

# **Experimentelle Gentherapie bei malignen Tumoren des Zentralnervensystems**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Sandra Koch**

geb. am: 31.07.1973 in Aschersleben (Sachsen/Anhalt)

Gutachter:

1. PD Dr. Nikolai G. Rainov, University of Liverpool, Dept. of Neurological Science
2. Prof. Dr. Rainer Rudolph, Institut für Biotechnologie, MLU Halle
3. Prof. Dr. Thomas Braun, Institut für Physiologische Chemie, MLU Halle

Die Arbeit wurde im Rahmen eines ordentlichen Promotionsverfahrens am 25. September 2002 öffentlich verteidigt.

**urn:nbn:de:gbv:3-000003950**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003950>]

# PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert und präsentiert:

## Originalpublikationen

**Koch, S.**, POHL, P., COBET, U., UND RAINOV, N. G. 2000. Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, 897-903.

RAINOV, N. G., **Koch, S.**, SENA-ESTEVEZ, M., UND BERENS, M. E. 2000. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 607-613.

SCHWINGER, S., **Koch, S.**, JAHNZ, U., WITTLICH, P., RAINOV, N. G., UND KRESSLER, J. 2002. High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter device. *J. Microencapsul.* **19**, 273-280.

## Eingereichte Publikationen

**Koch, S.**, SCHWINGER, C., KRESSLER, J., UND RAINOV, N. G. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells - comparison of production devices, methods, and microcapsule characteristics. (*J. Microencapsul.*)

## Abstracts

**KOCH, S.**, POHL, P., COBET, U., UND RAINOV, N. G. Ultrasound-mediated enhancement of liposomal transfection in cell culture is caused by cavitation effects. 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy, Washington, DC, 9.-13.6.1999, Suppl. - 551.

RAINOV, N. G., **KOCH, S.**, QUINONES, A., UND KRAMM, C. M. Strategies for *in vivo* delivery of virus and non-virus vectors in experimental brain tumor gene therapy. *J. Gene Med.* **1**, Suppl. (1999) – 53 (abstr. #175).

RAINOV, N. G., **KOCH, S.**, UND BERENS, M. E. Characterization of a canine glioma cell line as related to experimental brain tumor gene therapy. *Zentralbl. Neurochir.* **61**, Suppl. 1 (2000) – 41.

**KOCH, S.**, UND RAINOV, N. G. Characterization of liposome-mediated transfection efficiency of glioma cell lines in culture. *Zentralbl. Neurochir.* **61**, Suppl. 1 (2000) – 42.

**KOCH, S.**, SCHWINGER, C., KRESSLER, J., UND RAINOV, N. G. Immunoprotective encapsulation of retrovirus vector producer cells for use in gene therapy of brain tumors. *Zentralbl. Neurochir.* **61**, Suppl. 1 (2000) – 43.

SCHWINGER, C., KRESSLER, J., **KOCH, S.**, RAINOV, N. G., UND CLEMENZ, A. Strategies for encapsulation of living cells with polymeric systems - microencapsulation. *Proc. Am. Chem. Soc.*, PMSE **84**, 221<sup>st</sup> ACS National Meeting, S. Diego, CA, 1.-5.4.2001.

Für die Erkenntnis gibt es keine endgültigen Ziele, sondern der Fortschritt der Erkenntnis ist nichts als eine Differenzierung der Fragestellungen.

Hermann Hesse,  
Gesammelte Briefe 1936-1949

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	<b>Einleitung und Zielstellung</b> .....	1
1.1.	<b>Einleitung</b> .....	1
1.2.	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	1
1.3.	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	2
1.3.1.	Nichtviraler Gentransfer mittels Liposomen.....	2
1.3.2.	Ultraschall.....	4
1.3.3.	APA-Mikroenkapselung.....	5
1.3.4.	Retrovirale Verpackungszellen.....	8
1.3.4.1.	Retrovirale Vektoren.....	8
1.3.4.2.	Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase.....	8
2.	<b>Material und Methoden</b> .....	10
2.1.	<b>Pro- und eukaryontische Organismen und Vektoren</b> .....	10
2.1.1.	Bakterien und Vektoren.....	10
2.1.2.	Maligne Gliomzellen und Fibroblasten.....	11
2.2.	<b>Kultivierungsbedingungen</b> .....	12
2.2.1.	Nährmedien, Seren, Antibiotika und Fluorochrome.....	12
2.2.2.	Zellanzucht.....	14
2.2.2.1.	Zellanzucht von Bakterien.....	14
2.2.2.2.	Zellanzucht von eukaryontischen Zellkulturen.....	14
2.2.3.	Stammhaltung und Kultivierung.....	15
2.2.3.1.	Stammhaltung von Bakterien.....	15
2.2.3.2.	Kultivierung von Gliomzellen, Fibroblasten und immobilisierten Zellen.....	15
2.3.	<b>Molekulargenetische Standardtechniken</b> .....	16
2.3.1.	Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	16
2.3.2.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	16
2.3.2.1.	Präparative Plasmidisolierung mit dem JETstar-Maxiprep-Kit.....	16
2.3.3.	DNA-Techniken.....	17
2.3.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.3.3.2.	DNA-Größenstandard.....	18

2.3.3.3.	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	19
2.3.3.4.	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	19
2.3.3.5.	Dialyse von DNA.....	20
2.4.	<b>Techniken für das Arbeiten mit Liposomen.....</b>	<b>20</b>
2.4.1.	Synthetisierung von Liposomen mit dem Mini Lipoprep® Dialyser.....	20
2.4.2.	Größenbestimmung der Liposomen mittels Streulichtanalyse.....	24
2.4.3.	Rasterkraftmikroskopie (RKM).....	24
2.4.4.	Liposomale Transfektionen von Gliomzellkulturen.....	25
2.4.4.1.	Lipoplexbildung.....	25
2.4.4.2.	Transiente Transfektion mit Liposomen.....	26
2.4.4.3.	Ultraschallstudien und Anwendung von Ultraschall-Kontrastmittel.....	26
2.4.5.	Quantifizierung der Markergenexpression.....	27
2.5.	<b>Einkapselung von eukaryontischen Zellen.....</b>	<b>28</b>
2.5.1.	Materialien.....	28
2.5.2.	Bestimmung der Zytotoxizität der Alginate.....	29
2.5.3.	Einkapselung und Kapselmodifizierung.....	29
2.5.3.1.	Zellernte.....	29
2.5.3.2.	<i>Vibrating nozzle</i> -Methode.....	30
2.5.3.3.	<i>AirJet</i> -Methode.....	31
2.5.3.4.	<i>JetCutter</i> -Methode.....	31
2.5.3.5.	Analyse der Mikrokapseln.....	32
2.5.4.	Viabilität der eingekapselten Zellen.....	32
2.5.5.	Virustitrierung.....	33
2.5.5.1.	Herstellung der Überstände von eingekapselten, Retrovirus-Vektor produzierenden Zellen.....	33
2.5.5.2.	Behandlung der Zellen mit Ganciclovir.....	33
2.5.5.3.	Zytotoxizitätsbestimmung mit Hilfe des MTT-Test.....	33
2.6.	<b>Anwendung der Kapselvektoren im intrakraniellen Tiermodell.....</b>	<b>34</b>
2.6.1.	Intrakranielles Tiermodell.....	34
2.6.2.	Paraffineinbettung für histologische Auswertungen.....	35
2.7.	<b>Molekularbiologische Reagenzien, Chemikalien und Materialien... 36</b>	
3.	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>

3.1.	Größenbestimmung der synthetisierten Liposomen mittels Streulicht-analyse.....	38
3.2.	Liposomale Transfektionsraten in Zellkultur.....	40
3.3.	Transfektionsraten in Abhängigkeit von Liposomengrößen.....	45
3.4.	Ultraschallstudien.....	46
3.5.	Einkapselung von eukaryontischen Zellen - Zellimmobilisierung.....	49
3.5.1.	Alginatezytotoxizität.....	50
3.5.2.	<i>Vibrating nozzle</i> -Methode.....	50
3.5.2.1.	Kapselherstellung und Größenverteilung.....	50
3.5.2.2.	Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen.....	55
3.5.3.	<i>AirJet</i> -Methode.....	59
3.5.3.1.	Kapselherstellung und Größenverteilung.....	59
3.5.3.2.	Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen.....	62
3.5.4.	<i>JetCutter</i> -Methode.....	64
3.5.4.1.	Kapselherstellung und Größenverteilung.....	64
3.5.4.2.	Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen.....	66
3.5.5.	Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-Gentherapie-system.....	68
3.5.6.	Intrakranielles Tiermodell.....	70
4.	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>
4.1.	Kationische Liposomen.....	72
4.1.1.	Allgemeines zu kationischen Liposomen.....	72
4.1.2.	Liposomenstruktur und chemische Zusammensetzung.....	73
4.1.3.	Lipoplex-Transfektionen in Zellkultur.....	73
4.1.4.	Serumeinfluss auf Transfektionen <i>in vitro</i> .....	74
4.1.5.	Abhängigkeit zwischen Liposomengrößen und Gentransfereffizienzen.....	75
4.2.	Ultraschallstudien.....	76
4.2.1.	Allgemeines zum Ultraschall.....	77
4.2.2.	Ultraschallstudien und Kontrastmittel.....	78
4.3.	Vergleich der APA-Mikroverkapselungsmethoden.....	80
4.4.	Anwendung retroviraler Verpackungszellen in der Zellimmobilisierung.....	87

---

4.4.1.	Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-Toxizität mikroverkapselter Mausfibroblasten.....	87
4.5.	APA-Mikrokapseln im Rattengliommodell.....	90
5.	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>92</b>
6.	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
7.	<b>Anhang.....</b>	<b>119</b>
7.1.	Abkürzungen und Erklärung von Fachbegriffen.....	119
	Danksagung.....	123
	Lebenslauf.....	124
	Erklärung.....	126



# 1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

## 1.1. EINLEITUNG

Die malignen Gliome sind invasive und biologisch heterogene Neoplasmen des Zentralnervensystems (ZNS) mit erheblicher Entdifferenzierung ihrer zellulären Bestandteile. Trotz multimodaler klinischer Therapie und kombinierter Behandlungsstrategien, die ihre Grenzen erreicht haben und nicht mehr wesentlich verbesserungsfähig zu sein scheinen, sind diese Tumoren immer von einem tödlichen Ausgang für die betroffenen Patienten gekennzeichnet (MAHALEY *et al.*, 1989). Aufgrund der schlechten Prognose wird zur Zeit nach neuen Behandlungsstrategien gesucht, welche individuelle biologische Merkmale dieser malignen Gliome besser berücksichtigen und eine klinisch relevante Verlängerung der Überlebenszeit dieser Patienten ohne wesentliche Verschlechterung der Lebensqualität erlauben. Neben den drei Standardtherapien, wie chirurgische Resektion, Radiotherapie und bei einigen Patienten Chemotherapie, stellt die Gentherapie eine innovative experimentelle Strategie zur Behandlung von malignen Gliomen dar. Da bisherige Studien zum Gentransfer *in vivo* eine eher niedrige Effizienz gezeigt haben (ANDERSON, 1998), ist es in diesem Rahmen ein sehr wichtiges Ziel, neue Vektoren zu entwickeln bzw. bestehende Systeme für die Gentherapie weiter zu optimieren. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Entwicklung und Optimierung physikalischer Gentransfermethoden und Vektoren zum Einsatz bei Tumoren des Zentralnervensystems dar.

## 1.2. ZIELE DER ARBEIT

Das vorliegende Projekt war auf die Entwicklung und Charakterisierung innovativer Strategien zur Behandlung maligner Gliome des ZNS ausgerichtet.

Das erste wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Transduktionseffizienz von Liposomen, die aus einem kationischen und einem neutralen Lipid eigens synthetisiert wurden, zu untersuchen und die Effizienz des Gentransfers dieser Liposomen in Kultur von Hirntumorzellen mit Hilfe der Expression des Markergens *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) zu quantifizieren und zu optimieren. Zusätzlich sollte dieses Projekt die Kenntnisse über die Methode des Ultraschall-(US)-verstärkten, Lipoplex vermittelten Gentransfers hinsichtlich therapeutischer Anwendung in Zellkultur erweitern, zu Aussagen über Vor- und Nachteile führen und die augmentative US-Anwendung für die *in vivo*-

Hirntumorthherapie etablieren. Da gepulster 2 MHz-US den Schädel durchdringt, wurde im Folgenden der Effekt von Kontrastmittel auf die Transfektionseffizienz und die Viabilität der Hirntumorzellen getestet und charakterisiert.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Säugerzellen mit Alginat in Alginat-poly-L-Lysin-Alginat(APA)-Mikrokapseln zu immobilisieren, um diese hinsichtlich ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften, wie Perlenformation, Alginatbeschichtung, mechanische Stabilität der APA-Mikrokapseln sowie Wachstum und Langzeitüberleben von normalen, Tumor- (neoplastischen) und transgenen (gentechnisch veränderten) Zellen in definierten Mikrokapselgrößen (Durchmesser <300 µm) unter Anwendung verschiedener Einkapselungsmethoden in Zellkultur zu testen, zu evaluieren und zu optimieren. Des Weiteren sollten die zur Verfügung stehenden, gentechnisch veränderten Säugerzellen (Mausfibroblasten), die das Gen für die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK) tragen, im Hinblick auf eine Quantifizierung der Retrovirenproduktion mikroverkapselt werden, um Aussagen über die Transduktion TK-negativer Zellen *in vitro* zu treffen. Die Anwendung immobilisierter, transgener Zellen *in vivo* in einem intrakraniellen Rattenmodell wurde zur Aufklärung der intraarteriellen Injizierbarkeit, der mechanischen Stabilität der Membran der applizierten APA-Mikrokapseln sowie der Vitalität der injizierten immobilisierten Zellen durch eine histologische Analyse der Rattenhirne herangezogen.

### **1.3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN**

#### **1.3.1. Nichtviraler Gentransfer mittels Liposomen**

Der Nukleinsäuretransfer in eukaryontische Zellen mittels synthetischer, nichtviraler Vektoren, den Liposomen, repräsentiert eine effiziente Technik für Genexpressionsstudien in Zellkultur bzw. *in vivo* und ist bereits in die klinische Anwendung vorgerückt (GAO UND HUANG, 1995; FELGNER UND RINGOLD, 1989; LIU UND SONG, 1998; SCHOFIELD UND CASKEY, 1995). Kationische Liposomen sind positiv geladene Doppelmembranvesikel, die aus synthetischen Lipiden hergestellt werden und Zellen, im Gegensatz zu Retrovirus(RV)-Vektoren, unabhängig vom Zellzyklus zu transfizieren vermögen (FELGNER *et al.*, 1987). Durch die Anwendung von Liposomen werden auftretende Risiken, die virale Vektoren in sich bergen, wie die Insertion viraler DNA in Normalgewebe in der Nachbarschaft eines Tumors und dadurch erzeugte Mutagenese oder Onkogenaktivierung, vermieden (HUG UND SLEIGHT, 1991; KRAMM *et al.*, 1995). Weiterhin ermöglicht der Einsatz nichtviraler Gentransfersysteme die Protektion vor Zell vermittelten immunologischen Reaktionen

(VERMA UND SOMIA, 1997). Aufgrund der polaren Ladungen sind kationische Liposomen fähig, die negativ geladene DNA, unabhängig von ihrer Größe, zu binden und Liposomen-DNA-Komplexe (Lipoplexe) zu bilden, die mit der Zellmembran fusionieren. Die Plasmid-DNA kann so direkt in das eukaryontische Zytoplasma übertragen werden (HUG UND SLEIGHT, 1991). Liposomen aus unterschiedlich zusammengesetzten Lipiden weisen unterschiedliche DNA-Transfereffizienzen in Zellkultur und *in vivo* auf (FELGNER *et al.*, 1994; HUG AND SLEIGHT, 1991; SAN *et al.*, 1993). Die meisten Liposomen, die zum Gentransfer eingesetzt werden, setzen sich aus einem kationischen Lipid und einem neutralen Helferlipid zusammen, die Lipoplexe ausbilden, wenn sie mit Plasmid-DNA komplexiert werden (NABEL *et al.*, 1993; RAINOV *et al.*, 1999). Die erste Beschreibung solcher Verbindungen wurde durch FELGNER und Kollegen (1987) geliefert, die zur Transfektion eines Reportergens in kultivierte Zellen Lipoplexe aus DOTMA/DOPE verwendeten. Seitdem wurden zahlreiche kationische Liposomen mit dem neutralen Lipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) synthetisiert und zum aktiven DNA-Transfer in verschiedene Zelltypen angewendet (BEHR *et al.*, 1989; FELGNER *et al.*, 1994; GAO AND HUANG, 1991; HAWLEY-NELSON *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1996; LEVENTIS AND SILVIUS, 1990; ROSE *et al.*, 1991; SOLODIN *et al.*, 1995). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Transfereffizienz kationischer Liposomen in Verbindung mit neutralen Helferlipiden, wie DOPE, höher ist als die der kationischen Lipide allein (FELGNER *et al.*, 1994; LIU UND SONG, 1998). Andere Studien ergaben, dass Cholesterol ebenfalls die Transfektionsaktivität kationischer Liposomen verbessert (BENNETT *et al.*, 1995; HONG *et al.*, 1997; TEMPLETON *et al.*, 1997). Die relativ einfache Herstellung und die biologisch sichere Anwendung (keine vektoreigenen Gene) kationischer Liposomen ist von großer Bedeutung für die Gentherapie. Durch ihre biologische Sicherheit ist gewährleistet, dass nur die genetische Information der Plasmid-DNA übertragen wird.

Zur Evaluierung des Liposomen vermittelten Gentransfers bietet das grün autofluoreszierende Protein GFP, das ursprünglich aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (SHIMOMURA *et al.*, 1962), aus 238 Aminosäuren besteht (PRASHER *et al.*, 1992), mittels UV oder blauem Licht angeregt wird (395 – 470 nm) und bei 508 nm grünes Licht emittiert, eine exzellente Möglichkeit. Denn in zahlreichen Studien wird und wurde GFP als Reporter- oder Markermolekül eingesetzt, um Genexpressionen und die Proteinlokalisierung in lebenden Zellen zu kontrollieren (CHALFIE *et al.*, 1994), da es in Säugerzellen keine Toxizität hervorruft oder Enzymaktivitäten von Fusionsproteinen, die mit GFP markiert wurden, inhibiert (VALDEZ *et al.*, 1998). Außerdem benötigt die intrazelluläre Detektion von GFP keine exogen zugeführten Substrate oder Kofaktoren wie für

verschiedene andere Methoden, z.B.  $\beta$ -Galaktosidase, *firefly* Luciferase oder bakterielle Luciferase (SILHAVY UND BECKWITH, 1985; GOULD UND SUBRAMANI, 1988; STEWART UND WILLIAMS, 1992). Die relativ geringe Größe des GFP erleichtert die Diffusion des Proteins durch das Zytoplasma sogar von verzweigten Zellen, wie Neuronen. Bei den Nähr- und Stützzellen der Neuronen, den Gliazellen, scheint GFP keine Störung bezüglich des Zellwachstums hervorzurufen und stellt einen geeigneten Transformationsindikator dar, wodurch eine Fluoreszenz aktivierte Zellseparation erlaubt wird (CHALFIE *et al.*, 1994). *Enhanced GFP* (EGFP) ist eine in den roten Wellenlängenbereich verschobene Variante des GFP, die intensiver als das Wildtyp GFP bei 516 nm fluoresziert (GAMBOTTO *et al.*, 2000). EGFP kann mittels Durchfluss-Zytometrie detektiert werden, da es das vom FACS-Laser emittierte Licht bei 488 nm absorbiert (CORMACK *et al.*, 1996).

### 1.3.2. Ultraschall

Über die Anwendung kationischer Liposomen hinaus wurde gezeigt, dass Ultraschall die Methode des nichtviralen Gentransfers in eukaryontische Zellen unterstützt bzw. verbessert. US findet eine breitgefächerte biomedizinische Verwendung und durchdringt Flüssigkeiten, Gewebe, Knochen und Knorpel (MARESCA *et al.*, 1998). US wurde bereits in einigen Studien zur Optimierung des DNA-Transfers in eukaryontische Zellen angewendet (KIM *et al.*, 1996; BAO *et al.*, 1997; UNGER *et al.*, 1997; LAWRIE *et al.*, 1999). Das Verständnis über den ausführlichen Mechanismus wie US den Gentransfer durch die Zellmembran gewährleistet und verbessert, ist noch nicht ausgereift, aber es existieren verschiedene Hypothesen. Es ist bekannt, dass US die Übertragung kleiner Moleküle durch die Zellmembran erleichtert (POHL *et al.*, 1993a; POHL *et al.*, 1993b). Außerdem ist es möglich, dass die US-Energie Makromoleküle durch den Lipid-Bilayer der Zellmembran in das Zytoplasma schleusen kann, da Lipoplexe von der Zelle durch Endozytose aufgenommen und aus den Endosomen wieder freigesetzt werden. Bei dem letzteren Vorgang verbleibt ein Hauptteil der DNA im Endosom und wird abgebaut (ZABNER *et al.*, 1995). Es wurde angenommen, dass die US-Energie die in den Endosomen eingeschlossene DNA aus dem Lipoplex möglicherweise freisetzt und sie in den Zellkern dirigiert (UNGER *et al.*, 1997). Dabei verbessern geringe Ultraschallenergien die Effizienz des Gentransfers (BAO *et al.*, 1997; LAWRIE *et al.*, 1999) und verursachen gleichzeitig kaum einen biologischen Zellmembranschaden (POHL *et al.*, 1995). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass US-Kontrastmittel zunehmend klinisch verwendet werden (OPHIR UND PARKER, 1989; GOLDBERG *et al.*, 1994). Kontrastmittel verstärken die

Reflexion des Ultraschalls (Echosignale) in Einzelzellen und im Gewebe (WINKELMANN *et al.*, 1994; MILLER UND THOMAS, 1995; WARD *et al.*, 1999). US-Kontrastmittel (KM) basieren auf mit Gas gefüllten, stabilisierten Protein-Mikrosphären (4–10 µm, Albunex<sup>®</sup>; CHRISTIANSEN *et al.*, 1994) oder auf Zucker-Mikrosphären (2–5 µm, Levovist<sup>®</sup>; SCHLIEF, 1993a). Diese Kontrastmittel wurden bisher bei Patienten vorwiegend zu diagnostischen Zwecken eingesetzt (MARESCA *et al.*, 1998). Weiterhin ist bekannt, dass diese US-Kontrastmittel zur Verstärkung der Kavitation führen, wodurch die Zellmembran transient permeabilisiert wird (MILLER *et al.*, 1996; TACHIBANA *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 1999).

### 1.3.3. APA-Mikroinkapselung

Eine neue Methode und weitere wirkungsvolle nichtvirale Strategie der Gentherapie stellt die Mikroverkapselung von Säugerzellen dar. Die immunoprotektive Einkapselung umfasst ein weites Gebiet, wie z.B. die Immobilisierung und Protektion von Enzymen, Bakterien, Hefen und eukaryontischen Zellen. Dabei werden immobilisierte Zellen zur Produktion von rekombinanten Proteinen, Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren *ex* und *in vivo* über Langzeitperioden eingesetzt, wobei ein bidirektionaler Austausch von kleinen Molekülen, wie Sauerstoff, Nährstoffe oder Stoffwechselprodukte erfolgt (CHANG, 1995). Die Immobilisierung mittels der Alginat-poly-L-Lysin-Alginat(APA)-Methode stellt dabei nur eine Möglichkeit aus zahlreichen anderen Immobilisierungsverfahren dar.

Alginat bzw. Alginsäure ist ein natürliches, saures, nichttoxisches, hydrophiles, kolloidales, semipermeables Polysaccharid, das aus Braunalgen, wie *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* oder *Laminaria hyperborea*, gewonnen wird und willkürlich aus den Monomeren  $\alpha$ -L-Guluronsäure (G) und  $\beta$ -D-Mannuronsäure (M) in unterschiedlichen Verhältnissen und Verteilungen aufgebaut ist, deren Verbindung in einer 1→4 Verknüpfung vorliegt (OTTERLEI *et al.*, 1991; SERP *et al.*, 2000). Die Vernetzung dieses Hydrogels erfolgt, indem Chelate aus divalenten Kationen, wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Ba}^{2+}$ , mit  $\alpha$ -L-Guluronsäure gebildet werden. Alginat ist für kleine Moleküle, wie z.B. Glucose oder Insulin, aber nicht für große Moleküle, wie z.B. Immunglobuline oder Albumin, permeabel.

Bisher beschrieben viele Autoren die therapeutische Anwendung eingekapselter Säugerzellen, Proteine oder chemischer Substanzen (TAI UND SUN, 1993; CHANG, 1997; CHANG UND PRAKASH, 1998; PEIRONE *et al.*, 1998; MACHLUF *et al.*, 2000; ULUDAG *et al.*, 2000). Ein bedeutendes und immer weiter vorrückendes Feld auf dem Gebiet der Einkapselungsforschung nimmt die Immobilisierung von Inselzell-Xenotransplantaten

(CLAYTON, *et al.*, 1993; SIEBERS *et al.*, 1997; MULLEN *et al.*, 2000), aber auch die Einkapselung von rekombinanten Zellen zur Übertragung von therapeutischen Genprodukten, wie humane (CHANG *et al.*, 1993) oder mausartige (AL-HENDY *et al.*, 1995) Wachstumshormone bzw. der menschliche Gerinnungsfaktor IX (LIU *et al.*, 1993; HORTELANO *et al.*, 1996), in Alginat ein. Die Einkapselung von Langerhans'schen Inselzellen in protektiven Alginat-Mikrokapseln wurde erstmals von LIM UND SUN (1980) erwähnt. Diese Wissenschaftler erzielten Erfolge bei der Einkapselung lebender Inselzellen in eine semipermeable Membran, die aus vernetztem Alginat gebildet wurde. Da Alginat aufgrund seiner chemischen Struktur die natürliche Umgebung von Zellen im Körper sehr gut nachahmen kann, wurde bereits seit einigen Jahren von verschiedenen internationalen Forschungsgruppen versucht, künstliche Organe auf der Basis von Alginatgelen herzustellen. Für biohybride oder bioartifizielle Organe als neues Konzept für die biomedizinische Therapieentwicklung werden lebende, körperfremde Zellen für therapeutische Anwendungen isoliert, modifiziert und an spezifischen Wirkorten im Patienten implantiert. In ersten klinischen Studien wurden beispielsweise die bereits erwähnten Insulin produzierenden Zellen aus Schweinen zur Therapie von *Diabetes mellitus* oder gentechnisch modifizierte Fibroblasten zur Therapie des Morbus Parkinson, Alzheimer oder Huntington eingesetzt (HOFFMANN, 1992; LYSAGHT *et al.*, 1994; GALETTI *et al.*, 1995).

Obwohl Alginat die Anforderungen als Zusatzstoff, d.h. als Stabilisator und Verdickungsmittel, in Nahrungsmitteln, pharmazeutischen Produkten, in der Biotechnologie zum Einschluss von Zellen, in der Medizin und Zahntechnik zur Wundversorgung erfüllt, können kleinere Mengen an Polyphenolen, die im Alginat enthalten sind, sensitive Zellen schädigen (SMIDSRØD UND SKJÅK-BRÆK, 1990; Prof. Dr. U. Zimmermann, Universität Würzburg). Deshalb muss Alginat für moderne therapeutische Verfahren in der Anwendung als biokompatibles Implantationsmaterial von störenden Verunreinigungen, wie Pyrogenen und immunogenen Stoffen (Proteine und komplexe Kohlenhydrate), befreit werden. Im Hinblick auf die Protektion vor Immunreaktionen des Wirtes wurden bisher zahlreiche Mikroverkapselungen von eukaryontischen Zellen unternommen, um eine Minimierung von Entzündungen, die durch Mikrokapseln hervorgerufen werden, zu erreichen. Denn die physikalische Immunoisolation mit Hilfe einer semipermeablen Hydrogelmatrix bietet Schutz vor sofortiger Zerstörung der lebenden, körperfremden Zellen durch das Immunsystem des Empfängers (KULSENG *et al.*, 1999; SAKAI *et al.*, 2000). Diese Matrix ermöglicht einerseits die Versorgung der eingeschlossenen Zellen mit Nähr- und Wirkstoffen und die ungehinderte Passage bzw. Ausschleusung eines therapeutischen Agens (DE VOS *et al.*, 1993). Andererseits dürfen aber Zellen oder zytotoxische Komponenten des Immunsystems diese

Barriere nicht überbrücken. Somit konnte diese Strategie seither in verschiedenen Tiermodellen ihre Funktionsfähigkeit beweisen und es konnte gezeigt werden, dass ein Überleben der immobilisierten Zellen in Mikrokapseln mit Durchmessern von 200 bis 500  $\mu\text{m}$  im Empfängerorganismus über viele Monate gewährleistet ist (CLAYTON *et al.*, 1993; DE VOS *et al.*, 1993; AEBISHER *et al.*, 1994). Die Schwierigkeit dabei ist es, Mikrokapseln mit kleineren Durchmessern (<300  $\mu\text{m}$ ) als mit größeren Durchmessern (>500  $\mu\text{m}$ ) zu erzeugen. Denn kleinere Mikrokapseln besitzen gegenüber größeren Mikrokapseln mehr Vorteile, wie eine bessere Sauerstoffanreicherung der eingekapselten Zellen und kleinere Applikationsvolumen für eine erleichterte Anwendung *in vivo* (DE VOS *et al.*, 1996; ROBITAILLE *et al.*, 1999). Weiterhin ist es wichtig, eine sichere Immunoisolation zu garantieren und deshalb ist eine mechanische Stabilisierung der Mikrokapseln unerlässlich (DE VOS *et al.*, 1993). Viele Einkapselungsmethoden resultieren in physikalischen Mängeln, wie unbefriedigende Größenverteilungen oder mechanischer Instabilität der Alginate-Hydrogele, die durch die Vernetzung des Alginates mit divalenten Kationen hervorgerufen werden, wobei in bereits etablierten Methoden nur niedrig konzentrierte Alginate-Lösungen eingesetzt werden können (KLÖCK *et al.*, 1997; PEIRONE *et al.*, 1998). Deshalb werden die Alginateperlen mit einer protektiven polykationischen Hülle (z.B. poly-L-Lysin; PLL) und mit zusätzlichen Alginate-Schichten modifiziert, um APA-Mikrokapseln zu erhalten. PLL gewährleistet dabei eine sogenannte Absperrung zwischen dem gelbildenden Alginate und der äußeren Alginate-Schicht (GOOSEN *et al.*, 1985) und ermöglicht in Verbindung mit anderen Alginate-Schichten eine höhere Stabilität der Mikrokapseln *in vivo* (PEIRONE *et al.*, 1998). Die Gelfestigkeit erhöht sich, indem die Alginatekonzentration zunimmt oder mehr Anteile  $\alpha$ -L-Guluronsäure im Alginate vorkommen (MATINSEN *et al.*, 1989). Letzteres unterstützt die Aussage von SERP *et al.* (2000), die beinhaltet, dass das Vorhandensein von G-Anteilen bestimmend für die Vernetzungseigenschaften des Alginates ist. Deshalb besitzen Alginatehydrogele, die einen höheren Anteil an G-Sequenzen beinhalten, eine höhere Affinität zu vernetzenden Substanzen bzw. Ionen als Alginate mit geringeren G-Anteilen. Außerdem wurde beobachtet, dass Alginate mit geringen G-Anteilen nach der Implantation aufquellen und die PLL-Schicht dadurch brechen kann (DE VOS *et al.*, 1993). Wiederum binden Alginate mit hohen G-Anteilen nur mangelhaft an PLL, wodurch starke Fibrosereaktionen ausgelöst werden (DE VOS *et al.*, 1997a). Weiterhin kann durch Verwendung von  $\text{Ba}^{2+}$ - anstelle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Alginate, indem  $\text{BaCl}_2$  zur Vernetzung des Alginates eingesetzt wird, eine verbesserte mechanische Stabilität der Hydrogele erzielt werden (LIM UND SUN, 1980; GRÖHN *et al.*, 1994; KLÖCK *et al.*, 1994; THU *et al.*, 1996a, b; KLÖCK *et al.*, 1997; GAUMANN *et al.*, 2000; GAUMANN *et al.*, 2001).

### 1.3.4. Retrovirale Verpackungszellen

#### 1.3.4.1. Retrovirale Vektoren

Erstmalig wurden virale Verpackungszellen, wie  $\psi$ -2 (MANN *et al.*, 1983) und  $\psi$ -am (CONE UND MULLIGAN, 1984), generiert, die einen Mo-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)-Provirus mit einer deletierten  $\psi$ -Sequenz besitzen. Die  $\psi$ -Sequenz, die *downstream* zwischen der 5' LTR (*long terminal repeat*)-Sequenz und des Startcodons für das gag-Polyprotein liegt (MANN *et al.*, 1983), ist erforderlich, um große RNA-Moleküle, die durch rekombinate, retrovirale Konstrukte transkribiert werden können, und die genetische Virusinformation in retrovirale Partikel zu verpacken (LINIAL UND MILLER, 1990). Das Verpacken retroviraler RNA durch ein funktionales  $\psi$ -Signal und die Produktion biologisch aktiver Viruspartikel wird durch das Vorhandensein der viralen Proteine, die durch die Gene *gag* (virale Capsid-Proteine und Virus-Core), *pol* (Reverse Transkriptase, andere virusassoziierte Nukleasen) und *env* (Glykoproteine der viralen Lipidhülle) kodiert werden, bestimmt. Jedoch verursachen diese Zelllinien sehr häufig die Produktion von Wildtyp-Virus, da eine einzelne Rekombination zwischen dem Verpackungskonstrukt (*gag*, *pol*, *env*) und dem Vektor, der das native  $\psi$ -Signal trägt, ausreicht, um das Wildtyp-Genom zu produzieren (MILLER *et al.*, 1986; MUENCHAU *et al.*, 1990). Um die Risiken der Erzeugung eines Wildtyp- und replikationsfähigen Virus zu umgehen, wurde eine weitere Gruppe retroviraler Vektorsysteme, die Mutationen in der LTR-Sequenz des Verpackungskonstruktes tragen, konstruiert, so dass zusätzliche Rekombinationsereignisse erforderlich sind, bevor ein replikationsfähiger Virus produziert werden kann. Die Verpackungszelllinie PA317 (MILLER UND BUTTIMORE, 1986) trägt einen Provirus, der neben einer mutierten  $\psi$ -Region zusätzlich eine Deletion in der 5'-LTR-Sequenz aufweist. Der retrovirale Vektor enthält das Gen für die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK) *downstream* der 5'-LTR-Sequenz gefolgt von einem SV40-Promotor, wird von der retroviralen Zelllinie PA317 (Zelllinie GLI 328 in der vorliegenden Arbeit) verpackt und kann auf NIH/3T3-Zellen titriert werden (RAM *et al.*, 1997).

#### 1.3.4.2. Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase

Eine ganze Reihe von viralen Vektoren, die vom Herpes-Simplex-Virus (HSV) abgeleitet sind, wurden bereits in Tiermodellen angewendet, um bioaktivierende Transgene (Suizidgene) oder Tumorsuppressorgene in Tumorzellen zu übertragen (BI *et al.*, 1993; BOVIATIS *et al.*, 1994). Die Thymidinkinase (TK) des Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) ist



ein 30 kDa großes Enzym analog der eukaryontischen TK, ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese (GLORIOSO *et al.*, 1994; KRAMM *et al.*, 1995). HSV-TK kann in Hirntumorzellen transferiert werden, wo sie enzymatisch aktiv ist und intrazellulär das antivirale Nukleosidanalogs Ganciclovir (GCV) phosphoryliert (MINETA *et al.*, 1994). Die nach intrazellulärer GCV-Konversion resultierenden Phosphonukleotidanaloga führen zu einem Abbruch der DNA-Replikation (*strand breaks*) durch Blockierung der DNA Polymerase während der Mitose (RAM *et al.*, 1997) und vernichten auch benachbarte, nichtinfizierte Tumorzellen durch einen *Bystander*-Effekt (MOOLTEN, 1986; MOOLTEN UND WELLS, 1990; FREEMAN *et al.*, 1993; GAGANDEEP *et al.*, 1996). Dieser Effekt entsteht infolge der Passage toxischer Metabolite durch die interzellulären Gap-Junctions und erfordert Zell-Zell-Kontakte. Die Abstoßung transduzierter Tumorzellen durch das Immunsystem (BARBA *et al.*, 1993) stellt einen ganz prominenten Aspekt der Genterapie dar. Eine Expression der HSV-TK in weniger als 10% der Tumorzellen in Tiermodellen resultierte sogar in einer kompletten Tumorregression nach GCV-Behandlung (CULVER *et al.*, 1992; FREEMAN *et al.*, 1993; RAM *et al.*, 1993; LINK *et al.*, 1997). Aus diesem Grund präsentiert der Transfer des Gens *HSV-TK* in Tumorzellen mittels rekombinanter und replikationsdefizienter Retroviren eine beispielhafte Methode (MOOLTEN, 1986; CULVER *et al.*, 1992; OLDFIELD *et al.*, 1993), wobei HSV-TK intratumoral durch gentechnisch veränderte Mausfibroblasten (Retrovirus-Vektor produzierende Zellen) übertragen wird (DANOS UND MULLIGAN, 1988).

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. PRO- UND EUKARYONTISCHE ORGANISMEN UND VEKTOREN

#### 2.1.1. Bakterien und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme und Vektoren.

Stamm	Derivat	Plasmid	Genotyp	Beschreibung	Referenz / Herkunft
NOL-4	STBLII	pEGFP-N3 (4,7 kb)	<i>mcrA endA recA1</i> $\Delta(mcrBC-hsdRMS-mrr)$ <i>lon gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$	eukaryontischer Shuttlevektor für translationale Fusionen zu EGFP unter Kontrolle des stark konstitutiven CMV-Promotors am N-Terminus Kan <sup>r</sup> /Neo <sup>r</sup>	BD Clontech, Heidelberg
NOL-19	DH5- $\alpha$	pUC19	<i>supE44 (lacU169)</i> <i>recA1 thi-1 endA1</i> <i>gyrA96 relA1 hsdR17</i> ( $\Phi 80lacZ$ M15)	Vektor mit MCS im $\alpha$ -Peptid vom <i>lacZ</i> zur $\alpha$ -Komplementation in <i>E. coli</i> Amp <sup>r</sup>	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
NOL-89	DH5- $\alpha$	pAQC24 (6,2 kb)	<i>supE44 (lacU169)</i> <i>recA1 thi-1 endA1</i> <i>gyrA96 relA1 hsdR17</i> ( $\Phi 80lacZ$ M15)	pBabe-puro Derivat mit $\psi$ (psi)-Sequenz zum Verpacken der Virus-RNA in Virionpartikel und der translationalen Fusion CYP-4B1-EGFP, als 2,44 kb Fragment (Bam HI-Not I) gerichtet kloniert Amp <sup>r</sup>	Stamm-sammlung der Arbeitsgruppe

### 2.1.2. Maligne Gliomzellen und Fibroblasten

Aus der Tabelle 2 können Merkmale und Herkunft der verwendeten Gliom- und Fibroblastenzellen entnommen werden, die im Laufe dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tab. 2: Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten malignen Gliom- und Fibroblastenzellen.**

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Bemerkung / Referenz / Herkunft
9L	Ratte	Gliosarkom	Dr. D. Deen UCSF Brain Tumor Research Center, USA WEIZAECKER <i>et al.</i> , 1981; BARTH, 1998
J3T	Hund	Glioblastom	Dr. M. Berens, Barrow Neurological Institute, Phoenix, USA BERENS <i>et al.</i> , 1999
T98G	Mensch	Glioblastom	ATCC, Rockville, USA
U87 MG	Mensch	Glioblastom	ATCC
U87 $\Delta$ EGFR	Mensch	Glioblastom mit deletiertem <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)	Ludwig Institute for Cancer Research, University of California, USA NISHIKAWA <i>et al.</i> , 1994 ; SU HUANG <i>et al.</i> , 1997
BHK	Hamster	embryonale Fibroblasten (Nierengewebe)	Dr. P. Aebischer, Universität Lausanne, Schweiz MITTAL <i>et al.</i> , 2000
NIH/3T3	Maus	embryonale Fibroblasten	ATCC
GLI 328 (PA317)	Maus	embryonale Fibroblasten	Retrovirus(RV)-Vektor produzierende NIH/3T3-Zellen [Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK)] Dr. E. Otto, Genetic Therapy Inc., Gaithersburg, USA RAM <i>et al.</i> , 1997; STOCKHAMMER <i>et al.</i> , 1997 ; RAINOV, 2000
$\psi$ -CRIP-pAQC24	Maus	Fibroblasten	RV-Vektor produzierende NIH/3T3-Zellen (Dr. X. O. Breakefield, Massachusetts General Hospital, USA; DANOS UND MULLIGAN, 1988), die das Fusionsplasmid CYP4B1-EGFP und das $\psi$ -Signal tragen (NOL-89) RAINOV <i>et al.</i> , 1998

## **2.2. KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN**

### **2.2.1. Nährmedien, Seren, Antibiotika und Fluorochrome**

#### **A) Luria Broth Base**

Zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme in Flüssigmedium wurde Luria Broth Base (LB-Medium, GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in einer Konzentration von 25 g/l *Aqua dest.* hergestellt und vor Arbeitsbeginn 20 min bei 121°C autoklaviert.

#### **B) Luria Agar**

Als komplexes Festmedium zur Kultivierung von *E. coli* wurde Luria Agar (GIBCO) in einer Konzentration von 37 g/l *Aqua dest.* eingesetzt und ebenfalls vor Arbeitsbeginn 20 min bei 121°C autoklaviert.

#### **C) Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)**

Zur Kultivierung maligner Gliom- bzw. Fibroblastenzellen und der eingekapselten Zellen auf Gewebekulturschalen, in Zellkulturflaschen oder auf verschiedenen Mikroplatten wurde DMEM mit Glutamax (stabiles Glutamin: N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) und 1 g/l bzw. 4,5 g/l Glucose (Biochrom KG, Berlin) entsprechend der Petrischalengröße, der Größe der Zellkulturflaschen, der Kavitätengröße pro Mikroplatte bzw. der Zellkammergröße einer gesondert angefertigten Ultraschall(US)-Absorptionskammer in einem Volumen von 200 µl bis 50 ml eingesetzt. Vor dem Gebrauch wurde dem Medium je nach Zelllinie immer 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS, Biochrom KG) bzw. 10% (v/v) Donor Kälberserum (CS, GIBCO) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom KG) in einer Endkonzentration von 100 U Penicillin G (Na-Salz) und 0,1 mg Streptomycinsulfat pro ml Medium zugegeben.

#### **D) Serumfreies Medium und Seren**

Für Transfektionsexperimente wurde serumfreies Medium OPTIMEM<sup>®</sup> (GIBCO) verwendet. Um Transfektionen unter serumhaltigen Bedingungen durchzuführen, wurden dem Medium (DMEM) entweder FCS oder Humanserum (HS; Patientenserum) hinzugefügt.

