

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt

**Nicht-viraler Gentransfer in respiratorische Epithelzellen:
Vergleichende Untersuchung zur Effizienz der Transgen-
Expression in Abhängigkeit von Genvektor und
Nukleinsäure**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Friedemann Roos

München 2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians
Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med J. Rosenecker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle
Priv. Doz. Rika Draenert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Genvektoren	3
1.2	Virale Genvektoren und klinische Studien	5
1.3	Nicht-viraler Gentransfer	8
1.3.1	Kationische Lipide	9
1.3.2	Kationische Polymere	11
1.3.3	Polyethylenimine (PEI)	12
1.3.4	Intrazelluläre Wege von Polyethylenimine/DNA Komplexen (Polyplexe)	14
1.3.5	Magnetofektion	20
1.4	CpG-Motive der Plasmid DNA	20
1.5	Die Lunge als Target	22
1.6	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Verwendete Reagenzien und Geräte	25
2.2	Zellkultur	27
2.3	Elektroporation	27
2.4	Klonieren eines CPG-depleted-mSEAP Vektors	28
2.5	Quantifizierung und Reinheit der DNA	30
2.6	RNA (RNAActive™)	31
2.7	Verwendete Vektoren	32
2.8	N/P Verhältnis	32
2.9	Transfektion mit pCpG-depleted-mSEAP/b-PEI	33
2.10	Magnetofektion	34
2.11	Vergleich der Transfektionseffizienz von pDNA und mRNA mit b-PEI, Polymag und DMRIE-C	35
2.12	Messung der mSEAP Aktivität im Medium	36
2.13	Lichtmikroskopische Aufnahmen	37
2.14	Statistische Auswertung	38

3.	Ergebnisse	39
3.1	Klonieren des Vektors pCpG-depl.-mSEAP	39
3.2	Restriktionsanalyse	42
3.3	Vorversuche	43
3.4	Messung von mSEAP im Medium nach Transfektion von pCpG-depl.-mSEAP mit b-PEI	43
3.5	Mikroskopischer Nachweis von mSEAP in A549 nach Transfektion mit b-PEI	45
3.6	Messung von mSEAP im Medium und im Zelllysate	47
3.7	Transgenexpression in Abhängigkeit steigender Plasmid-DNA Konzentration	49
3.8	Vergleich der Transfektionseffizienz von b-PEI und der Magnetofektion	50
3.9	Erhöhte Proteinexpression nach Transfektion von mRNA	52
3.10	Mikroskopischer Vergleich nach Transfektion von pDNA und mRNA	55
4.	Diskussion	59
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literatur	69
7.	Abkürzungsverzeichnis	76
	Lebenslauf	78

1. Einleitung

Viele Erkrankungen des Menschen können mittlerweile auf angeborene oder erworbene Defekte des menschlichen Genoms zurückgeführt werden, z.B. Cystische Fibrose, Hämophilie A/B und vielfältigste Stoffwechselstörungen. Auch das individuelle Risiko an Carcinomen zu erkranken, ist teilweise genetisch determiniert. Es könnte sich deswegen mit gentechnischen Methoden ein kausaler therapeutischer Ansatz anbieten, wenn es gelänge mittels Vektoren intakte Gene in Genome betroffener Zellen einzuschleusen, die das defekte Gen ersetzen sollen, mit dem Ziel der Heilung oder klinischen Besserung einer Erkrankung.

Unter somatischer Gentherapie wird das Einschleusen einer intakten Kopie eines Genes in eine erkrankte Zelle verstanden. Dies hat zum Ziel, dass defekte Gene durch intakte Nukleotidsequenzen ersetzt werden und so auf zellulärer Ebene die Fehlfunktion durch Expression funktionstüchtiger Proteine korrigiert wird. Die somatische Gentherapie ist von der Keimbahngentherapie abzugrenzen, bei der anstelle ausdifferenzierter Zellen Keimzellen durch Einbringen von genetischer Information in ihrer Erbsubstanz verändert werden. Diese ist aufgrund von unbekanntem Risiko der Vererbbarkeit, Nebenwirkungen und vor allem wegen des Eingriffs in das menschliche Erbgut ethisch nicht vertretbar und nach dem Gesetz zum Schutz von Embryonen vom 1.1.1991 verboten.

Mittlerweile wurden weltweit über 1300 gentherapeutische klinische Studien, überwiegend in Phase I und II, durchgeführt, die größtenteils das Ziel hatten, die onkologische Therapie zu verbessern. (siehe Abb.1).

1.1 Genvektoren

Viren bzw. chemische Substanzen, mit denen ein Transfer von Nukleotidsequenzen in Zellen möglich ist, werden im Folgenden als Genvektoren bezeichnet. Ein entscheidendes Problem der Gentherapie ist das Einschleusen der DNA/RNA in die betroffenen Zellen. „Nackte“ Nukleotidsequenzen sind im Gegensatz zu „verpackten“, d.h. an Genvektoren gekoppelte Nukleotide, nicht vor ihrem Abbau durch Nukleasen

geschützt. Weiter stellt die Zellmembran ein erhebliches Hindernis für den Übertritt polyanionischer DNA oder RNA in die Zelle dar. Aus diesen Gründen werden Genvektoren benötigt, die das Einbringen von DNA oder RNA in Zellen und deren Zellkern ermöglichen. Prinzipiell unterscheidet man zwischen viralen und nicht-

