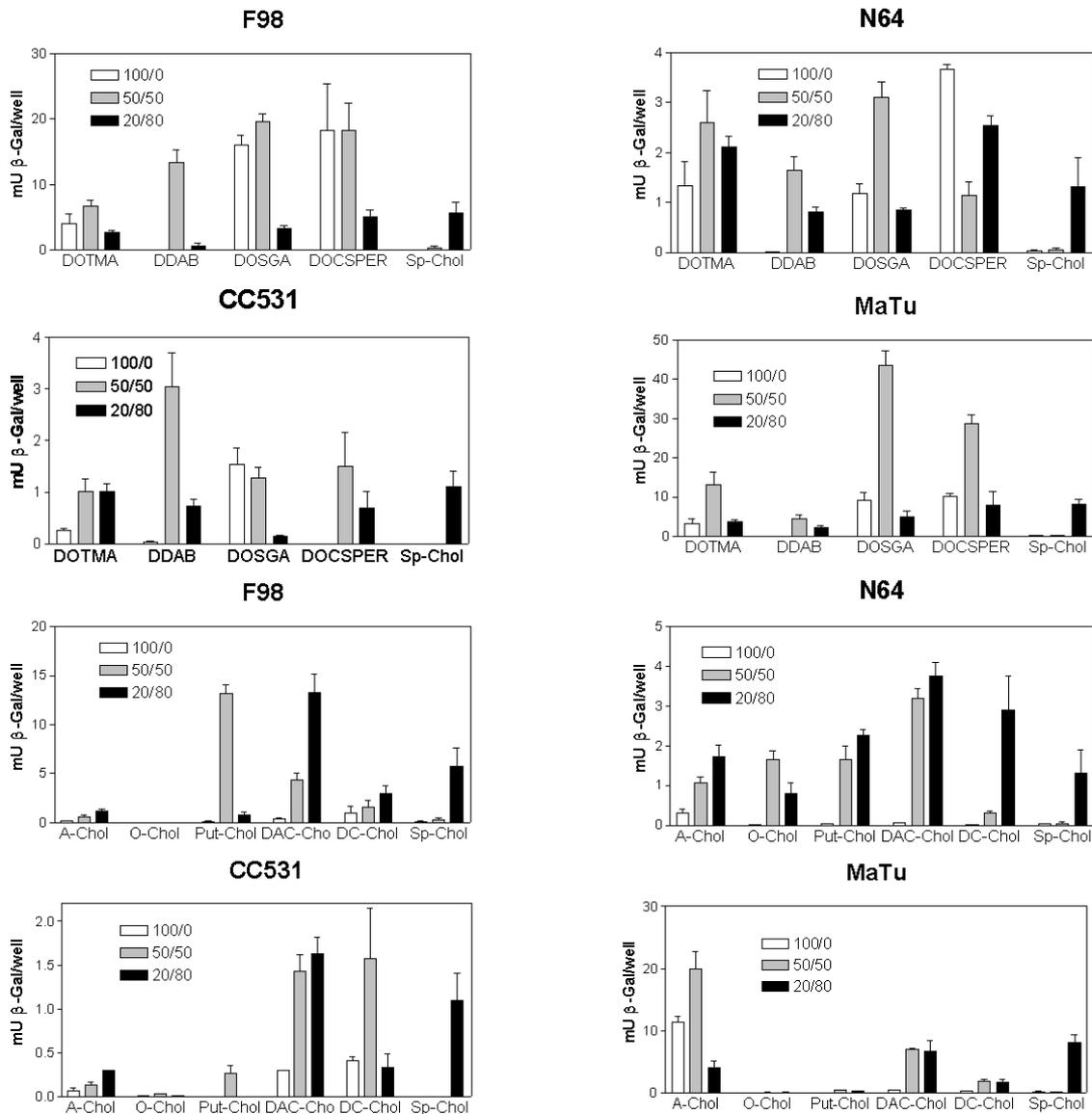


Abbildung 3.7: Einfluß der chemischen Struktur und des Anteils an Helferlipid auf die Gentransfereigenschaften von verschiedenen kationischen Lipiden.