#### **E) Antibiotika**

##### Antibiotika zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme:

Die Kanamycin-Stammlösung (60 mg/ml sterilem *Aqua dest.*) wurde nach AUSUBEL *et al.* (1993) hergestellt, zu je 1 ml aliquotiert bei -20°C gelagert und bei Anwendung den sterilen, flüssigen bzw. festen Nährmedien in einer Endkonzentration von 30 µg/ml zugesetzt.

##### Antibiotika zur Kultivierung der eukaryontischen Zellkulturen:

Zur Zellanzucht der humanen Gliomzelllinie U87ΔEGFR wurde Geneticin (G418-Sulfat, 50 mg/ml, steril erhalten; Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) bis zur Anwendung, in einer Endkonzentration vom 400 µg/ml nach dem Auftauen der Zellen, bei 4°C gelagert.

Zur Kultivierung der plasmidhaltigen Fibroblastenzellen ψ-CRIP (Maus) für spätere Einkapselungsversuche wurde Puromycin (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Stammlösung (10 mg/ml) konnte bei 4°C gelagert werden und wurde in einer Endkonzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

Für die Durchführung von Zytotoxizitätstests mit NIH/3T3-Fibroblasten, die mit Kulturüberständen von nativen und immobilisierten Retrovirus-Vektor produzierenden Zellen (GLI 328) transduziert wurden, wurde Ganciclovir (GCV; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) als Stammlösung (50 mg/ml) zu je 50 µl aliquotiert und bis zu seiner Anwendung bei -20°C gelagert. Vor Arbeitsbeginn wurde die Stammlösung 1:125 (v/v) verdünnt (400 µg/ml), um dann in Endkonzentrationen von 1 bis 50 µg/ml eingesetzt werden zu können.

## **F) Fluorochrome Farbstoffe**

Für Fluorochromfärbungen zur Identifizierung immobilisierter, lebender bzw. nichtlebender Gliom- und Fibroblastenzellen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Acridinorange (AO; Sigma) und Ethidiumbromid (EtBr; Reatec GmbH, Weiterstadt) jeweils in Konzentrationen von 1 mg/ml hergestellt, in einem Verhältnis AO:EtBr von 1:3 (v/v) gemischt und bei 4°C gelagert.

### **2.2.2. Zellanzucht**

#### **2.2.2.1. Zellanzucht von Bakterien**

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in Luria Broth Base (siehe 2.2.1.) kultiviert, die für Selektionszwecke die entsprechenden Antibiotikakonzentrationen (siehe 2.2.1.) enthielt. Als Anzuchtgefäße dienten sterile 15 ml-Röhrchen (Biochrom KG) und Erlenmeyerkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht aerob bei 37°C in fast waagrecht eingespannten Röhrchen bzw. in Erlenmeyerkolben mit 200 Upm auf einem Schüttelinkubator (INCUShake 111 mit fest eingebautem, kreisenden GFL-Schüttler 3005; MS Laborgerätehandel, Heidelberg) angezogen.

Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37°C für 18-24 h inkubiert.

#### **2.2.2.2. Zellanzucht von eukaryontischen Zellkulturen**

Die Zellanzucht von Gliom- und Fibroblastenzellen erfolgte, indem die bei -80°C bzw. im Flüssigstickstoff kryokonservierten Zellen schnell in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083; Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) bei 37°C aufgetaut, auf eine 10 cm-Petrischale (Biochrom KG) mit entsprechendem Medium pipettiert und bei 37°C im Inkubator mit einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Sanyo CO<sub>2</sub> Inkubator MCO-17AI; Cotech Vertriebs GmbH, Berlin) inkubiert wurden. Innerhalb von 2 bis 3 h adhärten die Zellen auf der Kunststoffoberfläche der Kultivierungsplatten und begannen, sich zu teilen. Am nächsten Tag erfolgte der erste Mediumwechsel, um Reste des zum Einfrieren der Zellen benötigten Dimethylsulfoxides (DMSO) vollständig zu beseitigen. Die visuelle Kontrolle des Wachstums der Zellen erfolgte an einem inversen Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 135, Zeiss GmbH,

Oberkochen), ausgestattet mit einer CCD Kamera (CellCam, Phase GmbH, Lübeck) unter Zuhilfenahme der Bildverarbeitungssoftware WinTV32 (Hauppauge Computer Works GmbH, Mönchengladbach).

### **2.2.3. Stammhaltung und Kultivierung**

#### **2.2.3.1. Stammhaltung von Bakterien**

Die *E. coli*-Stämme wurden auf Agar-Platten mit den jeweiligen Antibiotika entsprechender Konzentrationen kultiviert. Beimpfte Platten wuchsen aerob 18-24 h bei 37°C. Nach der Inkubation wurden alle Platten bei 4°C gelagert. Alle 4 Wochen wurden die Stämme auf frische Platten überimpft, um jederzeit über frisches Zellmaterial verfügen zu können.

Zusätzlich, um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden von allen Stämmen Glycerinkulturen angelegt. Dazu erntete man die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase und versetzte die Flüssigkultur mit Glycerin [Endkonzentration 20 % (v/v)]. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.3.2. Kultivierung von Gliomzellen, Fibroblasten und immobilisierten Zellen**

Für die Kultivierung der aufgetauten Zellen für spätere Transfektionen, Ultraschallstudien, Einkapselungsexperimente und Tierversuche erfolgte alle 2 bis 3 Tage die Erneuerung des für die Zellen individuellen Mediums. Bevor die adhären Zellen vollständige Konfluenz erreichten, wurde die Kultur passagiert. Dies erfolgte, indem das Kulturmedium verworfen wurde und, um Zellreste zu entfernen, die Zellmonolayer mit 1x phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; GIBCO) gewaschen wurden. Danach wurde vorsichtig, um Zellschäden zu vermeiden, mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma) für 30 Sekunden gespült. Es wurde bei 37°C inkubiert, um die Zellen proteolytisch abzulösen. War unter dem Mikroskop ein Abrunden der Zellen sichtbar, wurden die Zellen mit frischem Medium aufgenommen, die Zellsuspension verdünnt und in frische Zellkulturgefäße überführt. Das Kulturmedium der mikroverkapselten Zellen wurde einmal wöchentlich in den 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Biochrom KG) gewechselt.

Die visuelle Kontrolle des Zellwachstums wurde ebenfalls am inversen Lichtmikroskop (Axiovert 135) vorgenommen.

Um dauerhaft über alle Zelllinien verfügen zu können und dabei Alterungen vorzubeugen, wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde das Kultivierungsmedium verworfen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und danach in 10 ml entsprechendem Medium wieder aufgenommen, um die Zellen mit 200xg (1.200 Upm) für 10 min in einer Hettich Zentrifuge (Universal 16, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) zu pelettieren. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in einer 10%igen DMSO-Einfrierlösung (1,35 ml Medium und 150 µl DMSO; Sigma) mit einem Endvolumen von 1,5 ml in einem Kryoröhrchen (Merck Eurolab GmbH, Dresden) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen sofort für 10 min auf Eis gestellt, dann für 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und dann entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder im Flüssigstickstoff gelagert. So waren die kryokonservierten Zellen mindestens 1 Jahr haltbar.

## **2.3. MOLEKULARGENETISCHE STANDARDTECHNIKEN**

### **2.3.1. Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren**

Die Arbeit mit DNA macht eine Inaktivierung vorhandener DNasen unbedingt erforderlich. Sämtliche hitzebeständigen Geräte und Lösungen wurden vor Versuchsbeginn bei  $121^{\circ}\text{C}$  autoklaviert oder mit 70% (v/v) Ethanol gespült und getrocknet.

### **2.3.2. Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.3.2.1. Präparative Plasmidisolierung mit dem JETstar-Maxiprep-Kit (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen)**

Die folgende Plasmidpräparation basiert auf einer veränderten Methode der alkalischen Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (nach BIRNBOIM UND DOLY, 1979) in Verbindung mit der Methode der Adsorption der DNA auf mineralische Partikel (Silicagele) in Gegenwart hoher



Salzkonzentrationen (VOGELSTEIN UND GILLEPSIE, 1979). Es handelt sich hierbei um eine Isolation im präparativen Maßstab, bei der hochreine, kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA zur sofortigen Anwendung für Restriktionen, Transfektionen, *in vivo*-Experimente u.v.a.m. einsetzbar ist, und die in größeren Mengen und in kürzester Zeit ohne die Anwendung toxischer Substanzen, wie z.B. Phenol, erhalten wird.

Alle verwendeten Puffer stammten aus dem Kit.

Es wurden 200 ml LB-Medium 1:100 (v/v) mit einer frischen Übernachtskultur beimpft, mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Biochrom KG) überführt und bei 4°C mit 4.400xg (5.000 Upm) in einer Kühlzentrifuge (Rotanta 96, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) für 10 min pelletiert. Nach vollständiger Suspendierung des Zellpellets in 10 ml Puffer E1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; pH 8, RNase A 100 µg/ml) erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 10 ml E2-Lysislösung (200 mM NaOH, 1% SDS). Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde mit 10 ml E3-Puffer (3,1 M K-acetat; pH 5,5) durch vorsichtiges Mischen neutralisiert. Dann wurde der Ansatz 10 min mit 9.750xg (7.500 Upm) bei 20°C zentrifugiert, wobei Proteine, Zellreste und chromosomale DNA sedimentiert wurden. Der Überstand wurde auf eine vorher mit 30 ml Lösung E4 (600 mM NaCl, 100 mM Na-acetat, 0,15% TritonX-100; pH 5,0) equilibrierte Säule gegeben und mit 60 ml Puffer E5 (800 mM NaCl, 100 mM Na-acetat; pH 5,0) gewaschen. Danach wurde die DNA mit 15 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl; pH 8,5) eluiert und mit 0,7 Volumen (10,5 ml) Isopropanol präzipitiert, in dem sich eine Zentrifugation von 9.750xg für mindestens 30 min bei 4°C anschloss. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, für 10 min zentrifugiert und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) resuspendiert und war mehrere Monate bei -20 °C stabil.

### **2.3.3. DNA-Techniken**

#### **2.3.3.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Flachbett-Apparatur HORIZON® 58 (GIBCO). Die Gelkonzentration variierte von 0,5-1,0% (w/v) Agarose (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) für eine Separation von Plasmiden und größeren Fragmenten.

Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer [40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8.0)] verwendet. Die Agarose wurde dem Elektrophorese-Puffer zugegeben und in einer Mikrowelle (Bosch, Haushaltsgeräte) gelöst. Der verflüssigten Agarose wurden vor dem Erstarren 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben wurden vor dem Lauf mit 0,2 Volumen Schwerelösung [40% (v/v) Glycerin, 0.1% (w/v) SDS, 0.1 M EDTA, 0.2% (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Aufgetragen wurden 1-10 µl DNA für analytische Gele. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 75 bis 90 V bis die Farbstoffbande das Gelende erreicht hatte. Als Molekulargewichtsmarker wurde stets eine Standardprobe mit DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Die DNA-Banden wurden durch UV-Licht mittels eines Transilluminators (Spectroline® Model TC-312A; Spectronics Corp., USA) sichtbar gemacht und die Agarose-Gele mittels des Gel-Dokumentationssystems E.A.S.Y. RH (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch) auf einem Sony-Film (Sony Corporation Tokyo, Japan) mit einem Videoprintsystem von Mitsubishi dokumentiert.

### 2.3.3.2. DNA-Größenstandard

Die Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des Gene Ruler™ 1-kb DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) bestimmt (Tab. 3).

**Tab. 3: Fragmentgrößen linearisierter Standard-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Angaben in bp.**

1-kb DNA Ladder
10.000
8.000
6.000
5.000
4.000
3.500
<b>3.000</b>
2.500
2.000
1.500
1.000
750
500
250

### 2.3.3.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von nichtrestringierter Plasmid-DNA und geschnittener DNA-Fragmente konnte abgeschätzt werden, indem die Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid markierten DNA-Proben im Agarose-Gel mit der Intensität von DNA-Fragmenten bekannter Konzentration (0,5 µg/µl pUC19; GIBCO) verglichen wurde.

Die tatsächliche DNA-Konzentration wurde ermittelt, indem die DNA-Lösung 1:100 (v/v) mit *Aqua dest.* verdünnt und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gegen *Aqua dest.* am Spektrophotometer OPTOcon® mit Hilfe der Software SpectraWin 4.2 (Optische Sensoren und Messsysteme, Dresden) gemessen wurde. Die OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Mit Hilfe der im linearen Messbereich ermittelten OD-Werte wurde die DNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration der Probe} = \text{OD}_{\text{gemessen}} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der DNA-Proben wurde bestimmt, indem eine zusätzliche Messung bei 280 nm erfolgte und der Quotient OD<sub>260 nm</sub>:OD<sub>280nm</sub> ermittelt wurde. Lag der berechnete Wert zwischen 1,8–1,9, so konnte geschlussfolgert werden, dass die isolierte DNA optisch rein war.

### 2.3.3.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Gesamtvolumen der Restriktionsansätze betrug 10 µl (analytisch) und 50-200 µl (präparativ). Die Menge an zugegebener Restriktionsendonuklease variierte von 1-3 Units pro µg eingesetzter DNA. Eine Unit (U) eines Enzyms ist definiert als diejenige Aktivität, die 1 µg DNA in 1 h spaltet.

Als Inkubationspuffer für Einzelrestriktionen dienten die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Puffer, die in 10facher Konzentration vorlagen und immer mit einem Volumenanteil von 1/10 des Gesamtansatzes eingesetzt wurden. Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C inkubiert, wobei sich die Inkubationsdauer nach dem jeweiligen Enzym und der Menge der zu spaltenden DNA richtete.

Nach der Kontrolle der vollständigen Spaltung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese schloss sich eine Inaktivierung der jeweiligen Restriktionsendonuklease durch Inkubation des

Ansatzes von 20 min bei 65°C an, der eine Tropfendialyse zur Entfernung der Puffersalze folgte. Die restringierte bzw. modifizierte Plasmid-DNA wurde bei –20°C gelagert.

### **2.3.3.5. Dialyse von DNA**

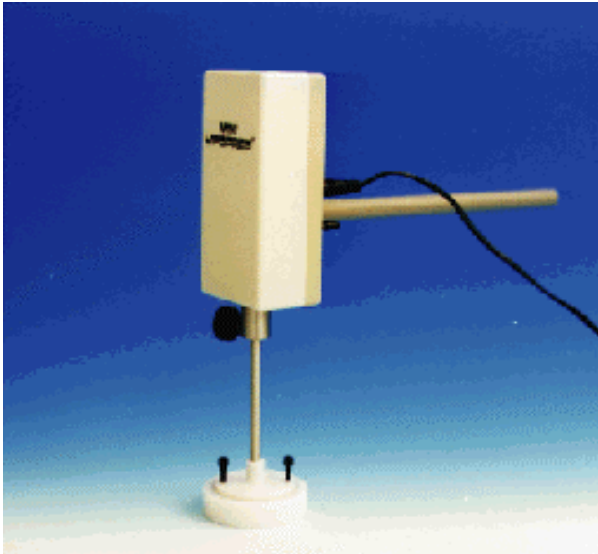
Kleine Mengen an DNA (max. 100 µl) wurden einer Tropfendialyse unterzogen (MARUSYK UND SERGEANT, 1980). Dazu wurde ein Membranfilterblättchen VSWP 04700 mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore GmbH; Eschborn) auf die Oberfläche des sich in einer Petrischale befindlichen sterilen *Aqua dest.* gelegt und die Probe daraufgetropft. Nach einer 30-minütigen Dialyse wurde die DNA-Lösung abpipettiert und konnte so für Transfektionen mit linearer DNA eingesetzt werden.

## **2.4. TECHNIKEN FÜR DAS ARBEITEN MIT LIPOSOMEN**

### **2.4.1. Synthetisierung von Liposomen mit dem Mini Lipoprep® Dialyser (Amika Corp., USA)**

Um zur Gentherapie maligner Hirntumoren nichtvirale Vektoren (kationische Liposomen) zu entwickeln, wurden eigene Liposomenkombinationen gewählt, die teilweise nicht kommerziell verfügbar sind.

Mit Hilfe der Dialysevorrichtung Mini Lipoprep® (Amika Corp., USA; Abb. 1) wurden die Liposomen in verschiedenen Zusammensetzungen und molekularen Verhältnissen aus ausgewählten kationischen Lipiden (Tab. 4) DiMTAP (C14:0, Avanti Polar Lipids, Inc., USA), DC-Cholesterol (ein Cholesterolderivat mit einem tertiären Amin als geladene Gruppe, GAO UND HUANG, 1991; Avanti Polar Lipids; Abb. 2 A) und DOTAP (C18:1, Avanti Polar Lipids; Abb. 2 B) mit neutralen Lipiden (Tab. 4), wie DOPE (C18:1; Sigma; Abb. 2 C), DMPE (C14:0; Sigma) oder Cholesterol (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) synthetisiert.



**Abb. 1: Schematische Abbildung des Mini Lipoprep® Dialysers.** Die Vorrichtung besteht aus einer Probenkammer, zwischen deren beide Hälften eine Membran fixiert wird und einem Motor, um die Probenkammer mit konstanter Geschwindigkeit während der Dialyse der Lipid/Detergenz-Vesikel zu bewegen.

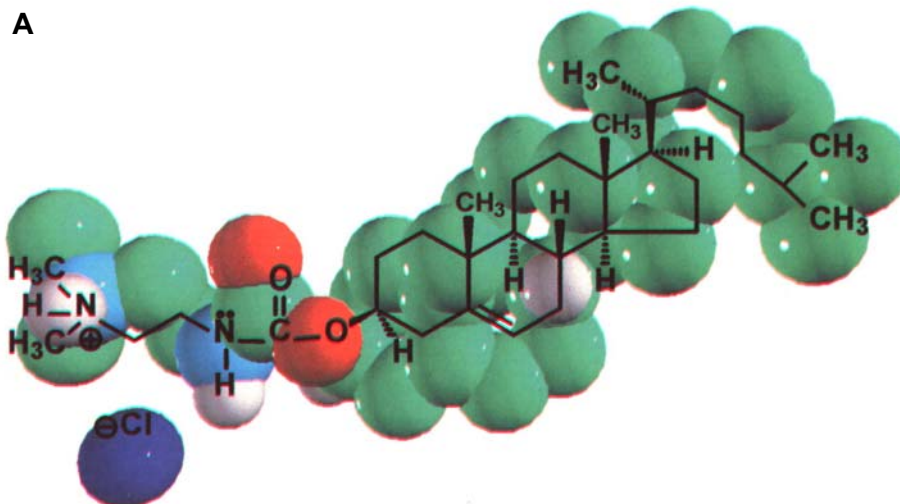
Die Hydratation der Lipide erfolgte, indem 10 mg der kationischen bzw. neutralen Lipide in 1 ml Chloroform (Merck Eurolab GmbH) gelöst wurden. So konnten sie bis zur Dialyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die Herstellung der Lipidkombinationen (kationisch:neutral) erfolgte in Zusammensetzungen von 1:1, 1:3, 3:1 und 3:2 (w/w). Danach erfolgte die Zugabe des Detergenz [2%iges (w/v) Na-Cholat; Merck Eurolab GmbH, gelöst in Methanol (KAGAWA UND RACKER, 1971)] im Verhältnis von 1:3 (Lipidmix:Detergenz) in einem maximalen Gesamtvolumen von 1 ml in einem Reaktionsgefäß. Anschließend wurde das Lösungsmittel-Detergenz-Gemisch bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Bioofen (BioTherm Corp., USA) eingedampft, bis ein weißer Lipidfilm am Rand des Reaktionsgefäßes zu sehen war und sichergestellt wurde, dass das Gemisch aus Chloroform und Methanol vollständig verdampft war. Der Lipidfilm wurde in 1 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 7,4) aufgenommen. Für die Dialyse wurde eine Dialysemembran (5.000 mw.-cutoff; Amika Corp.) 5 min in *Aqua dest.* getränkt, dann 20 min mit *Aqua dest.* gespült und 10 min in 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) getaucht, bevor die Membran im Dialyser fixiert wurde. Anschließend wurde die Liposomenprobe mit einer OMNIFIX®-F 1 ml-Einmalspritze (B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen) in den Dialyser injiziert. Im Anschluss daran erfolgte die Dialyse der gebildeten Liposomen bzw. die Entfernung der Detergenzrückstände mit Hilfe des Mini Lipoprep® Dialysers für maximal 10 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  gegen das 1.000fache Liposomenvolumen in sterilem *Aqua dest.* Das fertig synthetisierte Liposomenpräparat wurde einer Größen- und Strukturbestimmung mittels

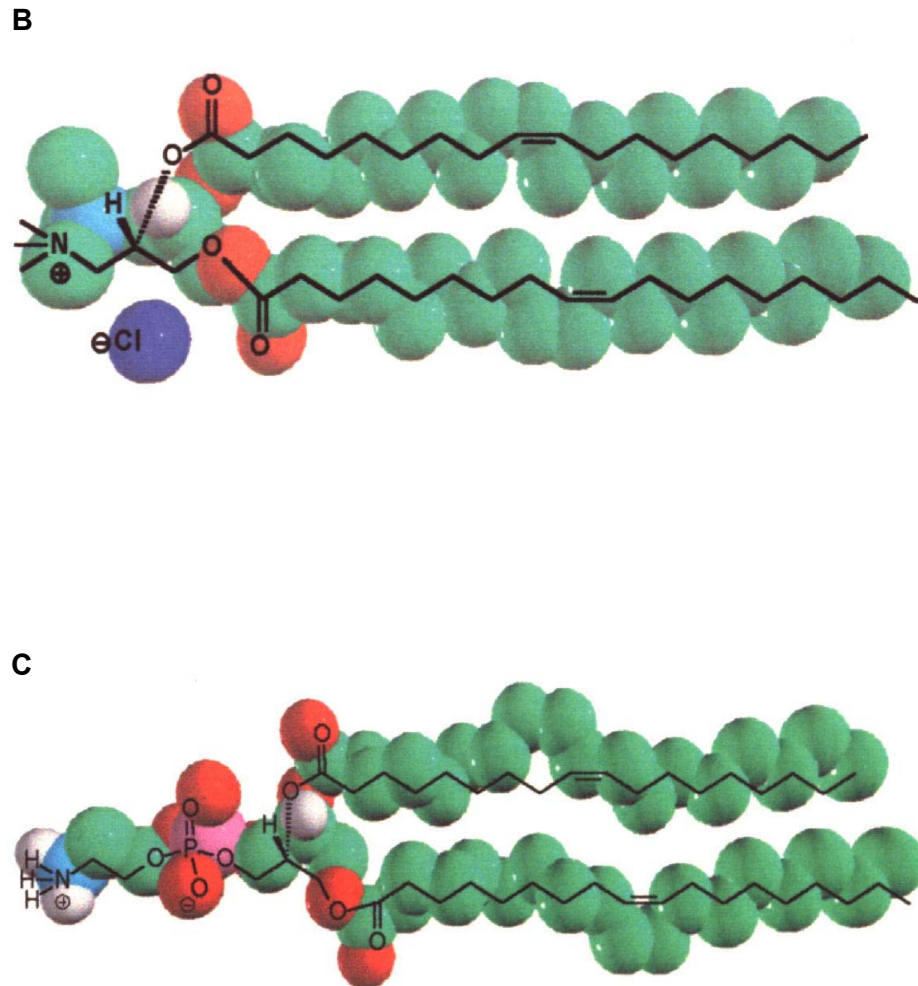
Streulichtanalyse und Rasterkraftmikroskopie unterzogen und für Transfektionen bzw. Ultraschallstudien in Zellkultur eingesetzt.

Die Liposomenproben konnten bis zu ihrer Anwendung bei 4°C gelagert werden und waren mindestens 6 Monate stabil.

**Tab. 4: Aufstellung der eingesetzten kationischen und neutralen Lipide zur Synthetisierung von Liposomen mit Hilfe des Liposomendialyser Mini Lipoprep® (Amika Corp., USA).**

Liposomenname	vollständige Bezeichnung
DC-Cholesterol	3 $\beta$ [N-(N', N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]- <b>cholesterol</b> -hydrochlorid
DiMTAP (TAP 14:0)	1,2- <b>Dimyristoyl</b> -3- <b>trimethylammonium</b> -propan
DOTAP (TAP 18:1)	1,2- <b>Dioleoyl</b> -3- <b>trimethylammonium</b> -propan
Chol	Cholesterol
DMPE	<b>Dimyristoyl</b> phosphatidylethanolamin
DOPE	<b>Dioleoyl</b> phosphatidylethanolamin





**Abb. 2: Struktur ausgewählter kationischer und neutraler Lipide. (A)** kationisches Lipid DC-Cholesterol (vorherige Seite). **(B)** kationisches Lipid DOTAP. **(C)** neutrales Helferlipid DOPE. DC-Chol - 3  $\beta$  [N-(N', N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol-hydrochlorid, DOTAP - 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan, DOPE - Dioleoylphosphatidylethanolamin. (Quelle: Avanti Polar Lipids, Inc.)

### 2.4.2. Größenbestimmung der Liposomen mittels Streulichtanalyse

Die Größenbestimmungen der Liposomen erfolgten mittels Streulichtanalyse am Zeta-Sizer 3 (Malvern Instruments Ltd., UK; Institut für Physikalische Chemie der MLU Halle) bei 18,5°C. Die synthetisch hergestellten Liposomenproben wurden 1:6 (v/v) mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer verdünnt. Für Vergleichsmessungen wurde das kommerziell verfügbare Liposomenpräparat LIPOFECTAMINE™ [DOSPA/DOPE 3:1 (w/w); GIBCO] ebenso verdünnt.

Bei Anwendung der Streulichtanalyse nutzt man den optischen Effekt aus, indem an einem beleuchteten Partikel ein Teil des auftreffenden Lichts zum Teil gestreut, zum Teil absorbiert wird. Eine winkelabhängige Streulichtverteilung (gestreutes Licht hat in unterschiedlichen Beobachtungswinkeln unterschiedliche Intensitäten) wird als Dispersitätsgröße gemessen und analysiert (VIELHABER UND WACHERNIG, 1990).

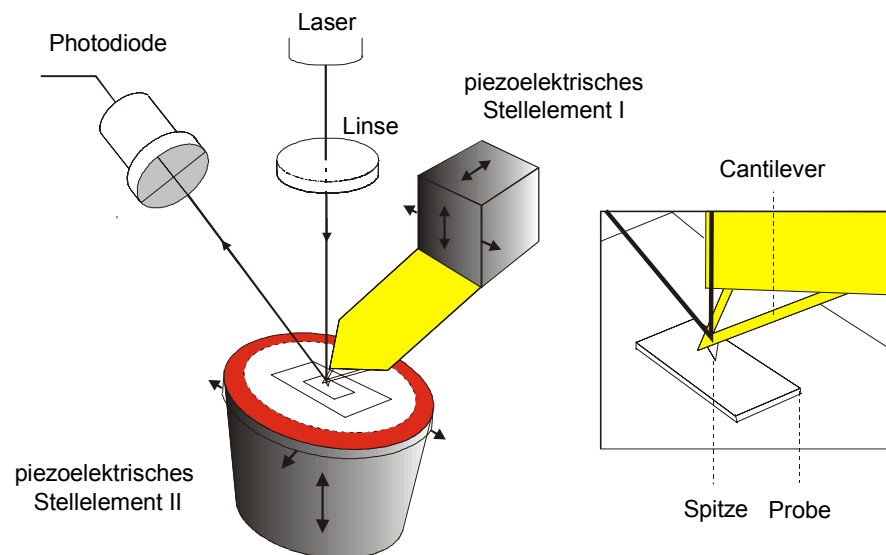
Die Messungen erfolgten in einer 5fach Bestimmung und die durchschnittlichen Größen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Microcal™ Origin 5.0 für Windows® (Microcal Software, Inc., USA) ermittelt, statistisch ausgewertet und verglichen.

### 2.4.3. Rasterkraftmikroskopie

Die Strukturen eines der selbst synthetisierten Liposomenpräparate [DC-Cholesterol/DOPE 3:2 (w/w)] wurden mittels Rasterkraftmikroskopie (RKM bzw. AFM - *atomic force microscopy*) erfasst. Diese Untersuchungen erfolgten am RKM TopoMetrix Discoverer TMX 2010 (ThermoMicroscopes, USA; Institut für Physikalische Chemie) in der dynamischen Betriebsweise des Nichtkontaktverfahrens im *low amplitude resonance modus* unter Umgebungsbedingungen (Abb. 3). Gemessen wurde die Änderung der Amplitude (Bereich 0,2–1 nm) des mit konstanter Resonanzfrequenz von 163 kHz schwingenden Silicium-Cantilevers (Tastspitze) mit der Länge von 231 µm und einem Spitzenradius von 15 nm. Die Liposomenprobe wurde unverdünnt auf Glimmer (*mica*) aufgetropft (max. 10 µl) und bei Raumtemperatur 20 h getrocknet.



Außerdem konnte parallel dazu eine weitere Größenbestimmung dieser Liposomenprobe erfolgen und mit den Ergebnissen aus der Streulichtanalyse verglichen werden.



**Abb. 3: Prinzipieller Aufbau der Raster- und Detektionseinheit eines Rasterkraftmikroskops.**  
Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den Messkopf mit Blattfeder und Tastspitze.

## 2.4.4. Liposomale Transfektionen von Gliomzellkulturen

### 2.4.4.1. Lipoplexbildung

Die kationischen Liposomen (1–30 nmol) wurden mit 1–10 µg gereinigter cDNA des Vektors pEGFP-N3 (BD Clontech Germany, Heidelberg) in 100 µl serumfreiem Medium OPTIMEM<sup>®</sup> bzw. serumhaltigem Medium (mit FCS oder HS) komplexiert (Lipoplexbildung), indem das Liposomen-DNA-Gemisch ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Lipoplexbildung wurde das Liposomen-DNA-Gemisch in OPTIMEM<sup>®</sup> bzw. in serumhaltigem Medium in einem Endvolumen von 0,7 ml/well für 12-well Platten und von 0,2 ml/Zellkammer verdünnt.

#### 2.4.4.2. Transiente Transfektion mit Liposomen

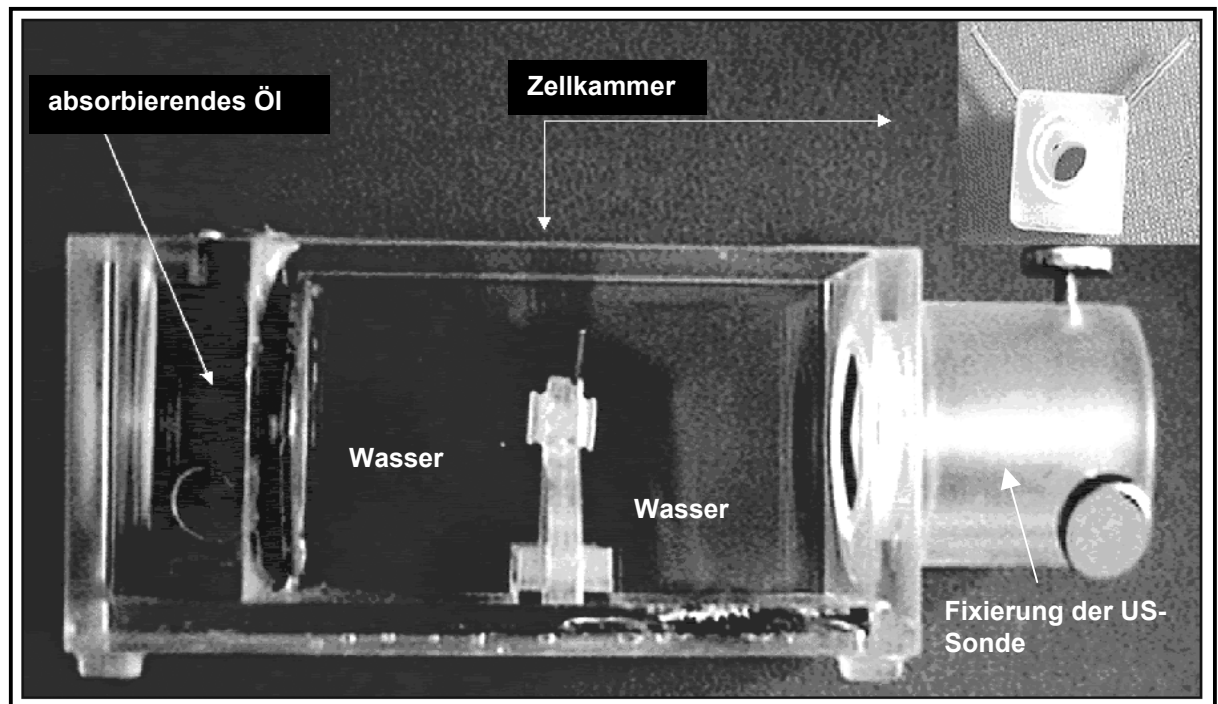
Für Transfektionsexperimente wurden die Gliomzellen in 12-well Platten (Biochrom KG) oder auf Polypropylenmembranen (Carl Roth GmbH & Co. KG) in den Zellkammern kultiviert. Nach 18 h bzw. als die Zellen eine 60-80%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen einmal mit OPTIMEM<sup>®</sup> gewaschen und anschließend mit den Liposomen-DNA-Gemischen 6-18 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Lipoplex-Transfektionsmedium gegen Standardmedium ausgetauscht.

Die Transfektionen wurden in 3fach Bestimmungen (Triplikate) durchgeführt.

#### 2.4.4.3. Ultraschallstudien und Anwendung von Ultraschall-Kontrastmittel

Für Ultraschallanwendungen in den Transfektionsexperimenten mit LipofectAMINE<sup>™</sup> wurden die Gliomzellen in 12-well Platten bzw. in den Zellkammern der gesondert angefertigten Ultraschall-Absorptionskammer (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der MLU Halle; Abb. 4) für 1 h mit den Lipoplexen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30, 60 und 90 Sekunden dem gepulsten US mittels eines Doppler-US-Gerätes (MultiDop L, DWL, Sipplingen), welches für klinische transkranielle Ultraschalldiagnostik verwendet wird, mit einer 2 MHz-Sonde ( $I_{\text{SATA}} = 0,5 \text{ W/cm}^2$ ) exponiert. Dabei wurde die 2 MHz-Sonde in das Zellmedium eingetaucht und im Abstand von 1 cm über dem Zellmonolayer fixiert.

In der Absorptionskammer wurden die Zellen in der mit Wasser gefüllten Kammer 60 Sekunden beschallt. Um Kavitationsereignisse während der US-Exposition auszuschließen, wurde die Zellkammer, in der die Zellen kultiviert wurden, im Focus der Sonde unter der Kontrolle eines Hydrophons fixiert, das einen vom transkraniellen Doppler erzeugten Druck von 0,3 MPa erfasste. Rizinusöl wurde dabei als Absorber eingesetzt, um die Ausbildung von stehenden Wellen zu verhindern. Weitere Experimente in der Absorptionskammer folgten mit dem US-Kontrastmittel Levovist<sup>®</sup> (Schering AG, Berlin), indem 2 ml der Konzentrationen 2 mg/ml, 20 mg/ml und 200 mg/ml während des Ultraschalls (60 s) gepumpt durch die Zellkammer mit einer Spritzenpumpe <sup>kd</sup>Scientific Modell 100 (Philadelphia, PA, USA) bei konstanter Durchflussrate von 100 ml/h appliziert wurden. Während der US-Applikation verblieben die Zellmonolayer im akustischen Fenster des US fest auf der PP-Membran.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der angefertigten Ultraschall-Absorptionskammer mit einer vergrößerten Abbildung der eingesetzten Zellkammer, in der die Tumorzellen auf einer Polymermembran (Polypropylen) als Monolayer kultiviert wurden. Rizinusöl wurde als absorbierende Matrix verwendet.

#### 2.4.5. Quantifizierung der Markergenexpression

Die Identifizierung der Markergenexpressionen des grün autofluoreszierenden Proteins EGFP erfolgte 24 h nach der Transfektion bzw. US-Applikation mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Filtersatz 09 am Inversmikroskop (Axiovert 135) durch Anregung mit 498 nm und Emission bei 516 nm. Anhand der FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) wurden die liposomalen Gentransferraten mit der Software CELLQuest (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) quantifiziert. Dafür wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Biochrom KG) von den Multiwellplatten bzw. der PP-Membran abgelöst, in ein 5 ml-FACS-Röhrchen überführt und mit 200xg zentrifugiert (Hettich Universal 16). Nachdem das Pellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert wurde, wurde es in 2 ml PBS zur FACS-Analyse von 10.000 Zellen resuspendiert.

Das Prinzip der Durchfluss-Zytometrie (FACS-Analyse) beruht (ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie) auf dem Nachweis (1) von Antigenen auf der Oberfläche oder innerhalb der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, (2) von exprimierten, fluoreszierenden Proteinen (GFP, DsRed) oder (3) von angefärbten Zellbestandteilen, z.B. DNA (ORMEROD, 1994). Zellen, die in Suspension vorliegen, werden objektiver durch Photomultiplier und nicht durch das menschliche Auge beurteilt. Hinsichtlich der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften werden die einzelnen Zellen statistisch analysiert (CARTER UND MEYER, 1994). Pro Zelle werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (FL1 und FL2; grüne bzw. orange Fluoreszenz) und morphologische Parameter, wie Vorwärtslichtstreuung (FSC; Partikel- oder Zellgröße) und Seitwärtslichtstreuung (SSC; Form und Oberflächenbeschaffenheit) zur Unterscheidung verschiedener Populationen innerhalb einer Zellsuspension gemessen. Die flüssigen Proben werden zur Messung in eine Trägerflüssigkeit eingebracht. Durch die Strömungsgeschwindigkeit des Trägers werden die Zellen vereinzelt an einem Laserlicht vorbeigeführt. Das Argonlicht leitet die Excitation der Fluorophore, die wiederum Licht emittieren, an. Die Fluoreszenzemission einzelner Zellen wird durch Photozellen detektiert und statistisch ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellüberlebensrate anschließend mit Trypanblau (Sigma) verifiziert. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Trypanblau gemischt. Die blaugefärbten (tote) und nichtangefärbten (lebende) Zellen wurden am Mikroskop mit Hilfe eines Hämozytometers (Sigma) manuell ausgezählt.

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programms Microcal™ Origin 5.0 statistisch ausgewertet.

## **2.5. EINKAPSELUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN**

### **2.5.1. Materialien**

Für drei verschiedene Einkapselungsstrategien wurden die nachstehenden Na-Alginat- und Lösungen verwendet.

Eine 1,5%ige (w/v) Alginat-Lösung (in 10 mM MOPS und 0,85% NaCl in *Aqua dest.*; pH 7,3) wurde von Inotech AG (Dottikon, Schweiz) sterilgefiltert erhalten (IE 1010). Alle anderen Na-Alginat- und Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Für eine 2,0%ige (w/v) Inotech-Alginat-Lösung und für eine 1,5%ige bzw. 1,0%ige (w/v) Fluka-Alginat-Lösung (MW 100.000–200.000; 71238 Fluka, Buchs, Schweiz) wurde Alginat als Pulver erhalten, in sterilem *Aqua dest.* gelöst und mit einem 1 µm-Falcon-Zellsieb (Merck Eurolab GmbH) gefiltert. Die 0,03%, 0,05%, 0,1%igen (v/v) Alginat-Lösungen und eine 0,05%ige (w/v) poly-L-Lysin-Lösung (PLL, MW 15.000–30.000; P-7890 Sigma) wurden mit einem 0,22 µm Filter (Sigma) sterilgefiltert und bei 4°C gelagert.

Der MOPS-Waschpuffer [10 mM MOPS und 0,85% (w/v) NaCl; ICN Biomedicals GmbH], die CaCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM MOPS und 100 mM CaCl<sub>2</sub>; ICN) und die Na-Citrat-Lösung [10 mM MOPS, 50 mM Na<sub>3</sub>-Citrat und 0,45% (w/v) NaCl] wurden mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## **2.5.2. Bestimmung der Zytotoxizität der Alginat**

Um die o.g. Alginat auf ihre Zytotoxizität zu testen, wurden die zu immobilisierenden Zellen (J3T, BHK, ψ-CRIP und GLI 328) als Monolayer in 6-well Platten (1x10<sup>5</sup> Zellen) mit 0,5 ml der jeweiligen Alginat-Lösungen in einem Endvolumen von 2 ml des entsprechenden Mediums kultiviert. Täglich erfolgte die mikroskopische Auswertung des Zellwachstums und die Beurteilung der Adhärenz der Zellen am Boden der Platte über einen Zeitraum von 72 h.

## **2.5.3. Einkapselung und Kapselmodifizierung**

### **2.5.3.1. Zellernte**

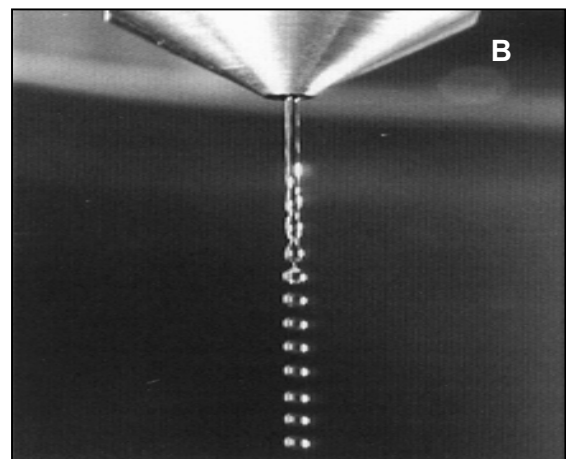
Für Einkapselungsexperimente wurden die konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1x Trypsin-EDTA von den Petrischalen abgelöst. Dann wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt, durch Zentrifugation mit 200xg (Hettich Universal 16) pelettiert und am Mikroskop mit Hilfe des Hämozytometers manuell ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer MOPS-Puffer:Alginat-Lösung von 1:6 (v/v) suspendiert und das Zell-Alginat-Gemisch durch ein 40 µm-Falcon-Zellsieb gefiltert.

Alle folgenden Einkapselungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.5.3.2. *Vibrating nozzle-Methode*

Für die Mikrokapselherstellung mit der medizinischen Ausführung des halb automatisierten Inotech Encapsulator™ IER-40 (Inotech AG; Abb. 5), dessen Methode auf einer vibrierenden Düse basiert, wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen (J3T, BHK,  $\psi$ -CRIP, GLI 328) pro ml Alginate (1,5% Inotech-Alginate, 1,5%- und 1,0% Fluka-Alginate) suspendiert. Mittels einer 20 ml-Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), die über eine *luer look*-Verbindung mit der pulsierenden Einheit des Einkapselungsgerätes verbunden war, wurde der Zell-Alginate-Mix mit einer Geschwindigkeit von 130 bis 240 ml/h (Speed: 1 bzw. 2 Einheiten in einer 20 ml-Spritze) durch eine 50  $\mu\text{m}$ -, 120  $\mu\text{m}$ - bzw. 200  $\mu\text{m}$ -Düse, die im elektrostatischen Feld mit einem Potential von 1,1 bis 1,8 kV und mit einer Frequenz von 2,9 bis 4,0 kHz vibrierte, gepumpt, um monodisperse Kapseln zu erhalten. Die Kapseln wurden in 225 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  gesammelt, wodurch die Alginat unter leichtem Rühren für 10 min polymerisiert bzw. vernetzt wurden.