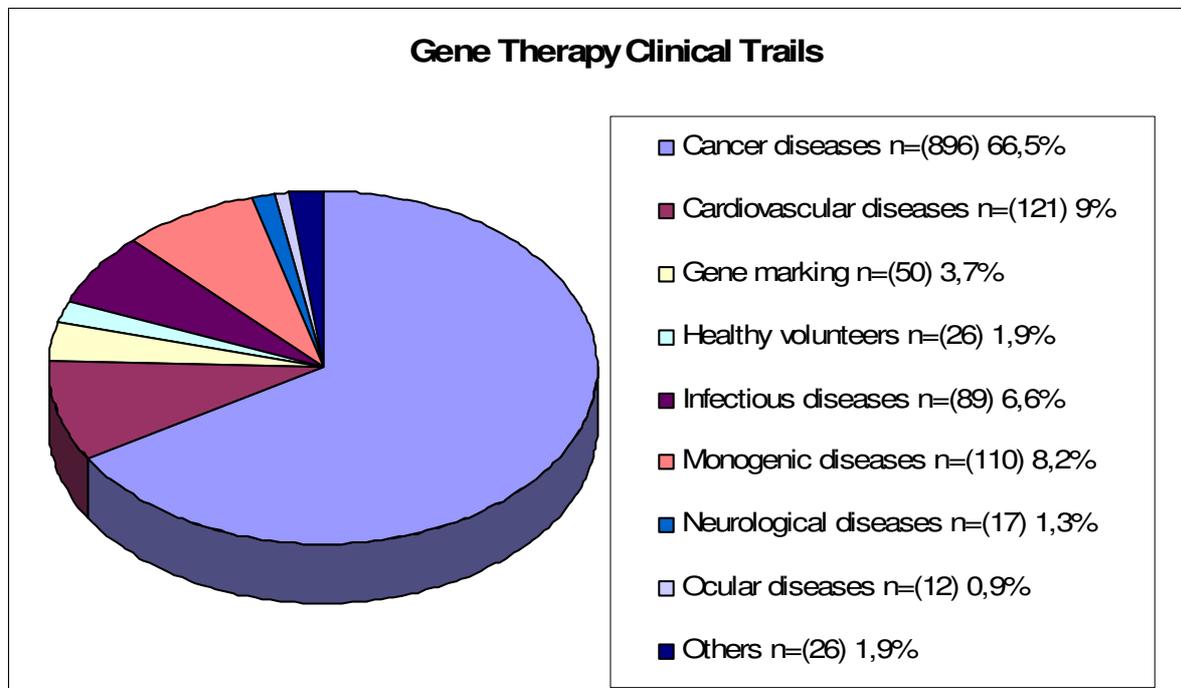


Abb. 1: Quelle: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> März 2008

viralen Vektoren. Beide Vektortypen haben Vor- und Nachteile. Ein optimaler Genvektor sollte folgende Eigenschaften aufweisen: (Rosenecker 2007)

- bei synthetischen Vektoren: möglichst geringe Toxizität;
- bei viralen Vektoren: keine Pathogenität des Virus
- keine Interaktion mit Serumbestandteilen, wie z.B. dem Komplementsystem
- geringe Immunogenität, damit das Immunsystem den Gentransfer nicht inhibiert oder transfizierte Zellen nicht abstößt,
- hohe Effizienz und Selektivität für den Gentransfer in die Zielzellen,
- Eignung für einen Gentransfer in stationäre (sich nicht teilende) Zellen,
- Fähigkeit zur stabilen episomalen Persistenz oder zur gezielten Integration in das Wirtsgenom,
- Steuerbare Genexpression über regulierbare Promotoren,
- Reproduzierbares und kostengünstiges Herstellungsverfahren.

Abb. 2 gibt eine Übersicht der verwendeten Vektoren in klinischen Studien.

1.2 Virale Genvektoren und klinische Studien

Virale Vektoren werden am häufigsten in klinischen Studien eingesetzt, vor allem Adenoviren mit 24,8% und Retroviren mit 22,3%, in wesentlich geringerem Anteil auch Adeno-assoziierte-Viren, Lentiviren und Herpes simplex Viren (Edelstein 2007). Bei der viralen Gentherapie werden die Eigenschaften von Viren ausgenutzt, Wirtszellen an spezifischen Rezeptoren anzukoppeln und ihr Erbgut einzuschleusen. Das Genom der Viren wird zuerst mittels molekularbiologischer Methoden entfernt und durch die gewünschte DNA ersetzt. Hierbei entstehen replikationsdefiziente

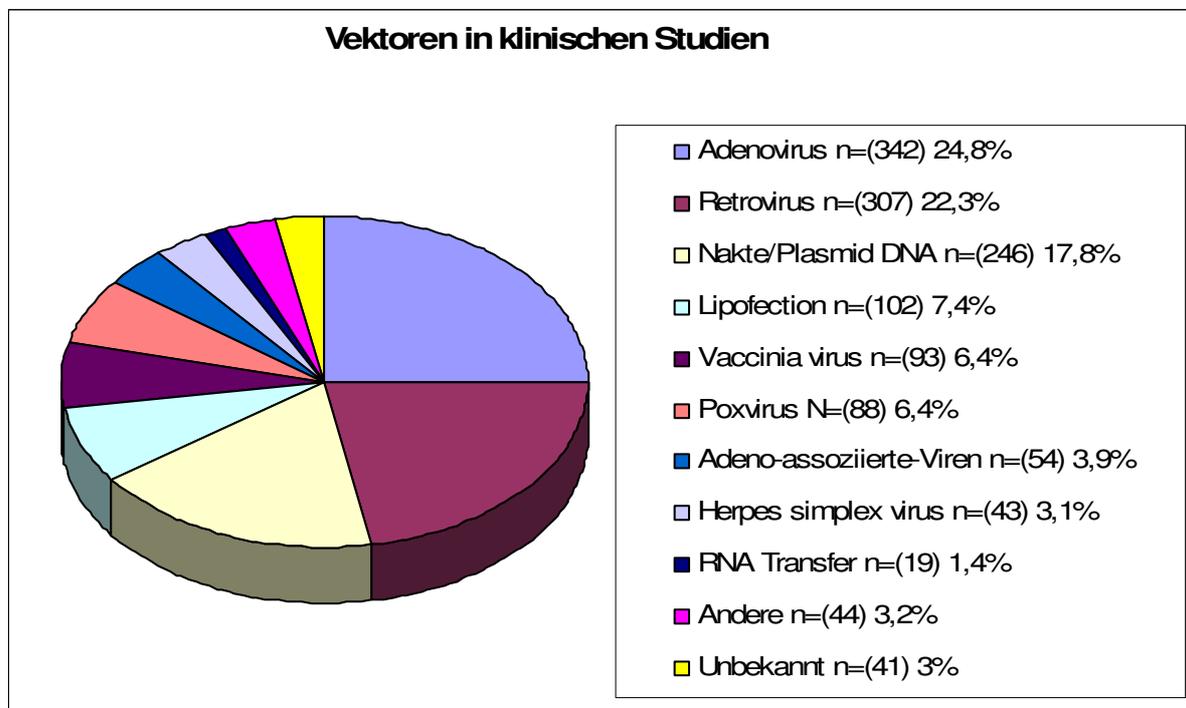


Abb. 2: Quelle: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> März 2008

Viren, die für den Gentransfer genutzt werden können. Allerdings ist die Kapazität viraler Genvektoren auf die Größe des viralen Genoms begrenzt, weshalb sie für den Transfer von Genen mit großen kodierenden Sequenzen nicht geeignet sind, wie es z.B. bei der Hämophilie A der Fall ist. (Rosenecker 2007)

Ähnlich wie Wildtyp Viren stimulieren virale Genvektoren, besonders Adeno- und Adeno-assoziierte Viren, das Immunsystem, wodurch die Transfektionseffizienz *in vivo* gemindert werden kann. Bei Adenoviren wird diese Immunreaktion vor allem

über dendritische Zellen und Makrophagen stimuliert, mit der Folge der Produktion von Zytokinen wie z.B. IL-6, IL12 oder TNF. Weiterhin werden die Genvektoren als virale Antigene an CD4 und CD8 positiven Zellen präsentiert, was eine zellvermittelte Immunantwort zur Folge hat. (Bessis et al. 2004)

Am drastischsten zeigte sich dies 1999 im Fall des 18jährigen Patienten Jesse Gelsinger, der an einem Ornithin Transcarbamylase Defekt (OTC) litt. Nach Gentherapie mit „E1 und E4 deleted“ Adenoviren Typ 5 mit einer Dosis von 6×10^{11} Partikeln/kg kam es zu einer massiven Entzündungsreaktion „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS), mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und multiplen Organversagen. Der Patient verstarb 98h nach Gentransfer (Raper et al. 2003). Die Studie wurde nach dem Tod von Jesse Gelsinger eingestellt.