Verschiedene Mengen an kationischen Liposomen (10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 und 0,3 μg) wurden mit verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA pUT651 (1, 0,33 oder 0,1 μg) komplexiert. Mit den Lipoplexen wurden F98, CC531, N64 und MaTu-Zellen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Das Mischungsverhältnis von kationischem Lipid zu Helferlipid betrug jeweils 100:0, 50:50 oder 20:80 (w/w). Angegeben sind jeweils die 3 maximalen β -Gal-Expressionswerte (\pm SEM).

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

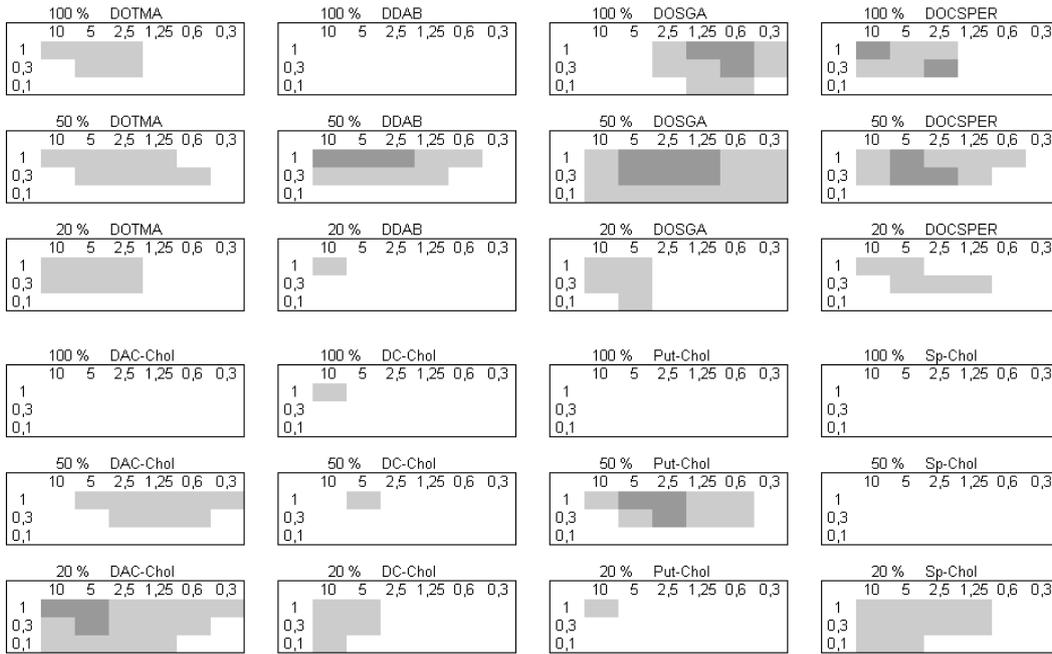
3.2.2 Einfluß des Helferlipides auf die Gentransferrate