Alle folgenden Modifizierungen der Kapselmembran wurden nach einem modifizierten Alginate-PLL-Alginate (APA)-Protokoll (LIM UND SUN, 1980) durchgeführt. Die Kapseln wurden 10 min mit PLL beschichtet bzw. stabilisiert und zweimal mit MOPS-Puffer gewaschen. Die Ausbildung der äußeren Alginate-Schicht der Mikrokapseln erfolgte mit 0,03; 0,05 oder 0,1%igen (v/v) Alginate-Lösungen. Für eine weitere Stabilisierung der mit 0,03%igem Alginate beschichteten Kapseln schlossen sich erneut die Waschschriffe von PLL bis zum 0,03%igen Alginate an. Nach der Kapselbeschichtung folgte ein Waschschriff mit MOPS-Puffer und der Alginatekern der Mikrokapseln wurde mit  $\text{Na}_3\text{-Citrat}$  herausgelöst (30 min), so dass Hohlkapseln entstanden. Es wurde nochmal mit MOPS gewaschen, der Waschpuffer durch Standardmedium ersetzt und die eingekapselten Zellen in 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen kultiviert.



**Abb. 5: (A) Äußere Ansicht des Inotech-Encapsulator™. (B) Vergrößerte Abbildung der vibrating nozzle (vorherige Seite).** Dieses Gerät kombiniert die Produktion definierter Kapselgrößen (100–1000 µm) mit geringer Größenverteilung der Kapseln und das Arbeiten unter sterilen Bedingungen (GMP). GMP – *Good manufacturing practice*. (Quelle: [www.inotechintl.com](http://www.inotechintl.com))

### 2.5.3.3. AirJet-Methode

Die Perlenbildung mit Hilfe der gesondert angefertigten Gasstrom-Apparatur (Fachbereich Ingenieurwissenschaften, Institut für Bioengineering der MLU Halle) erfolgte, indem etwa  $1 \times 10^7$  Zellen (J3T, GLI 328) pro ml Alginat (1,5% bzw. 2,0% Inotech-Alginat oder 1,5% Fluka-Alginat) suspendiert wurden. Der Zell-Alginatmix wurde aus einer 10 ml-Spritze (B. Braun Melsungen AG) mit einer Durchflussrate von 10 ml/h mit Hilfe der Spritzenpumpe <sup>kd</sup>Scientific Modell 100 in eine 100 mm lange Kapillare bzw. Kanüle (0,17 mm innerer und 0,3 mm äußerer Durchmesser; GLT Gesellschaft für Löttechnik mbH, Pforzheim), die in der coaxialen Stickstoff-Gasapparatur (Metallröhrchen mit 5 mm innerem Durchmesser) fixiert wurde, gepumpt. Mit einem Volumendurchsatz von 2.500 und 4.800 l Stickstoff pro Stunde wurden die Alginatperlen durch laminare Gas-Scherkräfte am distalen Ende der Kapillare geformt, in 100 ml CaCl<sub>2</sub> eingeleitet und für 10 min polymerisiert.

Die weiteren modifizierenden Schritte wurden nach 2.5.3.2. durchgeführt. Die äußere Kapselschicht wurde mit 0,03%igem Alginat gebildet und die weiteren Waschschriffe erfolgten, nachdem die Kapseln mit Hilfe eines 40 µm-Zellsiebes von den Lösungen separiert wurden. Die eingekapselten Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert.

### 2.5.3.4. JetCutter-Methode

Zur Perlenproduktion mit Hilfe eines laminaren *jet break-up* des *JetCutters* (geniaLab<sup>®</sup> BioTechnologie – Produkte und Dienstleistungen GmbH, Braunschweig) wurde die im Detail in SCHWINGER, KOCH *et al.* (2002) beschriebene Methode angewendet. Dafür wurde 1,5%iges (w/v) Fluka-Alginat verwendet und  $1 \times 10^8$  GLI 328-Zellen in einem Endvolumen von 50 ml suspendiert. Die Alginat-Zellsuspension wurde aus einem Druckgefäß (200 ml) mit Hilfe von Stickstoff mit 0,75 bar als Laminarstrahl durch eine 200 µm-Düse zu einem rotierenden Schneidwerkzeug mit 48 Drähten á 50 µm Durchmesser und einer Frequenz von 5,2 kHz gepumpt, wobei der Flüssigkeitsstrahl zerschnitten wurde. Die Polymerisierung der

geschnittenen Zylinder, die sich zu Kapseln formierten, erfolgte unter ständigem Rühren für 10 min in 200 ml einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung.

Die Modifizierung der Kapseln erfolgte unter der 2.5.3.2. beschriebenen Methode. Die äußere Kapselmembran wurde mit 0,03%igem Fluka-Alginat gebildet, die Waschlösungen wurden nach dem Absetzen der Kapseln gewechselt und die Kapseln in 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen kultiviert.

#### **2.5.3.5. Analyse der Mikrokapseln**

Die Auswertung der physikalischen Parameter der Einkapselungstechniken, der Mikrokapselformen und -größen, der Proliferation und Morphologie der eingekapselten Zellen erfolgte am inversen Lichtmikroskop Axiovert 135.

#### **2.5.4. Viabilität der eingekapselten Zellen**

Zur Untersuchung der Zellviabilität der eingekapselten Zellen erfolgten aller 14 Tage Fluorochromfärbungen. Dazu wurden die Kapselsuspensionen mit einem 1:3 (v/v) Fluoreszenzfarbstoffmix aus Acridinorange (AO) und Ethidiumbromid (EtBr) in Endkonzentrationen von 0,17 ng AO und 0,5 ng EtBr pro  $\mu\text{l}$  gemischt. Nach 3 min wurden die Kapseln mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Filtersatz 09 bzw. 15 am Axiovert 135 betrachtet, um lebende (grüne Fluoreszenz durch AO Anregung bei 460 nm für DNA und 502 nm für RNA und Emission bei 526 bzw. 650 nm) und nichtlebende Zellen (rote Fluoreszenz durch EtBr Anregung bei 510 nm und Emission bei 595 nm) zu unterscheiden (GENG *et al.*, 1996).



## 2.5.5. Virustitrierung

### 2.5.5.1. Herstellung der Überstände von eingekapselten, Retrovirus-Vektor produzierenden Zellen

Um die Virusproduktion der eingekapselten Retrovirus-Vektor produzierenden Zellen (GLI 328) auf Fibroblastenzellen NIH/3T3 zu titrieren, wurde das Kapselmedium in den 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Biochrom KG) auf maximal 4 ml reduziert. 24 h danach wurden die NIH/3T3-Zellen, die auf 6-well Platten kultiviert wurden, mit gefilterten Kapselüberständen (0,45 µm-Filter; Sigma) unter Zugabe von 8 µg/ml Polybrene (Hexadimethrine Bromide; Sigma) transient für 24 h transduziert. Als Positivkontrolle dienten 4 ml Überstand von 5x10<sup>6</sup> nativen, nichteingekapselten GLI 328-Zellen. Als Negativkontrolle wurden die NIH/3T3-Fibroblasten eingesetzt.

### 2.5.5.2. Behandlung der Zellen mit Ganciclovir

Nach der transienten Transduktion der Fibroblastenzellen NIH/3T3 wurde das virushaltige Medium gegen Standardmedium ausgetauscht. Nach 24 h wurden die transduzierten Fibroblasten von den Platten abgelöst, zentrifugiert und mit Hilfe des Hämozytometers manuell ausgezählt. Pro well wurden je 1.000 Zellen auf 96-well Platten (Biochrom KG) ausplattiert, anschließend mit 0 bzw. 1; 2; 5; 10; 20 und 50 µg/ml Ganciclovir (GCV) versetzt und für 3 Tage in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut für 3 Tage dem GCV exponiert (GALIPEAU *et al.*, 1999). Pro GCV-Konzentration wurden Quadruplikatbestimmungen vorgenommen.

### 2.5.5.3. Zytotoxizitätsbestimmung mit Hilfe des MTT-Test

Um die Lebendzellzahl nach der GCV-Behandlung zu quantifizieren, wurden die Zellen einem MTT-Test, der auf dem Metabolismus des mitochondrialen löslichen Substrates MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau; Sigma) lebender Zellen zu unlöslichem Formazan beruht, unterzogen. Formazan kann detektiert werden, indem die Absorption bei 570 nm gemessen wird (HANSEN *et al.*, 1989). Dazu wurde MTT in einer Stammlösung von 5 mg/ml PBS hergestellt und die Lösung mit einem 0,22 µm Filter filtriert. Das MTT wurde im Test 1:10 verdünnt eingesetzt, wobei 20 µl der Lösung zum

Kulturvolumen hinzugegeben wurde (Endkonzentration 0,5 mg/ml). Es wurde für ca. 2 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert und danach das Medium gegen 100 µl sauren Isopropanol [0,1 N HCl in absolutem Isopropanol (v/v)] ausgetauscht. Die Multitestplatten wurden für 15 min geschüttelt, um die präzipitierten Formazankristalle zu lösen. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 570 und 630 nm mit einem Mikroplatten Reader EL<sub>x</sub>800 uv (BIO-Tek Instruments, Heidelberg).

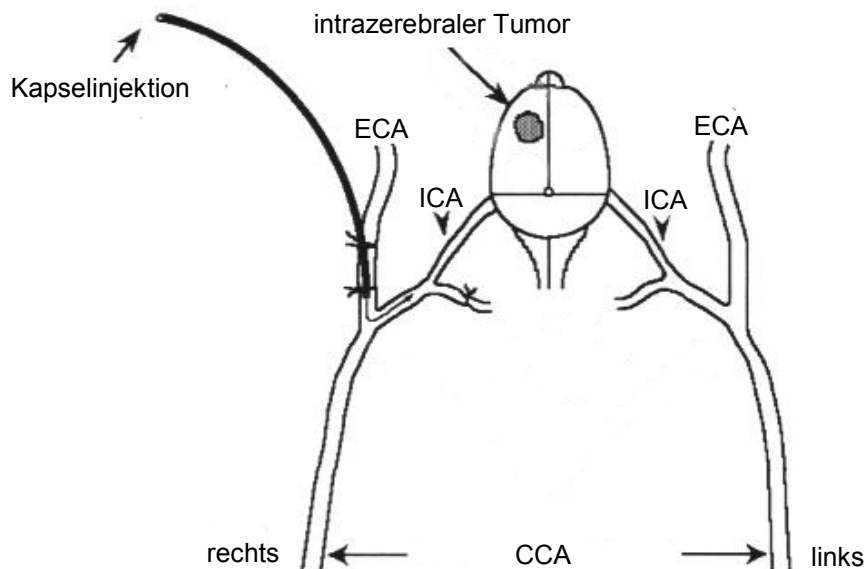
Die prozentualen Überlebensraten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Microcal™ Origin 5.0 ermittelt, normiert, statistisch ausgewertet und verglichen.

## **2.6. ANWENDUNG DER KAPSELVEKTOREN IM INTRAKRANIELLEN TIERMODELL**

### **2.6.1. Intrakranielles Tiermodell**

Für Modellgliome wurden vier Fischer-Ratten F344 verwendet, bei denen am Tag 0, nach intraperitonealer Xylazin/Ketamin-Narkose [2:1:1; isotone Natriumchlorid-Lösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen), 2% (w/v) Rompun (Xylazinhydrochlorid; BayerVital, Leverkusen), Ketanest (50 mg/ml, Wirkstoff Ketaminhydrochlorid; je 800 µl pro Tier)] und Desinfektion der Kopfhaut, ein Schnitt mit einem Skalpell in der Medianlinie frontoparietal gesetzt, das Periost gespalten und ca. 2 mm rechts der Sagittalnaht und ventral der Coronarnaht die Schädeldecke durchbohrt wurde. Die orthotrope Tumorzellimplantation erfolgte durch stereotaktische intrakranielle Inokulation von  $1 \times 10^5$  9L-Rattengliomzellen in 5 µl DMEM in 5 mm Tiefe des rechten Frontallappens (RAINOV *et al.*, 1995). Anschließend wurde die Schädeldecke mit Knochenwachs und das Periost bzw. die Kopfhaut mit Fibrinkleber verschlossen. Am Tag 7 wurde nach Narkose bei allen Tieren eine offene Katheterisierung der rechten *Aorta carotis interna* mit einem 0,1 mm PVC-Katheter vorgenommen (Abb. 6), wobei eine Kapselinjektion (immobilisierte GLI 328-Mausfibroblasten) von ca. 1.625 Kapseln pro 500 µl pro Tier erfolgte. Am Tag 5 nach der Kapselinjektion wurden die Ratten in einer Trapanalanästhesie (1 ml Thiopental-Natrium; Byk Gulden, Konstanz) durch transkardiale Perfusion getötet. Dazu erfolgte die Öffnung des Abdomens, die *Aorta abdominalis* wurde mit einer Gefäßklammer erfasst und das rechte Atrium durchtrennt. Ausgehend von der linken Herzkammer wurden die Tiere mit 50 ml 1x PBS perfundiert, die Hirne *in toto* entnommen, in 10%iger Formalinlösung (Sigma) fixiert und bis zur Paraffineinbettung bei 4°C gelagert.

Die Auswertung der intratumoralen Vitalität der injizierten immobilisierten GLI 328-Fibroblasten und der postinjizierten Beschaffenheit der Kapselmembranen erfolgte histologisch an Paraffin-eingebettetem Material.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des intraarteriellen Tierexperimentes.** ECA – *Aorta carotis externa*, ICA – *Aorta carotis interna*, CCA – *Aorta carotis communis*.

### 2.6.2. Paraffineinbettung für histologische Auswertungen

Die Paraffineinbettung der fixierten Rattenhirne und das Schneiden der Paraffinblöcke (3 µm-Schnitte auf Superfrost®; Carl Roth GmbH & Co. KG) wurde durch Prof. Holzhausen (Institut für Pathologie der MLU Halle) vorgenommen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Dazu wurden die Schnitte 5 Sekunden in Formalinlösung fixiert, mit *Aqua dest.* gespült und 20 Sekunden mit Hämatoxylin angefärbt. Anschließend wurde mit Leitungswasser gespült (Bläuen) und kurz mit Eosin gefärbt. Nach einer erneuten Spülung mit Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 90%) und danach mit Karbol-Xylol und Xylol dehydratisiert. Nachdem die gefärbten Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit einem Deckglas mit Hilfe von Eukitt (Kindler GmbH, Freyburg) eingebettet und lichtmikroskopisch ausgewertet (Axiovert 135).

## **2.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN, CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN**

**Für DNA-Isolationen und Restriktionsanalysen wurden Enzyme sowie Kits folgender Firmen verwendet:**

- GENOMED GmbH, Bad Oeynhausen
- InViTek, Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign m.b.H., Berlin-Buch
- MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- New England Biolabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
- QIAGEN GmbH, Hilden

**Biochemikalien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:**

- Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
- BD Clontech Germany, Heidelberg
- Biochrom KG, Berlin
- Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
- Merck Eurolab GmbH, Dresden
- ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Schering AG, Berlin
- Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

**Für die Arbeiten wurden folgende im Text nicht erwähnten Geräte verwendet:**

Autoklav: vertikal, Modell Systec 3870 ELV (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg)

pH-Meter: Mikroprocessor pH 537 mit der pH-Elektrode SenTix 41 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim)

Vortexer: Paramix 3 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)

Wasserbad: Julabo 13 (Julabo Labortechnik GmbH)

### 3. ERGEBNISSE

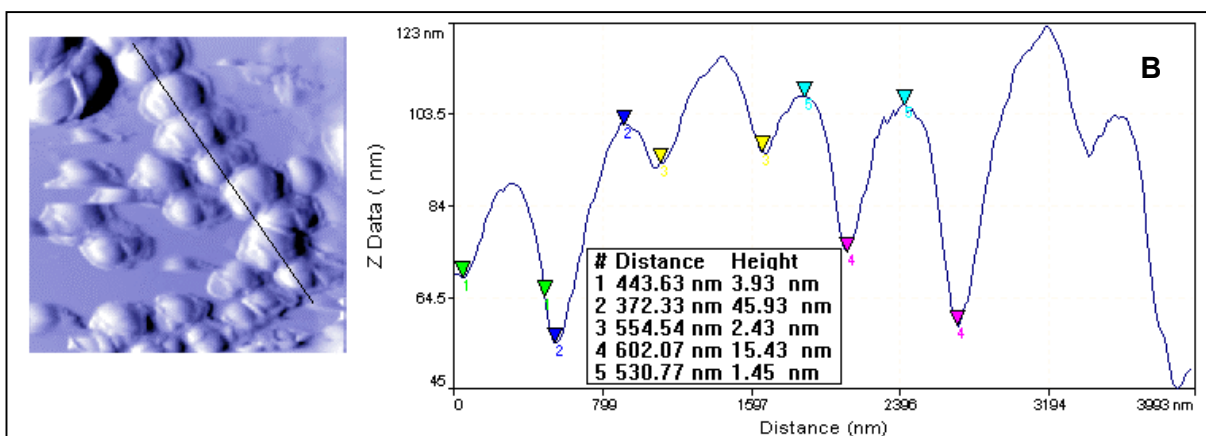
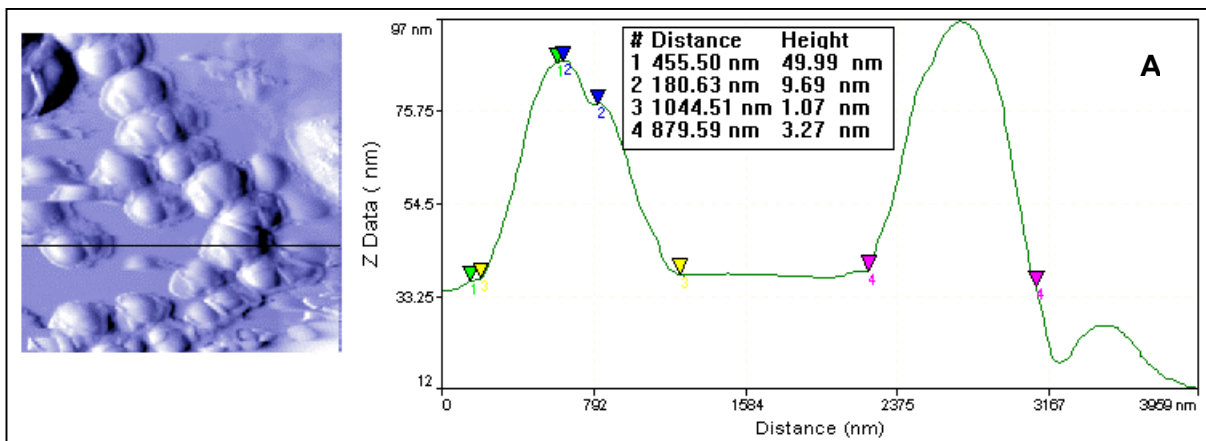
#### 3.1. GRÖßENBESTIMMUNG DER SYNTHETISIERTEN LIPOSOMEN MITTELS STREULICHTANALYSE

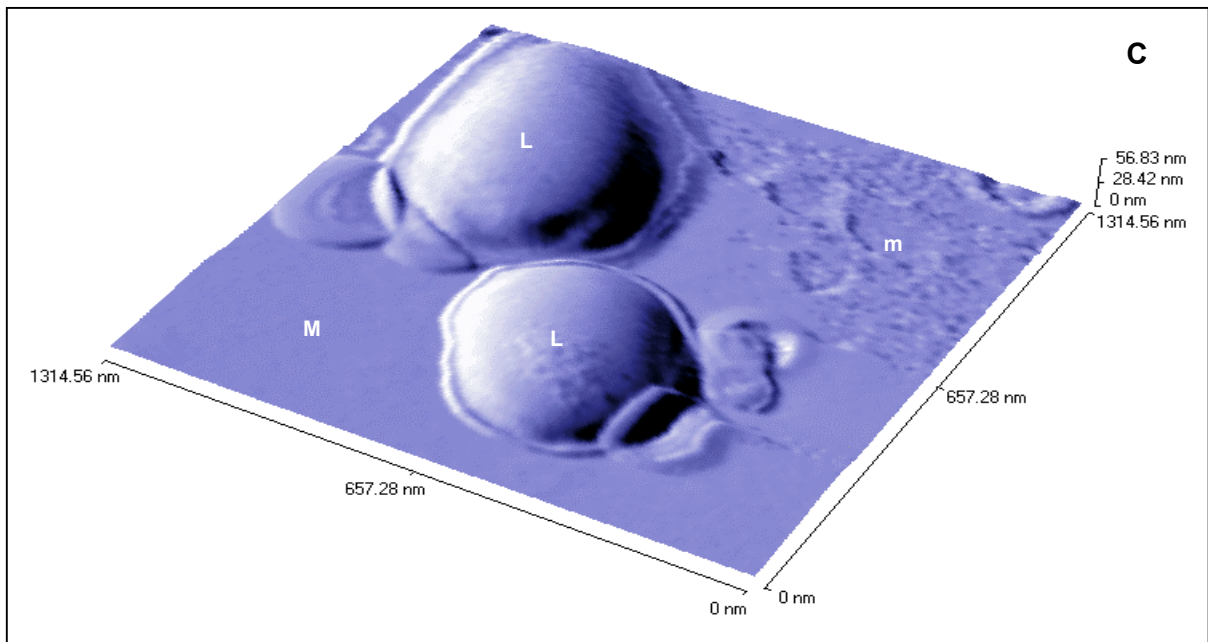
Einige ausgewählte, synthetisierte Liposomenproben sind in Tabelle 5 gezeigt, die mittels Malvern-Laserstreulichtanalyse gemessen wurden. Die Ergebnisse sind repräsentativ, da eine 5fach Bestimmung jeder Probe durchgeführt wurde.

**Tab. 5: Durchschnittliche Größen ausgewählter, synthetisch hergestellter Liposomenpräparate im Vergleich mit dem kommerziell verfügbaren LIPOFECTAMINE™.** Die Proben wurden mittels Streulichtanalyse am Zeta-Sizer 3 (Malvern Instruments Ltd., UK) bei 18,5°C mittels 5fach Bestimmung gemessen.

Liposomentyp	Durchmesser (Z Average in nm)
DC-Cholesterol/DOPE 3:1	762,1
DC-Cholesterol/DOPE 3:2	737,6
DC-Cholesterol/DMPE 3:1	644,8
DiMTAP/DOPE 3:1	993,2
DOTAP/DOPE 3:1	289,9
DOTAP/Cholesterol 1:1	279,1
LIPOFECTAMINE™	148,3

Die Ermittlung der Größen von ausgewählten Liposomen zeigte, dass die synthetisierten Proben deutlich höhere Werte (279,1 bis 993,2 nm) als das kommerziell verfügbare Präparat LIPOFECTAMINE™, bestehend aus DOSPA/DOPE 3:1 (w/w), mit 148,3 nm (Herstellerangaben: 150–200 nm) besitzen. Zusätzlich wurde die Struktur einer gemessenen Liposomenprobe mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (RKM bzw. AFM – *atomic force microscopy*) untersucht (JASS *et al.*, 2000). Die Abbildung 7 zeigt Images des in Zellkultur effektivsten Liposomenpräparates DC-Cholesterol/DOPE 3:2 (w/w), dessen einzelne Liposomenpartikelgrößen zusätzlich erfasst werden konnten.





**Abb. 7:** Rasterkraftmikroskopische Sequenzen des synthetisierten Liposomenpräparates DC-Cholesterol/DOPE 3:2, das unverdünnt auf Glimmer (*mica*) aufgetragen und in der dynamischen Betriebsweise des Nichtkontaktverfahrens im *low amplitude resonance modus* unter Umgebungsbedingungen abgetastet wurde. (A-B) Abbildung eines Verbandes aus Liposomen und deren erfasste Größen (vorherige Seite). (C) Starke Vergrößerung eines Images mit teilweise abgeflachten Liposomen (L) und der Lipid-Bilayer-Membran (M) auf der deutlich zu unterscheidenden *mica*-Oberfläche (m).

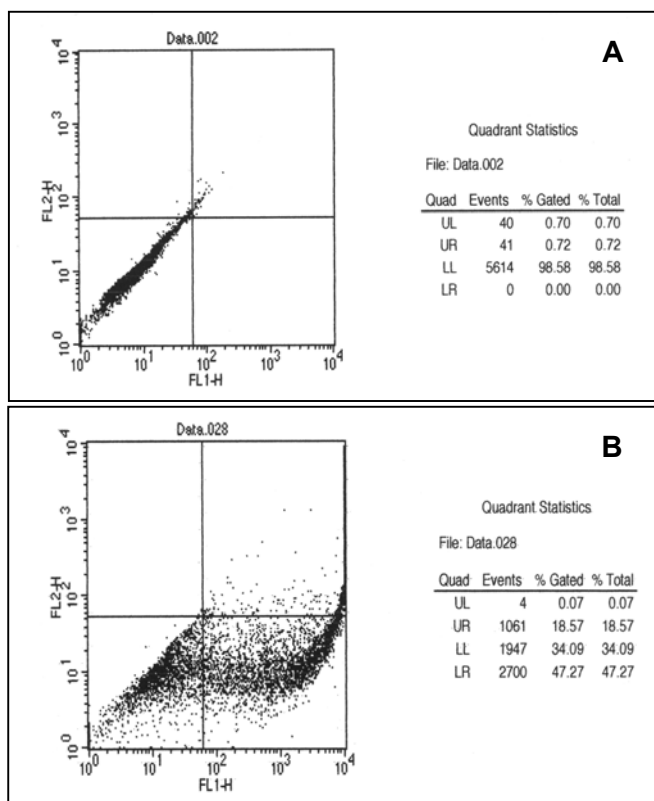
Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen von DC-Cholesterol/DOPE 3:2 zeigten abgeflachte kugelige Formen, die auf liposomale Strukturen hinweisen (LASIC, 1997) und deren "glatte" Lipid-Bilayer-Membran sich deutlich von der rauhen Matrix (*mica*-Glimmer) unterscheidet. Weiterhin konnten mittels RKM durchschnittliche Partikelgrößen der Probe von 642 nm ermittelt werden.

### 3.2. LIPOSOMALE TRANSFEKTIONSRATEN IN ZELLKULTUR

Die synthetisierten kationischen Liposomen wurden in Konzentrationen von 1 bis 30 nmol mit 1 bis 10 µg des 4,7 kb großen, gereinigten (zirkulären und linearisierten) eukaryontischen Expressionsplasmides pEGFP-N3 in serumfreiem Medium komplexiert. Das Reporter-



konstrukt trägt die cDNA für das grün autofluoreszierende Protein (EGFP) unter der Kontrolle des stark konstitutiven Cytomegalovirus(CMV)-Promotors. Die Expression des Markergens kann in lebenden Zellen quantifiziert werden. Verschiedene Gliomzellkulturen (9L, J3T, T98, U87, U87 $\Delta$ EGFR), kultiviert als Monolayer in 12-well Platten mit entsprechendem Medium, wurden mit den Liposomen-DNA-Komplexen (Lipoplexe) 6-18 h transfiziert. Die Markergenexpressionen (EGFP) wurden 24 h nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert und anhand der FACS-Analysen (*fluorescence-activated cell sorting*) quantifiziert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte, indem der prozentuale Anteil transfizierter (grüne Fluoreszenz) und untransfizierter (keine Fluoreszenz) Zellen ermittelt wurde. Dafür wurden Quantenstatistiken in Bereichen positiver, transfizierter Zellen in Dotplots der gemessenen Proben durchgeführt (Abb. 8 B). In dieser Vorgehensweise erfolgte die Auswertung aller am FACS quantifizierten Zellen.

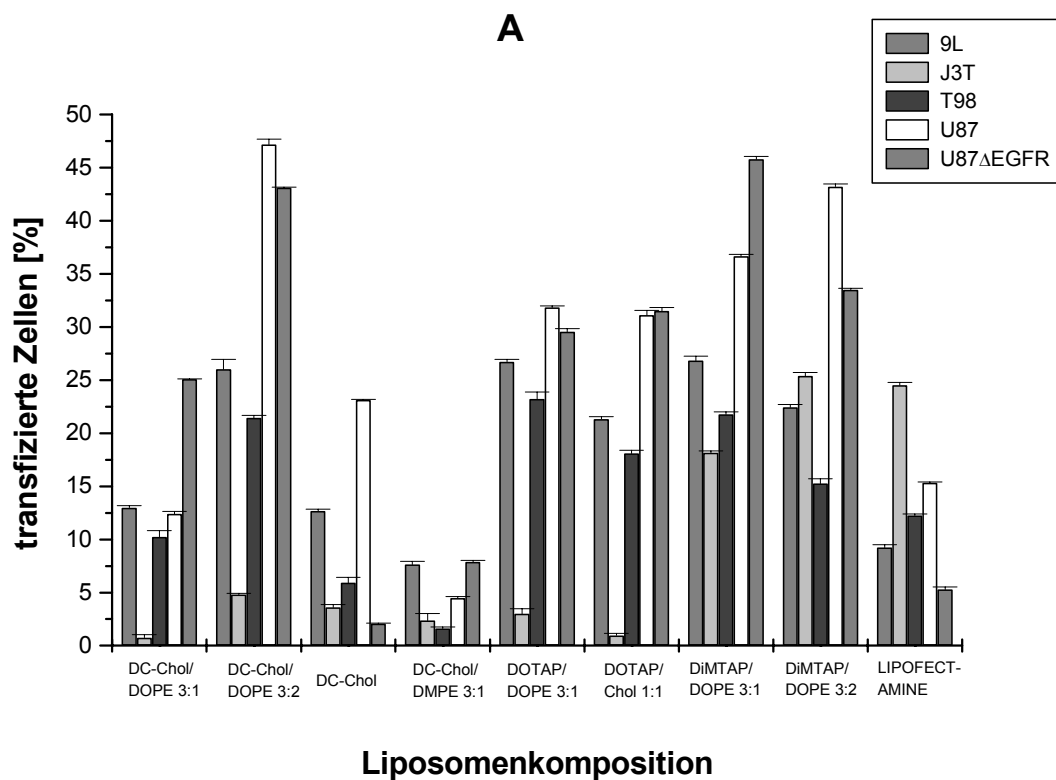


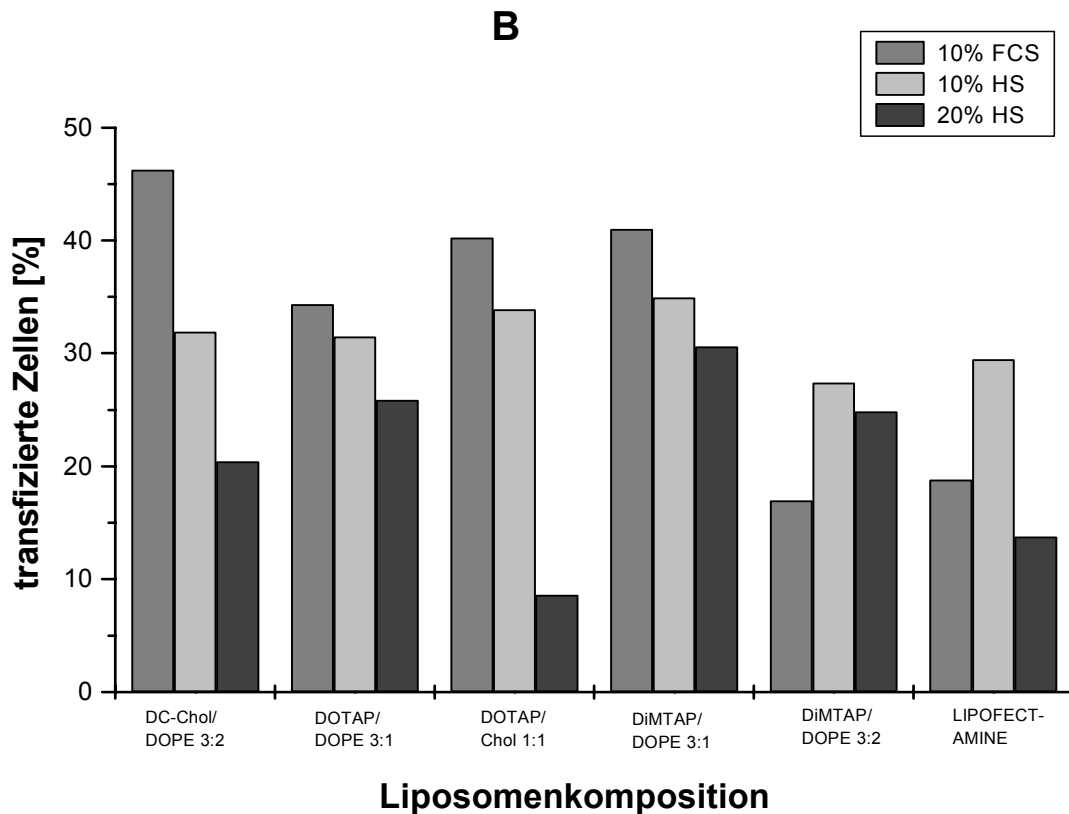
**Abb. 8: FACS-Dotplot - Images von U87  $\Delta$ EGFR-Zellen. (A) Negativkontrolle (untransfizierte Zellen). (B) Zellen, die mit DC-Cholesterol/DOPE 3:2 Liposomen und der pEGFP-N3 Vektor-DNA in serumfreiem Medium transfiziert wurden. FL1-H detektiert grün fluoreszierende Zellen und FL2-H orangefluoreszierende Zellen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware CELLQuest (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg).**

Um die Liposomen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen anzuwenden, wurden ausgewählte hergestellte Präparationen in Zellkultur unter serumhaltigen Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen fetalem Kälberserum (FCS) und Humanserum (HS)

getestet und optimiert. Die Transduktionseffizienzen der synthetisierten Liposomen unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen wurden charakterisiert und untereinander bzw. mit LIPOFECTAMINE™ verglichen.

In Abhängigkeit der verschiedenen getesteten Liposomentypen variierten die Transfektionsraten deutlich aufgrund der unterschiedlichen Strukturen der kationischen Lipide bzw. der Kombination mit den neutralen Lipiden (DOPE, DMPE oder Cholesterol; Abb. 9). Die besten Resultate zeigten DC-Cholesterol/DOPE 3:2 und DiMTAP/DOPE 3:1 im Gegensatz zu DC-Cholesterol/DMPE 3:1, DC-Cholesterol ohne neutrales Helferlipid und LIPOFECTAMINE™ mit den niedrigsten Transfektionsraten in serumfreiem Medium (Abb. 9 A). Aufgrund der Abwesenheit von Serumproteinen, die den Liposomen-DNA-Komplex in seiner Reifung beeinträchtigen und blockieren können (YANG UND HUANG, 1997; LI *et al.*, 1999), erwiesen die Liposomenstudien unter serumfreien Bedingungen generell höhere Transfektionsraten, obwohl die monovalente (monokationische) Präparation DiMTAP/DOPE 3:1 sogar in 20% (v/v) HS noch eine bemerkenswerte Transfektionseffizienz von 30,6% zeigte (Abb. 9 B).



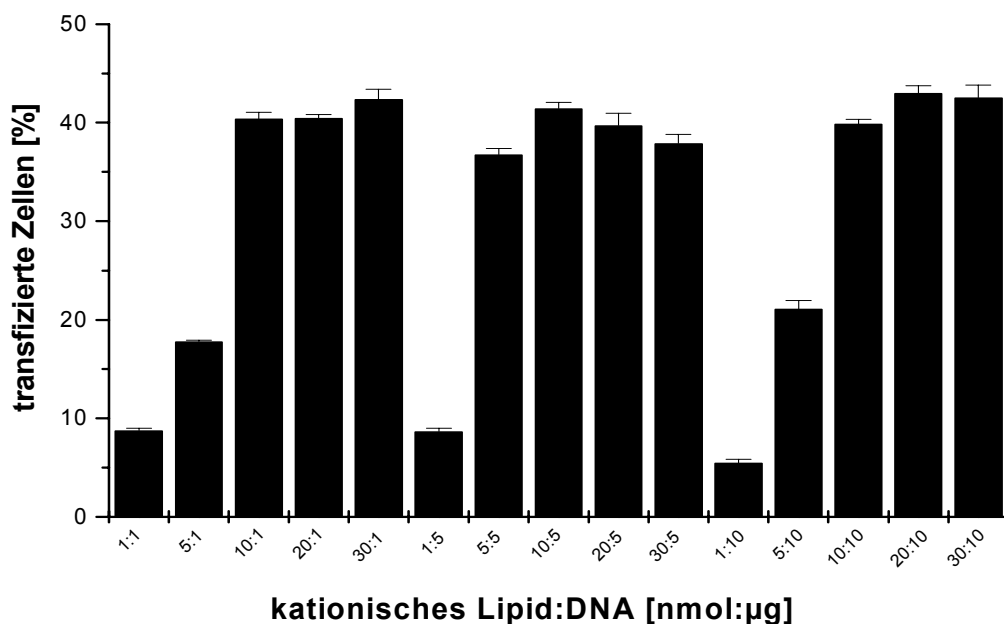


**Abb. 9:** Darstellung der Transfektionsraten: (A) verschiedener Gliomzellen: 9L (Rattengliosarkom), J3T (Hundeglioblastom), T98 (humanes Glioblastom), U87 (humanes Glioblastom), U87 $\Delta$ EGFR (humanes Glioblastom mit deletiertem *epidermal growth factor receptor EGFR*) mit synthetisierten kationischen Liposomen in serumfreiem Medium (OPTIMEM<sup>®</sup>) (vorherige Seite) und (B) von U87 $\Delta$ EGFR-Zellen in 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 10% bzw. 20% Humanserum (HS). Das Verhältnis der kationischen Lipide zur pEGFP-N3 Vektor-DNA im Liposomen-DNA-Komplex beträgt 10:1 (nmol: $\mu$ g). Die Messungen erfolgten in 3fach Bestimmungen und die Daten wurden mit der PC Software Microcal<sup>™</sup> Origin 5.0 für Windows<sup>®</sup> (Microcal Software, Inc., USA) statistisch ausgewertet und mit LIPOFECTAMINE<sup>™</sup> verglichen. DC-Chol - 3  $\beta$  [N-(N', N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol-hydrochlorid, DiMTAP - 1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropan, DOTAP - 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan, Chol - Cholesterol, DMPE - Dimyristoylphosphatidylethanolamin, DOPE - Dioleoylphosphatidylethanolamin.

In serumfreiem Medium führte eine dreifache Konzentrationserhöhung des kationischen Lipids (10 bis 30 nmol) in den Liposomen-DNA-Komplexen mit ausgewählten Liposomen, wie DC-Cholesterol/DOPE 3:2 (Abb. 10) oder DiMTAP/DOPE 3:1 bzw. 3:2 (Daten nicht gezeigt) zu keiner signifikanten Transfektionsverbesserung. Diese Ergebnisse decken sich mit Transfektionsexperimenten, die unter serumhaltigen Bedingungen, wie z.B. mit 20% HS, durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigte die Erhöhung der Plasmid-DNA-Konzentration (1–10  $\mu$ g) bei jeweils gleichbleibender getesteter DC-Cholesterol/DOPE 3:2

Konzentration in serumfreiem Medium (Abb. 10) wie unter serumhaltigen Bedingungen (Daten nicht gezeigt) ebenfalls keine Transfektionssteigerung. Zusätzliche Experimente im Bereich der Konzentrationen von 1 bis 10 nmol des kationischen Lipids bei jeweils gleichbleibender DNA-Konzentration im Liposomen-DNA-Komplex resultierten dagegen in einer signifikanten Erhöhung der Markergenexpression (Abb. 10), da z.B. bei einer DNA-Konzentration von 10  $\mu\text{g}$  eine Liposomenverzehnfachung (1 auf 10 nmol) zu einer 7fachen Transfektionssteigerung (5,5% auf 39,9%) führte.

Die FACS-Daten transfizierter U87 $\Delta$ EGFR-Zellen mit 1  $\mu\text{g}$  zirkulärer bzw. linearer DNA, komplexiert mit 10 nmol DC-Cholesterol/DOPE 3:2 in serumfreiem Medium, wiesen auf keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Kationische Liposomen, die mit dem neutralen Lipid DOPE im Verhältnis 1:3 hergestellt wurden, besaßen kaum Gentransfer-effizienzen, da ihre Transfektionsraten unter 3% blieben (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 10:** Darstellung der Transfektionsraten von U87 $\Delta$ EGFR-Zellen mit der kationischen Liposomenpräparation DC-Cholesterol/DOPE 3:2 in serumfreiem Medium. Das Verhältnis des kationischen Lipids DC-Cholesterol und der pEGFP-N3 Vektor-DNA im Liposomen-DNA-Komplex ist in der X-Achse dargestellt. Die Messungen erfolgten in 3fach Bestimmungen und die Daten wurden mit der PC Software Microcal™ Origin 5.0 für Windows® (Microcal Software, Inc., USA) statistisch ausgewertet.

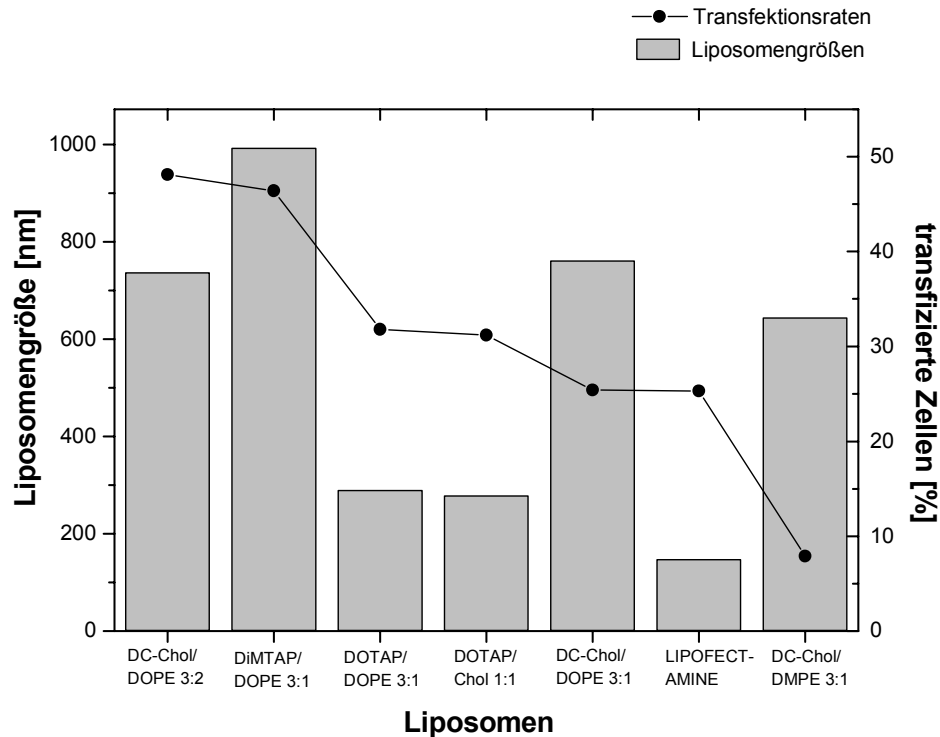
Generell führten Transfektionen mit selbst synthetisierten kationischen Liposomen zu höheren Genexpressionsraten unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen im Vergleich zur kommerziellen Präparation LIPOFECTAMINE™. Eine optimale Transfektion ergab sich mit einem Verhältnis von 10:1 (nmol:µg) des kationischen Lipids zur Plasmid-DNA nach 6 h Kontakt der kultivierten Zellkulturen mit den Lipoplexen. Transfektionen, die über Nacht durchgeführt wurden bzw. bei denen die Zellen mehr als 6 h mit den Lipoplexen in serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium inkubiert wurden, zeigten keine Transduktionsverbesserungen.