Weitere bekannte Studien, die einen therapeutischen Nutzen zeigten, sind die Therapien von ADA-SCID und X-SCID, schwere angeborene Immundefekte mit Mangel bzw. Fehlfunktion von T-, B-Lymphozyten und NK Zellen, mit retroviralen Genvektoren.

Klinisch äußert sich ein SCID meist ab den 2.- 3. Lebensmonat durch Gedeihstörungen in Folge intestinaler Infektionen, respiratorische virale Infekte z.B. pneumocystis jirovecii Pneumonie, Candidiasis Befall des Oropharynx, bakterielle Infektionen, sowie schwer beherrschbare Infektionen durch BCG nach Impfung. Häufig kann auch eine Beteiligung der Haut aufgrund einer Graft versus Host (GVH) Reaktion nach transplazentarer Transfusion von maternalen Lymphozyten mit Bluteosinophilie beobachtet werden (Zepp 2003)

ADA-SCID liegt in etwa 10% aller Fälle von schweren kombinierten Immundefekten vor. Es liegt ein Gen-Defekt auf Chromosom 20q13.4 vor, der zu einem Mangel an Adenosindesaminase (ADA) führt, einem Enzym des Purinstoffwechsels. Für die Therapie von ADA-SCID steht derzeit als kausale Therapie nur die allogene Knochenmarkstransplantation von einem HLA identischen Spender alternativ die Enzymsubstitution von Polyethylenglycol konjugierter Adenosindesaminase (PEG-ADA) zur Verfügung.

Alessandro Aiuti et al. führten eine Gentherapie bei zwei Patienten mit ADA-SCID im Alter von 7 Monaten und 2 Jahren und 6 Monaten durch, für die kein HLA-identischer Spender und keine PEG-ADA Therapie zur Verfügung standen. Hierfür wurden autologe CD34 positive humane Stammzellen (HSC) der Patienten gewonnen, und - nach extrakorporalem Gentransfer von GIADA1 retroviralen Vektoren - vier Tage später reinfundiert. Zuvor wurde eine nicht-myeloablative Konditionierung mit Busulfan (2mg/Kg KG) durchgeführt um „Platz“ im Knochenmark für die transduzierten HSC zu schaffen. Im Folgenden zeigten beide Patienten steigende ADA Aktivität im Serum sowie Anstieg von B-, T-Lymphozyten und NK Zellen. Beide Patienten sind zum Zeitpunkt der Veröffentlichung beschwerdefrei und benötigten keine weitere Therapie (Aiuti et al. 2002)

Klinische Studien zur Therapie von X-SCID wurden in Paris und London durchgeführt. Die Mutation bei X-SCID, mit 50% aller SCID Fälle die häufigste Form, liegt im IL2RG-Gen, das für die γ -Kette von Interleukinrezeptoren für Interleukin 2,4,7,9,15 und 21 kodiert. Fehlende Signaltransduktion führt zum Ausbleiben der Entwicklung von T- und NK Zellen. B-Lymphozyten sind nachweisbar, zeigen jedoch keine Funktion (Gasper et al. 2004). Ebenso wie beim ADA-SCID ist die allogene Knochenmarkstransplantation eine kausale Therapieoption, jedoch zeigen die meisten Patienten nach Transplantation persistierende B-Zell Defekte und benötigen lebenslang eine Immunglobulin Substitution (Hacein-Bey-Abina et al. 2002)

Erste Ergebnisse der Gentherapie waren in beiden genannten Studien vielversprechend. Es erfolgte eine autologe Transplantation von CD34+ Zellen, in die IL2RG-Gen tragende replikationsdefiziente gammaretrovirale Vektoren des „MFG“-Typs eingeschleust waren. Im Verlauf zeigte sich bei allen Patienten ein Anstieg der NK Zellen nach 2-4 Wochen und Auftreten von Thymus-gereiften T-Zellen nach 10-12 Wochen. Insgesamt wurden 20 Patienten mit X-SCID in beiden Studien therapiert, von denen 18 eine anhaltende Immunrekonstitution zeigten.

Hacein-Bey-Abina et al. berichtet erstmals 2003 über das sekundäre Auftreten einer T-ALL bei zwei Patienten 3 Jahre nach Gentherapie mit retroviralen Vektoren. (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Molekulargenetische Analysen zeigten bei beiden Patienten eine Integration des retroviralen Vektors in der Region des Proto-

Onkogens LMO2. LMO2 ist ein „bridging molecule“ das eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung bei der Hämatopoese spielt. Bei zwei weiteren Fällen konnte eine Insertion des IL2RG-Gen nahe der Onkogene LYL1, c-Jun, Bmi1 und CCND2 festgestellt werden (Pike-Overzet et al. 2007). Drei der vier Fälle in Paris zeigen nach Chemotherapie eine anhaltende Remission, der vierte Patient verstarb im Oktober 2004.

Im Dezember 2007 kam es zu einem fünften Fall, dem ersten in der britischen Studie (Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID www.asg.org). Im Moment sind deswegen beide Studien eingestellt und es wird an neueren selbst-inaktivierenden lenti- und retroviralen Vektoren gearbeitet (Pike-Overzet et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien schließen, dass virale Vektoren eine hohe Transfektionseffizienz zeigen, jedoch Nachteile wie die Immunogenität und die insertionelle Mutagenese besitzen. Unabhängig von oben genannten Studien ist bei viralem Gentransfer eine Einschränkung bei der Größe des zu befördernden Gens sowie Rekombinationsereignisse mit verwandten Wildtyp-Viren denkbar.

1.3 Nicht-viraler Gentransfer

Unter nicht-viralem Gentransfer werden physikalische und chemische Methoden zusammengefasst. Nach Injektion „nackter“ DNA in Muskel, Haut oder Leber kann eine geringe Genexpression in diesen Geweben festgestellt werden. Bei dieser Methode ist die DNA allerdings nicht vor dem Abbau durch extra- und intrazellulärer Nukleasen geschützt. Zellmembranen sind für die polyanionische hydrophile DNA eine Barriere, die weiter die Anwendung dieser Methode *in vivo* einschränkt (Gao et al. 2007). Aufgrund der einfachen Anwendung und fehlenden Toxizität stellt die Verwendung „nackter“ DNA derzeit mit 17,8% allerdings den größten Anteil nicht-viralen Gentransfers an klinischen Studien dar (Edelstein et al. 2007) (Abb. 2).