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

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

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

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



A: F98-Zellen



B: MaTu-Zellen

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

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

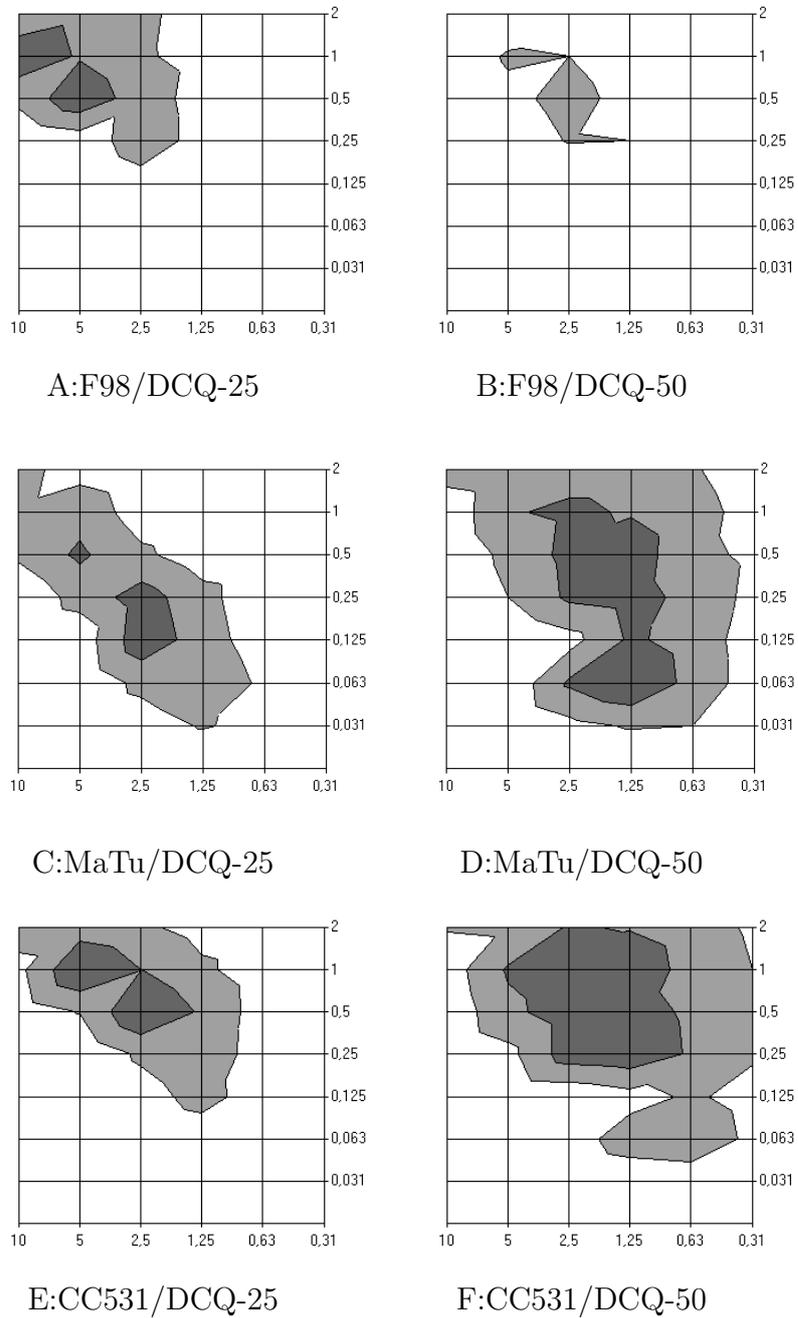


Abbildung 3.9: **Einfluß des Helferlipides auf die Transfektion mit DCQ-Chol-Liposomen**

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

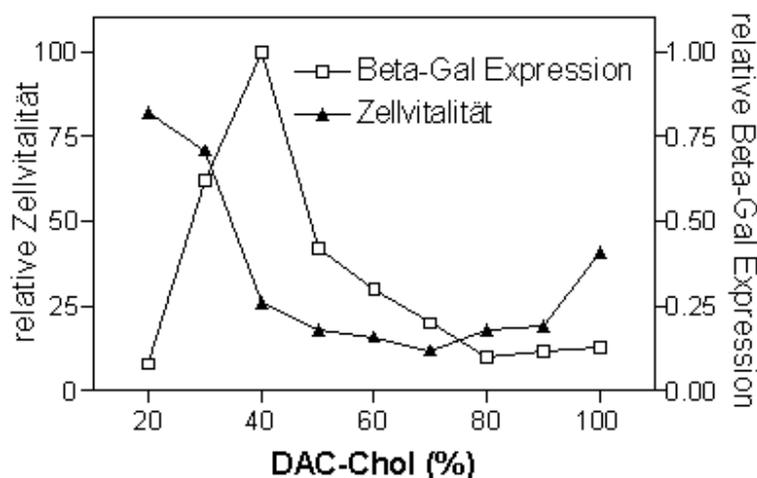


Abbildung 3.10: **Einfluß des Anteils DOPE-Anteils auf die Transfektion von F98-Zellen mit DAC-Chol-Liposomen.**