Die Ergebnisse der synthetisierten Liposomenpräparationen, die zur *in vivo*-Anwendung in Gliomzellkulturen unter Einsatz von Humanserum getestet wurden, zeigen, dass eine Erhöhung der Liposomenkonzentration nur bis zu einer bestimmten Dosis (10 nmol), die außerhalb einer für die Zellen toxischen Grenze liegt, signifikant die Transfektionsraten der Tumorzellen verbessert, wogegen eine Konzentrationserhöhung der Plasmid-DNA keinen Einfluss auf die Verbesserung der liposomalen Transfereffizienzen ausübte.

### **3.3. TRANSFEKTIONS RATEN IN ABHÄNGIGKEIT VON LIPOSOMENGRÖßEN**

Der Vergleich der mittels Streulichtanalyse gemessenen Liposomengrößen in Verbindung mit den ermittelten liposomalen Transfektionsraten führte zu keiner ersichtlichen Tendenz, d.h. es bestand keine eindeutige Abhängigkeit zwischen Größe und Transduktionsvermögen der Liposomen. Das beweist die in Abb. 11 wiedergegebene Aufstellung, da keine systematische Zuordnung der liposomalen Größen zu deren Markergenexpressionen in den getesteten Gliomzellkulturen erfolgen kann.

Weiterhin ergaben die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen des in Zellkultur effektivsten Liposomenpräparates DC-Cholesterol/DOPE 3:2 eine durchschnittliche Größe von 642 nm, im Gegensatz zur Streulichtanalyse mit 737,6 nm.



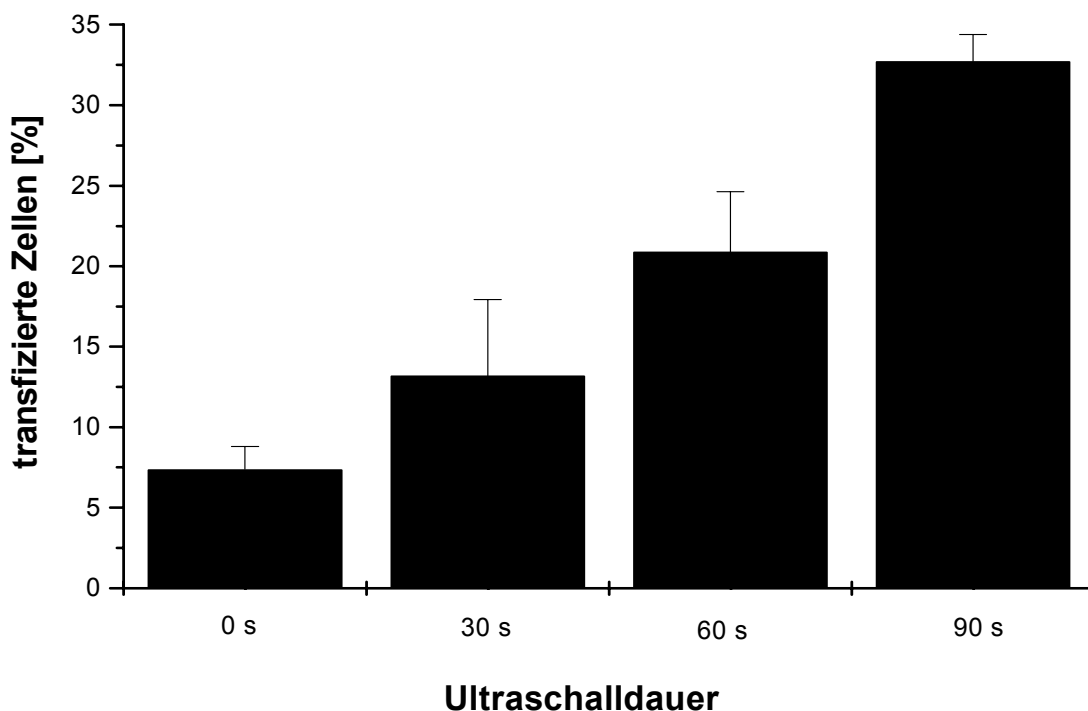
**Abb. 11: Höchste Markergenexpressionen ausgewählter Liposomen in Zellkultur im Vergleich zu ihren durchschnittlichen Größen.** Die Transfektionsraten wurden am FACS ermittelt und die Liposomengrößen mittels Streulichtanalyse gemessen.

### 3.4. ULTRASCHALLSTUDIEN

Ultraschall (US) unterstützt bzw. verbessert den liposomalen Gentransfer in eukaryontische Zellen. Aus diesem Grund wurde der Effekt eines 2 MHz fokussierten US auf den Liposomen unterstützten DNA-Transfer in Hirntumorzellen (Gliome) *ex vivo* untersucht und optimiert.

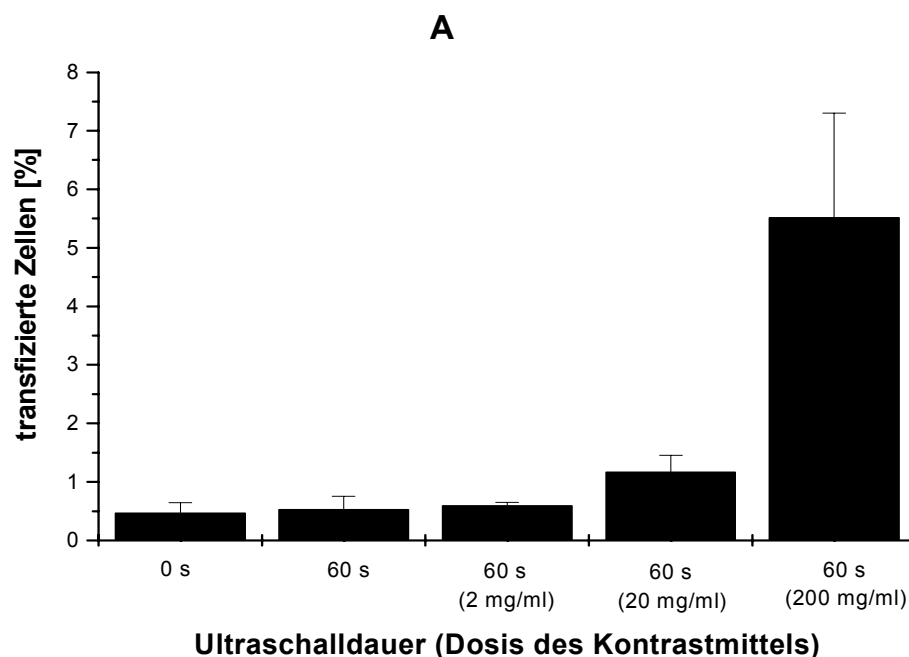
Für US-Anwendungen in den Transfektionsexperimenten mit LIPOFECTAMINE™ und der pEGFP Vektor-DNA wurden die Rattentumorzelllinie 9L und die Hundetumorzelllinie J3T verwendet. Die 9L-Zellen wurden in 12-well Platten kultiviert, wobei bei den US-Experimenten Reflexionen am Boden der Kulturplatten auftraten. In den Zellkammern der gesondert angefertigten US-Absorptionskammer wurden 9L- und J3T-Zellen auf einer Polypropylenmembran als Monolayer kultiviert, um US-Reflexionen zu vermeiden. Der gepulste US wurde mittels eines Doppler-Ultraschallgerätes, das für transkranielle

Ultraschalldiagnostik verwendet wird, mit einer 2 MHz-Sonde appliziert. Eine Stunde nach der Zugabe der Lipoplexe mit einem Verhältnis des kationischen Lipids zur Plasmid-DNA von 10:1 (nmol:µg) wurden die 9L-Zellen, die auf den 12-well Platten kultiviert wurden, für 30, 60 und 90 Sekunden dem Ultraschall exponiert. Die Markergenexpressionen des EGFP wurden 24 h nach der Transfektion bzw. der Ultraschallapplikation mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert und mittels FACS-Analyse quantifiziert. Bei der Tumorzelllinie 9L führte die Applikation von US zu einer signifikanten Transfektionsverbesserung mit LIPOFECTAMINE™. Die FACS-Analysen zeigten durchschnittliche Werte von 13,2% (30 s US), 20,9% (60 s US) und 32,7% (90 s US) Markergenexpression gegenüber transfizierten Kontrollzellen (ohne US) mit 7,4% (Abb. 12). Die Bestimmungen der Zellviabilitäten mit Trypanblau gaben Aufschluss darauf, dass US-Anwendungen von 90 Sekunden, im Gegensatz zu 30 und 60 Sekunden, zum Zelltod bei mehr als 80% der Gliomzellen führte (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen resultierte, dass der auf 9L-Tumorzellen, kultiviert in 12-well Platten, für 60 Sekunden applizierte US die stärkste Transfektionsverbesserung ohne Zellschaden hervorruft.

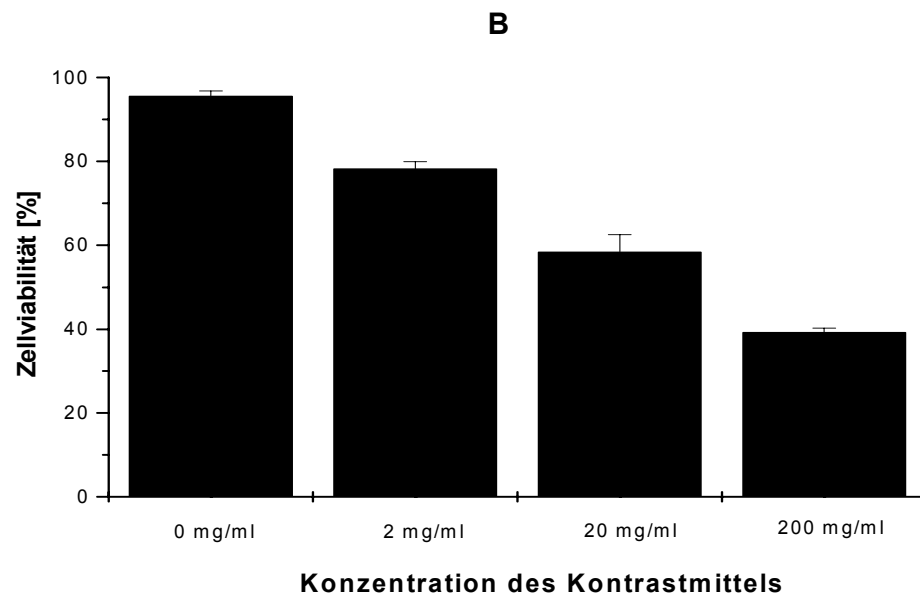


**Abb. 12:** Darstellung der Transfektionsraten nach Ultraschallapplikation (gepulster US, 2 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>) der in 12-well Platten kultivierten 9L-Zellen (Rattentumorzelllinie), die mit der kommerziell verfügbaren Liposomenpräparation LIPOFECTAMINE™ in OPTIMEM® transfiziert wurden. Die Differenzen zwischen der Kontrollgruppe (kein US) und den US-exponierten Gruppen sind statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

In der Absorptionskammer (Abb. 4 in 2.4.4.3.) wurden die Rattentumorzelllinie 9L und die Hundetumorzelllinie J3T dem Ultraschall ausgesetzt, wobei ultraschallbedingte Kavitationen und Reflexionen durch Absorption des US mittels Rizinusöl vermieden wurden. Es wurde mit der optimalen Ultraschalldauer von 60 Sekunden beschallt. Unter diesen Bedingungen kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Transduktionsraten durch US-Einwirkung (Abb. 13 A), was ein wichtiger Hinweis auf die Rolle von Kavitations- und Reflexionsphänomenen *in vitro* ist. Deshalb erfolgten in der Absorptionskammer zusätzliche Experimente mit dem Ultraschall-Kontrastmittel (KM) Levovist®, da Levovist® (Gasbläschen aus Galaktose und Palmitinsäure zur Stabilisierung) in klinischen Anwendungen zur intravenösen Applikation als Doppler-Signalverstärkung der Kavitationseffekte genutzt wird. Die Zugabe des KM Levovist® (2 mg/ml, 20 mg/ml und 200 mg/ml) während der US-Exposition (60 s) führte nun wiederum zu einer signifikanten Verbesserung der Transfektion von 0,5% der Markergenexpression in Kontrollzellen (ohne US) und 0,6% (US ohne KM bzw. US mit 2 mg/ml KM) über 1,2% mit 20 mg/ml KM auf 5,5% transgener Expression mit 200 mg/ml KM (Abb. 13 A). Jedoch war dabei zu erkennen, dass die Viabilität der Zellen, denen Kontrastmittel während der Beschallung verabreicht wurde, mit steigender Levovist®-Konzentration signifikant abnahm. Abbildung 13 B zeigt, dass die Lebensfähigkeit der Hundegliomzellen, die mit US und KM behandelt wurden, deutlich geringer war (39,3% mit 200 mg/ml KM, 58,5% mit 20 mg/ml KM und 78,3% mit 2 mg/ml KM), im Vergleich zur Überlebensrate der nicht-beschallten Kontrollzellen (95,7%).







**Abb. 13: (A) Darstellung der Transfektionsraten von J3T-Zellen, transfiziert mit LIPOFECT-AMINE™ in OPTIMEM® nach Ultraschallapplikation in der Absorptionskammer mit und ohne US-Kontrastmittel (Levovist®) (vorherige Seite). (B) Zellviabilität der J3T-Zellen in der Absorptionskammer nach Ultraschall und Kontrastmittelzugabe in verschiedenen Konzentrationen.** Die Differenzen (A) zwischen den Kontrollgruppen (kein US und 60 s US ohne KM) und der Gruppe mit 200 mg/ml Levovist® und (B) zwischen der Kontrolle (0 mg/ml KM) und den Gruppen mit 20 mg/ml bzw. 200 mg/ml Levovist® sind statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Kavitationseffekte, die durch US hervorgerufen werden, die liposomal unterstützte Gentransfereffizienz in Tumorzellkulturen verbessern, aber gleichzeitig den Zelltod durch Membranschäden einleiten.

### 3.5. EINKAPSELUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN

#### – ZELLIMMOBILISIERUNG

Die Anwendung einer weiteren innovativen Strategie der nichtviralen Gentherapie maligner Hirntumoren fand in der Zellimmobilisierung bzw. Einkapselung therapeutischer Vektoren tragender, eukaryontischer Zellen mit Alginateinsatz. Die Mikroverkapselung mit dem natürlich vorkommenden Polymer Alginate wurde durch Vernetzung in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit Hilfe

von drei unterschiedlichen Einkapselungstechniken initiiert. Es wurden die *vibrating nozzle*-Methode, die selbst entwickelte Gasextrusion-Methode (*AirJet*) und die Technologie des kürzlich entwickelten *JetCutters*, hinsichtlich des Zellwachstums in Kapseln mit Durchmessern <300 µm, der Zellüberlebensfähigkeit und der mechanischen Eigenschaften der Mikrokapseln getestet, optimiert und untereinander verglichen. Die Zellen wurden dazu mit einer Alginat-poly-L-Lysin-Alginat(APA)-Membran immobilisiert, wobei Alginatlösungen mit unterschiedlichen Viskositäten eingesetzt wurden. Ein 1,0 bis 2,0%iges Alginat diente zur Herstellung der soliden Kapseln bzw. Perlen. Die Beschichtung mit PLL gewährleistete die physikalische Festigkeit der Mikrokapseln und ein niedriger konzentriertes Alginat (0,1% bis 0,03%ig) bildete nach Herauslösen des Alginatkerns mit Na<sub>3</sub>-Citrat die äußere, stabilisierende Membran der beschichteten Hohlkapseln.

### **3.5.1. Alginatzytotoxizität**

Eine Zytotoxizitätsstudie der eingesetzten Alginatkonzentrationen von 0,03 bis 2,0% zeigte, dass keine der Polymerlösungen, weder Inotech- noch Fluka-Alginat, die Adhärenz der später einzukapselnden Zellen (J3T, BHK,  $\psi$ -CRIP und GLI 328) beeinträchtigte und die Zellen von den Kulturplatten ablöste, da keine toxische Wirkung bzw. Zellschäden oder sogar Zelltod induziert wurden. Das bedeutet, dass die Alginatlösungen uneingeschränkt zur Mikroinkapselung lebender Säugerzellen eingesetzt werden konnten.

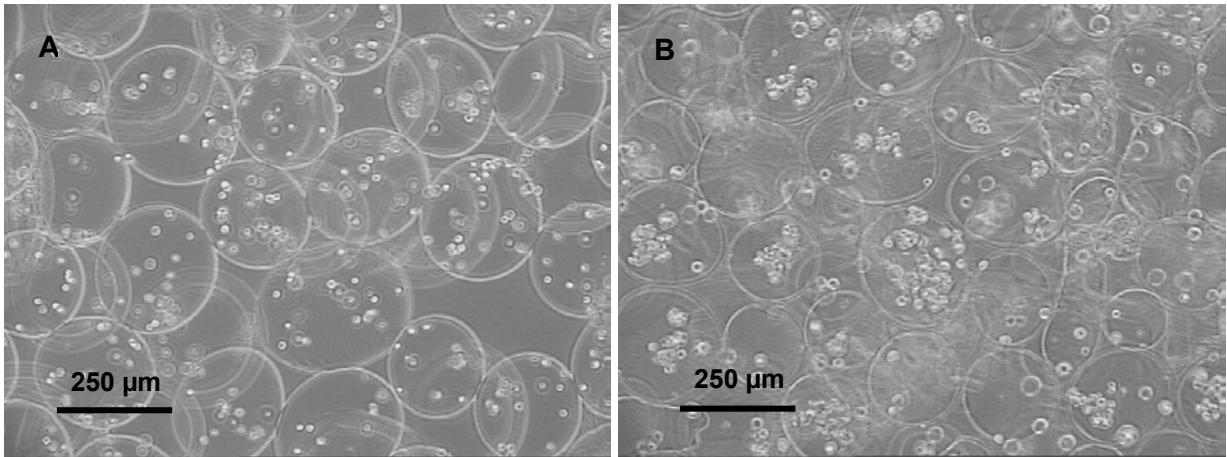
### **3.5.2. *Vibrating nozzle*-Methode**

#### **3.5.2.1. Kapselherstellung und Größenverteilung**

Um in kürzester Zeit Aussagen über die Größenverteilung und die Stabilität der Mikrokapseln treffen zu können bzw. die Geräteparameter zu optimieren, wurden für die Mikroverkapselung lebender Zellen anfangs die schnell proliferierende Hundegliomzelllinie J3T bzw. die Hamsterfibroblasten BHK verwendet. Für eine spätere Anwendung eingekapselter Zellen als Träger eines toxischen Transgens (HSV-Thymidinkinase) zur Applikation in einem Rattengliommodell wurden anschließend die Retrovirus(RV)-Vektor produzierenden Zelllinien  $\psi$ -CRIP bzw. GLI 328 immobilisiert. Die Zelllinien wurden mit den Alginatlösungen suspendiert und unter Einsatz des Inotech Encapsulator™ eingekapselt.

J3T- bzw. BHK-Zellen wurden ausschließlich mit 1,5%igem Inotech-Alginat immobilisiert und die äußere Alginatschicht wurde aus 0,03%igem Inotech-Alginat gebildet (Abb. 14). Die

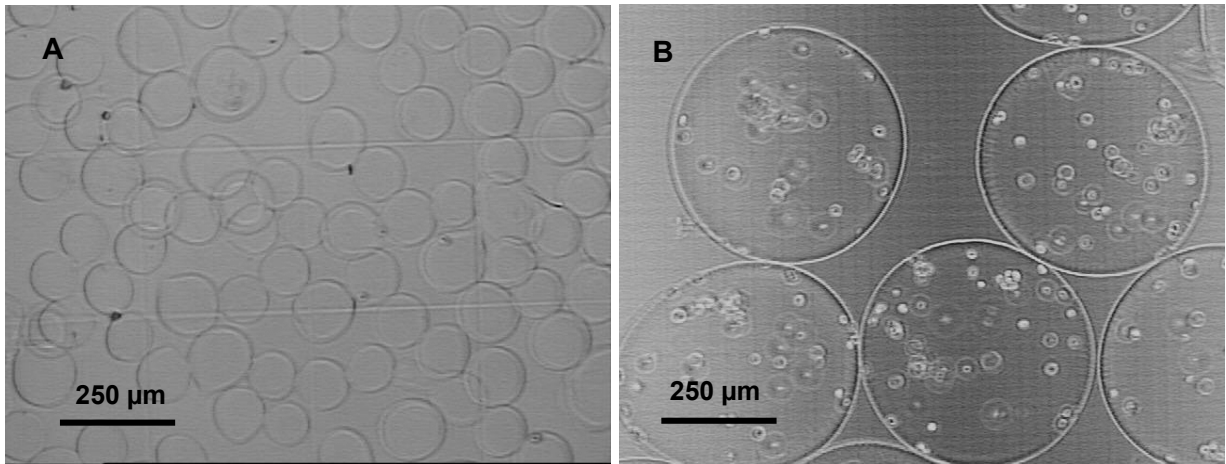
Einkapselungschargen resultierten in Kapselgrößen von 200 bis 250  $\mu\text{m}$  (maximal 300  $\mu\text{m}$ ) mit Hilfe einer 120  $\mu\text{m}$ -Düse.



**Abb. 14: Mikroskopische Abbildungen von APA-Mikrokapseln mit frisch immobilisierten J3T-Hundegliomzellen (A) und BHK-Fibroblastenzellen (B) in 1,5%igem Inotech-Alginat, die am Inotech Encapsulator™ mit einer 120  $\mu\text{m}$ -Düse hergestellt wurden. Die Beschichtung der Mikrokapseln erfolgte mit 0,03%igem Inotech-Alginat. Originalvergrößerung: 120x.**

Die J3T-Zellen wurden weiterhin dafür eingesetzt, die Abhängigkeit der Größe der Kapseln von der Düsendgröße zu testen und um Aussagen treffen zu können, ob eine Größenabhängigkeit der APA-Mikrokapseln zur Zellproliferationsgeschwindigkeit besteht und korreliert. Eine einmalige Perlenherstellung aus 1,5%igem Inotech-Alginat ohne Zellen mit einer 50  $\mu\text{m}$  großen Düse resultierte in  $\text{Ca}^{2+}$ -vernetzten Kapseln mit Größen von maximal 120  $\mu\text{m}$  (Abb. 15 A) und konnte nicht reproduziert werden. Außerdem führte der Einsatz von Zellen zu einer Zusetzung der Düse, die durch Anwendung niedriger Alginatkonzentrationen bzw. durch Einsatz einer geringeren Zellmenge nicht zu eliminieren war. Dagegen konnten mit Hilfe einer 200  $\mu\text{m}$ -Düse etwa 400 bis 500  $\mu\text{m}$  große Perlen aus 1,5%igem Inotech-Alginat mit J3T-Zellen produziert werden (Abb. 15 B).

Diese bisherigen Ergebnisse bestätigen die Aussage (Dr. Heinzen, Inotech AG, Schweiz; pers. Mitteilung), dass die resultierenden Kapselgrößen im Idealfall aus der doppelten Größe der vibrierenden Düse hervorgehen.

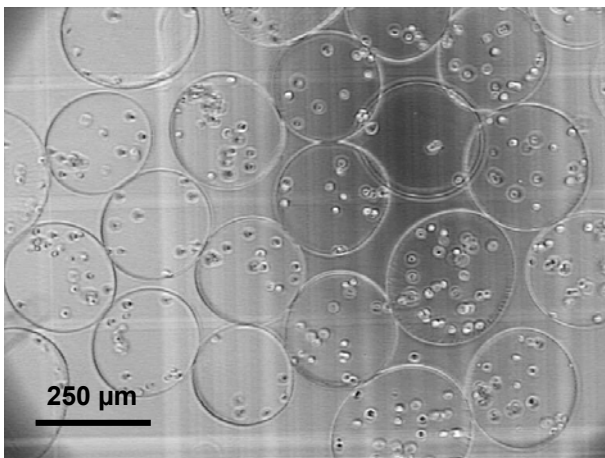


**Abb. 15:** Mikroskopische Abbildungen von Alginatperlen und APA-Mikrokapseln, die aus 1,5%igem Inotech-Alginat hergestellt wurden. (A) Alginatperlen ohne Zellen, hergestellt mit einer 50 µm-Düse. (B) Frisch immobilisierte Zellen in APA-Mikrokapseln, die mit einer 200 µm-Düse hergestellt wurden. Originalvergrößerung: 120x.

Um die Größenverteilungen der Mikrokapseln zu optimieren, wurden die Geräteeinstellungen, wie Frequenz, Flussrate des Alginates usw., am Encapsulator™ getestet und variiert. Daraus konnten die Parameterdaten, die in Tabelle 6 wiedergegeben sind, abgeleitet werden, um eukaryontische Zellen in Kapseln <300 µm zu immobilisieren. Diese Einstellungen führten dazu, dass homogene Mikrokapseln in engen Verteilungen mit durchschnittlichen Größen von 250 µm mit dem 1,5%igem Alginat (Inotech) erhalten werden konnten (Abb. 16). Eine 120 µm-Düse konnte für Mikroverkapselungen der Fibroblastenzellen  $\psi$ -CRIP und GLI 328 eingesetzt werden, um ideale Kapselgrößen reproduzierbar herzustellen. Dabei erbrachten geringe Düsenfrequenzen (<2,0 kHz) und höhere Frequenzen (>2,0 kHz) in Kombination mit einer geringeren Alginatflussrate (130 ml/h) sehr variierende Kapselgrößen. Im Gegensatz dazu konnten mit einer höheren Alginatflussrate (240 ml/h) und synchron angewendeten höheren Frequenzen uniforme Kapseln mit geringen Größen (<300 µm) produziert werden.

**Tab. 6: Parameter des Inotech-Encapsulator™ IER-40 zur Perlenproduktion aus 1,5%igem Inotech-Alginat mit Zellen.**

<b>Flussrate des Alginates (20 ml Spritze)</b>	240 ml/h (2 Einheiten)
<b>Durchmesser der Düse</b>	120 $\mu\text{m}$
<b>Schwingungsfrequenz der Düse</b>	2.900 Hz
<b>elektrostatisches Potential</b>	1,8 kV
<b>Amplitude der Schwingung</b>	80%
<b>resultierende durchschnittliche Kapselgrößen</b>	250 $\mu\text{m}$



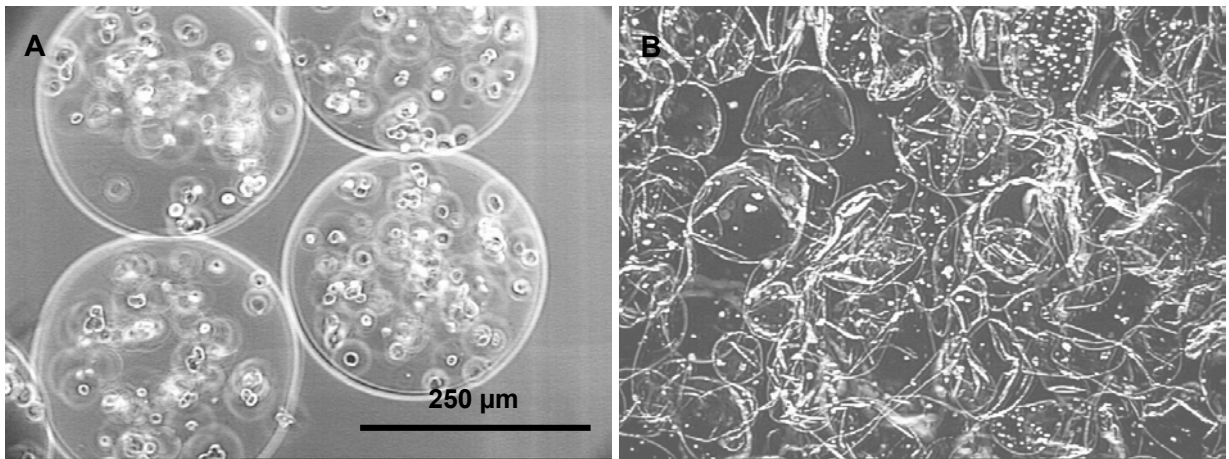
**Abb. 16: Mikroskopische Abbildung der Größenverteilung von APA-Mikrokapseln mit frisch immobilisierten Zellen, die mit der 120  $\mu\text{m}$ -Düse hergestellt wurden. Die Perlenproduktion fand mit den in Tabelle 6 aufgelisteten Parameter statt. Originalvergrößerung: 120x.**

Nach Optimierung der Encapsulator™-Parameter mit Hilfe der malignen Gliomzellen J3T und normalen Hamsternierenfibroblasten (BHK) wurden die RV-Vektor produzierenden Zelllinien  $\psi$ -CRIP und GLI 328 eingesetzt. Die  $\psi$ -CRIP-Zellen wurden mit 1,5%igem Alginat (Inotech) immobilisiert und die erhaltenen Perlen mit 0,03%igem Alginat (Inotech) beschichtet. Bei diesem Einkapselungsprozess resultierten Kapselgrößen von 200–250  $\mu\text{m}$ . Um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen Kapselgröße und Proliferationsausmaß der  $\psi$ -CRIP-

Zellen besteht, wurde mit Hilfe der 200  $\mu\text{m}$ -Düse immobilisiert, indem 400 bis 500  $\mu\text{m}$  große Perlen produziert wurden (nicht gezeigt).

An die Einkapselungen der  $\psi$ -CRIP-Zellen schlossen sich die Immobilisierungen der GLI 328-Fibroblasten an. Anfangs wurde mit 1,5%igem Inotech-Alginat eingekapselt. Um aufgrund des Zellwachstums die Stabilität der APA-Mikrokapseln zu erhöhen, wurden die Inotech-Perlen ausgehend von 0,03%igem Inotech-Alginat mit 0,03%igem Fluka- und mit 0,05% bzw. 0,1%igem (Abb. 17 A) Inotech-Alginat beschichtet. Für die Beschichtungen der Kapseln bewährte sich Fluka-Alginat als stabileres Hydrogel, da es im Gegensatz zum Inotech-Alginat ein höheres Molekulargewicht besitzt und bei gleichen Konzentrationen ist eine höhere Viskosität der Fluka-Lösung vorhanden. Eine weitere Modifizierung der Kapselmembran erfolgte, indem die mit 0,03%igem Alginat (Inotech) beschichteten Kapseln erneut mit PLL und 0,03%igem Alginat (Inotech) stabilisiert wurden. Um später die verschiedenen Beschichtungsvarianten der Mikrokapseln hinsichtlich ihrer Festigkeit in Verbindung mit dem zellimmobilisierenden Alginat beurteilen zu können, wurden die Fibroblasten GLI 328 außerdem mit dem stabileren Fluka-Hydrogel (1,5%ig) eingekapselt.

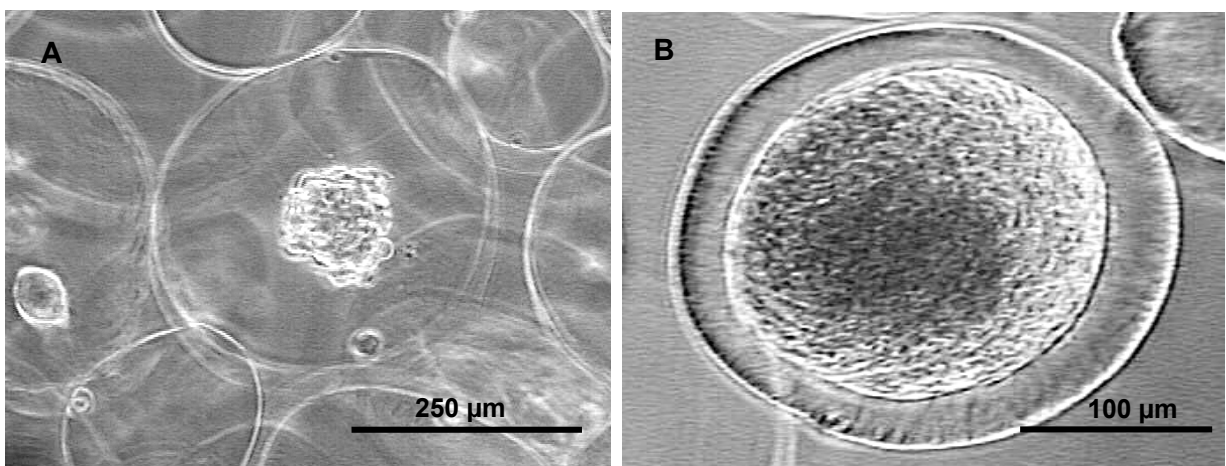
Beide Alginate (Inotech- und Fluka-Alginat) besaßen jeweils unterschiedliche Molekulargewichte, was Auswirkungen auf die Viskositäten ihrer wässrigen Lösungen hatte. Allerdings konnte aufgrund der höheren Viskosität des 1,5%igen Fluka-Alginates (ca. 0,5 Pa·s gegenüber dem 1,5%igen Inotech-Alginat mit einer Viskosität von  $<0,1$  Pa·s (KOCH *et al.*, eingereicht) keine Perlenbildung mit der Inotech-Einkapselungsmethode, weder mit den IER-40-Parametereinstellungen, mit denen 1,5%ige Inotech-Perlen hergestellt werden konnten, noch nach Variierung der verschiedenen Parameter, erzielt werden (Abb. 17 B). Aus diesem Grund wurde mit 1,0%igem Fluka-Alginat (0,2 Pa·s; KOCH *et al.*, eingereicht) immobilisiert. Die Beschichtung erfolgte diesmal nur mit dem stabileren Hydrogel (Fluka-Alginat, 0,03%ig). Die Verkapselungen der Fibroblastenlinie GLI 328 führten unter Einsatz der genannten Alginatkonzentrationen zu Kapselgrößen von 200 bis maximal 270  $\mu\text{m}$ . Da bezüglich der Kapselmembranstärken keine mikroskopischen Unterschiede zu erkennen waren, repräsentiert Abbildung 17 A alle der bisher erwähnten Beschichtungsvarianten für die GLI 328-Mikrokapseln.



**Abb. 17: Mikroskopische Abbildungen von APA-Mikrokapseln und deformierten Alginatperlen mit frisch immobilisierten GLI 328-Fibroblasten. (A) Immobilisiert mit 1,5%igem Inotech-Alginat, beschichtet mit 0,1%igem Inotech-Alginat. (B) Deformierte Alginatperlen aus 1,5%igem Fluka-Alginat. Originalvergrößerungen: 240x (A) und 40x (B).**

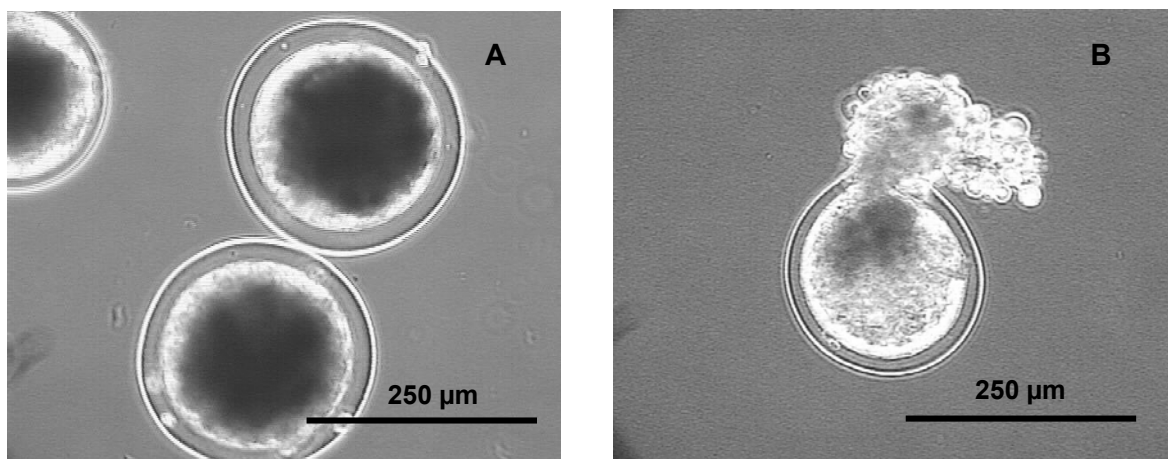
### 3.5.2.2. Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen

Die Beobachtung der Proliferationsrate der Hundegliomzelllinie J3T in 200 bis 300 µm großen Hohlkapseln zeigte, dass die J3T-Zellen in 4 Wochen zu einer großen Zellkugel aggregierten (Abb. 18 B). Weiterhin war ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen verwendeter Düsendröße und Zellproliferation besteht, denn die Teilung der J3T-Zellen in den 400 µm Kapseln führte bereits nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Wochen zum Heranwachsen einer großen, kapselfüllenden Zellkolonie (nicht gezeigt).



**Abb. 18: Immobilisierte J3T-Hundegliomzellen in 200–300 µm großen APA-Mikrokapseln, die in Standardmedium kultiviert wurden. (A) Nach 6 Tagen. (B) Nach 4 Wochen (vorherige Seite). Originalvergrößerungen: 240x (A) und 400x (B).**

Die mikroskopische Beobachtung der Proliferation der Hamsterfibroblasten (BHK-Zellen) erbrachte, dass die mit 0,03%igem Inotech-Alginat beschichteten Mikrokapseln nach etwa 4 bis 6 Wochen, in denen die BHK-Zellen das Kapselinnere ausfüllten bzw. sich eine große Zellkugel innerhalb der Hohlkapseln formierte (Abb. 19 A), zu platzen begannen (Abb. 19 B). Ein Beweis für die Viabilität der immobilisierten BHK-Zellen wurde erbracht, da die Zellen trotz Festigkeitsverlust vieler Mikrokapselmembranen am Kulturgefäßboden weiter proliferierten (nicht gezeigt). Das Gleiche wurde ebenfalls bei J3T-Zellen nach 6 Wochen beobachtet (nicht gezeigt). Daraus geht hervor, dass durch die Beschichtung mit 0,03%igem Inotech-Alginat die Stabilität der APA-Mikrokapseln hinsichtlich des Zellwachstumsmaßes nicht aufrecht erhalten werden konnte bzw. die geringe Widerstandsfähigkeit der äußeren Mikrokapselmembran war vermutlich eine Folge des hohen inneren Druckes, der wirkte.



**Abb. 19: Immobilisierte BHK-Zellen in APA-Mikrokapseln. (A) 4 Wochen in Standardmedium kultivierte Mikrokapseln. (B) Geplatze APA-Mikrokapsel nach 4 bis 6 Wochen. Die Kapseln wurden mit 0,03%igem Inotech-Alginat beschichtet. Originalvergrößerung: 240x.**

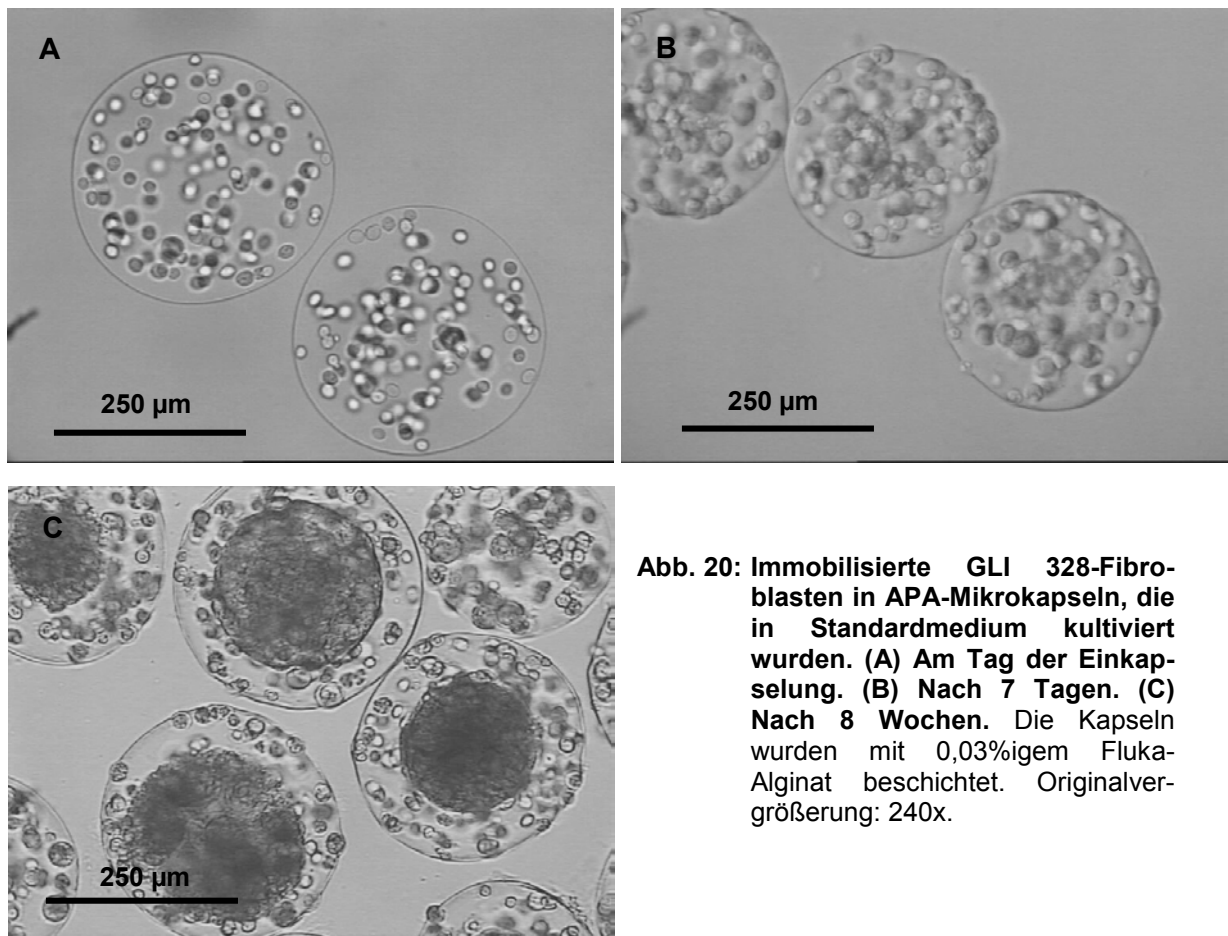


Aufgrund der Instabilität der mit 0,03%igem Inotech-Alginat beschichteten J3T- bzw. BHK-Kapseln wurde bei den weiteren Einkapselungsprozessen der RV-Vektor produzierenden Zelllinien  $\psi$ -CRIP und GLI 328 eine stringenter Beschichtung vorgenommen, um die Stabilität der Mikrokapseln weiter zu erhöhen.