Weitere physikalische Methoden des nicht-viralen Gentransfers stellen die so genannte „Gene-Gun“, die Elektroporation, der Ultraschall und hydrodynamische Methoden dar. Bei der Verwendung der „Gene-Gun“ werden DNA-Gold Komplexe mit unter Druck stehendem Gas „beschossen“, wodurch die Goldpartikel die Zellmembran penetrieren und die DNA auf Ihren Weg aus diesem Komplex freigesetzt wird. Bei der Elektroporation, ebenso wie bei der Verwendung von Ultraschall, entstehen Poren in der Zellmembran durch welche DNA diffundieren und somit in das Zytoplasma der Zellen eindringen kann. Es konnte eine 2-3 fache bei der Elektroporation bzw. 20 fache Steigerung bei der Verwendung von Ultraschall im Vergleich zur nackten DNA nachgewiesen werden (Gao et al. 2007).

Besonders effizient zeigten sich hydrodynamische Methoden bei denen Mäusen über die Schwanzvene eine DNA Lösung appliziert wurde, was zu einer kurzfristigen Volumenbelastung des rechten Ventrikels und Druckanstieg in der v. cava inferior führt. In der Folge kommt es zu einem Rückfluss der DNA-haltigen Lösung in die Leber und zu einem Anstieg des intrahepatischen Druckes. Dadurch entstehen reversible Risse der Leber Fenestrae durch welche die DNA in die Zellen gelangt. Mit dieser Methode konnten bis zu 40% der Hepatozyten im Mausmodell transfiziert werden (Li et al. 2007). Das hierbei notwendige große Volumen von 8-9% des Körpergewichtes entspräche beim Menschen einem Volumen bis zu 7,5l. Durch die Anwendung von Okklusionstechniken mittels Ballonkatheter und zeitgleicher Injektion könnte diese Volumenbelastung reduziert werden, wodurch diese Methode eine klinische Relevanz erreichen könnte (Gao et al. 2007).

1.3.1 Kationische Lipide

In klinischen Studien werden derzeit nach „nackter“ DNA (17,8%) auch kationische Lipide mit einem Anteil 7,4% am häufigsten als nicht-virale Vektoren verwendet (Edelstein et al. 2007). Felgner et al. zeigte erstmals 1987 eine effektive Transfektion verschiedener Zelllinien mit Komplexen aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) und Plasmid DNA (Felgner et al. 1987). Seitdem wurden eine Vielzahl verschiedener kationischer Lipide als Transfektionsreagenz entwickelt.

Kationische Lipide bestehen aus einer positiv geladenen Kopfgruppe, die über einen Linker mit dem hydrophoben „Schwanz“ verbunden sind. Sie bilden in wässrigem Milieu Liposomen, die wiederum - kombiniert mit DNA - durch elektrostatische Anziehung sogenannte kationische Lipoplexe bilden. Diese schützen die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen (Xu et al. 1996) und erleichtern die Aufnahme der DNA in die Zelle über die negativ geladene Zellmembran, welche eigentlich eine Barriere für „nackte“ negativ geladene DNA darstellt. Kationische Lipoplexe binden dabei an anionische Bestandteile der Zellmembran, wie z.B. Proteoglykane. Dabei werden verschiedene endozytotischen Wege diskutiert, wie Makropinocytose, Caveolae- und Clathrin -vermittelte Endozytose (Medina-Kauwe et al. 2005); letzterer wird als bedeutendster angesehen (Hoekstra et al. 2007). Um lysosomaler Degradierung zu entgehen, müssen Lipoplexe aus den Endosomen in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Dieser Schritt wird als ein entscheidend limitierender Faktor bei der Verwendung von nicht-viralen Vektoren angesehen. Kationische Lipide gehen dabei Wechselwirkungen mit negativ geladenen Lipiden der Endosomenmembran ein. Unter diesem Einfluss des Komplexes „klappen“ die anionischen Lipide in die innere Membran um und bilden mit den kationischen Lipiden des Lipoplexes neutrale Ionenpaare (Abb. 3). Lipoplexe verlieren so ihre Stabilität und die DNA wird in das Zytosol der Zelle entlassen (Xu et al. 1996).

Kationische Lipide können mit einem neutralen „Helfer“ Lipid, z.B. Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder Cholesterol, kombiniert werden, wodurch eine Steigerung der Transfektionsrate erreicht wird. Diese scheinen eine Konformationsänderung der Lipoplexe zu einer „inverted hexagonal Phase“ innerhalb der Endosomen bei sauren PH zu bewirken, was zur Steigerung des „endosomalen release“ in das Zytosol führt (Farhood et al. 1995) (Bennett et al. 1995) (Kikuchi et al. 1999) (Koltover et al. 1998).

Im Vergleich zu viralen Vektoren zeigen kationische Lipide eine geringere Transfektionseffizienz, besitzen jedoch nicht die negativen Eigenschaften der viralen Vektoren wie die begrenzte Kapazität für die Größe des zu transportierenden Gens und die Gefahr von Rekombinationsereignissen mit Wildtyp-Viren. (Rosenecker 2007). Ein weiterer Nachteil von kationischen Lipiden ist ihre Zytotoxizität. Lipoplexe

zeigen *in vitro* mit steigender Konzentration an Transferreagenz eine steigende Apoptoserate der transfizierten Zellen. Dabei konnten morphologische Kriterien und

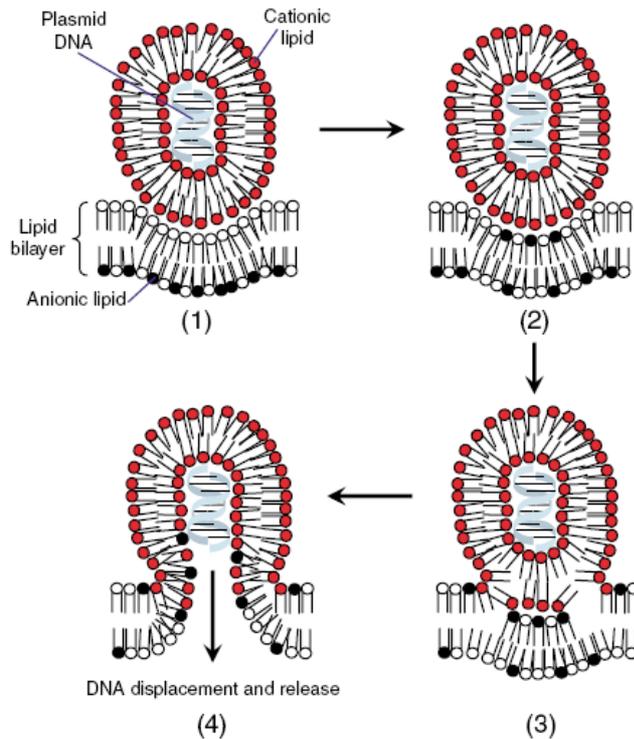


Abb. 3:
Mechanismus des Endosomal
Escape von Lipoplexen
Aus Medina-Kauweert al. 2005

DNA Fragmentierung als Zeichen der Apoptose sowie eine erhöhte Expression von Apoptose-induzierenden Genen festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich keine Zytotoxizität bei der Verwendung von Liposomen, die nicht mit DNA komplexiert waren (Nguyen et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde bei *in vivo* Studien eine Zytotoxizität von Lipoplexen nach intratrachealer bzw. intraperitonealer Installation festgestellt (Norman et al. 2000) (Dokka et al. 2000).