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

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

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

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

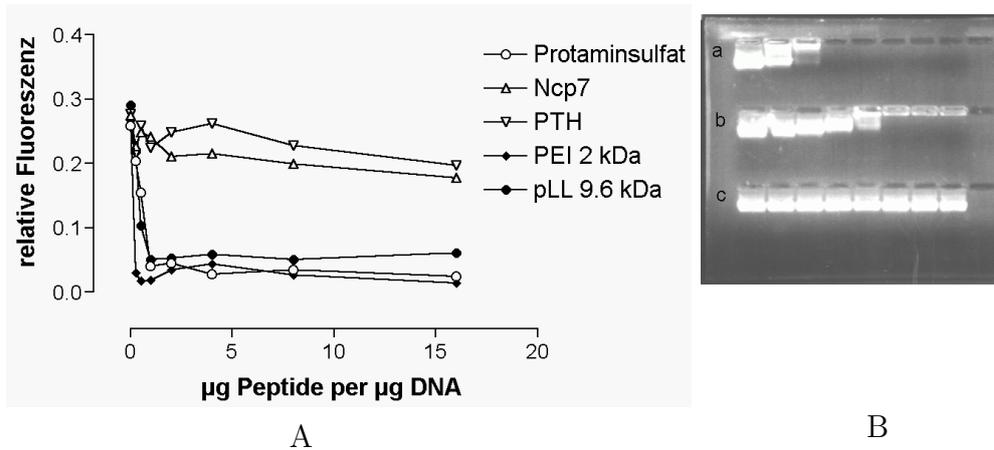


Abbildung 3.11: **Einfluß verschiedener Peptide auf die Fluoreszenz von DNA/EtBr-Komplexen bzw. auf die DNA-Mobilität im Agarose-Gel.**