Die  $\psi$ -CRIP-Zellen proliferierten weder in Kapseln, die mit der 120  $\mu\text{m}$ -Düse hergestellt wurden, noch in den größeren Kapseln, die mit der 200  $\mu\text{m}$ -Düse synthetisiert wurden. Da bereits eine Woche nach der Einkapselung ein Viabilitätsverlust der Zellen zu erkennen war (nicht gezeigt), kann in diesem Fall keine Auswertung bezüglich einer Korrelation zwischen Düsengröße und Zellproliferation erfolgen. Deshalb wurden keine weiteren Testungen zur Erhöhung der Festigkeit der Kapseln mit immobilisierten  $\psi$ -CRIP-Zellen vorgenommen.

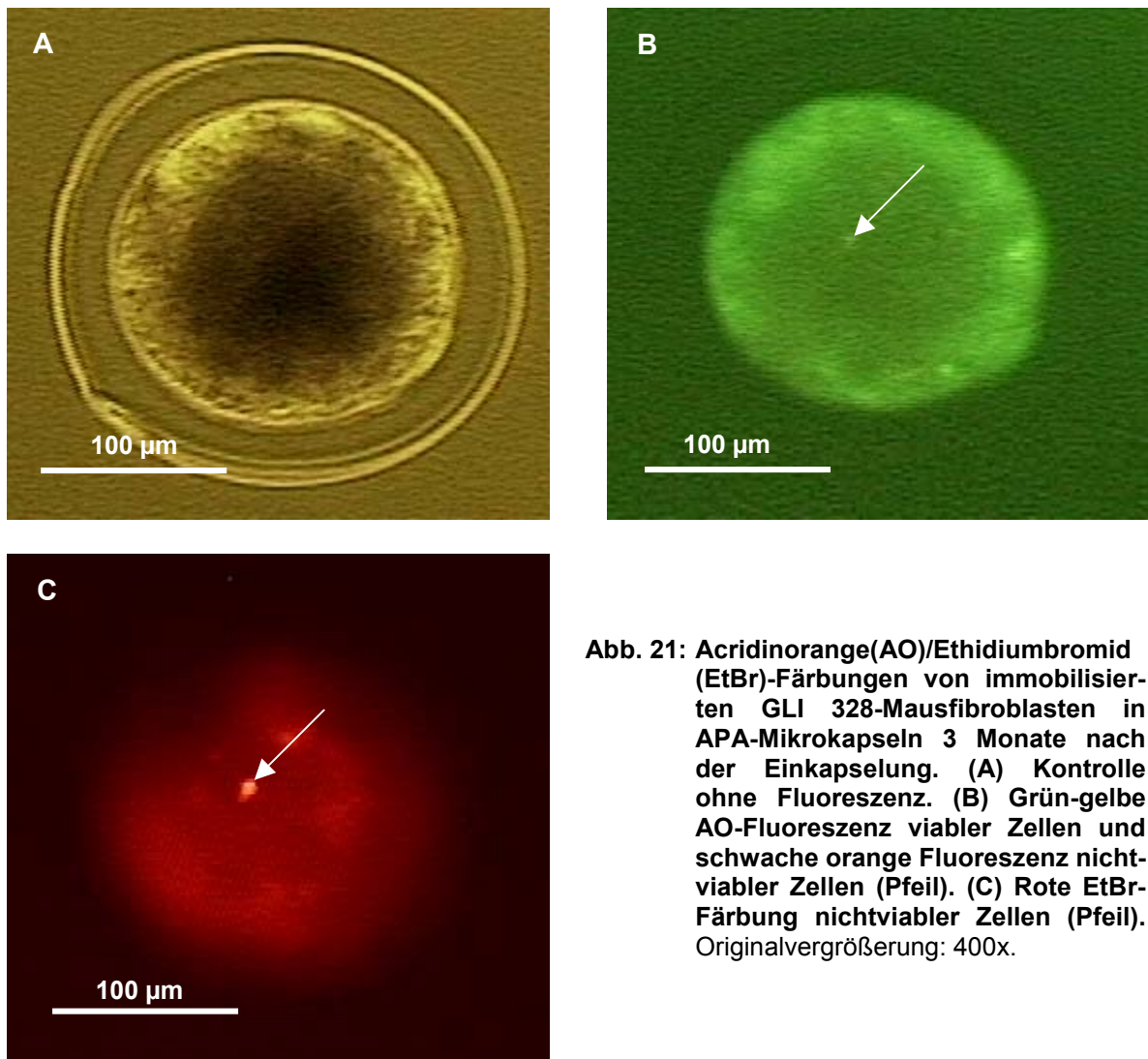
Das Wachstum der immobilisierten GLI 328-Fibroblasten in APA-Mikrokapseln bewies, dass bei Kapseln, die eine Alginatperlen-Beschichtung mit 0,05%igem Inotech-Alginat erfahren haben, im Vergleich zu Kapseln, die mit 0,03%igem Inotech-Alginat beschichtet wurden, keine Stabilitätsunterschiede festgestellt werden konnten (nicht gezeigt), da die Kapseln in beiden Fällen nach einem Monat ihre Festigkeit verloren hatten. Demzufolge lösten sich die Membranen auf und die viablen Zellen wurden aus den Mikrokapseln direkt ins Kulturmedium freigesetzt. Diese Instabilität wurde ebenfalls bei Mikrokapseln mit immobilisierten GLI 328-Zellen nach einem Monat beobachtet, die mit 0,1%igem Inotech-Alginat beschichtet wurden bzw. jeweils zwei alternierende Schichten aus PLL und 0,03%igem Inotech-Alginat besaßen (nicht gezeigt). Dagegen konnte erreicht werden, dass Kapseln, deren Membranen durch Beschichtung mit dem höhermolekularen Fluka-Alginat (0,03%) stabilisiert wurden, für 8 bis 10 Wochen (und mehr) ihre Festigkeit beibehalten haben, als die GLI 328-Zellen die Kapseln komplett ausgefüllt hatten (Abb. 20). Jedoch schien das Molekulargewicht bzw. die Viskosität der eingesetzten Alginat, aus dem die Perlen hergestellt wurden, die mechanische Stabilität der Mikrokapseln nicht zu beeinflussen. Es machte dabei keinen Unterschied, ob die Zellen mit 1,5%igem Inotech-Alginat oder 1,0%igem Fluka-Alginat immobilisiert wurden.

Aus all diesen Ergebnissen folgt, dass eine Verbesserung der Stabilität der APA-Mikrokapseln durch Beschichtung mit Hilfe eines Alginattyps höherer Viskosität, wie Fluka-Alginat (0,03%ig), erreicht werden konnte, denn Erhöhungen der Inotech-Alginatkonzentrationen (0,03-0,1%) bzw. alternierende Beschichtungen aus PLL und 0,03%igem Inotech-Alginat zeigten keinen Vorteil im Hinblick auf die Stabilität der Mikrokapselmembranen.



**Abb. 20: Immobilisierte GLI 328-Fibroblasten in APA-Mikrokapseln, die in Standardmedium kultiviert wurden. (A) Am Tag der Einkapselung. (B) Nach 7 Tagen. (C) Nach 8 Wochen. Die Kapseln wurden mit 0,03%igem Fluka-Alginat beschichtet. Originalvergrößerung: 240x.**

Das Wachstum bzw. die Viabilität der eingekapselten Zellen wurde zusätzlich mittels Acridinorange(AO)/Ethidiumbromid(EtBr)-Färbungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. AO-Färbungen zeigen eine uniforme Fluoreszenz entlang der Chromosomenarme, wobei AO durch Interkalation mit ds-Nukleinsäuren (DNA) zu einer gelb-grünen Kernfluoreszenz bei viablen Zellen und zu einer orange-roten zytoplasmatischen Fluoreszenz durch Bindung an ss-Nukleinsäuren (RNA) bei toten Zellen führt (RIGLER, 1966; RIGLER, 1969; RIGLER *et al.*, 1969; GENG *et al.*, 1996). Den Gegenbeweis zur orangen Fluoreszenz durch AO bei toten Zellen liefert die EtBr-Färbung, die die Zellkerne nichtviabler Zellen deutlich rot fluoreszieren lässt, da viable Zellen für EtBr nicht permeabel sind (GENG *et al.*, 1996). Die Viabilitätsuntersuchungen in dieser Arbeit zielten nicht auf die Bestimmung von Kern- bzw. Zytoplasmafärbungen einzelner Zellen, aber es konnten fluoreszierende viable und nicht-viable Zellkolonien, immobilisiert in Mikrokapseln, unterschieden werden. Aus den Viabilitätsfärbungen der immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten mit AO/EtBr konnte gezeigt werden, dass diese Zellen, mit Ausnahme einer kleineren Zellkolonie, für etwa 3 Monate in den intakten Kapseln lebensfähig waren (Abb. 21).



**Abb. 21:** Acridinorange(AO)/Ethidiumbromid (EtBr)-Färbungen von immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in APA-Mikrokapseln 3 Monate nach der Einkapselung. (A) Kontrolle ohne Fluoreszenz. (B) Grün-gelbe AO-Fluoreszenz viabler Zellen und schwache orange Fluoreszenz nichtviabler Zellen (Pfeil). (C) Rote EtBr-Färbung nichtviabler Zellen (Pfeil). Originalvergrößerung: 400x.

### 3.5.3. *AirJet*-Methode

#### 3.5.3.1. Kapselherstellung und Größenverteilung

Die Stabilität der mit Hilfe der *AirJet*-Methode (Abb. 22) produzierten Perlen wurde ebenfalls durch den Einsatz der Hundeglioblastomzelllinie J3T getestet. Zur Optimierung der *AirJet*-Parameter wurden anfangs Perlen ohne Zellen aus 1,5%igem Inotech-Alginat mit einem Stickstoffvolumenstrom von 2.500 l/h hergestellt, wobei es zur Deformation der Perlen beim Aufprall auf die Oberfläche der  $\text{CaCl}_2$ -Polymerisierungslösung kam (Abb. 23).

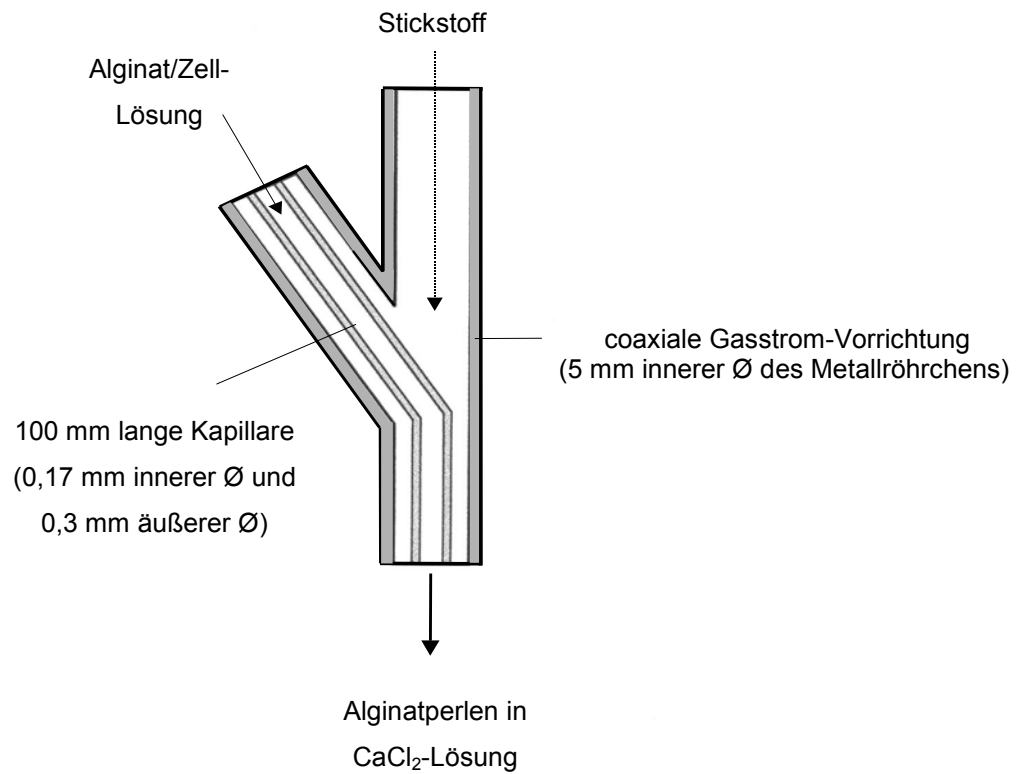


Abb. 22: Vereinfachte schematische Darstellung der *AirJet*-Methode.

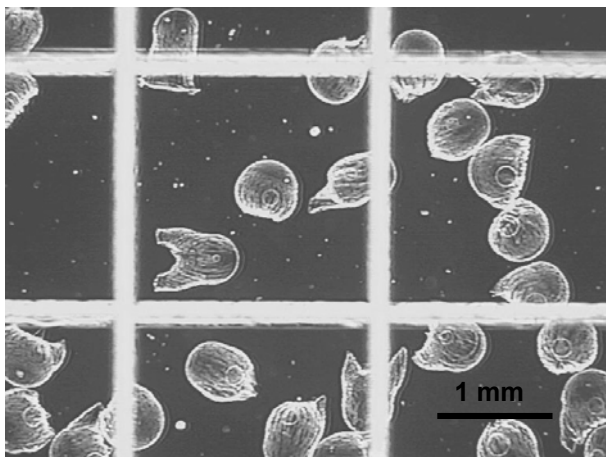
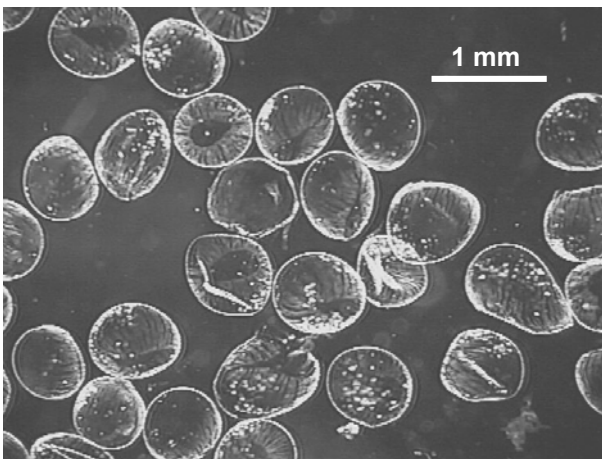


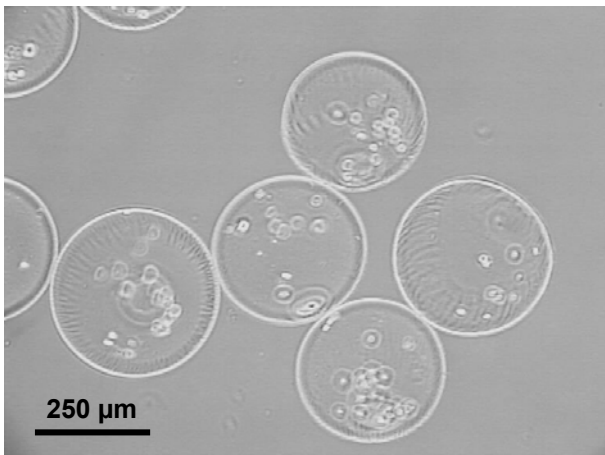
Abb. 23: Mikroskopische Abbildung von stark deformierten Alginateperlen ohne Zellen, hergestellt aus 1,5%igem Inotech-Alginat mit einem Stickstoffvolumenstrom von 2.500 l/h mit der *AirJet*-Apparatur. Originalvergrößerung: 40x.

Das Inotech-Alginat wurde danach in einer Konzentration von 2,0% zur Zellimmobilisierung eingesetzt (Abb. 24), da es aufgrund seiner höheren Viskosität ( $<0,2$  Pa-s) und daraus folgender verbesserten Stabilität gegenüber 1,5%igem Alginat ( $<0,1$  Pa-s; KOCH *et al.*, eingereicht) für die Anwendung der *AirJet*-Methode besser geeignet war. Die Beschichtung der Kapseln erfolgte mit 0,03%igem Inotech-Alginat. Weiterhin zeigt Abbildung 24, dass zum Teil unter den fertig modifizierten Mikrokapseln, die aus 2,0%igem Inotech-Alginat synthetisiert wurden, ebenfalls deformierte, kaputte Formen zu sehen sind. Die Auswertung einer Größenverteilung aller intakten, runden Kapseln, die den überwiegenden Teil der Kapselmasse darstellten, resultierte in Durchmessern von etwa 650  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 24:** Mikroskopische Abbildung deformierter und intakter APA-Mikrokapseln mit frisch immobilisierten Zellen, hergestellt aus 2,0%igem Inotech-Alginat mit einem Stickstoffvolumenstrom von 2.500 l/h. Originalvergrößerung: 40x.

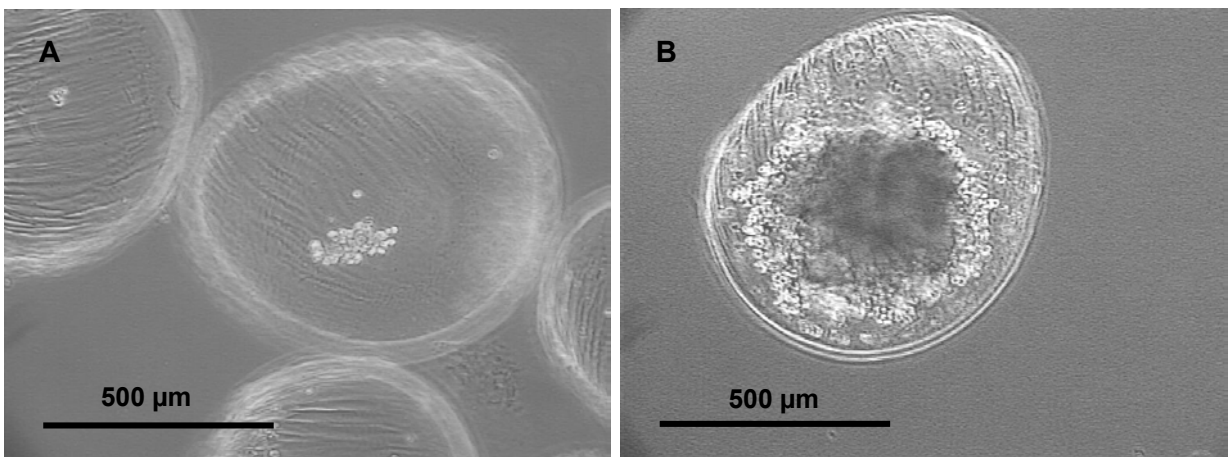
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde danach für spätere Virustitrierungen die Fibroblastenzelllinie GLI 328 mit Fluka-Alginat und einem höheren Volumenstrom (4.800 l N<sub>2</sub> pro Stunde), um kleinere Perlen zu erhalten, eingekapselt. Im Gegensatz zur Inotech-Methode konnte bei der Mikroverkapselung mit Hilfe der *AirJet*-Apparatur mit 1,5%igem Fluka-Alginat immobilisiert werden. Es wurde 0,03%iges Fluka-Alginat, statt Inotech-Alginat, zur Beschichtung der Mikrokapseln verwendet, da aufgrund der unter 3.5.2.2. beschriebenen Ergebnisse eine verbesserte Stabilität der Kapseln durch die Beschichtung mit einem höherviskosen Alginat erzielt wurde. Die Verkapselung der Zellen mit Hilfe eines höheren Stickstoffdruckes (4.800 l/h) und einem Alginat höherer Viskosität führte nun zu keiner Deformation bzw. Zerstörung des Hydrogels und zu 280 bis 300  $\mu\text{m}$  großen Kapseln (Abb. 25).

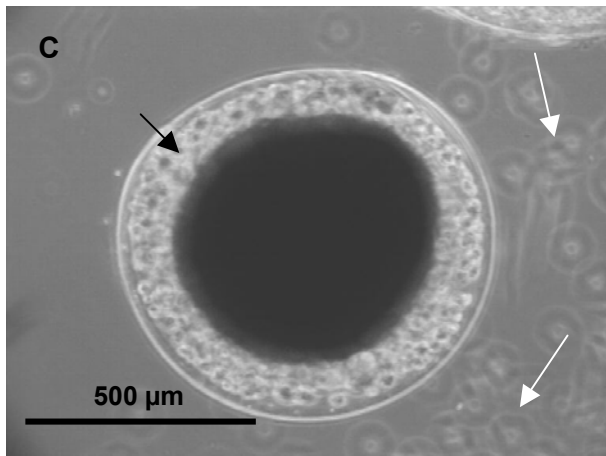


**Abb. 25: Mikroskopische Abbildung von APA-Mikrokapseln mit frisch immobilisierten Zellen, hergestellt aus 1,5%igem Fluka-Alginat und einem Stickstoffvolumenstrom von 4.800 l/h. Originalvergrößerung: 120x.**

### 3.5.3.2. Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen

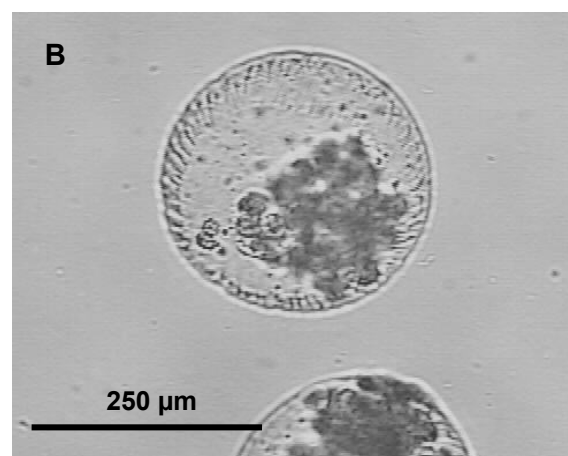
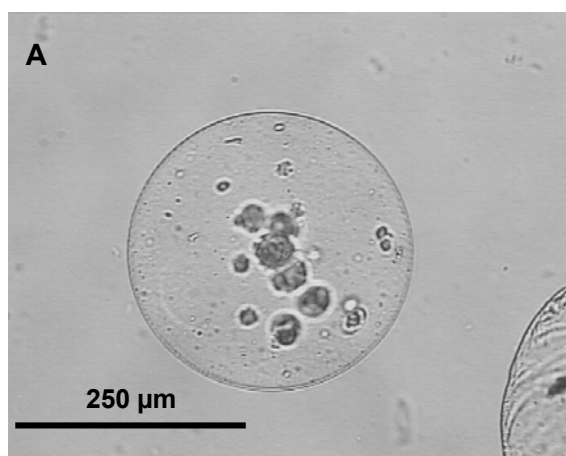
Das Wachstum der immobilisierten Hundegliomzellen J3T in den Inotech-Mikrokapseln zeigte, dass die Zellen die 650 µm großen Hohlkapseln bereits nach 19 Tagen füllten (Abb. 26). Jedoch führte das schnelle Zellwachstum nach 4 Wochen zum vollständigen Platzen aller Mikrokapseln. Die weißen Pfeile in der Abbildung 26 C zeigen freigesetzte Zellen, die aus geplatzten Kapseln stammen und am Kulturgefäßboden adhärirten. Diese lebenden Zellen weisen darauf hin, dass die Kapseln bereits in der dritten Woche nach dem Einkapselungsprozess begannen, sich aufzulösen. Der schwarze Pfeil in Abbildung 26 C deutet auf die Kapselwand hin, in der zum Teil einzelne tote Zellen eingeschlossen sind, die nicht fähig waren zu proliferieren.

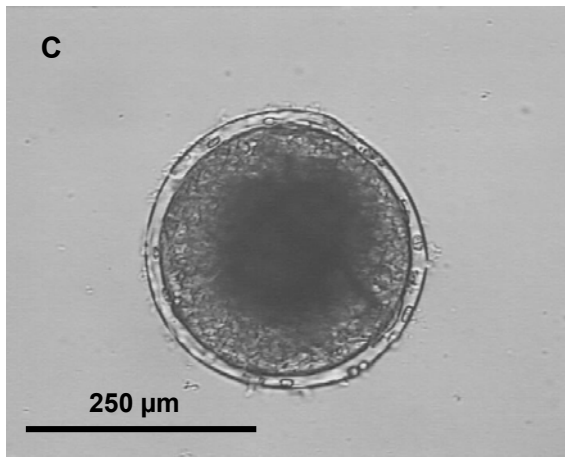




**Abb. 26: Immobilisierte J3T-Hundegliomzellen in APA-Mikrokapseln in Standardmedium kultiviert. (A) Nach 2 Tagen. (B) Nach 7 Tagen (vorherige Seite). (C) Nach 19 Tagen.** Die weißen Pfeile zeigen freie, lebende Zellen, die aus geplatzten Kapseln stammen. Der schwarze Pfeil deutet auf eingeschlossene, tote Zellen hin, die in der Kapselwand lagern. Originalvergrößerung: 120x.

Die Proliferation der eingekapselten Fibroblasten GLI 328 in Fluka-APA-Mikrokapseln führte dazu, dass die etwa 300 µm großen Kapseln erst nach etwa 5 Wochen mit einem Zellsphäroid ausgefüllt waren (Abb. 27) und aufgrund der Membranbeschichtung mit dem höhermolekularen Fluka-Alginat (0,03%) keine mechanische Instabilität aufwiesen bzw. während der gesamten Beobachtungszeit intakt blieben. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den immobilisierten, malignen Hundegliomzellen J3T, die das Innere von Mikrokapseln mit mehr als doppelt so großen Durchmessern (650 µm) in nur der Hälfte der Zeit füllten und anschließend platzten. Dies beweist, dass der Grad der Zellproliferation zwischen den Zelllinien variiert und gleichzeitig mit der Kapselgröße korreliert.





**Abb. 27:** Immobilisierte GLI 328-Mausfibroblasten in APA-Mikrokapseln, die in Standardmedium kultiviert wurden. (A) Nach 3 Tagen. (B) Nach 11 Tagen (vorherige Seite). (C) Nach 5 Wochen. Originalvergrößerung: 240x.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die mittels Gasextrusion hergestellten Mikrokapseln eine morphologische Besonderheit im Vergleich zu den "glatten" Oberflächen der Kapseln, die mit dem Inotech Encapsulator™ produziert wurden, aufwiesen. In den Abbildungen 23; 24; 25; 26, A und B bzw. 27 B ist zu erkennen, dass die *AirJet*-Kapseln eine unebene, fast "geriffelte" Membranstruktur besitzen. Zusätzlich wird gezeigt, dass die kultivierten, immobilisierten Zellen teilweise zu einer einzelnen Kolonie aggregierten, welche dazu tendierte, sich an die Kapselwand zu lagern (Abb. 26, A und B, 27 B), in der einzelne Zellen eingeschlossen blieben und die Fähigkeit zur Proliferation verloren haben (Abb. 26 C).

### 3.5.4. *JetCutter*-Methode

#### 3.5.4.1. Kapselherstellung und Größenverteilung

Die physikalischen Parameter zur Kapselherstellung mit der *JetCutter*-Technologie (Abb. 28) wurden mit der Firma geniaLab® (Braunschweig) im Vorfeld ohne Zellen optimiert, um Kapselgrößen <300 µm zu produzieren und die Scherkräfte gering zu halten. Die Einkapselung der RV-Vektor produzierenden Zellen GLI 328 erfolgte mit Fluka-Alginat (1,5%ig für die Perlenbildung und 0,03%ig für die Alginatbeschichtung), da es sich aus vorherigen Verkapselungen mit der Inotech- bzw. *AirJet*-Methode als stabileres Hydrogel bewährt hat. Die Parameter sind in Tabelle 7 aufgelistet.



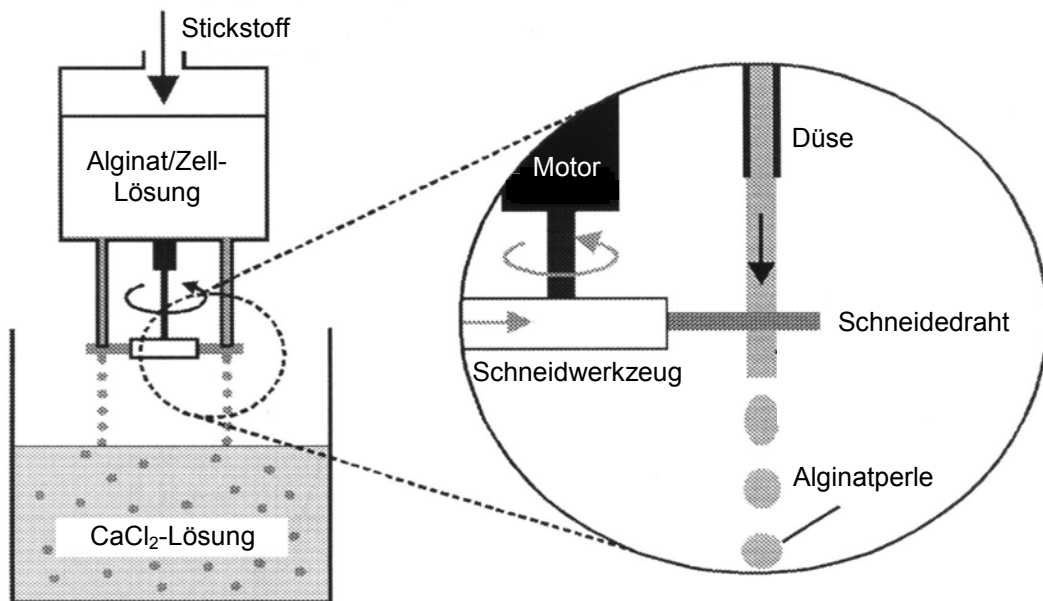
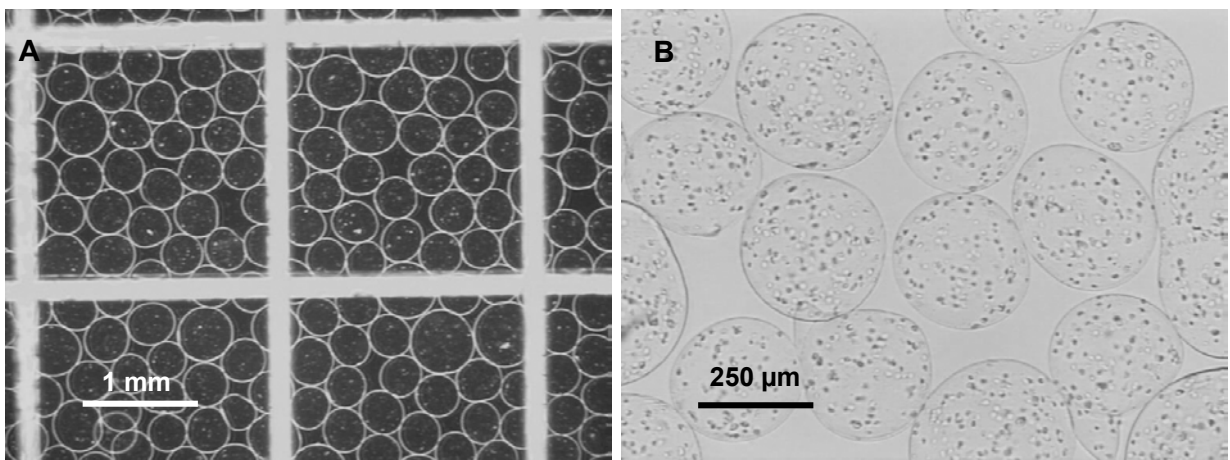


Abb. 28: Schematische Darstellung des *JetCutters*.

Tab. 7: *JetCutter*-Parameterprotokoll zur Herstellung der Alginat-Perlen mit immobilisierten Mausfibroblasten GLI 328.

Zufuhr der Lösungen	Druckgefäß mit 0,75 bar N <sub>2</sub>
rotierendes Schneidwerkzeug	48 Drähte á 50 µm Durchmesser, 6 500 Upm, Neigungswinkel 23°
Frequenz der Kapselproduktion	5,2 kHz
Durchmesser der Düse	200 µm
Flussrate des Alginates	8,2 ml/min (492 ml/h)
Perlenproduktion	5,5 ml/min

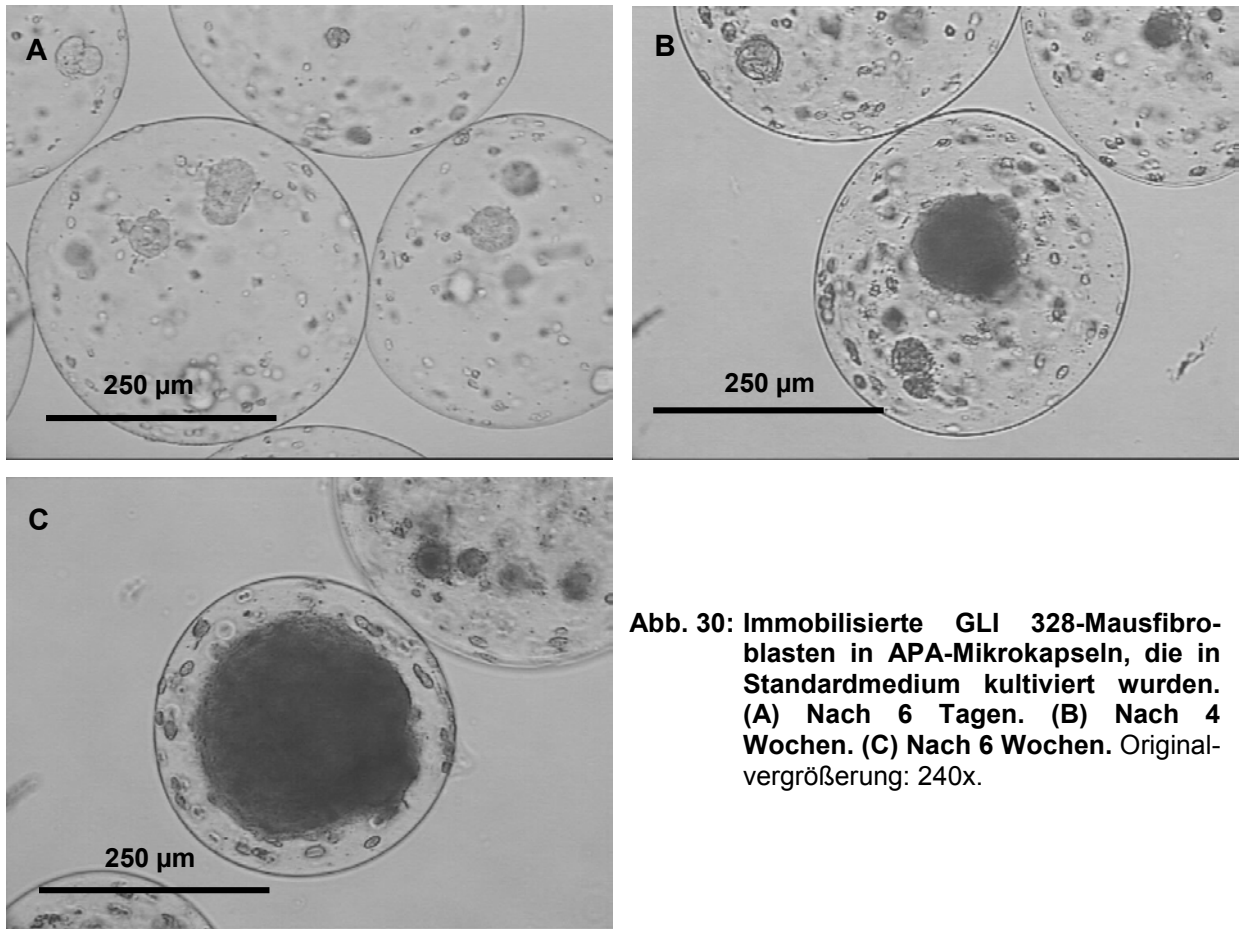
Die Abbildung 29 A zeigt, dass die mit der *JetCutter*-Methode produzierten Kapseln fast uniforme Größen aufwiesen. Mehr als 60% der Kapseldurchmesser variierten von 295 bis 325  $\mu\text{m}$  und nur 1% der Mikrokapseln waren kleiner als 265  $\mu\text{m}$  (SCHWINGER, KOCH *et al.*, 2002). Das Vorkommen größerer Perlen ist möglicherweise in Zusammenstößen und nachfolgenden Verschmelzungen aufgrund der hohen Durchsatzrate, die mit dieser Technologie erreicht wird, begründet, da z.B. zwei Perlen mit einer Größe von 320  $\mu\text{m}$  zu einer 400  $\mu\text{m}$  großen Perle fusionierten.



**Abb. 29: Mikroskopische Abbildungen von Alginatperlen und APA-Mikrokapseln, die mit dem *JetCutter* hergestellt wurden. (A) Alginatperlen ohne Zellen. (B) Frisch immobilisierte Zellen in APA-Mikrokapseln. Originalvergrößerungen: 40x (A) und 120x (B).**

#### 3.5.4.2. Zellproliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen

Das Zellwachstum der immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in APA-Mikrokapseln korrelierte mit den Kapseldurchmessern, d.h. Zellen in größeren Kapseln tendierten dazu, etwas schneller zu wachsen als Zellen in kleineren Kapseln. In der ersten Woche nach der Einkapselung waren zwar nur einzelne Zellen bzw. kleine Zellkolonien zu erkennen (Abb. 30 A), aber einige Wochen später füllten die Zellen das Kapselinnere und verschmolzen zu einer großen Zellkugel (Abb. 30, B und C). Zum anderen zeigt Abb. 30 Einschlüsse, die aus ungelösten Fluka-Alginatpartikeln stammen.



**Abb. 30: Immobilisierte GLI 328-Mausfibroblasten in APA-Mikrokapseln, die in Standardmedium kultiviert wurden. (A) Nach 6 Tagen. (B) Nach 4 Wochen. (C) Nach 6 Wochen. Originalvergrößerung: 240x.**

Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass Perlen, die mit dem *JetCutter* (laminarer *jet break-up*) produziert wurden, keine Unterschiede hinsichtlich mechanischer Eigenschaften und Zellüberlebensrate im Vergleich zu Perlen, die mit anderen, etablierten Einkapselungstechniken, wie z.B. *vibrating nozzle*- oder *AirJet*-Methode, hergestellt wurden, aufweisen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Methode des *JetCutters* zur Immobilisation von Säugerzellen unter GMP-Arbeitsbedingungen anwendbar ist.

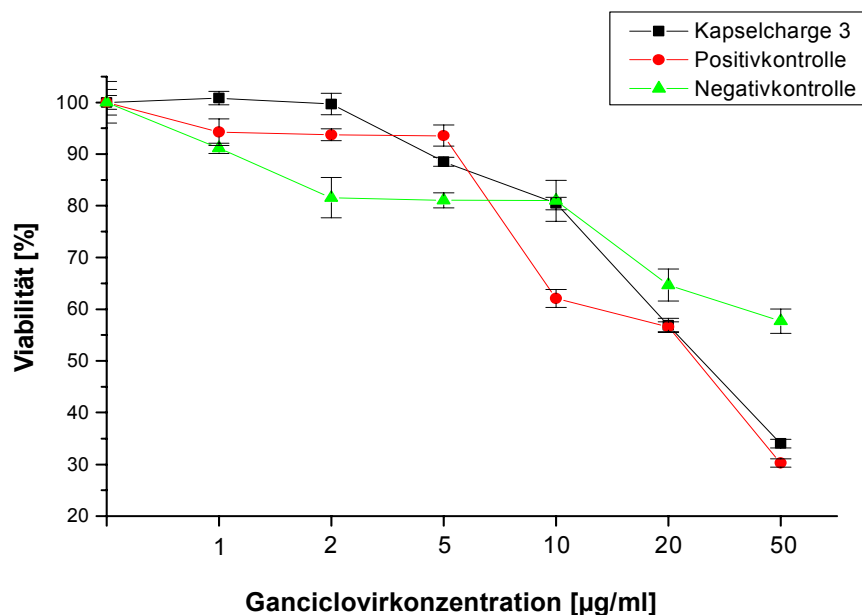
Allgemein demonstrieren die Ergebnisse aller getesteten Einkapselungsstrategien, wie *vibrating nozzle*, *AirJet* und *JetCutter*, die Durchführbarkeit der Erzeugung von sphärischen Alginatperlen und die Lebensfähigkeit der Säugerzellen in definierten APA-Mikrokapselgrößen. Jedoch stellte sich heraus, dass die Technik der *vibrating nozzle* auf die Anwendung von Alginaten mit Viskositäten  $<0,2$  Pa·s beschränkt ist. Wogegen die *AirJet*- und die

*JetCutter*-Methode weniger Sensitivität gegenüber höherviskosen Alginaten zeigten. Inotech-Alginat besaß sogar bei Konzentrationen von 2,0% (w/v) eine Viskosität von  $<0,2$  Pa·s. Die Viskosität des Fluka-Alginates erhöhte sich jedoch bei einer Konzentration von 2,0% (w/v) auf mehr als 1,6 Pa·s (KOCH *et al.*, eingereicht). Hinsichtlich der mechanischen Stabilität der APA-Mikrokapseln schienen niedermolekulare Alginat den höhermolekularen Massen der Alginat unterlegen zu sein. Wobei die Proliferation der eingekapselten Zellen durch die Viskosität der Alginat nicht beeinflusst wurde. Die immobilisierten Zellen bildeten Kolonien und proliferierten beträchtlich, sogar nachdem einige Kapselchargen die Festigkeit bzw. Stabilität ihrer Kapselmembranen verloren hatten. Das beweist, dass der mechanische Stress während der Einkapselungsprozesse von den Zellen toleriert wurde und keinen irreversiblen Zellschaden einleitete. Eine Ausnahme stellten die RV-Vektor produzierenden Zellen  $\psi$ -CRIP dar, die weder in 200 bis 250  $\mu\text{m}$  großen noch in größeren (400–500  $\mu\text{m}$ ) Mikrokapseln viabel blieben.