1.3.2 Kationische Polymere

Verschiedene synthetische und natürliche kationische Polymere bilden mit DNA Komplexe (Polyplexe), mit denen ein Gentransfer (Polyfektion) möglich wird. Vertreter der natürlichen Polymere sind Polylysin und Chitosan, die synthetischen Polymere Poly[2-(Dimethylamino)-Ethyl-Methacrylat] (PDMAEMA), Poly-b-

Aminoester, Dendrimere und Polyethylenimine (PEI) (Tiera et al. 2006). Auf letzteres wird im Folgenden näher eingegangen.

In Abb. 4 sind Strukturformeln von häufig verwendeten kationischen Polymeren dargestellt.

1.3.3 Polyethylenimine (PEI)

$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ besitzt eine Masse von 43Da und stellt die kleinste sich wiederholende Einheit des gut wasserlöslichen kationischen Polymers Polyethylenimin dar. Diese können zu einer linearen bzw. verzweigten Form konjugiert sein. Aufgrund von sekundären und tertiären Amin-Gruppen bei verzweigten PEI bzw. hauptsächlich sekundären Amin-Gruppen bei linearem PEI, zeigt dieses, im Gegensatz zu z.B. Polylysin mit primären Amingruppen, eine hohe Pufferkapazität über eine sehr breite pH Spanne (Tang et al. 1997). Gerade aufgrund dieser Pufferkapazität gilt PEI als ein sehr attraktiver Genvektor, da PEI in späten Endosomen als „Protone Sponge“ wirkt und so der Komplex von DNA und PEI dem lysosomalen Abbau entgeht (siehe unten). Im physiologischen pH Bereich ist jedes fünfte bis sechste Stickstoffatom protoniert. Durch Bindung von DNA über elektrostatische Kräfte wird dieses Profil leicht verändert, wodurch jedes zweite bis dritte Stickstoffmolekül bei physiologischem pH protoniert ist (Kircheis et al. 2001). Das Verhältnis (N/P) von kationischem Stickstoff (N) der Polyethylenimine zu anionischem Phosphat (P) der DNA beeinflusst das Transfektionsverhalten von Polyplexen durch Parameter wie Partikelgröße und Zetapotential. Der Grad der Kondensation, Partikelgröße und Zetapotential beeinflussen Schritte des Gentransfers wie Zellbindung und -aufnahme, sowie den Schutz vor dem Abbau durch Nukleasen und auch die Transkription der DNA. Bei einem N/P Verhältnis von 10:1 entstehen Polyplexe von 70-500nm Größe und einem Zetapotential von +40mV (Honore et al. 2005) (Ferrari et al. 1999).

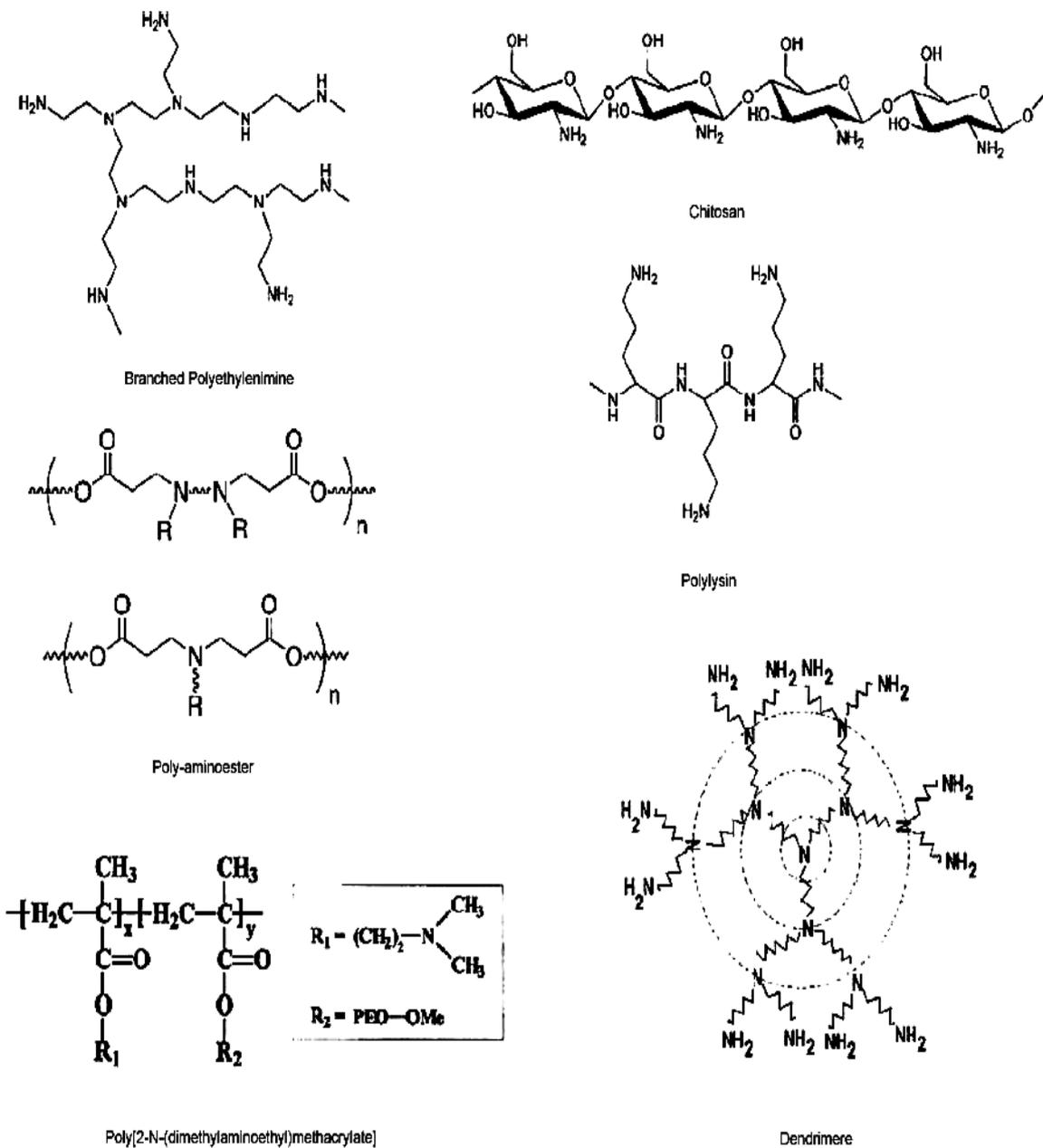


Abb. 4: Aus Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives Tiera et al. *Current Gene Therapy*, 2006, 6, 59-71

Erstmals wurden Polyethylenimine von Bousiff et al. 1995 als nicht-virale Vektoren *in vitro* und *in vivo* eingesetzt, wobei PEI-Moleküle von 800kD und 25kD verwendet wurden (Boussif et al. 1995). Derzeit wird am häufigsten lineares PEI von 22kD und verzweigtes PEI von 25kD verwendet, jedoch auch PEI von 2kD bis zu 800kD (Kircheis et al. 2001). PEI von geringerer Größe als 2kD zeigten keine zufriedenstellende Transfektions-Eigenschaften (Godbey et al. 1999 b).