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

A: Ergebnisse der EtBr-Fluoreszenzuntersuchungen

B: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese

a) Protaminsulfat/pUT651

b) Ncp7/pUT651

c) PTH/pUT651

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

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

3.2.3 Steigerung der Genexpression mit Hilfe kationischer Polymere

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

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

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

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

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

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

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

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

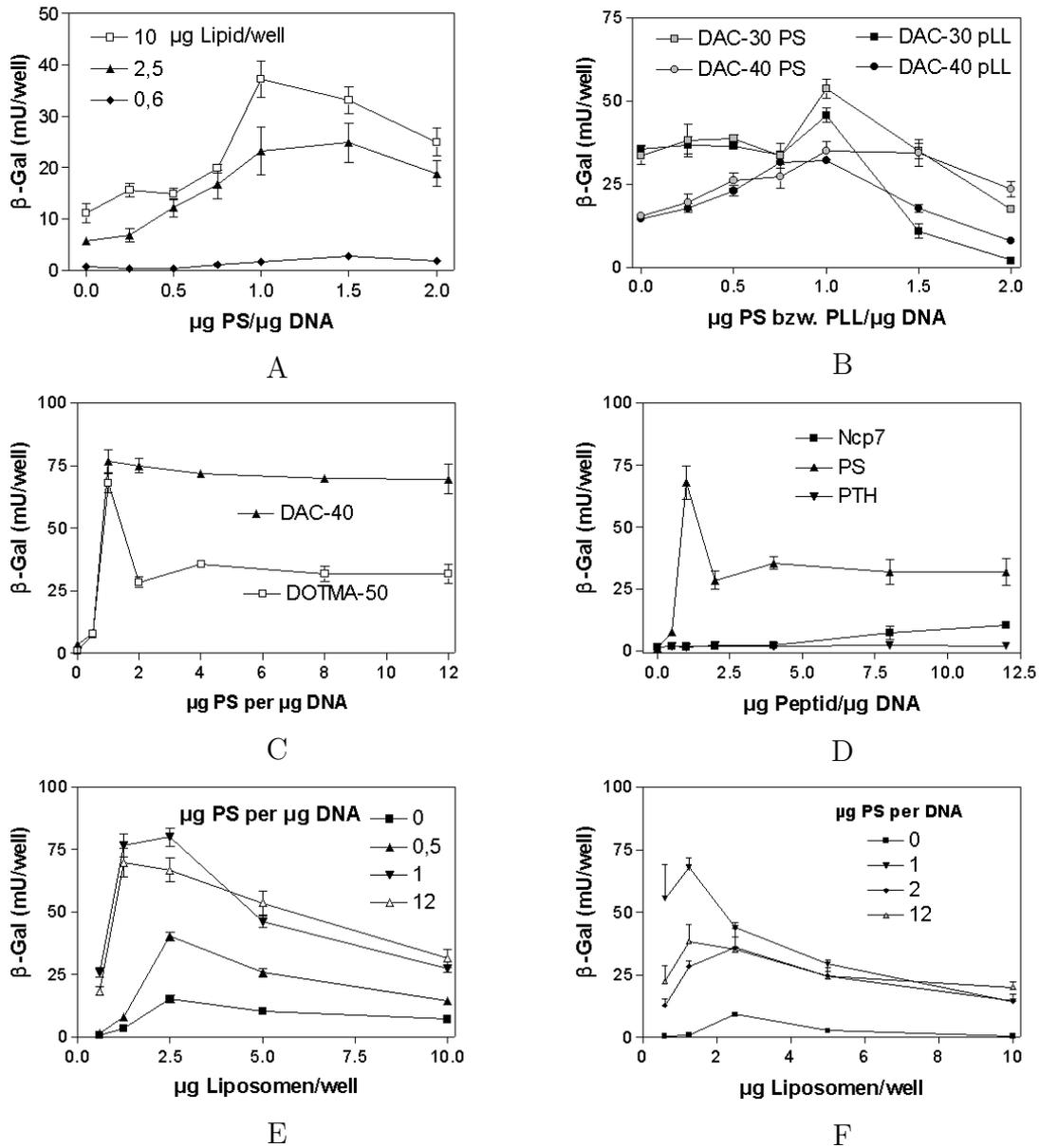


Abbildung 3.12: Einfluß von PS und PLL auf die Transfektion von F98- und N64-Zellen mit DAC-Chol- und DOTMA-Liposomen.