### **3.5.5. Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-Gentherapiesystem**

Zur Auswertung der HSV-Thymidinkinase/Ganciclovir(HSV-TK/GCV)-Toxizität wurden die Kulturüberstände von 3 verschiedenen Kapselchargen zur Bestimmung der RV-Vektortiter auf HSV-TK-negative Zellen (NIH/3T3) verwendet. Die Mikroverkapselung der immobilisierten HSV-TK/Retrovirus produzierenden Mausfibroblasten GLI 328 erfolgte mit Hilfe des Inotech Encapsulators™. Die GLI 328-Fibroblasten wurden mit 1,5%igem Inotech-Alginat (Charge 1 und 3) und mit 1,0%igem Fluka-Alginat (Charge 2) immobilisiert. Die äußere Membran der Kapseln wurde mit 0,03%igem Inotech-Alginat und erneut mit PLL und 0,03%igem Inotech-Alginat modifiziert (Charge 1) bzw. aus 0,03%igem Fluka-Alginat allein (Charge 2 und 3) gebildet. Die Mikrokapseln wurden etwa vier Wochen nach der Immobilisierung zur Toxizitätsbestimmung eingesetzt. Zum Vergleich wurden die Kulturüberstände der nativen, nichteingekapselten GLI 328-Fibroblasten (Positivkontrolle) eingesetzt. Nach 6 Tagen wurde die Dosisabhängigkeit (Inhibitorkonzentration) von GCV auf die Viabilität der NIH/3T3-Fibroblasten mit Hilfe eines MTT-Testes ermittelt. Die Positivkontrolle und die Kapselchargen 1 bis 3 führten zur Sensibilisierung der NIH/3T3-Zellen gegenüber Ganciclovir, da die Halbwertshemmkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) von GCV für die Positivkontrolle und alle drei Kapselchargen (gezeigt ist Vertreter 3) zwischen

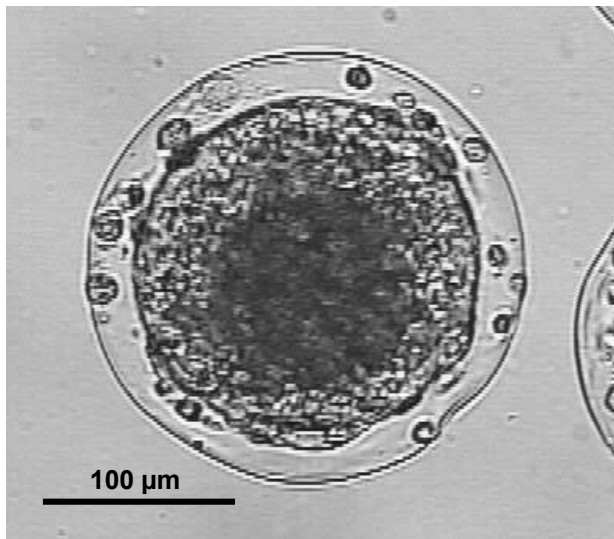
20 und 50  $\mu\text{g/ml}$  lagen (Abb. 31). Außerdem sah man das typische apoptotische Verhalten der NIH/3T3-Zellen (Kernkondensation und Kernfragmentation), die mit den Kapselchargen 1 bis 3 transduziert wurden, am Tag 2 nach GCV-Zugabe. Weiterhin war erkennbar, dass 70 bis 80% der Zellen bei einer Dosis von 50  $\mu\text{g/ml}$  GCV nicht mehr lebten. Diese Ergebnisse beweisen, dass die immobilisierten GLI 328-Fibroblasten mittels RV in ihren Mikrokapselkulturüberständen fähig waren, einen direkten toxischen Effekt in NIH/3T3-Zellen hervorzurufen. Um eine Aussage über den effektiven Austritt der RV-Partikel zu treffen, muss hervorgehoben werden, dass HSV-TK-produzierende und mit unterschiedlich stabilen Alginathydrogelen (Inotech und Fluka) immobilisierte GLI 328-Fibroblasten in Mikrokapseln mit modifizierten Membranbeschichtungen im gleichen Ausmaß fähig waren, Retroviren zu produzieren und in den Kulturüberstand freizusetzen, um NIH/3T3-Zellen zu transduzieren. Dabei erbrachten Kulturüberstände von  $5 \times 10^6$  nativen GLI 328-Fibroblasten die gleichen Transduktionsraten wie immobilisierte GLI 328-Fibroblasten 4 Wochen nach der Einkapselung von  $1 \times 10^7$  Zellen.



**Abb. 31: Darstellung der Überlebensrate der transduzierten NIH/3T3-Zellen in Abhängigkeit von der Ganciclovirkonzentration.** Die Positivkontrolle entspricht Kulturüberständen von  $5 \times 10^6$  nativen, nichtimmobilisierten GLI 328-Fibroblasten. Die Kapselcharge 3 stellt Kulturüberstände der GLI 328-Fibroblasten 4 Wochen nach Immobilisierung von  $1 \times 10^7$  Zellen mit 1,5%igem Inotech-Alginat in Mikrokapseln dar, die mit 0,03%igem Fluka-Alginat beschichtet wurden. Für die Negativkontrolle wurden nichttransduzierte NIH/3T3-Zellen eingesetzt, denen Ganciclovir appliziert wurde.

### 3.5.6. Intrakranielles Tiermodell

Die am Inotech Encapsulator™ mit 1,5%igem Inotech-Alginat immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in 200 bis 270 µm großen Mikrokapseln, beschichtet mit 0,03%igem Fluka-Alginat (siehe 3.5.2.1.), bewährten sich als mechanisch stabilste Kapselcharge in Zellkultur. Demzufolge wurden diese Mikrokapseln (4 Wochen nach der Immobilisierung) für ein 9L-Gliommodell in Fischer-Ratten F344 eingesetzt (Abb. 32). Am Tag 5 nach der Injektion von 1.625 Mikrokapseln in 0,5 ml pro Tier wurden den getöteten Ratten die Hirne entnommen, in Paraffin eingebettet und einer H&E-Färbung unterzogen.

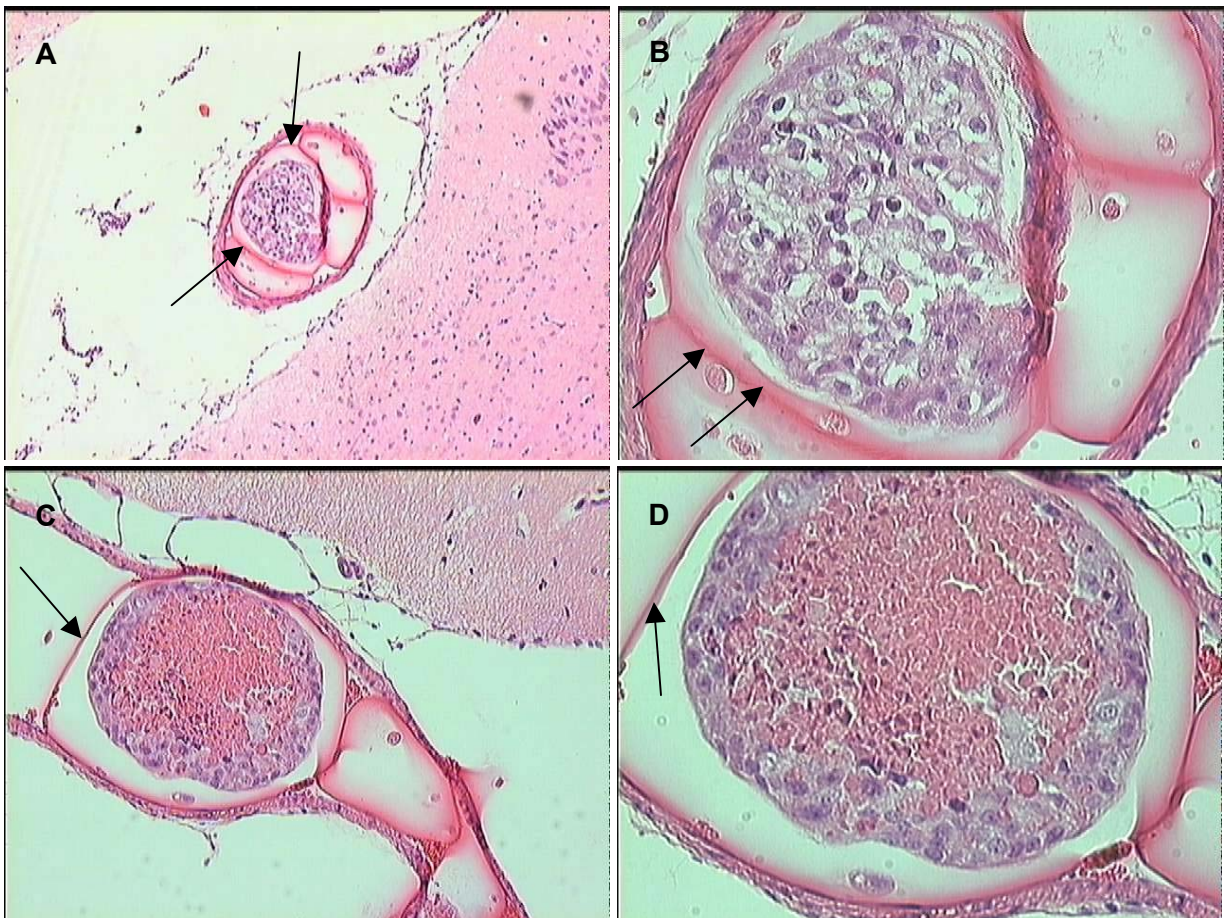


**Abb. 32: Mikroskopische Darstellung einer der in Fischer-Ratten F344 intraarteriell injizierten APA-Mikrokapseln.**

Originalvergrößerung: 400x.

Anhand histologischer Untersuchungen der Paraffin-eingebetteten Rattenhirne war erkennbar, dass die intraarteriell applizierten Mikrokapseln den Tumor nicht erreicht haben, da sie aufgrund ihrer Größen in proximalen Arterien der Rattenhirne arretiert wurden (Abb. 33, A und C). Obwohl in diesem Modell dadurch keine Aussage bezüglich der Antitumoreffekte durch die Mikrokapselapplikation getroffen werden kann, demonstrieren diese Experimente auch *in vivo* die gute mechanische Stabilität der Mikrokapseln sowie das Überleben eines Großteils der Zellpopulation (Abb. 33).





**Abb. 33: Mikroskopische Aufnahmen von intravasalen APA-Mikrokapseln mit immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in H&E-gefärbten, 3 µm dünnen Schnitten der Paraffin-eingebetteten F344-Rattenhirne. (A und B) Verschiedene Vergrößerungen einer Mikrokapsel mit viablen Zellen. (C und D) Verschiedene Vergrößerungen einer Mikrokapsel mit viablen Zellen und zentralen Nekrosen. Die schwarzen Pfeile markieren die Membran der Mikrokapseln. Originalvergrößerungen: 120x (A), 240x (C), 400x (B) und (D).**

Aus den histologischen Abbildungen der Rattenhirne ist erkennbar, dass die Membranen der Mikrokapseln durch die intravasale Applikation nicht zerstört wurden und vollkommen intakt blieben. Das wiederum beweist, dass die mit Fluka-Alginat beschichteten Mikrokapseln in Zellkultur und in den Tierexperimenten stabil blieben. Weiterhin kann geschlossen werden, dass die in Mikrokapseln mit Größen von 200 bis 270 µm immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten die Fähigkeit haben, nicht nur in Zellkultur sondern auch *in vivo* zu überleben.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. KATIONISCHE LIPOSOMEN

Die durchschnittlichen Größen der mit Hilfe einer Dialysevorrichtung synthetisierten kationischen Liposomen wurden mittels Streulichtanalyse bestimmt. Die Lichtstreuung ergab Durchmesser von 279,1 bis 993,2 nm. Diese Größen wurden mit dem kommerziell verfügbaren Liposomenpräparat LIPOFECTAMINE™, das parallel zu den eigens hergestellten Proben mit 148,3 nm gemessen wurde, verglichen. Die Genexpressionsraten zeigten keine Korrelation zwischen Größe der Liposomen und Transfektionseffizienz der Gliomzellen *in vitro* und ihre Transfektionsraten variierten deutlich. Allgemein wurden mit den synthetisierten kationischen Liposomenproben höhere Transduktionsraten unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen in Zellkultur als mit LIPOFECTAMINE™ erzielt, wobei unter serumfreien Bedingungen generell höhere Transfereffizienzen zu verzeichnen waren. Die besten Lipoplex-Transfektionen konnten mit 10 nmol des kationischen Lipids und 1 µg der Markergen-DNA nach einer Inkubationszeit von 6 h erreicht werden. Die Präparationen DC-Cholesterin/DOPE 3:2 und DiMTAP/DOPE 3:1 führten zu den höchsten Gentransferraten in serumfreiem Medium gegenüber Liposomenproben, die ohne oder mit neutralen Lipiden, wie DMPE, komplexiert wurden.

#### 4.1.1. Allgemeines zu kationischen Liposomen

Liposomen sind nichtvirale synthetische Vektoren, die zum Gentransfer eingesetzt werden. Allgemein sind sie relativ einfach in ihrer Herstellung und können in größeren Mengen produziert werden. Durch die Anwendung von Liposomen werden z.B. die Risiken umgangen, die durch Einsatz von viralen Vektoren auftreten können, wie Mutagenese, Onkogenaktivierung oder Entzündungen (HUG UND SLEIGHT, 1991; KRAMM *et al.*, 1995).

Liposomen vermögen kultivierte Zellen hocheffizient zu transfizieren, obwohl verschiedene Lipidzusammensetzungen unterschiedliche Transfektionseffizienzen aufweisen und fähig sind, unterschiedliche Mengen an DNA zu übertragen (SAN *et al.*, 1993; FELGNER *et al.*, 1994). Es ist allerdings nicht möglich, durch den liposomalen Gentransfer eine Langzeittransgenexpression zu erreichen, da keine spezifischen Mechanismen für den Transport der übertragenen DNA in den Zellkern existieren. Ein Grund dafür stellt die spezielle Art und Weise der Übertragung von Lipidvesikeln dar. Kationische Liposomen, die negativ geladene



DNA effizient einschließen, interagieren wahrscheinlich mit der Zellmembran und schleusen die DNA, die eine lysosomale Degradierung umgeht (SCHOFIELD UND CASKEY, 1995), ins Zytoplasma (FELGNER *et al.*, 1987; HUG UND SLEIGHT, 1991; GAO UND HUANG, 1995).

#### 4.1.2. Liposomenstruktur und chemische Zusammensetzung

Ausgewählte kationische Lipide wurden zusammen mit DOPE in unterschiedlichen Verhältnissen synthetisiert, da zahlreiche kationische Liposomen, die mit dem neutralen Helferlipid DOPE komplexiert sind, zum nichtviralen Gentransfer Einsatz fanden (BEHR *et al.*, 1989; FELGNER *et al.*, 1987; LEVENTIS UND SILVIUS, 1990; GAO UND HUANG, 1991; ROSE *et al.*, 1991; HAWLEY-NELSON *et al.*, 1993; FELGNER *et al.*, 1994; SOLODIN *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996). Es ist allgemein bekannt, dass DOPE in Lipoplexen den Transfer der DNA über die endosomale Membran erleichtert und deshalb die Transfektionsaktivität verbessert (LEGENDRE UND SZOKA, 1992; WROBEL UND COLLINS, 1995; FARHOOD *et al.*, 1995).

Liposomale hydrophobe Bereiche mit mehr als 14 Kohlenstoff(C)-Atomen und ohne ungesättigte Bindungen, wie z.B. C18:0 Liposomen, zeigen starre und gelähmte Eigenschaften auf. Aus diesem Grund ermöglichen DiMTAP mit nur 14 C-Atomen oder DOTAP mit 18 C-Atomen und einem ungesättigten C-Atom in jeder Alkylkette (vergleichbar mit DOPE, das ebenfalls zwei 18:1 Alkylketten besitzt) einen aktiveren DNA-Transfer in eukaryontische Zellen, im Gegensatz zu länger-kettigen, ungesättigten Alkylketten, wie z.B. C16:0 oder C18:0 Liposomen (MAYHEW UND FREEMAN, 1991; FELGNER *et al.*, 1994), die aber in dieser Arbeit nicht getestet wurden.

#### 4.1.3. Lipoplex-Transfektionen in Zellkultur

Die Ergebnisse der Transfektionsraten der selbst synthetisierten Liposomen zeigten, dass das kationische Liposomenpräparat DC-Cholesterol, komplexiert mit DOPE, die besten Transfektionsraten bei allen getesteten malignen Gliomzelllinien erbrachte. DC-Cholesterol wurde erstmals von GAO UND HUANG (1991) synthetisiert und stellt ein stabiles und wertvolles Transfervehikel für die Gentherapie dar. Es wurde bereits von weiteren Arbeitsgruppen für Transfektionsexperimente *in vitro* (CAPLEN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1996; YANG UND HUANG, 1998; MURRAY *et al.*, 1999) und auch *in vivo* (SZALA *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1997) eingesetzt. In dieser Arbeit ergab DC-Cholesterol/DOPE in einem Verhältnis von 3:2 höhere Transfereffizienzen als im Verhältnis 3:1. Die Liposomenprobe DiMTAP dagegen zeigte mit einfacher und auch doppelter Konzentration an DOPE keinen Transferunterschied

unter serumfreien Bedingungen, obwohl DiMTAP/DOPE 3:1 die besten Transfektionsraten aller Liposomenproben in 20%igem Humanserum besaß. Die Plasmid-DNA konnte mit Hilfe der nichtviralen Transfervektoren, die mit dem neutralen Lipid DOPE komplexiert wurden, effektiv in maligne Gliomzellen übertragen werden. Weniger gute Ergebnisse ergaben sich mit kationischen Liposomen, die Cholesterol oder DMPE als neutrale Komponente bzw. die kein Helferlipid besaßen. Diese Studien decken sich mit den veröffentlichten Ergebnissen von FELGNER *et al.* (1994) sowie mit denen von LIU UND SONG (1998), die aussagen, dass Liposomen mit DOPE *in vitro* aktiver sind als z.B. kationische Liposomen allein. Neben den Transfektionsergebnissen mit DC-Cholesterol/DOPE konnte weiterhin gezeigt werden, dass die kationische Liposomenprobe DiMTAP (C14:0) bei den transfizierten humanen Zelllinien U87 MG und U87 $\Delta$ EGFR höhere Gentransferraten als DOTAP (C18:1) zeigte.

#### **4.1.4. Serumeinfluss auf Transfektionen *in vitro***

Verglichen mit Transfektionsexperimenten unter serumfreien Bedingungen führten Transfektionen mit kationischen Liposomen in Gegenwart von Serum im allgemeinen zu niedrigeren Transfereffizienzen. Transfektionsexperimente mit der kommerziell verfügbaren Liposomenpräparation LIPOFECTAMINE™ fielen in der vorliegenden Arbeit in Anwesenheit von Serum teilweise schlechter aus, als mit den selbst synthetisierten (monovalenten bzw. monokationischen) Liposomen, wie z.B. DiMTAP oder DOTAP. Die multivalente Probe LIPOFECTAMINE™ (5 positive Ladungen pro Molekül) ist fähig, einen kleinen und festen Komplex mit der DNA zu bilden bzw. die DNA effektiver als monovalente Liposomen zu kondensieren. Jedoch zeigen diese kompakten LIPOFECTAMINE™-Komplexe unter serumhaltigen Bedingungen keine Anzeichen einer Reifung (YANG UND HUANG, 1998). Dieses Problem wird auf das Vorhandensein von Serum zurückgeführt, da Serum direkt den kationischen Liposomenvektor inaktivieren kann (YANG UND HUANG, 1997; YANG UND HUANG, 1998; LI *et al.*, 1999). Außerdem wird der Reifungsprozess des Liposomen-DNA-Komplexes blockiert und die zelluläre Aufnahme des Lipoplexes durch Gegenwart von Serumproteinen behindert (YANG UND HUANG, 1998).

Wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, führten gleichzeitige Erhöhungen der DNA-Konzentration (1 bis 10  $\mu$ g) und der Konzentration des kationischen Lipids (10 bis 30 nmol) in den Lipoplexen zu keinen signifikanten Transfektionsverbesserungen unter serumfreien Bedingungen. Obwohl nach BOUSSIF *et al.* (1996) Lipoplexe mit höheren DNA- und Liposomenkonzentrationen serumresistenter sind als mit geringeren Konzentra-

tionen, wurden bei Transfektionen mit Serum keine Transfektionssteigerungen festgestellt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung der Markergenexpression in Abhängigkeit der Erhöhung der Konzentration des kationischen Lipids von 1 bis 10 nmol bei gleichbleibender DNA-Konzentration unter serumfreien Bedingungen kam. *In vitro* konnte eine optimale Transfektion mit DC-Cholesterol/DOPE 3:2 und der Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 10:1 (nmol:µg) erzielt werden. Möglicherweise führt die Anwendung von Liposomenmengen (wie z.B. 10 nmol), die wahrscheinlich nur gering toxisch auf die Zellen wirken, zu besseren Transfektionseffizienzen als unter höheren Liposomenkonzentrationen.

#### 4.1.5. Abhängigkeit zwischen Liposomengrößen und Gentransfereffizienzen

Die Durchmesser der Liposomen wurden mittels Streulichtanalyse bestimmt und mit ihren Markergenexpressionen *in vitro* verglichen, um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen liposomaler Partikelgröße und Transfektionseffizienz erkennbar ist. Eine positive Abhängigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise nachgewiesen werden. Das Liposomenpräparat LIPOFECTAMINE™ mit ca. 150 nm stellt das kleinste und zugleich zweitschlechteste Transfervehikel in Zellkultur dar und wurde als einzige Probe nicht selbst synthetisiert. Dagegen wiesen DC-Cholesterol/DOPE 3:2 Liposomen mit Größen von 737,6 nm die höchsten Transfektionsraten auf. Diese Ergebnisse werden durch FELGNER *et al.* (1994) bestätigt, da Vesikel mit 300–700 nm Durchmesser (*large multilamellar vesicles*, LMV oder MLV) Nukleinsäuren wirksamer als kleinere Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) übertragen konnten. Weiterhin hat eine japanische Forschergruppe herausgefunden, dass multilamellare Liposomen von großem Nutzen in der Gentherapie von Hirntumoren, besonders maligner Gliome, sind (MIZUNO *et al.*, 1990a; MIZUNO *et al.*, 1990b; YOSHIDA *et al.*, 1991; YOSHIDA *et al.*, 1992; MIZUNO UND YOSHIDA, 1998). Diese multilamellaren Liposomen werden spontan gebildet und erst Beschallung bewirkt die Größenreduzierung dieser Partikel, wobei SUV geformt werden (LASIC, 1997; FELGNER *et al.*, 1987; FARHOOD *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1996; WASAN *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu MLV, die die DNA in das Liposomeninnere aufnehmen, besitzen SUV-Liposomen ein höheres Toxizitätspotential (YAGI *et al.*, 1993) und binden DNA an ihre Oberfläche, um Lipoplexe zu bilden (YOSHIDA *et al.*, 2001). LIU UND SONG (1998) zeigten ebenfalls, dass durch Einsatz von DOTAP-Liposomen mit Größen von 450 nm statt nur 100 nm eine 10fache Aktivitätssteigerung in einem Luciferase-Assay erfolgte.

Die ermittelten durchschnittlichen Größen der synthetisierten und zugleich größten Liposomen DiMTAP/DOPE betragen ca. 1 µm, wobei das Präparat in serumfreiem Medium nur als zweitbestes, aber unter Humanserum haltigen Bedingungen (10 und 20%ig) als effizientestes Transfektionsmittel wirkte. Liposomen mit Durchmessern von 1 µm oder mehr werden bereits als *giant vesicles* (Riesenliposomen; LASIC, 1997) bezeichnet, obwohl sie sich in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Transfereffizienz vergleichbar mit MLV-Liposomen verhielten. Eine Ausnahme bezüglich der Korrelation von Liposomengröße und Transfereffizienz stellen die DC-Cholesterol/DMPE Liposomen dar, da sie mit mittleren Größen um 650 nm die niedrigsten Transfektionsraten zeigten. Bereits FELGNER *et al.* (1994) fanden heraus, dass Liposomen, die DMPE als neutrale Komponente beinhalten, weniger aktiv sind als z.B. Liposomen, die mit DOPE komplexiert sind. Neben der Größenbestimmungen der selbst hergestellten Liposomen mittels Streulichtanalyse wurden die Partikeldurchmesser der Liposomenpräparation DC-Cholesterol/DOPE 3:2 zusätzlich mit der Rasterkraftmikroskopie erfasst. Ein Vergleich der durchschnittlichen gemessenen Partikeldurchmesser dieser zwei unterschiedlichen Methoden zeigte Abweichungen mit einer Differenz von 13% (Streulichtanalyse: 737,6 nm und RKM: 642 nm). Für die Rasterkraftmikroskopie wurde die Liposomenpräparation luftgetrocknet abgebildet. Eine Verfälschung dieses Ergebnisses erfolgte, da die adsorbierten Liposomenkörper während der Lufttrocknung nach und nach teilweise abflachen (JASS *et al.*, 2000), sogar brechen können und sich letztendlich als Bilayer-Scheibe ausbreiten (PIGNATARO *et al.*, 2000). Dagegen erfolgte die Größenbestimmung mittels Streulichtanalyse, in der die Probe in Lösung gemessen wird, genauer.

## 4.2. ULTRASCHALLSTUDIEN

Neben der Anwendung kationischer Liposomen wurde Ultraschall (US) für die Transfektion maligner Hirntumorzellen eingesetzt. US unterstützt bzw. verbessert den nichtviralen Gentransfer in eukaryontische Zellen. Die Ergebnisse der Ultraschallstudien zeigten, dass der Effekt von gepulstem US (2 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>) auf den liposomalen Gentransfer in Rattenhirntumorzellen (9L) *ex vivo* auf Multitestplatten zu einer signifikanten Steigerung der liposomalen, transienten Genexpression in kultivierten Hirntumorzellen von 7,4% (ohne US) über 13,2% (30 Sekunden US) und 20,9% (60 Sekunden US) bis 32,7% (90 Sekunden US) führte. Die letztere US-Exposition führte jedoch zum Zelltod von mehr als 80% der

Gliomzellen. Im Folgenden wurden diese Transduktionsverbesserungen durch US-Applikationen bei 9L-Ratten- und J3T-Hundetumorzellen, die auf Polypropylenfolie in der Zellkammer einer gesondert angefertigten US-Absorptionskammer dem 2 MHz-US für 60 Sekunden exponiert wurden, nicht beobachtet. Denn in dieser Absorptionskammer wurden Reflexionen und Kavitationen, die durch US hervorgerufen werden, durch Rizinusöl vermieden. Anschließend wurde das US-Kontrastmittel (KM) Levovist<sup>®</sup> zusätzlich zur einminütigen US-Exposition den Zellen während der liposomalen Tumorzelltransfektion verabreicht. Levovist<sup>®</sup> wurde in Konzentrationen von 2 mg/ml bis 200 mg/ml verabreicht und leitete eine erneute Verstärkung der Kavitationseffekte ein. Die KM-Applikation resultierte in einer signifikanten Steigerung der transgenen Expression von 0,5% (ohne US) bzw. 0,6% (US ohne KM und mit 2 mg/ml KM) bis 5,5% mit 200 mg/ml Levovist<sup>®</sup>. Im Gegensatz zur US-Exposition ohne KM-Gabe wurden Tumorzellschäden durch US und KM hervorgerufen.

#### 4.2.1. Allgemeines zum Ultraschall

US als *Enhancer* von Lipoplex-Transfektionen besitzt entscheidende Vorteile für den Einsatz in Zellkultur und *in vivo*. US ist leicht in seiner Anwendung in der Zellkultur, da die übertragene Energie für jeden einzelnen Zelltyp gemessen werden kann. Der US kann die Lipoplex-Transfektion, die durch Serum inhibiert wird, möglicherweise kompensieren (BAO *et al.*, 1997) und es wurde berichtet, dass US eine transgene Expression in schwer zu transfizierenden Zellen möglicherweise positiv beeinflusst (LAWRIE *et al.*, 1999). Weiterhin kann der US auf eine relativ kleine Fläche appliziert werden, woraufhin eine Regulation des Gentransfers und der Genexpression ermöglicht wird (BEDNARSKI *et al.*, 1997). Außerdem wird die zu applizierende DNA durch den Einsatz von kationischen Liposomen gegen Schäden, die durch US-Kavitationen hervorgerufen werden, geschützt, da ein großer Prozentsatz an Liposomen-DNA durch den Prozess der Beschallung intakt bleibt. Somit besitzt Ultraschall die Fähigkeit für *in vitro*-Transfektionen (WASAN *et al.*, 1996).

Da 2 MHz-Doppler-US nicht nur Flüssigkeiten und Gewebe, sondern auch Knochen und Knorpel durchdringt (MARESCA *et al.*, 1998), kann man ganz spezifische Bereiche eines Organs oder Gewebes dem US exponieren (BEDNARSKI *et al.*, 1997). Diese gezielte Anwendung ist besonders für den Einsatz im ZNS bedeutend, da der Schädel eine Barriere für nichtinvasive Applikationen des Gehirns darstellt.

#### 4.2.2. Ultraschallstudien und Kontrastmittel

Es wurde gezeigt, dass die verschiedenen, selbst synthetisierten kationischen Liposomenproben aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen und Zusammensetzungen in ihren Transfereffizienzen in Zellkultur variieren. Weiterhin wurde bewiesen, dass die in den Kulturplatten hervorgerufenen US-Kavitationen und Reflexionen möglicherweise als Hauptmechanismen für das beobachtete Phänomen der verbesserten Lipoplex-Transfektion verantwortlich sind. Bei US-unterstützten Transfektionsexperimenten in der US-Absorptionskammer wurde dieses Phänomen mit einem US-Druck von 0,3 MPa in Zellkultur nicht beobachtet. Deshalb wurde postuliert, dass Kavitationen in diesem Zellkulturmodell möglicherweise mit Kontrastmittel während der US-Exposition (60 Sekunden) induziert werden können. Das klinisch-diagnostisch angewandte US-Kontrastmittel Levovist<sup>®</sup>, ein auf Gasmikrobläschen basierender aktiver Carrier, wurde in Konzentrationen von 2 mg/ml, 20 mg/ml und 200 mg/ml eingesetzt. Die KM-Experimente demonstrierten eine deutliche Transfektionssteigerung mit der höchsten KM-Konzentration (200 mg/ml). Während einer einminütigen US-Applikation resultierte eine 11fach höhere Transfektionsrate mit 200 mg/ml Levovist<sup>®</sup>, im Vergleich zu US-Kontrollzellen ohne KM. Niedrigere KM-Konzentrationen erhöhten die Transfektionseffizienzen von 1,2% (US mit 20 mg/ml KM) gegenüber 0,5% (ohne US) oder 0,6% (US ohne KM und mit 2 mg/ml KM) nicht signifikant. Als Nebenwirkung dieser Kavitationsinduktion verringerte sich die Zellüberlebensrate jedoch drastisch (95,7% viable Kontrollzellen, 78,3% Viabilität mit 2 mg/ml KM, 58,5% Viabilität mit 20 mg/ml KM und 39,3% Viabilität mit 200 mg/ml KM).

Die Resultate der beobachteten US-Effekte durch KM in dieser Arbeit werden durch Aussagen anderer Autoren unterstützt. Durch Einsatz von Kontrastmittel wurde eine verstärkte Zellestörung und Sonoporation von Zellen aus einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region in Suspension mit niedrigen Zellkonzentrationen (WARD *et al.*, 1999) und im menschlichen Blut (POLIACHIK *et al.*, 1999) durch US induziert. Studien von MILLER *et al.* (1996) zeigten, dass Zellmembranschäden als primäre Effekte durch applizierten US in Zellkultur ausgelöst werden. Die Schwelle, bei der durch US-Kontrastmittel Kavitation *in vitro* mit einer 2 MHz-Sonde initiiert wird, liegt bei etwa 0,4 MPa (MILLER UND THOMAS, 1995). Wenn man die Sensitivität der angewandten Isoluminol-Methode zur Detektion von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dieser Autoren betrachtet, so scheint der in der vorliegenden Arbeit resultierende Druck von 0,3 MPa in der Absorptionskammer der Auslöser für hervorgerufene Zellschäden zu sein. Dem entsprechend wurde eine KM-induzierte Hämolyse (MILLER *et al.*, 1997; MILLER UND GIES, 1998) und die Schädigung der Krebszelllinien HeLa S3 (WARD *et al.*, 1999) mit 0,2 MPa bei gleicher Frequenz beobachtet.

Normalerweise werden nur geringe Zellschäden hervorgerufen, es sei denn, das Reaktionsgefäß, das dem US ausgesetzt ist, wird rotiert (MILLER UND THOMAS, 1995; WARD *et al.*, 1999). Der Zellschaden, ausgelöst durch diesen Rotationseffekt, erfolgt durch ein Recycling der Gasbläschen. Die Gasbläschen, die sich an der hinteren Gefäßwand, wo der US reflektiert wird, befinden, gelangen wieder nach vorn und können erneut Kavitationen auslösen (MILLER *et al.*, 1999; MILLER UND WILLIAMS, 1989). In den Zellkammern der angefertigten Absorptionskammer, in denen die Zellen adhären auf einer immobilen Membran aus Polypropylen kultiviert wurden, war keine Rotation für die Kavitationseffekte verantwortlich, da die Zellkammern fixiert wurden.

Die Verbesserung der lipoplexigen Transduktion durch US in Gliomzellen scheint ein Phänomen zu sein, das zusätzlich Zellschäden hervorruft. Es wäre möglich, diesen selektiven Zellschaden für *in vivo*-Experimente auszunutzen, um eine tumorselektive Therapie durch ein lokal appliziertes Kontrastmittel mit fokussiertem US hervorzurufen. Da Levovist® in Dosen von 200–400 mg/ml in einem Volumen bis 20 ml beim Menschen angewendet werden kann (SCHLIEF, 1993b), kann im Blut eines durchschnittlichen Erwachsenen schätzungsweise eine Konzentration von 1 bis 2 mg/ml erreicht werden. Dieses Kontrastmittel (Levovist®) besteht aus stabilisierten Galaktosemikrobläschen, im Gegensatz zu anderen mit Gas gefüllten stabilisierten Protein-Mikrosphären (Albumin; 4-10 µm), wie Albunex® oder Optison®. Diese auf Albumin basierenden Kontrastmittel sind effizientere US-Signalverstärker und erzeugen zelluläre Effekte (CHRISTIANSEN *et al.*, 1994; SCHLIEF, 1993a, 1993b). Die Autoren MILLER UND THOMAS (1995) haben die Konzentration des Wasserstoffperoxides nach Beschallung in einem rotierenden Gefäß während der Zugabe von Albunex® und Levovist® in verschiedenen Konzentrationen gemessen und sie demonstrierten eine signifikante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion mit einem 2 MHz-US bei 0,41 MPa. Jedoch ist dieses System nicht mit dem einer Absorptionskammer vergleichbar, das auf adhären Zellen oder in Suspension befindlichen (nichtadhären) hämotopetischen Zellen (POLIACHIK *et al.*, 1999; BRAYMAN UND MILLER, 1999) basiert. GREENLEAF und Mitarbeiter (1998) erhöhten die US-unterstützte DNA-Transfektionseffizienz in menschlichen Chondrozyten durch Zugabe von Albunex® signifikant. Die Transfektionseffizienz von in Multitestplatten kultivierten Zellen, die mit 1 MHz-US mit und ohne KM beschallt wurden, stieg linear mit der Erhöhung der US-Energie an. Aufgrund der verwendeten DNA-Konzentration von 40 mg/ml kann die Studie von GREENLEAF *et al.* (1998) hinsichtlich der KM-Konzentration bzw. der Transfektionseffizienz mit dieser Arbeit nicht verglichen werden, da hier DNA im Mikrogrammbereich eingesetzt wurde. Darüber hinaus unterscheiden sich

die biologischen Zellmembraneigenschaften unterschiedlicher Zelltypen bezüglich physikalischer Beständigkeit und Transfektionsstabilität (PAGANO UND WEINSTEIN, 1978). Diese Unterschiede lassen keinen Vergleich von menschlichen hämatopoetischen Zellen oder Zellen des Bindegewebes mit Ratten- bzw. Hundegliomzellen zu.

Die US-induzierte Kavitation ist ein Phänomen, das hauptsächlich in Zellkultur vorkommt. Der US-unterstützte Gentransfer *in vivo* scheint nur durchführbar zu sein, wenn das Kontrastmittel vor der Beschallung appliziert wird. Bei Abwesenheit des Kontrastmittels unterstützen nur niedrige US-Signale, wie sie in klinischer Therapie angewendet werden, den Gentransfer in humane Krebszelllinien, wenn die Bedingungen von stehenden Wellen erfüllt sind (TATA *et al.*, 1997), die *in vivo* schwer zu ermöglichen sind. Eine Zellschädigung, die gewöhnlich durch die Anwendung von KM initiiert wird, kann durch das Vorhandensein von KM-Mikrobläschen und ebenso durch einen Zusammenfall der Mikrosphären erfolgen. Vergleiche der US-Studien dieser Arbeit, die einerseits in Kulturplatten und andererseits zusätzlich mit Kontrastmittel in der Absorptionskammer vorgenommen wurden, lassen die Aussage zu, dass Kavitationen in beiden Experimenten (Kavitationskeime durch den Gasgehalt des frischen Mediums im ersten Fall bzw. KM im zweiten Fall) für einen Zellschaden verantwortlich sind.

### **4.3. VERGLEICH DER APA-MIKROVERKAPSELUNGSMETHODEN**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit umfasste die Herstellung von kleinen APA-Mikrokapseln (200–300 µm) mit regelmäßigen, sphärischen Formen und ausreichender mechanischer Festigkeit. Drei beschriebene Methoden und Apparaturen wurden für die Immobilisierung von Säugerzellen in uniforme, kleine Alginatperlen (Vollkapseln ohne Beschichtung und ohne herausgelösten Alginatkern) und anschließender Alginat-poly-L-Lysin-Alginat(APA)-Beschichtung für eine spätere Applikation *in vivo* in dieser Arbeit angewendet.

ROBITAILLE *et al.* (1999) verkapselten Langerhans'sche Inselzellen und postulierten, dass Mikrokapseln mit Durchmessern <350 µm viele Vorteile gegenüber größeren Kapseln besitzen (700–1.500 µm), wie z.B. kleinere Applikationsvolumen, eine bessere Insulinkinetik, besserer Sauerstoffaustausch und den Zugang zu neuen Implantationsorten. Große Mikrokapseln gleichen Volumens und Alginatgehaltes verursachen *in vivo* stärkere



Fibrosereaktionen als kleinere Mikro kapseln. Es wurde festgestellt, dass 20 große Kapseln eine stärkere perikapsuläre Wirkung erzeugen als 1.000 kleine Kapseln, obwohl kleine Kapseln eine 3,4fach größere Applikationsoberfläche aufbrachten (ROBITAILLE *et al.*, 1999). CHANG UND PRAKESH (1998) stellten fest, dass ein Volumen von 10 ml mit 20 µm großen Kapseln eine Oberfläche von etwa 2 m<sup>2</sup> besitzen. Diese und andere Autoren schlussfolgerten eine höhere Biokompatibilität kleiner Mikro kapseln (DE VOS *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurden drei Methoden der Zellimmobilisierung in APA-Mikro kapseln durchgeführt. Dafür wurde eine Methode, die Gasextrusion bzw. *AirJet*, selbst entwickelt. Weiterhin wurden der kommerziell verfügbare Inotech Encapsulator™ IER-40 und die Technologie des kürzlich entwickelten *JetCutters* angewendet. Bei den verschiedenen Methoden der Einkapselung sollte eine Optimierung des Einkapselungsprozesses hinsichtlich biologischer und physikalischer Eigenschaften, wie der mechanischen Belastbarkeit der Kapseln, der Morphologie, Proliferation und Lebensfähigkeit der eingekapselten Zellen in definierten APA-Kapselgrößen erzielt werden. Es wurden in Vorversuchen normale Nierenfibroblastenzellen aus Babyhamstern (BHK) und maligne Hundegliomzellen (J3T) für Größenverteilungs- und Stabilitätstestungen der Mikro kapseln und Optimierungen der Geräteparameter eingesetzt. Anschließend wurden genetisch modifizierte (transgene) Mausfibroblasten, wie ψ-CRIP- und GLI 328-Zellen immobilisiert bzw. verkapselt. Abgesehen von den ψ-CRIP-Zellen, die in keinen der hergestellten Mikro kapseln überlebten, proliferierten die getesteten (J3T und BHK) bzw. die für spätere Anwendungen eingesetzten Zellen (GLI 328) in den APA-Mikro kapseln.

Da keine Proliferation der immobilisierten ψ-CRIP-Zellen in den APA-Mikro kapseln im Lauf dieser Arbeit zu verzeichnen war, könnte die Hypothese von DE VOS *et al.* (1999) auf dieses Ergebnis zutreffen, in der ausgesagt wird, dass vermutlich ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Zellerneuerung und Zelltod vorherrscht und die Reproduktion der Zellen nicht ausreichend ist, um den Zellverlust zu kompensieren. Die Zellproliferation der GLI 328-Mausfibroblasten, die das Gen für die HSV-Thymidinkinase tragen, wurden über den längsten Zeitraum beobachtet und für ein Rattengliommodell eingesetzt. Die durchgeführten Viabilitätsfärbungen bewiesen, dass die GLI 328-Zellen mindestens 3 Monate in Zellkultur viabel blieben.

Ein wachsendes Interesse auf dem Gebiet der Zellimmobilisierung führte zur Entwicklung von zahlreichen Techniken, wie *dripping* (WALSH *et al.*, 1996; ROMO UND PEREZMARTINEZ, 1997), Emulgierung (PONCELET *et al.*, 1992, 1995 ; GREEN *et al.*, 1996), Zerstäubung mittels einer rotierenden Scheibe (BÉGIN *et al.*, 1991; OGBONNA *et al.*, 1991), *AirJet* (KLEIN *et al.*,

1983; LEVEE *et al.*, 1994), Zerstäubung (SIEMANN *et al.*, 1990; KWOK *et al.*, 1991), elektrostatisches *dripping* (BUGARSKI *et al.*, 1994; HALLE *et al.*, 1994; PONCELET *et al.*, 1994), mechanisches Schneiden (*JetCutter*; PRÜSSE *et al.*, 1998) und die *vibrating nozzle*-Methode (SHIMI *et al.*, 1991; GHOSAL *et al.*, 1993; SEIFERT UND PHILLIPS, 1997; BRANDENBERGER UND WIDMER, 1998). All diese Methoden lassen eine Durchführbarkeit nur unter gewissen Einschränkungen zu. Keine Technik erlaubt die Perlenproduktion bei einer gleichzeitigen engen Größenverteilung, einer hohen Produktionsrate, einer Materialanwendung unter milden bzw. nichttoxischen und kompletten sterilen Bedingungen mit einer Produktionsmöglichkeit im großen Maßstab. Deshalb ist die Technik der *vibrating nozzle* des Inotech Encapsulators™ (IER-40) eine geeignete Methode zur Zellimmobilisierung, um monodisperse Mikrokapseln unter den genannten Kriterien herzustellen (SERP *et al.*, 2000). In dieser Arbeit hat sich ein Nachteil der Einkapselungsmethode mit dem IER-40 herausgestellt, da der Einsatz von Biopolymermaterialien auf geringviskose Alginat beschränkt war. Deshalb konnten auch nur geringere Konzentrationen von höherviskosen Alginaten (Fluka-Alginat) eingesetzt werden (wie 1,0%), um Perlen zu produzieren. Eine 1,5%ige Fluka-Lösung konnte am IER-40 nicht eingesetzt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen von SERP *et al.* (2000), die zeigten, dass für die Produktion von Kapseln mit Durchmessern <600 µm nicht alle Alginat in der Anwendung des IER-40 hinsichtlich rheologischer Eigenschaften, des Molekulargewichtes (MW) und der Fähigkeit zur Perlenproduktion geeignet sind. Denn verschiedene kommerziell erhältliche Alginat unter Einsatz bestimmter Düsendgrößen (80–200 µm) erbrachten unzufriedenstellende oder sogar keine Perlenproduktion. Diese Ergebnisse sind die Folge der Anwesenheit von Verunreinigungen, die durch Filtrationen auftreten. Aus diesem Grund werden Alginatlösungen durch Autoklavieren sterilisiert (SERP *et al.*, 2000). Jedoch können Alginatketten durch thermische Prozesse aufgespalten werden, wodurch die Viskosität verringert wird (HARTMANN *et al.*, 1975; LEO *et al.*, 1990). Allerdings wurde das Augenmerk in dieser Arbeit nicht auf die Erniedrigung der Alginatviskosität durch Autoklavieren gelegt, denn eine geringere Viskosität konnte durch Erniedrigung der Hydrogelkonzentration erreicht werden. Die Alginat wurden in erhaltener Pulverform in sterilem *Aqua dest.* gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Sterilfiltration der 1,5%igen Fluka-Alginatlösung löste laut SERP *et al.* (2000) somit vermutlich das Vorhandensein von Fremdpartikeln aus, wodurch keine Perlenformation erfolgte. Entsprechend dieser Ergebnisse, die mit der *vibrating nozzle*-Methode erzielt wurden, scheint die Anwendung der Alginat mit erforderlichen und relativ geringen Viskositäten das größte Hindernis zur Produktion von uniformen Perlen mit kleinen Durchmessern (<300 µm) zu sein.