Nachteil von Polyethylenimininen ist ebenso wie bei kationischen Lipiden deren Zytotoxizität. *In vitro* konnten Zeichen von Zellnekrose sowie Apoptose (Moghimi et al. 2005) ebenso beobachtet werden, wie zytotoxische Effekte *in vivo* (Chollet et al. 2002). Die Zytotoxizität hängt dabei vom molekularen Gewicht, dem Verzweigungsgrad und der Oberflächenspannung der verschiedenen PEI ab (Fischer et al. 1999).

1.3.4 Intrazelluläre Wege von Polyethylenimine/DNA Komplexen (Polyplexe)

Als „Target“ kann bei Gentransfer von DNA der Zellkern bzw. das Zytoplasma mit den Ribosomen für den RNA-Transfer angesehen werden. Dabei zeigen sich verschiedene Barrieren, die von den Polyplexen überwunden werden müssen: Zellbindung, Endozytose, endosomale Freisetzung und nuklearer Transport der DNA (Khalil et al. 2006). Nicht alle Einzelheiten der genannten Vorgänge sind bis jetzt aufgeklärt und bedürfen weiterer Nachforschung. Abb. 5 gibt eine schematische Übersicht über den intrazellulären Weg von Polyplexen mit DNA wieder.

Zelluläre Aufnahme

Polyplexe tragen aufgrund des N/P Verhältnisses, welches auf Seiten des Stickstoffes liegt, netto eine positive Ladung und lagern sich durch elektrostatische Kräfte an die negativ geladene Zellmembran an. Dabei spielen Heparansulfat, Proteoglykane bzw. Syndecane bei der unspezifischen Bindung von Polyplexen an die Zellmembran eine Rolle. Bei Syndecanen handelt es sich um Transmembran-

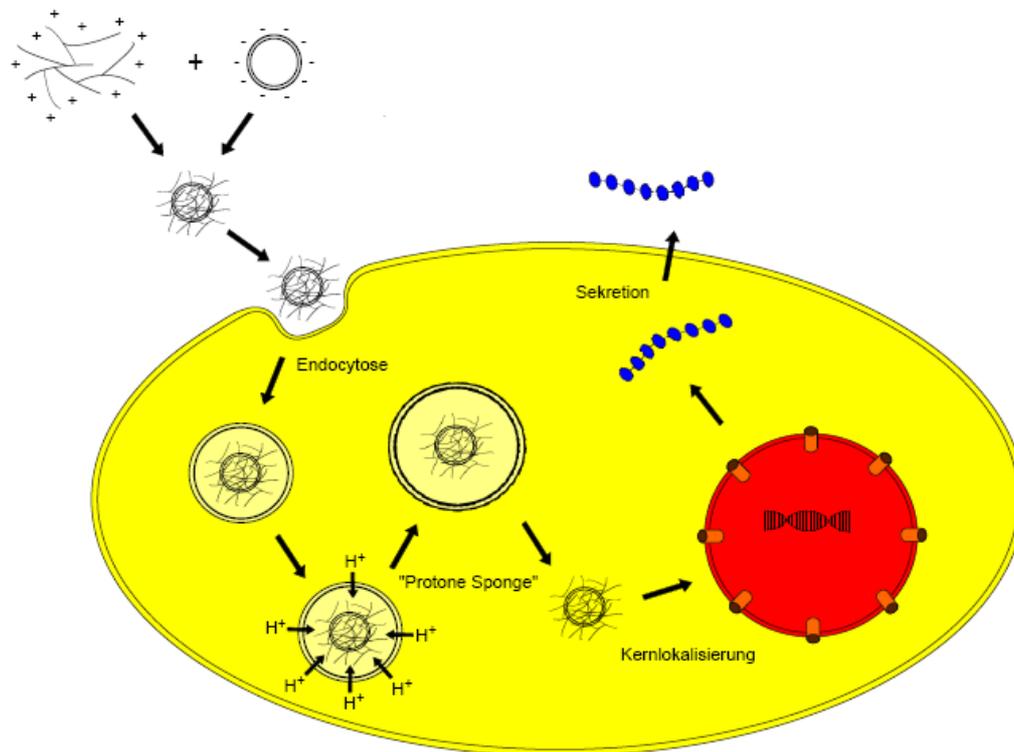


Abb. 5: Schema Zelleintritt und Proteinexpression von Polyplexen; Einzelheiten siehe Text

proteine mit verschiedenen Funktionen der Zellphysiologie wie Zelladhäsion, Modulation von Wachstumsfaktoren und Organisation von Mikrofilamenten im Zytoskelett (Paris et al. 2008) ebenso wie bei der Bindung und Aufnahme von Mikroorganismen wie z.B. HSV, AAV, CMV und Protozoen (Kopatz et al. 2004). Vor allem Syndecan 1 scheint für den effektiven Gentransfer mit Polyplexen eine entscheidende Rolle zu spielen.

Unter anderem wegen dieser unspezifischen Bindung an Zellen würden *in vivo* hohe Dosen an Polyplexen benötigt, um eine therapeutische Wirksamkeit im Zielgewebe zu erreichen. Dies würde aber auch zu einer dosisabhängig gesteigerten Toxizität führen. Durch rezeptor- und dadurch zellspezifischen Gentransfer könnte dieses Problem umgangen werden. Unter anderem wurden als Liganden für den rezeptorvermittelten Gentransfer Insulin, Folat und Transferrin sowie Antikörper gegen CD3, CD5 und EGF Rezeptoren verwendet (Medina-Kauweert al. 2005).

Makromoleküle werden von Zellen über Endozytose aufgenommen, wobei verschiedene Mechanismen der Aufnahme unterschieden werden können. Zur

Phagozytose sind nur spezialisierte Zellen wie z.B. Makrophagen fähig, während alle Zellen zur Pinozytose, Clarithrin abhängigen-, Caveolae abhängigen- und Clarithrin bzw. Caveolae-unabhängigen Endozytose in der Lage sind (Khalil et al. 2006).

Clarithrin vermittelte Endozytose führt nach Bindung an spezifische Rezeptoren zur Einstülpung der Zellmembran und Abschnürung sogenannter „Clarithrin coated pits“. Clarithrin wird in die Zellmembran zurückgeführt und es entstehen frühe Endosomen. Im folgenden Schritt findet eine Verschmelzung mit Lysosomen und Abbau des aufgenommenen Materials statt, bzw. werden aufgenommene Substanzen zu ihrem Bestimmungsort transportiert (Mellman 1996).