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

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

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

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

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

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

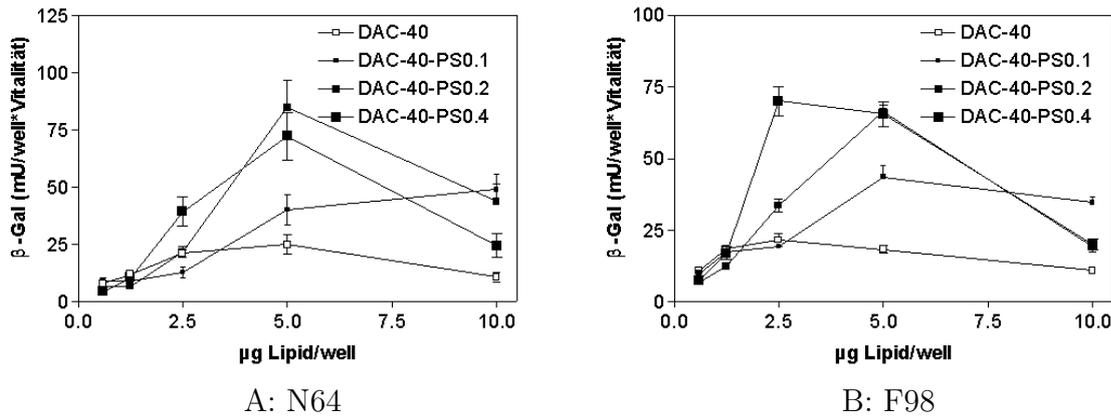


Abbildung 3.13: **Transfektion mit DAC-40/PS-Formulierungen**

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

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

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

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

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

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

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

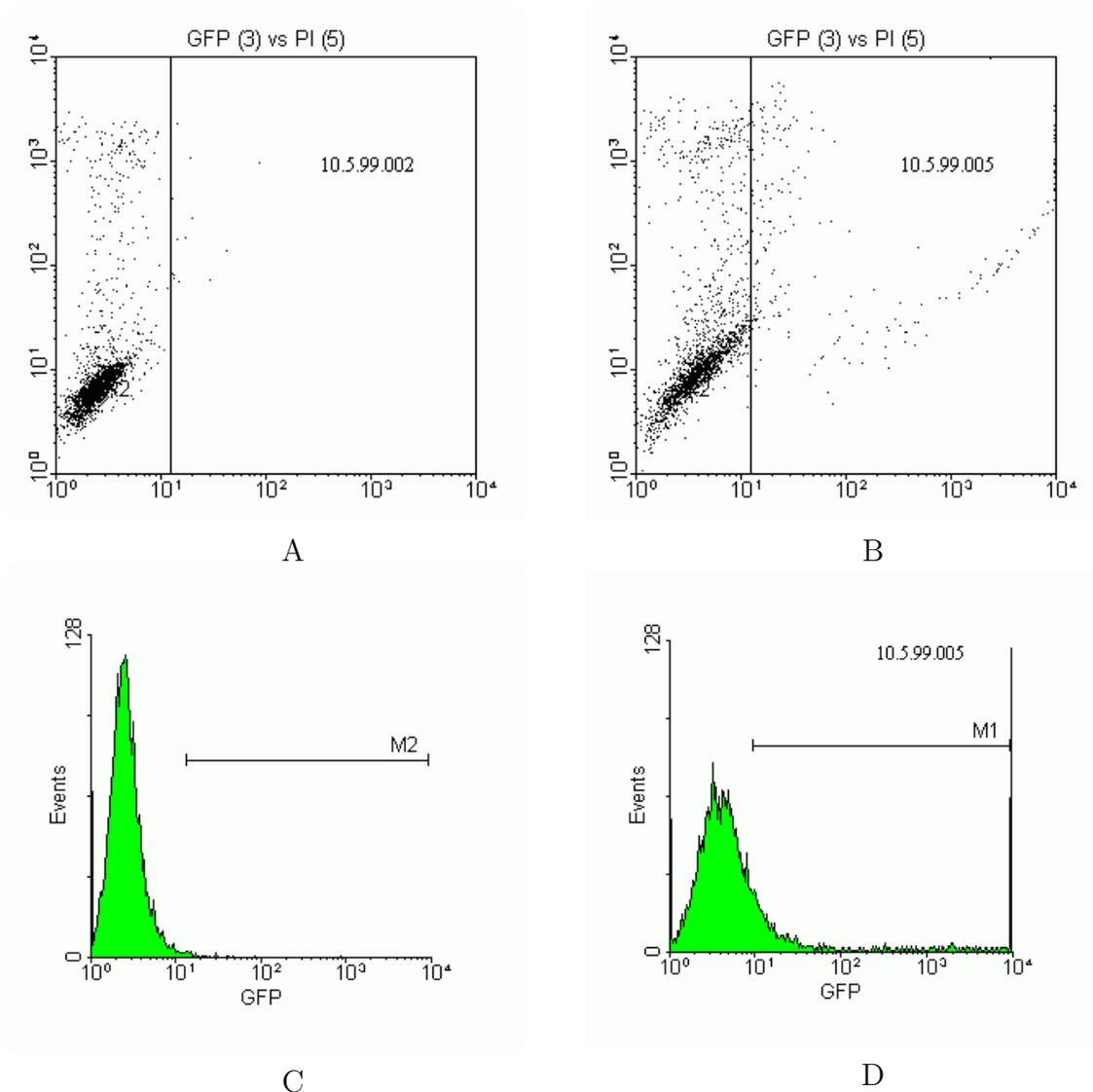


Abbildung 3.14: **FACS-Analyse von GFP-transfizierten K562-Zellen**

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

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

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