Gegenüber dem IER-40 lässt die selbst entwickelte coaxiale Gasstrom-Apparatur (*AirJet*) die Anwendung höherviskoser Polymere zu bzw. scheint weniger sensitiv gegenüber diesen Biomaterialien zu sein. Da die *AirJet*-Methode einen nur geringen Durchsatz ermöglicht, ist sie für experimentelle Arbeiten, jedoch nicht für eine Produktion von Alginatperlen und APA-Mikrokapseln im großen Maßstab (*large scale*) geeignet. Die Ergebnisse der durchgeführten Einkapselungen mit der gesondert angefertigten Gasstrom-Vorrichtung beweisen die Eignung der Alginat-Mikroverkapselung von Säugerzellen und lassen einen repräsentativen Vergleich mit kommerziellen Apparaturen, wie z.B. mit dem Inotech Encapsulator™ IER-40, zu. Hinsichtlich der Anwendung von Alginatlösungen höherer Viskosität bietet die selbst entwickelte Methode der Gasextrusion einen Vorteil gegenüber dem IER-40. Das höherviskose Fluka-Alginat konnte beim *AirJet* in einer Konzentration von 1,5% eingesetzt werden, wogegen es bei Einkapselungen mit dem IER-40 nur bis zu einer Konzentration von 1,0% Perlen hervorbrachte. Darüber hinaus führten die Einkapselungen nur zu unbefriedigenden Ergebnissen.

Da nur einige Studien sich auf eine *large scale*-Produktion von Hydrogelkapseln unter GMP-Bedingungen (*good manufacturing practice*) konzentrierten (DE VOS *et al.*, 1997b; GRÖHN *et al.*, 1994; SERP *et al.*, 2000), wurde die Technologie des *JetCutter*s entwickelt. Diese Methode erreicht hohe Produktionsraten von kleinen Perlen und wurde in dieser Arbeit für Alginat-Immobilisierungen von Säugerzellen angewendet. Der *JetCutter*, der vielversprechende Ergebnisse zeigte, besitzt Vorteile, die für das Arbeiten mit höherviskosen Biopolymerlösungen zur Produktion von stabilen Alginatkapseln gegenüber anderen Methoden geeignet sind (PRÜSSE *et al.*, 2000). Mit dieser Technologie wird ein Flüssigkeitsstrahl mit dem einzukapselnden Material durch eine Düse geleitet und mittels eines rotierenden Schneidwerkzeuges in identische Zylinder geschnitten. Die Zylinder nehmen durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine kugelige Form an und werden zur Vernetzung des Alginats in Elektrolytlösungen eingeleitet. Da die Extrusion und die Perlenformation durch mechanische Schritte erfolgen, ist die Viskosität der Flüssigkeit von geringerer Bedeutung. Der *JetCutter* zeichnet sich, neben der Methode der *vibrating nozzle* (SERP *et al.*, 2000), durch seine hohe Produktionskapazität hinsichtlich der Anzahl der produzierten Perlen pro Sekunde aus, wobei Frequenzen bis 10 kHz zur Perlenformation erreicht werden können. Die hohe Produktionsrate des *JetCutter*s schien in dieser Arbeit mit einer hohen mechanischen Belastung der eingekapselten Zellen zu assoziieren. Der kritischste Part für die sich im *JetCutter* befindlichen Zellen ist die Passage mit einer Flüssigkeitgeschwindigkeit von etwa  $5 \text{ ms}^{-1}$  durch die eingesetzte 200  $\mu\text{m}$ -Düse, wodurch hohe Scherkräfte auftreten. Die Ergebnisse der Einkapselungen mit dem *JetCutter*

demonstrierten, dass Alginatmikrokapseln zu etwa 60% mit Größen von 295 bis 325  $\mu\text{m}$ , in denen viable Zellen immobilisiert wurden, mit einer sehr hohen Durchsatzrate produziert werden konnten. Die eingekapselten Mausfibroblasten bildeten Kolonien und proliferierten. Das beweist, dass der mechanische Stress während des Einkapselungsprozesses von den Zellen toleriert und kein irreversibler Zellschaden hervorgerufen wurde. Bezogen auf diese Resultate, sind weiterführende Optimierungen des *JetCutter*s hinsichtlich einer Verbesserung der physikalischen Eigenschaften der produzierten Alginatperlen möglich und notwendig. Die Geschwindigkeit des Schneidwerkzeuges, die Fließgeschwindigkeit der Lösung, der Düsendurchmesser, die Anzahl der Schneidedrähte und möglicherweise die Anzahl der Düsen könnte durch eine volle Ausnutzung des Gerätes erhöht werden. Eine Reduzierung der Kapselgrößen ist essentiell für eine *in vivo* Applikation und kann durch die Anwendung kleinerer Düsen (80 oder 150  $\mu\text{m}$ ) oder auch durch eine Erhöhung der Geschwindigkeit des Schneidwerkzeuges erreicht werden (SCHWINGER, KOCH *et al.*, 2002). Die Methode der *vibrating nozzle* des IER-40 brachte optimale Kapselverteilungen hervor (220 bis 270  $\mu\text{m}$ ). Dagegen fielen die Größenverteilungen der APA-Mikrokapseln des *JetCutter*s (1% unter 265  $\mu\text{m}$ , 60% 295 bis 325  $\mu\text{m}$  und 400  $\mu\text{m}$  große Kapseln) und der Gasextrusion mit noch breiteren Verteilungen ( $\leq 300 \mu\text{m}$ ) nicht ganz so gut aus.

Die Sterilisation von Zubehöerteilen der *JetCutter*- und *AirJet*-Apparaturen, die mit der Alginat-Zell-Suspension in Kontakt kamen, die sterilen Arbeitslösungen und die Aufstellung der Apparaturen in einer Sterilwerkbank verhinderten eine Kontamination der immobilisierten Zellen und der Mikrokapseln. Dadurch war die Mikrokapselproduktion unter GMP-Bedingungen mit dem *JetCutter* und dem *AirJet* ermöglicht, die mit der sterilen, geschlossenen Apparatur des IER-40 komplett vergleichbar sind. Die Verteilungen der Mikrokapseln, die mit dem *JetCutter* und der Gasextrusion produziert wurden, zeigten gegenüber den *vibrating nozzle*-Mikrokapseln mit einer sehr engen Verteilungsspanne sehr breite Größenstreuungen. Jedoch eigneten sich der *JetCutter* und die Gasextrusion in dieser Arbeit dazu, auch höherkonzentrierte und höherviskose Alginatlösungen anzuwenden. Im Gegensatz zum Inotech-Alginat konnte das höherviskose Fluka-Alginat für Immobilisierungen bzw. Mikroverkapselungen von lebenden Säugerzellen mit dem *JetCutter* und der Gasextrusion in einer Konzentration von 1,5% eingesetzt werden (SCHWINGER, KOCH *et al.*, 2002; KOCH *et al.*, eingereicht). Diese Eigenschaft entspricht einem Vorteil gegenüber der Methode der *vibrating nozzle*, bei der nur eine 1,0%ige Fluka-Alginatlösung anwendbar war.

Die getesteten Methoden erlaubten die Durchführung der Erzeugung von APA-Mikrokapseln mit immobilisierten lebenden Säugerzellen. Im weiteren Verlauf der Einkapselungsexperimente wurde festgestellt, dass die mechanische Stabilität der Mikrokapseln einen bedeutenden Aspekt hinsichtlich des Ausmaßes der Zellproliferation darstellt. Aufgrund dieser Tatsache musste die Membranfestigkeit der Mikrokapseln, die mit dem IER-40, der Gasextrusion- und der *JetCutter*-Methode produziert wurden, optimiert bzw. erhöht werden. Denn die immobilisierten Säugerzellen hatten das Innere von größeren Kapseln (400 bis 650  $\mu\text{m}$ ) nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Wochen bzw. von kleineren Mikrokapseln (<300  $\mu\text{m}$ ) nach 4 bis maximal 6 Wochen bereits ausgefüllt. Die Kapseln sollten in Zellkultur intakt bleiben, um *in vivo*-Applikationen vornehmen zu können. Außerdem musste gewährleistet sein, dass die Mikrokapseln nicht mit unzulänglicher Festigkeit im Tierversuch eingesetzt wurden. Obwohl die Polymerisation des Alginathydrogels mit Ba<sup>2+</sup>-Ionen aufgrund der Bindung an G-Moleküle und an die M-Moleküle des Alginates stabiler zu sein scheint (LIM UND SUN, 1980; GRÖHN *et al.*, 1994; KLÖCK *et al.*, 1994; THU *et al.*, 1996a, b; KLÖCK *et al.*, 1997; GAUMANN *et al.*, 2000; GAUMANN *et al.*, 2001), besitzen Fibroblasten, immobilisiert in Ca<sup>2+</sup>-Alginat, eine bessere Proliferationsrate (PEIRONE *et al.*, 1998). Da das Augenmerk der verschiedenen Einkapselungsmethoden im Hinblick auf eine Etablierung der Immobilisierung von transgenen Mausfibroblasten (GLI 328) gerichtet war, wurden aus diesem Grund alle Alginatpolymerisierungen mittels Ca<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt.

Modifizierungen der Mikrokapselmembranen mit Inotech-Alginat zeigten, dass verschiedene Beschichtungen mit 0,03%, 0,05%, 0,1%igem Inotech-Alginat oder alternierende Schichten aus PLL und 0,03%igem Inotech-Alginat zu keinen Stabilitätsunterschieden führten. Dagegen zeigten ULUDAG *et al.* (2000), dass Faktoren, wie die Anzahl der Beschichtungen der äußeren Membran oder die Konzentration des PLL, die Stabilität der APA-Mikrokapseln beeinflussen. SCHNEIDER *et al.* (2001) analysierten *multilayer*-Mikrokapseln mit eingeschlossenen Inselzellen und alternierenden Schichten aus Polyethylenimin, Polyacrylsäure oder Carboxymethylcellulose (CMC) und Alginat. Die gemessene Dicke dieser mehrschichtigen Membran betrug nur ungefähr 145 nm und zeigte klare Vorteile gegenüber Einkapselungen, die in einem Arbeitsschritt absolviert werden, wobei solide Alginatperlen ohne Beschichtung produziert werden. Außerdem gewährleisteten diese Mikrokapseln eine bessere Biokompatibilität, eine optimale Insulinantwort und eine mechanisch stabile Kapselmembran mit nur 145 nm Dicke. SHIMI *et al.* (1991) untersuchten die Permeabilität und mechanische Festigkeit von APA-Mikrokapseln mit unterschiedlichen Molekulargewichten von PLL. Die Beschichtung der Mikrokapseln, die mit PLL geringeren Molekulargewichtes produziert wurden, führte zu widerstandsfähigen Kapselmembranen.

Kapseln, die hingegen mit PLL höheren Molekulargewichtes modifiziert wurden, wiesen entgegengesetzte Merkmale auf. PLL mit einem Molekulargewicht von 22.000 schien optimal für die Ausbildung einer stabilen Kapselmembran, die z.B. für Immunglobuline impermeabel ist. Diese APA-Mikrokapseln ohne Zellen blieben nach Implantation *in vivo* mindestens 3 Monate intakt.

Durch die Verringerung der mechanischen Stabilität von Alginat-Mikrokapseln beim Einschluss von Zellen (VAN RAAMSDONK UND CHANG, 2001) und durch die bisher in dieser Arbeit durchgeführten Zellimmobilisierungen mit dem Inotech-Alginat war es erforderlich, eine stringendere Beschichtung der Mikrokapseln vorzunehmen. Dies brachte hervor, dass eine Modifizierung der Kapselmembranen mit dem höhermolekularen Alginat (Fluka, MW 100.000–200.000) mit einer Konzentration von 0,03% einige Vorteile gegenüber geringermolekularen Alginaten bietet. Diese Vorteile umfassen die Gewährleistung einer besseren mechanischen Langzeitstabilität der Kapseln in Bezug auf das Wachstumsausmaß der eingesetzten Zellen. So erfolgte eine bessere Abgrenzung der Mikrokapseln ohne jegliche Einschränkung oder sogar Verschlechterung der Biokompatibilität und der Transduktionsfähigkeit von immobilisierten, transgenen GLI 328-Mausfibroblasten (siehe Kapitel 4.4. und 4.5.). Das einzige positive Ergebnis zur Stabilisierung der Mikrokapseln konnte durch die Beschichtung mit dem höherviskosen Fluka-Alginat in einer Konzentration von 0,03% erreicht werden. Im Gegensatz besaßen die Mikrokapseln, die mit steigenden Konzentrationen des Inotech-Alginates von 0,03% über 0,05% bis 0,1% beschichtet wurden, keine stabileren Membranen. Weiterhin zeigte der Einsatz der Alginat, die für die Zellimmobilisierung bzw. Perlenherstellung verwendet wurden, keinen Einfluss auf die Stabilität der Mikrokapselmembranen. Aus diesen Gründen kann die Aussage der Erhöhung der Gelfestigkeit durch zunehmende Alginatkonzentration von MATINSEN *et al.* (1989) oder auch PEIRONE *et al.* (1998) in dieser Arbeit widerlegt werden. Den Beweis dafür liefert der Verlust der mechanischen Stabilität, den die mit Inotech-Alginat beschichteten Mikrokapseln durch das Ausmaß der Zellproliferation nach etwa 4 Wochen erfuhren. Dagegen untermauert die langzeitige Stabilitätserhaltung der mit Fluka-Alginat beschichteten Mikrokapseln dieses Gegenargument.

Da die mechanische Stabilität von  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Ba}^{2+}$ -Alginaten mit nachfolgenden Beschichtungen größer ist als die Festigkeit von nichtmodifizierten Mikrokapseln (PEIRONE *et al.*, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 2001), müssen beim Einsatz von Alginaten folgende Gesichtspunkte genau betrachtet werden:

Erstens ist die Zusammensetzung dieser Hydrogele deutlich von der Braunalgenspezies abhängig, wodurch rheologische Eigenschaften (z.B. die Viskosität) und die Fähigkeit zur

Bildung uniformer Perlen aus Alginaten von verschiedenen Anbietern und sogar aus Alginaten unterschiedlicher Chargen des gleichen Anbieters beträchtlich variieren (SERP *et al.*, 2000).

Zweitens ist die Reinheit der Alginathydrogele ein bedeutender Faktor für die Biokompatibilität der APA-Mikrokapseln und für die klinische Anwendung (HASSE *et al.*, 2000; ULUDAG *et al.*, 2000).

Drittens ermöglicht der Einsatz von APA-beschichteten Mikrokapseln im Gegensatz zu soliden Alginatperlen einen besseren Transport von höhermolekularen Substanzen, wie Proteinen, durch die semipermeable APA-Membran (LIM UND SUN, 1980) und die Diffusion von Nährstoffen zu den eingekapselten Zellen in APA-Mikrokapseln wird im Vergleich zu Zellen in einer festen Alginatperle erleichtert (THU *et al.*, 1996b).

#### **4.4. ANWENDUNG RETROVIRALER VERPACKUNGSZELLEN IN DER ZELLIMMOBILISIERUNG**

##### **4.4.1. Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-Toxizität mikroverkapselter Mausfibroblasten**

Das Gentherapiemodell Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir (HSV-TK/GCV) wurde in dieser Arbeit genutzt, um die HSV-TK-Transduktion immobilisierter, retroviraler Verpackungszellen auf TK-negative Zellen mit Hilfe der GCV-Toxizität zu untersuchen. Dafür wurden drei Mikrokapselchargen mit GLI 328-Mausfibroblasten, die mit dem Inotech Encapsulator™ in unterschiedlich modifizierte Mikrokapseln immobilisiert wurden, getestet. Die Kulturüberstände der lebenden, immobilisierten transgenen, Retrovirus (HSV-TK) produzierenden GLI 328-Fibroblasten wurden auf HSV-TK-negative NIH/3T3-Zellen appliziert und die Zellproliferation mit einem MTT-Test untersucht. Lebende Zellen metabolisieren das mitochondriale, lösliche Tetrazoliumsalz (MTT) zu farbigem und unlöslichem Formazan (HANSEN *et al.*, 1989). Wachstumshemmungen können durch induzierte Zytotoxizitätseffekte oder Zellnekrosen mit dem MTT-Assay gemessen werden (MOSMANN, 1983). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von 0; 1; 2; 5; 10; 20 und 50 µg/ml Ganciclovir auf die Viabilität transduzierter NIH/3T3-Zellen ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Positivkontrolle (RV-haltiger Überstand von nativen, nichtimmobilisierten GLI 328-

Zellen) sowie alle drei getesteten Kapselchargen

- (1) GLI 328-Zellen immobilisiert mit 1,5%igem Inotech-Alginat und Modifizierung der Kapselmembran mit 0,03%igem Inotech-Alginat und erneut mit PLL und 0,03%igem Inotech-Alginat
- (2) GLI 328-Zellen immobilisiert mit 1,0%igem Fluka-Alginat und beschichtet mit 0,03%igem Fluka-Alginat
- (3) GLI 328-Zellen immobilisiert mit 1,5%igem Inotech-Alginat und beschichtet mit 0,03%igem Fluka-Alginat,

unabhängig von der Stabilität ihrer Kapselmembranen, vergleichbare Halbwertsstemkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) zwischen 20 und 50  $\mu\text{g/ml}$  GCV demonstrierten. Das bedeutet, dass NIH/3T3-Zellen im gleichen Ausmaß mit retroviral transferierter HSV-TK nichtimmobilisierter oder immobilisierter GLI 328-Zellen transfiziert und gegenüber GCV sensibilisiert wurden.

Die Ergebnisse der HSV-TK-Transduktion durch den Überstand der Positivkontrolle bzw. der Kapselüberstände mit einer induzierten  $IC_{50}$  durch mehr als 20  $\mu\text{g/ml}$  GCV stehen im Gegensatz zu anderen publizierten Ergebnissen. Diese sagten aus, dass durch weniger als 2  $\mu\text{g/ml}$  GCV eine  $IC_{50}$  in HSV-TK-exprimierenden Zellen hervorgerufen wurde, wobei HSV-TK-negative Zellen einerseits mit HSV-TK-exprimierenden Zellen kokultiviert und andererseits direkt mit HSV-TK-Vektoren infiziert wurden (RUBSAM *et al.*, 1999; VANDIER *et al.*, 2000). Außerdem wurden in unserer Arbeitsgruppe TK-exprimierende Tumorzelllinien mit GCV behandelt, wobei der Einsatz von 2 bis 3,2  $\mu\text{g/ml}$  GCV zu einer  $IC_{50}$  führte (RAINOV *et al.*, 2000). Da in dieser Arbeit mit immobilisierten HSV-TK-Retrovirus produzierenden GLI 328-Zellen gearbeitet wurde, konnten zur Transduktion von TK-negativen Zellen (NIH/3T3) nur die Kulturüberstände der Kapselchargen wie auch die Überstände der Positivkontrolle eingesetzt werden, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die RV-haltigen Kulturüberstände von  $5 \times 10^6$  nativen GLI 328-Fibroblasten, die 24 h kultiviert wurden und von  $1 \times 10^7$  immobilisierten GLI 328-Zellen, die 4 Wochen nach der Einkapselung eingesetzt wurden und die abgesehen von einer kleineren Zellkolonie viabel waren, führten nach GCV-Applikation bei den transduzierten NIH/3T3-Fibroblasten zu gleicher Zytotoxizität. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die NIH/3T3-Zellen durch gleiche Mengen HSV-TK-Retroviren transduziert wurden. Dabei waren die immobilisierten GLI 328-Zellen aufgrund der vierwöchigen Kultivierung im Überschuss in den APA-Mikrokapseln, im Gegensatz zu den nichtimmobilisierten GLI 328-Fibroblasten, zur Transduktion vorhanden.

Zum Vergleich zeigte ein Experiment, dass durch  $1 \times 10^6$  retrovirale Verpackungszellen, die in 600 bis 800  $\mu\text{m}$  großen APA-Mikrokapseln immobilisiert wurden, deutlich weniger Viren freigesetzt wurden als durch  $1 \times 10^6$  freie, nichteingekapselte Verpackungszellen. Es wurde



weiterhin bewiesen, dass in jeder der beiden Testgruppen (freie und immobilisierte Zellen) die Freisetzung der Retroviren von Tag 7 zu Tag 21 offensichtlich verringert wurde (RAINOV, unveröffentlicht).

Alle drei Mikrokapselchargen ermöglichten einen identischen Austritt der Retroviren unabhängig von den unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Kapselmembranen, wie z.B. die höhere Membranstabilität der mit Fluka-Alginat beschichteten Kapseln. Das zeigt, dass immobilisierte Zellen zwar Transduktionskompetenz besitzen, aber keine Korrelation zwischen der Anzahl an eingesetzten nativen (Positivkontrolle) bzw. immobilisierten Zellen (Kapselchargen) und dem Transduktionsvermögen besteht.

Im Gegensatz zu Literaturangaben zeigten die mit HSV-TK-transduzierten NIH/3T3-Mausfibroblasten eine höhere Resistenz gegenüber GCV, denn Halbwertsstemkonzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit erst durch höhere Mengen GCV (20 bis 50 µg/ml) erreicht. Nach Einsatz einer GCV-Konzentration von 50 µg/ml blieben noch 30% der NIH/3T3-Positivkontrollzellen und sogar 34% der NIH/3T3-Zellen viabel, die mit der Kapselcharge 3 transduziert wurden. Die GCV-Zytotoxizität der Kapselcharge 3 wurde durch GLI 328-Zellen hervorgerufen, die mit 1,5%igem Inotech-Alginat immobilisiert wurden. Die äußere Membran dieser Mikrokapseln wurde aus 0,03%igem Fluka-Alginat gebildet.

Die geringen Transduktionsraten der NIH73T3-Zellen und die mögliche Resistenz gegenüber GCV kann möglicherweise mit einer zu kurzen Inkubationszeit mit denen im Kulturüberstand vorhandenen Retroviren zusammenhängen. Zusätzlich könnten die Retroviren toxisch auf die NIH/3T3-Zellen gewirkt haben, wodurch apoptotische Kaskaden aktiviert wurden, bevor eine TK-Expression stattfinden konnte. Ein weiter Verlust der Retroviren wäre auf nichtvorhandene Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen. Dadurch würde der *Bystander*-Effekt von HSV-TK-exprimierenden Zellen auf nichttransduzierte Zellen verloren gehen. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit keine unzureichende Zellkonfluenz beobachtet, so dass ein relativer Verlust von Retroviren als negativer Einfluss ausgeschlossen werden kann.

Da das Verhältnis von Mikrokapsel Eigenschaften und "Leistung" der immobilisierten Zellen eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Einkapselung darstellt, ist es sehr wichtig, die Kapsel Eigenschaften, wie Kapselpermeabilität, mechanische Stabilität, Immunprotektion und Biokompatibilität, zu verbessern (ULUDAG *et al.*, 2000). Für *in vivo*-Applikationen wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Anwendung des Inotech-Alginates das höhermolekulare Fluka-Alginat zur Ausbildung der äußeren Kapselmembran bzw. für eine stringenter Oberflächenmodifizierung der Mikrokapseln eingesetzt. Durch die Anwendung des Fluka-Alginates bei der APA-Mikrokapselherstellung erfolgte keine

Einschränkung der Biokompatibilität der Kapseln und es veränderte sich die Quantität der freigesetzten Viren nicht. Die veränderten physikochemischen Eigenschaften der Mikrokapseln stehen hier nicht im Zusammenhang mit der reduzierten Leistungsfähigkeit der immobilisierten HSV-TK-produzierenden GLI 328-Mausfibroblasten.

Außerdem wurde jede Kapselcharge zur Herstellung von widerstandsfähigen APA-Mikrokapseln mit PLL, der eigentlichen Permeabilitätsbarriere (ULUDAG *et al.*, 2000), stabilisiert. Im Gegensatz zu den nativen, nichteingekapselten GLI 328-Zellen, deren produzierte Retroviren direkt ins Kulturmedium abgegeben werden, könnte PLL wahrscheinlich für einen reduzierten Retrovirenaustritt bei den immobilisierten GLI 328-Fibroblasten verantwortlich gewesen sein. Das beweist, dass es sehr schwierig ist, alle Kriterien, die für Anwendungen am lebenden Modell notwendig und unumgänglich sind, zu berücksichtigen und zu verbessern. Für weiterführende Studien bedarf es diesbezüglich Entwicklungen, wobei die Freisetzung der Retroviren durch Einsatz anderer biokompatibler Alginathydrogele für die Ausbildung der äußeren Mikrokapseln optimiert werden sollte.

#### **4.5. APA-MIKROKAPSELN IM RATTENGLIOMMODELL**

Um die Biokompatibilität und die Immunprotektion der in Zellkultur stabilsten Mikrokapselcharge (GLI 328-Zellen immobilisiert mit 1,5%igem Inotech-Alginat und beschichtet mit 0,03%igem Fluka-Alginat) im lebenden Gewebe und die Überlebensrate der immobilisierten Zellen in einem F344-Rattengliommodell zu evaluieren, erfolgte die intrakranielle Implantation von 9L-Tumorzellen. Am Tag 7 wurden lebensfähige GLI 328-Zellen in 1.625 Mikrokapseln, die bereits seit 4 Wochen nach der Einkapselung in Zellkultur gehalten wurden und Größen von 200 bis 270 µm besaßen, pro Tier injiziert.

Histologische Untersuchungen ergaben, dass die Mikrokapseln den Tumor nicht erreicht haben und in proximalen Arterien arretierten. Die immobilisierten GLI 328-Zellen schienen 5 Tage nach der Kapselinjektion, an dem die Ratten getötet und die Hirne in Paraffin eingebettet wurden, noch lebend zu sein. Die Membranen der Mikrokapseln wurden nicht durch die intravasale Applikation zerstört und waren intakt. Das zeigt, dass die immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in Mikrokapseln <300 µm *in vitro* und *in vivo* lebensfähig sind und dass die Mikrokapseln aufgrund ihrer stabilen äußeren Fluka-Alginatmembran in einer sehr guten Beschaffenheit *in vivo* vorgefunden wurden. LANZA *et al.* (1999) demonstrierten, dass Kapseln, deren äußere Matrix aus 1,5%igem oder höher-

konzentriertem Alginat gebildet wurde, im Vergleich zu unstabileren Kapseln, deren äußere Membran aus <0,5–0,75%igem Alginat gebildet wurde, mehr als 1 Jahr in Ratten stabil waren. Es kann kein direkter Vergleich der applizierten Mikrokapseln mit anderen Studien erfolgen, da den Ratten in der vorliegenden Arbeit bereits 5 Tage nach der Kapselinjektion die Hirne *in toto* entnommen wurden, um die Lokalisation und die postinjizierte Beschaffenheit der Kapseln sowie das Verhalten der immobilisierten GLI 328-Zellen zu untersuchen. Aufgrund der getesteten Viabilität der immobilisierten GLI 328-Fibroblasten und der anhaltenden Stabilität der APA-Mikrokapseln über 3 Monate in Zellkultur ist es wahrscheinlich, dass die in den Mikrokapseln eingeschlossenen GLI 328-Zellen *in vivo* über einen längeren Zeitraum, als nur 5 Tage, überdauern würden. ZHOU *et al.* (1999) demonstrierten in Versuchen mit immobilisierten Insulin produzierenden Zellen, dass die Zellen *in vitro* sowie *in vivo* (in Diabetikermäusen) 2 Monate viabel waren. Eine Studie von PEIRONE *et al.* (1998) zeigte, dass Kapseln, die mit PLL und Alginat beschichtet wurden, eine höhere mechanische Stabilität besaßen und gegenüber Kapseln, die aufgrund geringerer Stabilität weniger als 14 Tage *in vivo* intakt blieben, mehr als 2 Monate *in vivo* überstanden. Weiterführende und zeitlich verlängerte Tierexperimente würden somit zu einer genaueren Aussage bezüglich der Langzeitüberlebensrate der immobilisierten Zellen in den Mikrokapseln führen. Die *in vivo*-Stabilität der Kapselmembranen sowie der wirksame Transport der Mikrokapseln zum Hirntumor könnte durch im Vorfeld optimierte Mikrokapseln mit Größen <200 µm erreicht werden, um eine lokale Antitumorwirkung durch das Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-Gentherapiesystem zu erzielen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Nichtvirale Vektoren, wie Liposomen, Ultraschall oder in APA-Mikrokapseln immobilisierte Zellen, stellen alternative Gentransfer- und Genterapie-Vektoren dar. Liposomen werden aufgrund ihrer niedrigen Toxizität als Transfervehikel für Makromoleküle, wie z.B. Nukleinsäuren, eingesetzt. Sie besitzen eine hohe Transfektionseffizienz, die unabhängig vom Zellzyklus abläuft und gewährleisten eine biologische Sicherheit, da sie die auftretenden Risiken viraler Vektoren, wie Mutagenese durch Einbau viraler DNA oder unerwünschte Aktivierung inaktiver Onkogene im menschlichen Genom, umgehen. Neben Liposomen stellt Ultraschall (US) ein weiteres unterstützendes Element zum Gentransfer in eukaryontische Zellen dar. Mittels Mikroverkapselung werden Zellen, die z.B. therapeutische oder toxische Vektoren bzw. Gene tragen, immobilisiert.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, kationische Liposomen aus einem kationischen und neutralen Lipid selbst zu konstruieren und sie hinsichtlich ihrer Gentransfereffizienz in Zellkultur von Hirntumorzellen zu untersuchen und zu optimieren. Weiterhin sollte der liposomale Gentransfer mit appliziertem 2 MHz-Ultraschall charakterisiert und verbessert werden. Die Anwendung von fokussiertem US führte zu Reflexions- und Kavitationsphänomenen *in vitro*. Deshalb wurde eine spezielle US-Absorptionskammer entwickelt, um diese Probleme zu umgehen.

Außerdem wurde die Zellimmobilisierung bzw. Mikroverkapselung von normalen, Tumor- und transgenen Zellen, eine weitere Strategie des nichtviralen Gentransfers, in dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurde eine Methode selbst entwickelt und zwei etablierte Mikroverkapselungsapparaturen unter Anwendung von Alginatlösungen unterschiedlicher Viskosität hinsichtlich physikalischer und biologischer Eigenschaften der produzierten Alginat-poly-L-Lysin-Alginat(APA)-Mikrokapseln mit immobilisierten Zellen getestet. Verschiedene Geräteeinstellungen (Parameter) wurden bei allen drei Techniken für die Produktion von Alginatperlen mit Durchmessern <300 µm untersucht und optimiert. Gleichzeitig wurden die Stabilität der beschichteten APA-Mikrokapseln und die Viabilität der immobilisierten Zellen in Zellkultur evaluiert. Die Applikation immobilisierter Mausfibroblasten in einem Rattengliommodell sollte zu Aussagen bezüglich der intraarteriellen Injizierbarkeit, der mechanischen Festigkeit der Membran der APA-Mikrokapseln und der Vitalität der injizierten immobilisierten Zellen *in vivo* führen.

Die mittels Streulichtanalyse ermittelten Größen der selbst synthetisierten kationischen Liposomenkompositionen ergaben Partikeldurchmesser von 280 nm bis etwa 1  $\mu\text{m}$ . Die parallel dazu durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen der Liposomenpräparate verifizierten liposomale Strukturen und Lipid-Bilayer-Membranen, die sich deutlich von der abgrenzenden *mica*-Oberfläche unterschieden.

Die quantifizierten Transfereffizienzen der mit dem Expressionsplasmid pEGFP-N3 komplexierten, synthetisierten kationischen Liposomen (Lipoplexe) unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen mittels FACS-Analyse zeigten deutlich variierende, aber höhere Transfektionsraten als das kommerziell verfügbare Liposomenpräparat LIPOFECTAMINE™. Es war dabei nicht erkennbar, dass eine Abhängigkeit zwischen Liposomengröße und Transfektionseffizienz besteht. Die synthetisierte Liposomenprobe DC-Cholesterol/DOPE 3:2 mit einem mittleren Durchmesser von ca. 740 nm zeigte allgemein die besten Ergebnisse.

Während der Optimierung der liposomalen Transfektionsraten maligner Gliomzelllinien führte eine Erhöhung der Konzentration des kationischen Lipids von 10 auf 30 nmol sowie die Erhöhung der Plasmid-DNA-Konzentration im Liposomen-DNA-Komplex von 1 auf 10  $\mu\text{g}$  zu keiner Steigerung der Transferrate unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen. Dagegen waren Liposomenkonzentrationen von 1–10 nmol für eine Transfektionsverbesserung bei gleichbleibender Plasmid-DNA-Konzentration verantwortlich. Weiterhin führte die Transfektion mit linearer und zirkulärer Plasmid-DNA zu keinem signifikanten Unterschied. Die höchste Transfektionseffizienz in Zellkultur konnte mit einem Verhältnis des kationischen Lipids zur Plasmid-DNA von 10:1 (nmol: $\mu\text{g}$ ) im Liposomen-DNA-Komplex bei einer Transfektionsdauer von 6 Stunden erreicht werden.

Der liposomale DNA-Transfer in Gliomzellen wurde mit einem 2 MHz fokussierten Ultraschall und einer Energie von  $0,5 \text{ W/cm}^2$  unterstützt. Die US-Applikationsdauer von 60 Sekunden zeigte eine signifikante Transfektionsverbesserung ohne Zellschaden, dagegen führten 90 Sekunden US zum Zelltod von mehr als 80% der Gliomzellen.

In einer gesondert angefertigten US-Absorptionskammer, in der die Gliomzellen 60 Sekunden dem US exponiert wurden, war keine Verbesserung der Genexpression nach US-Absorption erkennbar. Deshalb wurde durch die Anwendung des US-Kontrastmittels Levovist®, in Konzentrationen von 2 mg/ml, 20 mg/ml und 200 mg/ml, während der US-

Exposition eine ultraschallbedingte Kavitation induziert. Dies wiederum führte zu einer verbesserten liposomalen, US-unterstützten Transfektion, wobei die Vitalität der Zellen mit steigender Levovist®-Konzentration abnahm.

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen und um die in Zellkultur durchgeführten liposomalen Gentransferstudien und deren Ergebnisse *in vivo* zu bewahren bzw. die Rolle der US-unterstützten Lipoplex-Transfektion mit und ohne Kontrastmittel zu klären, wäre es weiterhin wichtig, diese Experimente in ein intrakranielles Tiermodell mit transplantierten, malignen humanen Hirntumorzellen zu übertragen und zu untersuchen. Mit einer erschwerten Übertragung der besten Ergebnisse auf Tiermodelle ist zu rechnen, da eine Transfektionseffizienz *ex vivo* nicht unbedingt mit *in vivo*-Applikationen korreliert.

Die drei angewandten Methoden der Zellimmobilisierung durch Mikroverkapselung mit dem Polymer Alginate, wie (1) die selbst entwickelte *AirJet*-Methode, (2) die *vibrating nozzle* des Inotech Encapsulators™ IER-40 und (3) der *JetCutter*, bewiesen die Durchführung der Erzeugung von definierten APA-Mikrokapselgrößen (<300 µm) und deren mechanische Stabilität. Immobilisierte Säugerzellen in APA-Mikrokapseln überlebten für mindestens 3 Monate in Zellkultur. Dabei war eine Korrelation zwischen Mikrokapselgröße und Wachstum der eingeschlossenen Zellen erkennbar. Eine Stabilitätserhöhung der APA-Mikrokapseln konnte durch Modifizierung der Kapselmembranen mit einem Alginate höherer Viskosität erzielt werden.

In unterschiedlich beschichteten Mikrokapseln immobilisierte, Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Retrovirus produzierende Zellen (GLI 328) konnten nach Ganciclovir-Gabe im gleichen Ausmaß einen toxischen *Bystander*-Effekt auf NIH/3T3-Zellen in Zellkultur hervorrufen wie native, nichteingekapselte GLI 328-Zellen.

Histologische Untersuchungen von Rattenhirnen demonstrierten, dass intraarteriell applizierte APA-Mikrokapseln mit immobilisierten GLI 328-Mausfibroblasten in einem F344-Rattengliommodell zur intravaskulären Administration *in vivo* geeignet sind die Fähigkeit besitzen, lebende, eingekapselte Zellen vor immunologischen Reaktionen des Wirtsorganismus zu schützen. Die immobilisierten Zellen konnten mindestens 5 Tage *in vivo* überleben, die Mikrokapselmembranen blieben intakt. Jedoch arretierten die Kapseln

aufgrund ihrer Größe in proximalen Hirnarterien der Ratten.

In weiteren Arbeiten sollten zunächst Zellimmobilisierungen erfolgen, aus denen kleinere APA-Mikrokapseln mit Größen  $<200\ \mu\text{m}$  hervorgehen. Es soll überprüft werden, ob eine Langzeitüberlebensrate der eingeschlossenen Zellen in kleineren Mikrokapseln gewährleistet ist, um die Applikation der Kapseln in tierexperimentellen Arbeiten mittels invasiven Kathetern oder Kanülen vornehmen zu können. Mikrokapseln  $<200\ \mu\text{m}$  müssten aufgrund ihrer geringeren Größe gegenüber Mikrokapseln, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, besser zum ZNS-Tumor gelangen, um eine direkte lokale Antitumorwirkung hervorzurufen. Weiterhin sollten die in dieser Arbeit angewendeten APA-Verkapselungs- und Beschichtungstechniken weiter optimiert werden. Besonderes Augenmerk sollte auf die Verbesserung der Retrovirenfreisetzung durch Anwendung anderer Alginat zur Beschichtung der Hohlkapseln mit immobilisierten Zellen gelegt werden, wodurch gleichzeitig die Stabilisierung der Mikrokapselmembranen und die Biokompatibilität gewährleistet ist, um eine mögliche Immunantwort *in vivo* zu umgehen.

Somit liefert die vorliegende Arbeit nicht nur neue Ergebnisse in Bezug auf den US-unterstützten, liposomalen Gentransfer in Gliomzellen *in vitro*, auf Zellimmobilisierungstechniken, auf die Beschichtungsstrategie zur Membranstabilisierung der APA-Mikrokapseln sowie auf deren Applikation in einem Rattenhirntumormodell, sondern besitzt Anwendungspotential in der Gentherapie maligner Hirntumoren.

## 6. LITERATUR

AEBISHER, P., BUCHSER, E., JOSEPH, J. M., FAVRE, J., DETRIBOLET, N., LYSAGHT, M., RUDNICK, S., UND GODDARD, M. 1994. Transplantation in humans of encapsulated xenogeneic cells without immunosuppression – a preliminary-report. *Transplantation* **58**, 1275-1277.

AL-HENDY, A., HORTELANO, G., TANNENBAUM, G. S., UND CHANG, P. L. 1995. Allogeneic somatic gene therapy: correction of growth hormone deficiency in dwarf mice with microencapsulated non-autologous myoblasts. *Hum. Gene Ther.* **6**, 165-175.

ANDERSON, F. W. 1998. Human gene therapy. *Nature* **392**, 25-30.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R. E., KINGSTON, D. D., SEIDMANN, J. R., SMITH, J. A., UND STRUHL, J. A. 1993. Current protocols in molecular biology. Sec.edition. Green Publishing and John Wiley & Sons Inc., New York.

BAO, S., THRALL, B. D., UND MILLER, D. L. 1997. Transfection of reporter plasmid into cultured cells by sonoporation *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* **23**, 953-959.

BAO, S., THRALL, B. D., GIES, R. A., UND MILLER, D. L. 1998. *In vivo* transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer Res.* **58**, 219-221.

BARBA, D., HARDIN, J., RAY, J., UND GAGE, F. H. 1993. Thymidine kinase-mediated killing of rat brain tumors. *J. Neurosurg.* **79**, 729-735.

BARTH, R. F. 1998. Rat brain tumor models in experimental neurooncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neurooncol.* **36**, 91-102.

BEDNARSKI, M. D., LEE, J. W., CALLSTROM, M. R., UND LI, K. C. 1997. *In vivo* target-specific delivery of macromolecular agents with MR-guided focused ultrasound. *Radiology* **204**, 263-268.



BÉGIN, F., CASTAIGÉ, F., UND GOULET, J. 1991. Production of alginate beads by a rotative atomizer. *Biotechnol. Tech.* **5**, 459-464.

BEHR, J. P., DEMENEIX, B., LOEFFLER, J. P., UND MUTUL, J. P. 1989. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6982-6986.

BENNETT, M. J., NANTZ, M. H., BALASUBRAMANIAM, R. P., GRUENERT, D. C., UND MALONE, R. W. 1995. Cholesterol enhances cationic liposome-mediated DNA transfection of human respiratory epithelial cells. *Bioscience Reports* **15**, 47-53.

BERENS, M. E., GIESE, A., SHAPIRO, J. R., UND COONS, S. W. 1999. Allogeneic astrocytoma in immune competent dogs. *Neoplasia* **1**, 107-112.

BI, W. L., PARYSEK, L. M., WARNICK, R., UND STAMBROOK, P. J. 1993. *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **4**, 725-731.

BIRNBOIM, J. C., UND DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

BOUSSIF, O., ZANTA, M. A., UND BEHR, J.-P. 1996. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* **3**, 1074-1080.

BOVIATIS, E. J., CHASE, M., WEI, M. X., TAMIYA, T., HURFORD, R. K., JR., KOWALL, N. W., TEPPER, R. I., BREAKEFIELD X. O., UND CHIOCCA, E. A. 1994. Gene transfer into experimental brain tumors mediated by adenovirus, herpes simplex virus, and retrovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **5**, 183-191.

BRANDENBERGER, H., UND WIDMER, F. 1998. A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate. *J. Biotechnol.* **63**, 73-80.

BRAYMAN, A. A., UND MILLER, M. W. 1999. Sonolysis of AlbuNex-supplemented, 40% hematocrit human erythrocytes by pulsed 1-MHz ultrasound: pulse number, pulse duration and exposure vessel rotation dependence. *Ultrasound Med. Biol.* **25**, 307-314.