Caveolae sind rundliche Einstülpungen der Plasmamembran von 50-80nm Größe in welchen reichlich Cholesterol und Sphingolipide ebenso wie Caveolin vorkommen; letzteres ist für die Stabilität der Caveolae notwendig. Caveolae-vermittelte Endozytose spielt beim Transport von Cholesterol und Glykosphingolipiden ebenso eine Rolle, wie bei der Trans- bzw. Endozytose von Viren, z.B. SV40, und Toxinen, z.B. Cholera toxin. Nach Endozytose verschmelzen die abgeschnürten Vesikel mit Caveasomen, in denen ein neutraler pH Wert herrscht und es folgt der Transport zu dem endoplasmatischen Retikulum und/oder dem Golgi Apparat. Eine lysosomale Degradierung der aufgenommenen Substanzen findet nicht statt (Pelkmans et al. 2002) (Khalil et al. 2006).

Verschiedene Studien zeigen, dass eine Clarithrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose bei der Aufnahme von Polyplexen eine Rolle spielt. Mittels spezifischer Inhibitoren für den jeweiligen Endozytose-Weg konnten Polyplexe in den jeweiligen Vesikeln nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass Polyplexe über beide Wege aufgenommen werden (Rejman et al. 2005).

Van der Aa et al. zeigten, dass die Transfektionseffizienz nur nach Hemmung der Caveolae vermittelten Endozytose bei COS7 Zellen signifikant abnimmt (van der Aa et al. 2006). Allerdings scheint die Art der Endozytose von der Zelllinie abhängig zu sein. So zeigte sich eine deutliche Abnahme der Transfektionseffizienz in HUH-7 Zellen nach Inkubation mit Chlorpromazin, einem Inhibitor für die Clarithrin-

vermittelte Endozytose, jedoch nicht nach Verwendung von Flippin, das die Caveolae-vermittelte Endozytose hemmt (Gersdorff et al. 2006).

Die Partikelgröße scheint ebenfalls von Bedeutung für die Aufnahme in Zellen zu sein. Rejman et al. zeigten, dass die Größe von Lipoplexen für die Art der Endozytose wichtig ist. So wurden Partikel von bis zu 200nm über Clarithrin-vermittelte Endozytose aufgenommen, während für Lipoplexe von 500nm Größe der Caveolae-vermittelte Weg dominant ist (Rejman et al. 2004).

Intrazelluläre Vorgänge

Die Freisetzung der Polyplexe aus den Endosomen wird als eine der limitierenden Barrieren des nicht-viralen Gentransfers angesehen. Polyethylenimine besitzen im Gegensatz zu Polylysin eine Pufferkapazität über einen breiten pH Bereich (siehe oben). Während bei einem pH von 7,0 20% der Stickstoffatome protoniert sind, sind es bereits 45% bei einem pH von 5. Wegen der ausgeprägten Pufferkapazität werden Polyethylenimine auch als „Protone Sponge“ bezeichnet, da Protonen, welche nach Endozytose in die Endosomen/Lysosomen gepumpt werden, durch Polyethylenimine abgefangen werden. Parallel zu dem Transport von Protonen in die Lysosomen fließen aufgrund der Elektroneutralität Cl⁻ Ionen in die Lysosomen. Aufgrund der dadurch gesteigerten Osmolarität folgt H₂O in das Lumen, woraufhin Endosomen/Lysosomen anschwellen, was letztlich zu einem Platzen der Vesikel und der Freisetzung der Polyplexe in das Zytoplasma der Zelle führt. Im Vergleich dazu wird die geringere Transfektionseffizienz von z.B. Polylysinen durch die fehlende Pufferkapazität erklärt (Boussif et al. 1995) (Akinc et al. 2005) (Sonawane et al. 2003).

Über den intrazellulären Transport von Polyplexe zum Zellkern ist noch wenig bekannt, jedoch scheint ein aktiver Transport stattzufinden. Dabei scheinen Aktin-filamente vor allem bei der Aufnahme und dem Transport von Endosomen zu den Lysosomen verantwortlich zu sein. Weiter konnte ein Transport am mikrotubulären System zum Zellkern festgestellt werden. Die Frage, ob der Transport im Endosom oder als „freier“ Polyplex stattfindet, ist nicht eindeutig geklärt (Grosse et al. 2007) (Suh et al. 2003).

Aufnahme in den Zellkern

Als weitere Hürde für den nicht-viralen Gentransfer gilt die Aufnahme des Genkomplexes in den Zellkern, das eigentliche Ziel des Transfers von DNA. Es bestehen zwei Möglichkeiten der Aufnahme, einerseits während der Ruhephase mittels Diffusion durch Zellkernporenkomplexe (nuclear pore complex; NPC) andererseits während der Mitose-Phase, wenn die Zellkernmembran ihre Integrität verliert. Aufgrund der Größe von Polyplexen von durchschnittlich 150nm (30nm-700nm) bei N/P Verhältnissen von 6-10 ist eine reine Diffusion durch NPC mit einem maximalen Durchmesser von 25nm nicht möglich. Grosse et al. zeigten, dass die Zellkernaufnahme vor allem während der Mitose stattfindet. Geringe Expression des Reporterproteins GFP von stationären Zellen in der S Phase wurde mit Eintritt von kleinen Polyplexen bis 30nm durch NPC begründet (Grosse et al. 2006).

Kernlokalisierungssequenzen (nuclear localisation signal; NLS) binden im Zytoplasma an Karyopherin und Importinen, die die Kernaufnahme über NPC regeln. So konnte bereits eine Steigerung der Transfektionseffizienz durch Bindung von NLS an lineare DNA erreicht werden. Es zeigte sich jedoch auch eine fehlende Verbesserung bei der Verwendung von Plasmid DNA. Dies könnte auch auf eine verminderte Transkriptionsrate der DNA nach Bindung von NLS zurückzuführen sein, da als Endpunkt fast ausschließlich die Expression des Reporter Proteins gewählt wurde (van der Aa et al. 2006).

Schließlich muss die DNA durch Polymerasen transkribiert werden. Entweder dissoziieren die Polyplexe in freie DNA und PEI oder es findet eine Transkription an den Polyplexen selber statt. Godbey et al. zeigten, dass die DNA vor allem als Komplex mit PEI in den Zellkern gelangt (Godbey et al. 1999 a). Honore et al. konnten nachweisen, dass die Transkriptionsrate der kondensierten DNA im Gegensatz zu freier Plasmid DNA vermindert jedoch nicht komplett aufgehoben ist. Die effizienteste Transkription wurde bei einem N/P Verhältnissen von 5-10 festgestellt (Honore et al. 2005).