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

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

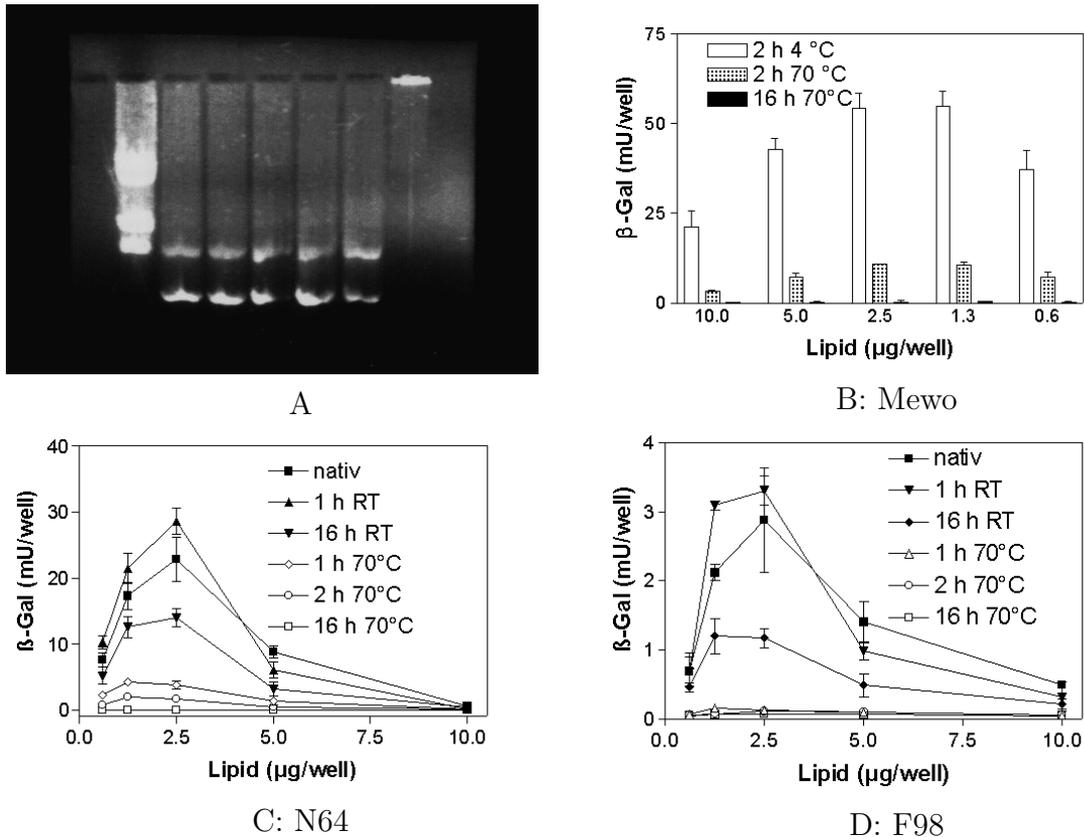


Abbildung 3.15: Einfluß der DNA-Qualität auf die Reporterexpression

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

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

Bahn 1: Marker λ-DNA Hind-III-verdaut

Bahn 2: Plasmid-DNA pUT651 nativ

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.4 Einfluß der Qualität der Plasmid-DNA

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

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

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

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

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

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

3.2.5 Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses

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

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

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