- BUGARSKI, B., LI, Q. L., GOOSEN, M. F. A., PONCELET, D., NEUFELD, R. J., UND VUNJA, G. 1994. Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation. *AICHE J.* **40**, 1026-1031.
- CAPLEN, N. J., KINRADE, E., SORGI, F., GAO, X., GRUENERT, D., GEDDES, D., COUTELLE, C., HUANG, L., ALTON, E. W., UND WILLIAMSON, R. 1995. *In vitro* liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther.* **2**, 603-613.
- CARTER, N. P., UND MEYER, E. W. Introduction to the principles of flow cytometry. 1994. ORMEROD, M. G. ed., *Flow Cytometry*, 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press, Oxford.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W., UND PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- CHANG, P. L. 1997. Microcapsules as bio-organs for somatic gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **831**, 461-473.
- CHANG, T. M. S. 1995. Artificial cells with emphasis on bioencapsulation. *Biotech. Ann. Rev.* **1**, 267-295.
- CHANG, T. M., UND PRAKASH, S. 1998. Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells. *Mol. Med. Today* **4**, 221-227.
- CHANG, P. L., SHEN, N., UND WESTCOTT, A. J. 1993. Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **4**, 433-440.
- CHRISTIANSEN, C., KRYVI, H., SONTUM, P. C., UND SKOTLAND, T. 1994. Physical and biochemical characterization of Alburnex, a new ultrasound contrast agent consisting of air-filled albumin microspheres suspended in a solution of human albumin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **19**, 307-320.
- CLAYTON, H. A., JAMES, R. F. L., UND LONDON, N. J. M. 1993. Islet microencapsulation: a review. *Acta Diabetol.* **30**, 181-189.

CONE, R. D., UND MULLIGAN, R. C. 1984. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81**, 6349-6353.

CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H., UND FALKOW, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.

CULVER, K. W., RAM, Z., WALLBRIDGE, S., ISHII, H., OLDFIELD E. H., UND BLAESE R. M. 1992. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**, 1550-1552.

DANOS, O., UND MULLIGAN, R. C. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6460-6464.

DE VOS, P., DE HAAN, B. J., UND VAN SCHILFGAARDE, R. 1997a. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials* **18**, 273-278.

DE VOS, P., DE HAAN, B. J., UND VAN SCHILFGAARDE, R. 1997b. Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* **18**, 1085-1090.

DE VOS, P., DE HAAN, B. J., PATER, J., UND VAN SCHILFGAARDE, R. 1996. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* **62**, 893-899.

DE VOS, P., DE HAAN, B. J., WOLTERS, G. H. J., UND VAN SCHILFGAARDE, R. 1999. Why do microencapsulated islets fail in the absence of overgrowth? *Diabetes* **48**, 1381-1388.

DE VOS, P., WOLTERS, G. H., FRITSCHY, W. M., UND VAN SCHILFGAARDE, R. 1993. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation. *Int. J. Artif. Organs* **16**, 205-212.

FARHOOD, H., SERBINA, N., UND HUANG, L. 1995. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 289-195.

FARHOOD, H., GAO, X., SON, K., YANG, Y. Y., LAZO, J. S., HUANG, L., BARSOUM, J., BOTTEGA, R., UND EPAND R. M. 1994. Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **716**, 23-34.

FELGNER, J. H., KUMAR, R., SRIDHAR, C. N., WHEELER, C. J., TSAI, Y. J., BORDER, R., RAMSEY, P., MARTIN, M., UND FELGNER, P. L. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **269**, 2550-2561.

FELGNER, P. L., UND RINGOLD, G. M. 1989. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* **337**, 387-388.

FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M., UND DANIELSEN, M. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417.

FREEMAN, S. M., ABBOUD, C. N., WHARTENBY, K. A., PACKMAN, C. H., KOEPLIN, D. S., MOOLTEN, F. L., UND ABRAHAM, G. N. 1993. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* **53**, 5274-5283.

GAGANDEEP, S., BREW, R., GREE, B., CHRISTMAS, S. E., KLATZMANN, D., POSTON, G. J., UND KINSELLA, A. R. 1996. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther.* **3**, 83-88.

GALETTI, P. M., AEBISHER, P., UND LYSAGHT, M. L. 1995. The dawn of biotechnology in artificial organs. *Asaio J.* 49-57.

GALIPEAU, J., LI, H., PAQUIN, A., SICILIA, F., TARPATI, G., UND NALBANTOGLU, J. 1999. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* **59**, 2384-2394.

GAMBOTTO, A., DWORACKI, G., CICINNATI, V., KENNISTON, T., STEITZ, J., TÜTING, T., ROBBINS, P. D., UND DELEO, A. B. 2000. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-K<sup>d</sup>-restricted CTL epitope. *Gene Ther.* **7**, 2036-2040.

GAO, X., UND HUANG, L. 1991. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179**, 280-285.

GAO, X., UND HUANG, L. 1995. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **2**, 710-722.

GAUMANN, A., LAUDES, M., JACOB, B., POMMERSHEIM, R., LAUE, C., VOGT, W., UND SCHREZENMEIR, J. 2000. Effect of media composition on long-term *in vitro* stability of barium alginate and polycationic acid multilayer microcapsules. *Biomaterials* **21**, 1911-1917.

GAUMANN, A., LAUDES, M., JACOB, B., POMMERSHEIM, R., LAUE, C., VOGT, W., UND SCHREZENMEIR, J. 2001. Xenotransplantation of parathyroids in rats using barium-alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 35-43.

GENG, Y.-J., WU, Q., MUSZYNSKI, M., HANSSON, G. K., UND LIBBY, P. 1996. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by *in vitro* stimulation with interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleucine-1 $\beta$ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 19-27.

GHOSAL, S. K., TALUKDAR, P., UND PAL, T. K. 1993. Standardization of a newly designed vibration capillary apparatus for the preparation of microcapsules. *Chem. Eng. Technol.* **16**, 395-398.

GLORIOSO, J. C., GOINS, W. F., MEANEY, C. A., FINK, D. J., UND DELUCA, N. A. 1994. Gene transfer to brain using herpes simplex virus vectors. *Ann. Neurol.* **35**, Suppl. S28-34.

GOLDBERG, B. B., LIU, J., UND FORSBERG, F. 1994. Ultrasound contrast agents: a review. *Ultrasound Med. Biol.* **20**, 319-333.

GOOSEN, M. F. A., O'SHEA, G. M., GHARAPETIAN, H. M., CHOU, S., UND SUN, A. M. 1985. Optimization of microencapsulation parameters: semipermeable microcapsules as a bioartificial pancreas. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 146-150.

GOULD, S. J., UND SUBRAMANI, S. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* **175**, 5-13.

GREEN, K. D., GILL, I. S., KHAN, J. A., UND VULFSON, E. N. 1996. Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 535-543.

GREENLEAF, W. J., BOLANDER, M. E., SARKAR, G., GOLDRING, M. B., UND GREENLEAF, J. F. 1998. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med. Biol.* **24**, 587-595.

GRÖHN, P., KLÖCK, G., SCHMITT, J., ZIMMERMANN, U., HORCHER, A., BRETZEL, R. G., HERING, B. J., BRANDHORST, D., BRANDHORST, H., ZEKORN, T., *et al.* 1994. Large-scale production of Ba(2+)- alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**, 380-387.

HALLE, J. P., LEBLOND, F. A., PARISEAU, J. F., JUTRAS, P., BRABANT, M. J., LEPAGE, Y. 1994. Studies on small (less than 300 µm) microcapsules. II. Parameters governing the production OF ALGINATE BEADS BY HIGH-VOLTAGE ELECTROSTATIC PULSES. *CELL TRANSPLANT.* **3**, 365-372.

HANSEN, M. B., NIELSEN, S. E., UND BERG, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.

HARTMANN, A. W., NESSBITT, R. U., SMITH, J. F. M., UND NUESSELE, N. O. 1975. Viscosities of acacia and sodium alginate after sterilization by cobalt-60. *J. Pharm. Sci.* **64**, 802-805.

HASSE, C., BOHRER, T., BARTH, P., STINNER, B., COHEN, R., CRAMER, H., ZIMMERMANN, U., UND ROTHMUND, M. 2000. Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in experimental hypoparathyroidism: long-term *in vivo* function following microencapsulation with a clinically suitable alginate. *World J. Surg.* **24**, 1361-1366.

HAWLEY-NELSON, P., CICCARONE, V., GEBEYEHU, G., UND JESSEE, J. 1993. Lipofectamine reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus* **15**, 73-79.

HOFFMANN, A. S. 1992. Molecular bioengineering of biomaterials in the 1990s and beyond: a growing liaison of polymers with molecular biology. *Artif. Organs* **16**, 43-49.

HONG, K., ZHENG, W., BAKER, A., UND PAPAHADJORPOULOS, D. 1997. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient *in vivo* gene delivery. *FEBS Lett.* **400**, 233-237.

HORTELANO, G., AL-HENDY, A., OFOSU, F. A., UND CHANG, P. L. 1996. Delivery of human factor IX in mice by microencapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood* **87**, 5095-5103.

HUG, P., UND SLEIGHT, R. G. 1991. Liposomes for the transformation of eucaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 1-17.

JASS, J., TJÄRNHAGE, T., UND PUU, G. 2000. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* **79**, 3153-3163.

KAGAWA, Y., UND RACKER, E. 1971. Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **246**, 5477-5487.

KIM, I. J., GREENLEAF, J. F., KINNICK, R. R., BRONK, T. J., UND BOLANDER, M. E. 1996. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1339-1346.

KING, G. A., DAUGULIS, A. J., FAULKNER, P., UND GOOSEN, M. F. A. 1987. Alginate-polylysine microcapsules of controlled membrane molecular weight cutoff for mammalian cell culture engineering. *Biotechnol. Prog.* **3**, 231-240.

KLEIN, J., STOCK, J., UND VORLOP, K.-D. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 86-91.

KLÖCK, G., PFEFFERMANN, A., RYSER, C., GRÖHN, P., KUTTLER, B., HAHN, H. J., UND ZIMMERMANN, U. 1997. Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* **18**, 707-713.

KLÖCK, G., FRANK, H., HOUBEN, R., ZEKORN, T., HORCHER, A., SIEBERS, U., WÖHRLE, M., FEDERLIN, K., UND ZIMMERMANN, U. 1994. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 638-643.

KOCH, S., POHL, P., COBET, U., UND RAINOV, N. G. 2000. Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, 897-903.

KRAMM, C. M., SENA-ESTEVEZ, M., BARNETT, F. H., RAINOV, N. G., SCHUBACK, D. E., YU, J. S., PECHAN, P. A., PAULUS, W., CHIOCCA, E. A., UND BREAKEFIELD, X. O. 1995. Gene therapy for brain tumors. *Brain Pathol.* **5**, 345-381.

KULSENG, B., SKJÅK-BRÆK, G., RYAN, L., ANDERSSON, A., KING, A., FAXVAAG, A., UND ESPEVIK, T. 1999. Transplantation of alginate microcapsules: generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. *Transplantation* **67**, 978-984.

KWOK, K. K., GROVES, M. J., UND BURGESS, D. J. 1991. Production of 5- 15 mm diameter alginate polylysine microcapsules by air-atomization technique. *Pharm. Res.* **8**, 341-344.

LANZA, R. P., JACKSON, R., SULLIVAN, A., RINGELING, J., MCGRATH, C., KUHTREIBER, W., UND CHICK, W. L. 1999. Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* **67**, 1105-1111.

LASIC, D. D. 1997. Liposomes in gene delivery. CRC Press LLC, USA.

LAWRIE, A., BRISKEN, A. F., FRANCIS, A. F., TAYLER, D. I., CHAMBERLAIN, J., CROSSMAN, D. C., CUMBERLAND, D. C., UND NEWMAN, C. M. 1999. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells *in vitro*. *Circulation* **99**, 2617-2620.

LEE, E. R., MARSHALL, J., SIEGEL, C. S., JIANG, C., YEW, N. S., NICHOLS, M. R., NIETUPSKI, J. B., ZIEGLER, R. J., LANE, M. B., WANG, K. X., WAN, N. C., SCHEULE, R. K., HARRIS, D., SMITH, A. E., UND CHENG, S. H. 1996. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1701-1717.

LEGENDRE, J. Y., UND SZOKA, F. C. 1992. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res.* **9**, 1235-1242.



- LEO, W. J., MCLOUGHLIN, A. J., UND MALONE, D. M. 1990. Effects of sterilization treatment on some properties of alginate solutions and gels. *Biotechnol. Prog.* **6**, 51-53.
- LEVEE, M. G., LEE, G.-M., PAEK, S.-H., UND PALSSON, B. O. 1994. Microencapsulated human bone-marrow cultures: a potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cells. *Biotechn. Bioeng.* **43**, 734-739.
- LEVENTIS, R., UND SILVIUS, J. R. 1990. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 124-132.
- LI, S., TSENG, W.-C., BEER STOLZ, D., WU, S.-P., WATKINS, S. C., UND HUANG, L. 1999. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* **6**, 585-594.
- LIM, F., UND SUN, A. M. 1980. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**, 908-910.
- LINIAL, M. L., UND MILLER, A. D. 1990. Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 125-152.
- LINK, C. J., LEVY, J. P., MCCANN, L. Z., UND MOORMAN, D. W. 1997. Gene therapy for colon cancer with the herpes simplex thymidine kinase gene. *J. Surg. Oncol.* **64**, 289-294.
- LIU, D., UND SONG, Y. K. 1998. Cationic liposome-mediated transfection *in vivo*. *Gene Ther. Mol. Biol.* **2**, 59-68.
- LIU, F., YANG, J., HUANG, L., UND LIU, D. 1996. New cationic lipid formulations for gene transfer. *Pharm. Res.* **13**, 1856-1860.
- LIU, H. W., OFOSU, F. A., UND CHANG, P. L. 1993. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum. Gene Ther.* **4**, 291-301.
- LYSAGHT, M. J., FRYDEL, B., GENTILE, F., EMERICH, D., UND WINN, S. 1994. Recent progress in immunisolated cell therapy. *J. Cell. Biochem.* **56**, 196-203.

- MACHLUF, M., ORSOLA, A., UND ATALA, A. 2000. Controlled release of therapeutic agents: slow delivery and cell encapsulation. *World J. Urol.* **18**, 80-83.
- MAHALEY, M. S., JR., METTLIN, C., NATARAJAN, N., LAWS, E. R., JR., UND PEACE, B. B. 1989. National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J. Neurosurg.* **71**, 826-836.
- MANN, R., MULLIGAN, R. C., UND BALTIMORE, D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159.
- MARESCA, G., SUMMARIA, V., COLAGRANDE, C., MANFREDI, R., UND CALLIADA, F. 1998. New prospects for ultrasound contrast agents. *Eur. J. Radiol.* **2**, 171-178.
- MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G., UND SMIDSRØD, O. 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 79-89.
- MARUSYK, R., UND SERGEANT, A. 1980. A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal. Biochem.* **105**, 403-404.
- MAYHEW, E., UND FREEMAN, A. I. 1991. Liposomes, erythrocytes, and other macromolecule-targeted drug-delivery systems. In: ECONOMU, S. G., WITT, T. R. DEZIEL, D. J., et al., eds. *Adjuncts to Cancer Surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger, 423-428.
- MILLER, A. D. UND BUTTIMORE, C. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2895-2902.
- MILLER, D. L., UND GIES, R. A. 1998. Enhancement of ultrasonically-induced hemolysis by perfluorocarbon-based compared to air-based echo-contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* **24**, 285-292.
- MILLER, D. L., UND THOMAS, R. M. 1995. Ultrasound contrast agents nucleate inertial cavitation *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* **21**, 1059-1065.

MILLER, D. L., UND WILLIAMS, A. R. 1989. Bubble cycling as the explanation of the promotion of ultrasonic cavitation in a rotating tube exposure system. *Ultrasound Med. Biol.* **15**, 641-648.

MILLER, D. L., BAO, S., UND MORRIS, J. M. 1999. Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system. *Ultrasound Med. Biol.* **25**, 143-149.

MILLER, D. L., GIES, R. A., UND CHRISLER, W. B. 1997. Ultrasonically induced hemolysis at high cell and gas body concentration in a thin-disc exposure chamber. *Ultrasound Med. Biol.* **23**, 625-633.

MILLER, M. W., MILLER, D. L., UND BRAYMAN, A. A. 1996. A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med. Biol.* **22**, 1131-1154.

MILLER, A. D., TRAUBER, D. R., UND BUTTIMORE, C. 1986. Factors involved in production of helper virus-free retrovirus vectors. *Somatic Cell Mol. Genet.* **12**, 175-183.

MINETA, T., RABIN, S. D., UND MARTUZA, R. L. 1994. Treatment of malignant gliomas using ganciclovir-hypersensitive, ribonucleotide reductase-deficient herpes simplex viral mutant. *Cancer Res.* **54**, 3963-3966.

MITTAL, R. A., TAN, C. H., UND KHOO, H. E. 2000. Adenosine modulates cell growth in baby hamster kidney (BHK) cells. *Biofactors* **11**, 247-256.

MIZUNO, M., UND YOSHIDA, J. 1998. Effect of human interferon- $\beta$  gene transfer upon human glioma transplanted into nude mouse brain involves induced natural killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **47**, 227-232.

MIZUNO, M., YOSHIDA, J., SUGITA, K., INOUE, I., SEO, H., HAYASHI, Y., KOSHIZAKA, T., UND YAGI, K. 1990a. Growth inhibition of glioma cells transfected with the human  $\beta$ -interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. *Cancer Res.* **50**, 7826-7829.

MIZUNO, M., YOSHIDA, J., SUGITA, K., INOUE, I., SEO, H., HAYASHI, Y., KOSHIZAKA, T., UND YAGI, K. 1990b. Growth inhibition of glioma cells of different cell lines by human interferon- $\beta$  produced in the cells transfected with its gene by means of liposomes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **9**, 73-77.

MOOLTEN, F. L. 1986. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: a paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* **46**, 5276-5281.

MOOLTEN, F. L., UND WELLS, J. M. 1990. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 297-300.

MUENCHAU, D. D., FREEMAN, S. M., CORNETTA, K., ZWIEBEL, J. A., UND ANDERSON, W. F. 1990. Analysis of retroviral packaging lines for generation of replication-competent virus. *Virology* **176**, 262-265.

MOSMANN, T. R. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55.

MULLEN, Y., MARUYAMA, M., UND SMITH, C. V. 2000. Current progress and perspectives in immunoisolated islet transplantation. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* **7**, 347-357.

MURRAY, K. D., MCQUILLIN, A., STEWART, L., ETHERIDGE, C. J., COOPER, R. G., MILLER, A. D., UND GURLING, H. M. D. 1999. Cationic liposome-mediated DNA transfection in organotypic explant cultures of the ventral mesencephalon. *Gene Ther.* **6**, 190-197.

NABEL, G. L., NABEL, E. G., YANG, Z., FOX, B. A., PLAUTZ, G. E., GAO, X., HUANG, L., SHU, S., GORDON, D., UND CHANG, A. E. 1993. Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma: Expression, biological activity, lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11307-11311.

NISHIKAWA, R., JI, X.-D., HARMON, R. C., LAZAR, C. S., GILL, G. N., CAVENEE, W. K., UND SU HUANG, H.-J. 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7727-7731.

- OGBONNA, J. C., MATSUMURA, M., UND KATAOKA, H. 1991. Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameter: a review. *Process. Biochem.* **26**, 109-121.
- OLDFIELD, E. H., RAM, Z., CULVER, K. W., BLAESE, R. M., DEVROOM, H. L., UND ANDERSON, W. F. 1993. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.* **4**, 39-69.
- OPHIR, J., UND PARKER, K. J. 1989. Contrast agents in diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **15**, 319-333.
- ORMEROD, M. G. 1994. An introduction to fluorescence technology. ORMEROD, M. G. ed., *Flow Cytometry*, 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press, Oxford.
- OTTERLEI, M., OSTGAARD, K., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDSRØD, O., SOON-SHIONG, P., UND ESPEVIK, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunol.* **10**, 286-291.
- PAGANO, R. E., UND WEINSTEIN, J. N. 1978. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, 435-468.
- PEIRONE, M., ROSS, C. J., HORTELANO, G., BRASH, J. L., UND CHANG, P. L. 1998. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 587-596.
- Pinataro, B., Steinem, C., Galla, H.-J., Fuchs, H., und Janshoff, A. 2000. Specific adhesion of vesicle monitored by scanning force microscopy and quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **78**, 487-498.
- POHL, P., ANTONENKO, Y. N., UND ROSENFELD, E. H. 1993a. Effect of ultrasound on the pH profiles in the unstirred layers near planar bilayer lipid membranes measured by microelectrodes. *Biochim. Biophys. Acta* **1152**, 155-160.

POHL, P., ROSENFELD, E. H., UND MILLNER, R. 1993b. Effects of ultrasound on the steady-state transmembrane pH gradient and the permeability of acetic acid through bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1145**, 279-283.

POHL, E. E., ROSENFELD, E. H., POHL, P., UND MILLNER, R. 1995. Effects of ultrasound on agglutination and aggregation of human erythrocytes *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* **21**, 711-719.

POLIACHLIK, S. L., CHANDLER, W. L., MOURAD, P. D., BAILEY, M. R., BLOCH, S., CLEVELAND, R. O., KACZKOWSKI, P., KEILMAN, G., PORTER, T., UND CRUM, L. A. 1999. Effect of high-intensity focused ultrasound on whole blood with and without microbubble contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* **25**, 991-998.

PONCELET, D., BUGARSKI, B., AMSDEN, B. G., ZHU, J., NEUFELD, R., UND GOOSEN, M. F. A. 1994. A parallel-plate electrostatic droplet generator: parameters affecting microbead size. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 252-255.

PONCELET, D., DESMET, B. P., BEAULIEU, C. HUGUET, M. L., FOURNIER, A., UND NEUFELD, R. J. 1995. Production of alginate beads by emulsification internal gelation. 2. Physicochemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 644-650.

PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., HALLE, J. P., NEUFELD, R. J., UND FOURNIER, A. 1992. Production of alginate beads by encapsulation/internal gelation. I. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 39-45.

PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G., UND CORMIER, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

PRÜSSE, U., DALLHUHN, J., BREDFORD, J., UND VORLOP, K. D. 2000. Production of spherical beads by JetCutting. *Chem. Eng. Technol.* **23**, 1105-1110.

PRÜSSE, U., FOX, B., KIRCHHOF, M., BRUSKE, F., BREDFORD, J., UND VORLOP, K.-D. 1998. New process (jet cutting method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chem. Eng. Technol.* **21**, 29-33.

RAINOV, N. G. 2000. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2389-2401.

RAINOV, N. G., KOCH, S., SENA-ESTEVEZ, M., UND BERENS, M. E. 2000. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 607-613.

RAINOV, N. G., SENA-ESTEVEZ, M., FRAEFEL, C., DOBBERSTEIN, K.-U. , CHIOCCA, E. A., UND BREAKEFIELD, X. O. 1998. A chimeric fusion protein of cytochrome CYP4B1 and green fluorescent protein for detection of pro-drug activating gene delivery and for gene therapy in malignant glioma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **451**, 393-403.

RAINOV, N. G., ZIMMER, C., CHASE, M., KRAMM, C. M., CHIOCCA, E. A., WEISSLEDER, R., UND BREAKEFIELD, X. O. 1995. Selektive uptake of viral and monocrySTALLINE particles delivered intra-arterially to experimental brain neoplasms. *Human Gene Ther.* **6**, 1543-1552.

RAINOV, N. G., IKEDA, K., QURESHI, N., GROVER, S., HERRLINGER, U., PECHAN, P., CHIOCCA, E. A., BREAKEFIELD X. O., UND BARNETT, F. H. 1999. Intraarterial delivery of adenovirus vectors and liposome-DNA complexes to experimental brain neoplasms. *Hum. Gene Ther.* **10**, 311-318.

RAINOV, N. G., KRAMM, C. M., ABOODY-GUTERMANN, K., CHASE, M., UEKI, K., LOUIS, D. N., HARSH, G. R., 4TH, CHIOCCA, A., UND BREAKEFIELD, X. O. 1996. Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm. *Cancer Gene Ther.* **3**, 99-106.

RAM, Z., CULVER, K. W., WALBRIDGE, S., BLAESE, R. M. UND OLDFIELD, E. H. 1993. *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.* **53**, 83-88.

RAM, Z., CULVER, K. W., OSHIRO, E. M., VIOLA, J. J., DEVROOM, H. L., OTTO, E., LONG, Z., CHIANG, Y., MCGARRITY, G. J., MUUL, L. M., KATZ, D., BLAESE, R. M., UND OLDFIELD, E. H. 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* **3**, 1354-1361.

READ, T. A., STENSVAAG, V., VINDENES, H., ULVESTAD, E., BJERKVIG, R., UND THORSEN, F. 1999. Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**, 653-663.

RIGLER, R. 1966. Microfluometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **267**, 1-122.

RIGLER, R. 1969. Acridine orange in nucleic acid analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **157**, 211-224.

RIGLER, R., KILLANDER, D., BOLUND, L., UND RINGERTZ, N. R. 1969. Cytochemical characterization of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei. Techniques for obtaining heat denaturation curves with the aid of acridine orange microfluorimetry and ultraviolet microspectrophotometry. *Exp. Cell Res.* **55**, 215-224.

ROBITAILLE, R., PARISEAU, J. F., LEBLOND, F. A., LAMOUREUX, M., LEPAGE, Y., UND HALLE, J. P. 1999. Studies on small (<350  $\mu\text{m}$ ) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 116-120.

ROMO, S., UND PEREZMARTINEZ, C. 1997. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena-Galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *J. Phycol.* **33**, 1073-1076.

ROSE, J. K., BUONOCORE, L., UND WHITT, M. A. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* **1065**, 8-14.

RUBSAM, L. Z., BOUCHER, P. D., MURPHY, P. J., KUKURUGA, M., UND SHEWACH, D. S. 1999. Cytotoxicity and accumulation of ganciclovir triphosphate in bystander cells cocultured with herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-expressing human glioblastoma cells. *Cancer Res.* **59**, 669-675.

SAKAI, S., ONO, T., IJIMA, H., UND KAWAKAMI, K. 2000. Control of molecular weight cut-off for immunoisolation by multilayering glycol chitosan-alginate polyion complex on alginate-based microcapsules. *J. Microencapsul.* **17**, 691-699.



SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., UND MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Sec.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

SAN, H., YANG, Z. Y., POMPILI, V. J., JAFFE, M. L., PLAUTZ, G. E., XU, L., FELGNER, J. H., WHEELER, C. J., FELGNER, P. L., GAO, X., *ET AL.* 1993. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **4**, 781-788.

SCHLIEF, R. 1993a. Saccharide based contrast agents. In: NANDA, N. C., UND SCHLIEF, R., eds. Advances in echo imaging using contrast enhancement. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 112-129.

SCHLIEF, R. 1993b. Diagnostic value of contrast enhancement in vascular Doppler ultrasound. In: NANDA, N. C. UND SCHLIEF, R., eds. Advances in echo imaging using contrast enhancement. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 309-323.

SCHNEIDER, S., FEILEN, P. J., SLOTTY, V., KAMPFNER, D., PREUSS, S., BERGER, S., BEYER, J., UND POMMERSHEIM, R. 2001. Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. *Biomaterials* **22**, 1961-1970.

SCHOFIELD, J. P., UND CASKEY, C. T. 1995. Nonviral approaches to gene therapy. *Brit. Med. Bull.* **51**, 56-71.

SCHWINGER, S., KOCH, S., JAHNZ, U., WITTLICH, P., RAINOV, N. G., UND KRESSLER, J. 2002. High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter device. *J. Microencapsul.* **19**, 273-280.

SEIFERT, D. B., UND PHILLIPS, J. A. 1997. Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Prog.* **13**, 562-568.

SERP, D., CATANA, E., HEINZEN, C., VON STOCKAR, U., UND MARISON, I. W. 2000. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 41-53.

SHIMI, S. M., NEWMAN, E. L., HOPWOOD, D., UND CUSHIERI, A. 1991. Semi-permeable microcapsules for cell culture: ultra-structural characterization. *J. Microencapsul.* **8**, 307-316.

SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., UND SAIGA, Y. 1962. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223-239.

SIEBERS, U., HORCHER, A., BRETZEL, R. G., FEDERLIN, K., UND ZEKORN, T. 1997. Alginate-based microcapsules for immunoprotected islet transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **831**, 304-312.

SIEMANN, M., MÜLLER-HURTIG, R., UND WAGNER, F. 1990. Characterization of the rotating nozzle-ring technique for the production of small spherical biocatalysts. Physiology of immobilized cells. Proceedings of an International Symposium. Wageningen, The Netherlands: Elsevier Science. p. 275-282.

SILHAVY, T. J., UND BECKWITH, J. R. 1985. Uses of lac fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* **49**, 398-418.

SMIDSRØD, O., UND SKJÅK-BRÆK, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* **8**, 71-78.

SOLODIN, I., BROWN, C. S., BRUNO, M. S., CHOW, C. Y., JANG, E. H., DEBS, R. J., UND HEALTH, T. D. 1995. A novel series of amphiphilic imidazolium compounds for *in vitro* and *in vivo* gene delivery. *Biochemistry* **34**, 13537-13544.

STEWART, G. S., UND WILLIAMS, P. 1992. *lux* genes and the application of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1289-1300.

STOCKHAMMER, G., BROTCI, J., LEBLANC, R., BERNSTEIN, M., SCHACKERT, G., WEBER, F., OSTERTAG, C., MULDER, N. H., MELLSTEDT, H., SEILER, R., YONEKAWA, Y., TWERDY, K., KOSTRON, H., DE WITTE, O., LAMBERMONT, M., VELU, T., LANEUVILLE, P., VILLEMURE, J. G., RUTKA, J. T., WARNKE, P., LASEUR, M., MOOIJ, J. J., BOETHIUS, J., UND MARIANI, L. 1997. Gene therapy for glioblastoma multiforme: *In vivo* tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *J. Mol. Med.* **75**, 300-304.

SU HUANG, H.-J., NAGANE, M., KLINGBEIL, K. C., LIN, H., NISHIKAWA, R., JI, X.-D., HUANG, C.-M., GILL, G. N., WILEY, H. ST., UND CAVENEE, W. K. 1997. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* **272**, 2927-2935.

- SZALA, S., MISSOL, E., SOCHANIK, A., UND STROZYK, M. 1996. The use of cationic liposomes DC-Chol/DOPE and DDAB/DOPE for direct transfer of Escherichia coli cytosine deaminase gene into growing melanoma tumors. *Gene Ther.* **3**, 1026-1031.
- TACHIBANA, K., UCHIDA, T., OGAWA, K., YAMASHITA, N., UND TAMURA, K. 1999. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet* **353**, 1409.
- TAI, I. T., UND SUN, A. M. 1993. Microencapsulation of recombinant cells: a new delivery system for gene therapy. *FASEB J.* **7**, 1061-1069.
- TATA, D. B., DUNN, F., UND TINDRALL, D. J. 1997. Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 64-67.
- TEMPLETON, N. S., LASIC, D. D., FREDERIK, P. M., STREY, H. H., ROBERTS, D. D., UND PAVLAKIS, G. N. 1997. Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology* **15**, 647-652.
- THU, B., BRUHEIM, P., ESPEVIK, T., SMIDSRØD, O., SOON-SHIONG, P., UND SKJÅK-BRÆK, G. 1996a. Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* **17**, 1031-1040.
- THU, B., BRUHEIM, P., ESPEVIK, T., SMIDSRØD, O., SOON-SHIONG, P., UND SKJÅK-BRÆK, G. 1996b. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* **17**, 1069-1079.
- ULUDAG, H., DE VOS, P., UND TRESKO, P. A. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **42**, 29-64.
- UNGER, E. C., MCCREERY, T. P., UND SWEITZER, R. H. 1997. Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Invest. Radiol.* **32**, 723-727.
- VALDEZ, B. C., PERLAKY, L., CAI, Z.-J., HENNING, D., UND BUSCH, H. 1998. Green fluorescent protein tag for studies of drug-induced translocation of nucleolar protein RH-III/Gu. *BioTechniques* **24**, 1032-1036.

- VANDIER, D., RIXE, O., BESNARD, F., KIM, M., RIKIYAMA, T., GOLDSMITH, M., BRENNER, M., GOUYETTE, A., UND COWAN, K. H. 2000. Inhibition of glioma cells *in vitro* and *in vivo* using a recombinant adenoviral vector containing an astrocyte-specific promotor. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1120-1126.
- VAN RAAMSDONK, J. M., UND CHANG, P. L. 2001. Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 264-271.
- VERMA, M. I., UND SOMIA, N. 1997. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242.
- VIELHABER, U., UND WACHERNIG, H. 1990. Partikelgrößenbestimmung im Bereich 0,1–2000 µm: Malvern-Laserstreulichtanalyse. Veröffentlicht in: Verfahrenstechnik 11/1990.
- VOGELSTEIN, B., UND GILLESPIE, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.
- WALSH, P. K., ISDELL, F. V., NOONE, S. M., ODOVONAN, M. G., UND MALONE, D. M. 1996. Growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* microcolonies in alginate and carrageenan gel particles: effect of physical and chemical properties of gels. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 366-372.
- WARD, M., WU, J., UND CHIU, J. F. 1999. Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents. *J. Acoust. Soc. Am.* **105**, 2951-2957.
- WASAN, E. K., REIMER, D. L., UND BALLY, M. R. 1996. Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. *J. Pharm. Sci.* **85**, 427-433.
- WEINZAECKER, M., DEEN, D. F., ROSENBLUM, M. L., HOSHINO, T., GUTIN, P. H., UND BARKER, M. 1981. The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J. Neurol.* **224**, 183-192.

- WILLIAMS, J. C., JR., STONEHILL, M. A., COLMENARES, K., EVAN, A. P., ANDREOLI, S. P., CLEVELAND, R. O., BAILEY, M. R., CRUM, L. A., UND MCATEER, J. A. 1999. Effect of macroscopic air bubbles on cell lysis by shock wave lithotripsy *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* **25**, 473-479.
- WINKELMAN, J. W., KENNER, M. D., RAVE, R., CHANDWANDEY, R. H., UND FEINSTEIN, S. B. 1994. Contrast echocardiography. *Ultrasound Med. Biol.* **20**, 507-515.
- WROBEL, I., UND COLLINS, D. 1995. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 296-304.
- YAGI, K., NODA, H., KURONO, M., UND OHISHI, N. 1993. Efficient gene transfer with less cytotoxicity by means of cationic multilamellar liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1042-1048.
- YANG, J.-P., UND HUANG, L. 1997. Overcoming the inhibitority effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther.* **4**, 950-960.
- YANG, J.-P., UND HUANG, L. 1998. Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. *Gene Ther.* **5**, 380-387.
- YANG, K., MU, X. S., HAYES, R. L., QIU, Y. H., SORGI, F. L., HUANG, L., UND CLIFTON, G. L. 1997. DC-Chol liposome-mediated gene transfer in rat spinal cord. *Neuroreport* **8**, 2355-2358.
- YOSHIDA, J., MIZUNO, M., YAGI, K. 1991. Secretion of human  $\beta$ -interferon into the cystic fluid of glioma transferred with the interferon gene. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **11**, 123-128.
- YOSHIDA, J., MIZUNO, M., UND YAGI, K. 1992. Antitumor effect of endogenous human  $\beta$ -interferon on malignant glioma and augmentation of the effect by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Clin. Biochem. Nutr.* **12**, 153-160.

YOSHIDA, J., MIZUNO, M., TANIGUCHI, K., NAKAYASHIKI, N., WAKABAYASHI, T., UND YOSHIDA, J. 2001. Rat glioma cell death induced by cationic liposome-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment. *J. Surg. Oncol.* **76**, 19-25.

ZABNER, J., FASBENDER, A. J., MONINGER, T., POELLINGER, K. A., UND WELSH, M. J. 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 18997-19007.

ZHOU, D., KINTSOURASHVILI, E., MAMUJEE, S., VACEK, I., UND SUN, A. M. 1999. Bioartificial pancreas: alternative supply of insulin-secreting cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **875**, 208-218.

## 7. ANHANG

### 7.1. ABKÜRZUNGEN UND ERKLÄRUNG VON FACHBEGRIFFEN

<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (entspricht RKM)
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
<i>AirJet</i>	Gasextrusion
AO	Acridinorange
Alginatperlen	Kapseln ohne Beschichtung und ohne herausgelösten Alginkern (Vollkapseln)
APA	Alginat-poly-L-Lysin-Alginat
APA-Mikrokapseln	Mikrokapseln mit einer APA-Membran und herausgelöstem Alginkern (Hohlkapseln)
ATCC	American Type Culture Collection
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoffatom
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
Chol	Cholesterol
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalovirus
CS	Kälberserum ( <i>donor calf serum</i> )
DC-Cholesterol	3 β [N-(N', N'-Dimethylaminoethan)-carbonyl]-cholesterol-hydrochlorid
d.h.	das heißt
DiMTAP	1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammonium-propan
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMPE	Dimyristoylphosphatidylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

DOPE	<b>Dioleoylphosphatidylethanolamin</b>
DOSPA	<b>2,3-Dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetat</b>
DOTAP	<b>1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan</b>
<i>downstream</i>	stromabwärts
ds	<i>double strand</i> (doppelsträngig)
E	Eosin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EGFP	grün autofluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EK	Endkonzentration
<i>enhanced</i>	erweitert, verbessert
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> : und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
G	$\alpha$ -L-Guluronsäure
GCV	Ganciclovir (Cymeven)
<i>giant vesicles</i>	Riesenliposomen
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
h	Stunde
H	Hämatoxylin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HS	Humanserum (Patientenserum)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IC	Hemmkonzentration ( <i>inhibitory concentration</i> )
<i>in press</i>	im Druck
<i>in toto</i>	im Ganzen
<i>jet break-up</i>	Zerschneiden eines Flüssigkeitsstrahls (beim <i>JetCutter</i> )
K	Kalium
Kan <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton



KHz	Kilohertz (Einheit der Frequenz)
KM	Kontrastmittel
kV	Kilovolt (Einheit der Spannung)
l	Liter
LA	Luria Agar
<i>large scale</i>	in großem Maßstab
LB	Luria Broth Base
Lipoplexe	Komplexe aus kationischen Liposomen und DNA
LMV	<i>large multilamellar vesicles</i>
<i>long terminal repeat</i>	lange terminale Sequenzwiederholung
M	Molarität oder $\beta$ -D-Mannuronsäure
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mol	Stoffmenge
min	Minute
MLV	<i>multilamellar vesicles</i>
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl Blau
<i>multilayer</i>	mehrschichtig
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N	Normalität
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Neo <sup>r</sup>	Neomycinresistenz
NOL	Neuroonkologisches Labor
N-Terminus	NH <sub>2</sub> - oder Aminoterminus eines Proteins
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
Pa·s	Pascalsekunde (Einheit der Viskosität)
PBS	phosphatgepufferte Saline (NaCl; Kochsalzlösung)
PLL	poly-L-Lysin

---

PP	Polypropylen
PS	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PVC	Polyvinylchlorid
RKM	Rasterkraftmikroskopie (entspricht AFM)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RV	Retrovirus
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	<i>single strand</i> (einzelsträngig)
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UCSF	University of California at San Francisco
US	Ultraschall
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v	<i>volume</i> (Volumen)
<i>vibrating nozzle</i>	vibrierende Düse
w	<i>weight</i> (Gewicht)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## DANKSAGUNG

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden zwischen März 1998 und März 2001 an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Klinik für Neurochirurgie im Labor für Molekulare Neuroonkologie unter Betreuung von PD Dr. med. Nikolai G. Rainov durchgeführt.

PD Dr. med. Nikolai G. Rainov gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die außerordentliche Betreuung und Unterstützung, die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft, sein förderndes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die wertvollen Ratschläge, Ideen und Denkanstöße während der gesamten Promotionsphase.

Ganz besonders danke ich Drs. Karl Dobberstein und Yong-Jiang Cao für die zahlreichen fachlichen Hinweise, die für mich förderlich gewesen sind und für die freundschaftliche Unterstützung.

Ein großes Dankeschön gilt Kathrin Franke und Barbara Hüppe für die geduldigen Einweisungen in die Zellkultur. Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Christel Trümpler für die erfrischende Arbeitsatmosphäre und die liebe Unterstützung im Laboralltag bedanken.

Dr. Pohl (Institut für Physik und Biophysik) danke ich für die Idee der Ultraschall-Absorptionskammer und die stets gegebene Hilfsbereitschaft bei Ultraschallfragen, Dr. Heinzen (Inotech AG, Schweiz) danke ich recht herzlich für die Bereitstellung des IER-40 und Prof. Holzhausen (Institut für Pathologie) danke ich für die Paraffinschnitte.

Bei Christian Schwinger und insbesondere Prof. J. Kressler (FB für Ingenieurwissenschaften, Institut für Bioengineering) bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei verschiedenen Verkapselungen und vor allem für die Herstellung der *AirJet*-Düse.

Allen weiteren Laborkollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Des Weiteren danke ich Dr. Hauser (Institut für Physikalische Chemie) für die Liposomenaufnahmen am Rasterkraftmikroskop und Dr. Pinaki (Institut für Physikalische Chemie) für die Liposomenmessungen mittels Streulichtanalyse.

Frank, Babsi, Barbara Thiemer und anderen Freunden sowie Bekannten danke ich für den privaten Ausgleich und die moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung mein Studium und die Promotion wohl kaum möglich gewesen wären.

## LEBENS LAUF

Name: Sandra Koch  
Geburtsdatum: 31. Juli 1973  
Geburtsort: Aschersleben

### Schulbildung:

1980 - 1988 Besuch der Polytechnischen Oberschule "Rosa Luxemburg" in Halle  
1988 - 1992 Besuch des Gymnasiums Latina "August Hermann Francke" in Halle  
Mai 1992 Abitur mit erweitertem Sprachunterricht in den Fächern Englisch, Französisch und Russisch, Latein 1 Jahr (fakultativ)

### Wissenschaftlicher Werdegang:

September 1992 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studienfach Biochemie (Diplom)  
März 1994 Vordiplomprüfung Teil I in den Fächern Allgemeine und Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie und Physik  
September 1994 Vordiplomprüfung Teil II in den Fächern Biochemie, Naturstoffchemie und Allgemeine Biologie  
Juli 1996 Diplomprüfung Teil I in den Fächern Enzymologie/Enzymkinetik und Allgemeine Biochemie  
September 1996 Diplomprüfung Teil II in den Fächern Gentechnik, Mikrobiologie und Organische Chemie  
Oktober 1996 -  
Juli 1997 Experimentelle Diplomarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. H. Nies und Dipl. Biochem. Nicola Peitzsch am Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Martin-Luther-Universität mit dem Thema: "Untersuchung der Struktur des ChrA-Transporters in *Alcaligenes eutrophus* unter Einsatz von Reporter-Gen-Fusionen"

Oktober 1997 -

Februar 1998

März 1998

Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie  
Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation an  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität in der Klinik  
für Neurochirurgie im Labor für Molekulare Neuroonkologie unter  
Leitung von PD Dr. med. Nikolai G. Rainov

März 2001

Abschluss der experimentellen Arbeiten zur Dissertation

April 2001

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Tübingen in der  
Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie und  
Rheumatologie – Aufbau des *Labor für Experimentelle Onkologie* unter  
Leitung von Prof. Dr. med. C. Bokemeyer inklusive zweier Forschungs-  
aufenthalte im Lab for Experimental Patho-Oncology bei Dr. L.  
Looijenga am Josephine-Nefkens-Institut der Erasmus Universität in  
Rotterdam

**Erklärung:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Filderstadt, Februar 2002

Sandra Koch