Postulierte intrazelluläre Wege nach mRNA Transfektion mit kationischen Polymeren bzw. kationischen Lipiden

Aus den oben genannten intrazellulären Vorgängen bei Polyplexen mit pDNA lassen sich nun für den Transfer von mRNA mit kationischen Lipiden bzw. kationischen Polymeren unterschiedliche Wege postulieren. Während bei der Transfektion von Lipoplexen mit mRNA durch einen „Flip-Flop“ Mechanismus freie mRNA in das Zytoplasma entlassen wird, gelangen Polyplexe als intakte Komplexe in das Zytosol. Für eine effektive Translation der mRNA scheint allerdings eine Dekomplexierung der Polyplexe im Zytosol notwendig zu sein. (Bettinger et al. 2001) (siehe Abb. 6).

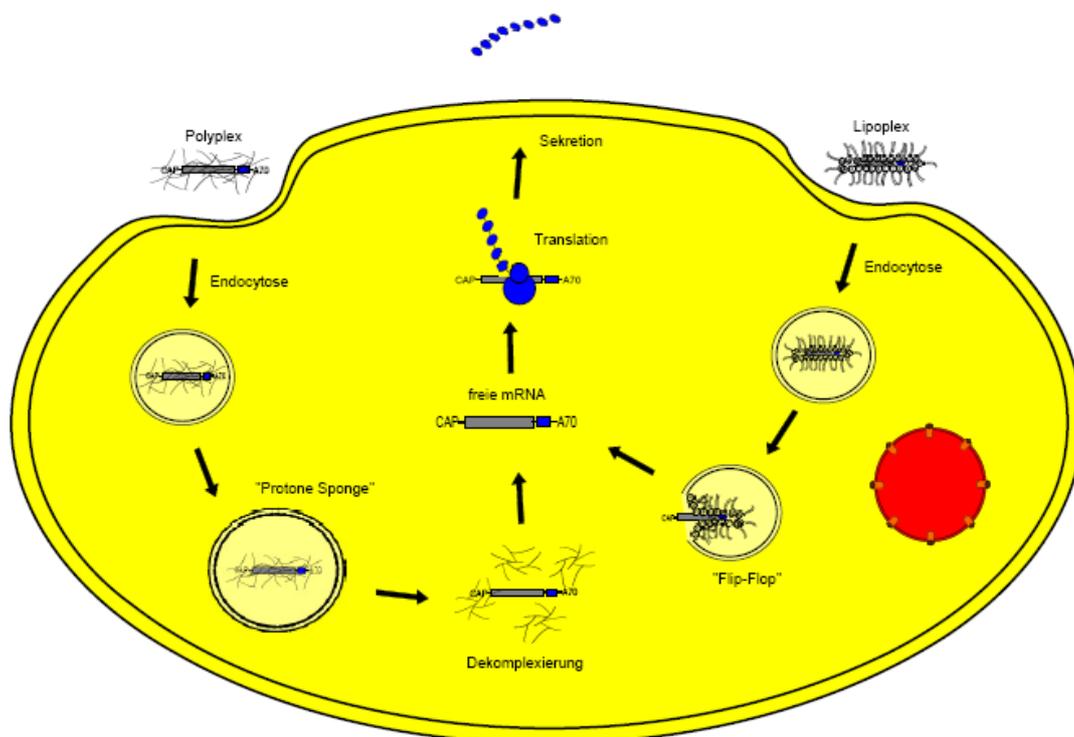


Abb. 6: Postulierte intrazelluläre Wege von mRNA nach Transfektion von Lipoplexen bzw. Polyplexen modifiziert nach Bettinger et al.

1.3.5 Magnetofektion

Nicht-viraler Gentransfer ist abhängig von der Akkumulation der Polyplexe bzw. Lipoplexe an der Zelloberfläche, wobei elektrostatische Kräfte eine Rolle spielen. *In vitro* und vor allem *in vivo* ist dies durch physiologische Gegebenheiten limitiert, da z.B. bei der pulmonalen Applikation durch die mukoziliäre Clearance bzw. die Mukusschicht und die Glykokalix die Akkumulation und Kontaktzeit der Polyplexe mit den Endothelzellen vermindert ist (siehe unten) (Scherer et al. 2002) (Gersting et al. 2004).

Bei der Methode der Magnetofektion werden Polyplexe, die mit Eisenoxidnanopartikeln verknüpft sind, mit DNA komplexiert. Durch Anlegen eines Magnetfeldes kommt es zu einer schnelleren und effizienteren Anreicherung der Partikel an der Zelloberfläche. Diese werden über Endozytose aufgenommen und folgen dem gleichen intrazellulären Weg wie Polyplexe ohne Eisenoxidnanopartikel (Huth et al. 2004).

Durch die Methode der Magnetofektion lässt sich also die nötige Expositionszeit sowie die Vektordosis vermindern. Eine zielgerichtete therapeutische Applikation in definierte Gewebeabschnitte für die Anreicherung von Vektoren in z.B. Tumoren oder bestimmten Organen, ist ebenfalls durch Anlegen eines lokalen Magnetfeldes möglich (Scherer et al. 2002).

1.4 CpG-Motive der Plasmid DNA

Bakterielle- bzw. Plasmid-DNA ist im Gegensatz zu humaner DNA reich an Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) Motiven. Im Gegensatz zu humaner DNA, in der die vorkommenden Cytosine in CpG Motive hauptsächlich methyliert sind, liegen diese in bakterieller DNA in unmethylierter Form vor.

Unmethylierte CpG Motive der bakteriellen DNA führen über Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9) zu einer Stimulation des Immunsystems. Toll-like Rezeptoren gehören zu den PRR (pattern recognition receptor) die PAMPs (pathogen specific molecular

patterns) erkennen und zu einer Immunantwort führen. So dienen Toll-like Rezeptor 2 und 4 der Erkennung von mikrobiellen Bestandteilen, wie Lipoproteinen und Lipopolysacchariden. TLR 3, TLR 7 und TLR 8 binden doppelsträngige und einzelsträngige RNA. Sie bestehen aus einer Leucin-reichen-Region (LRR), einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne. TLR 9 ist in der Membran von intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum, Endosomen und Lysosomen vor allem von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten lokalisiert. Bei einer Stimulation des Rezeptors führt dies über die Bildung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und activator protein-1 zur Transkription von Cytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF- α . Über humorale Faktoren und direkten Zellkontakt werden im Folgenden NK-Zellen und T-Lymphozyten aktiviert (Kumagai et al. 2008) (Hemi et al. 2000) (Bauer et al. 1999).

Yew et al. verglichen Plasmid DNA, die reich an CpG-Motiven war, mit Plasmid DNA, in der eben diese CpG-Motive reduziert waren. *In vitro* konnte eine Abnahme der Cytokine IL-12, IL-6 und TNF- α sowie eine erhöhte Proteinexpression festgestellt werden. *In vivo* zeigte sich nach intravenöser Applikation bzw. intranasaler Installation von Lipoplexen mit CpG-reduzierter Plasmid DNA in Serum bzw. bronchoalveolärer Lavage (BALF) ebenfalls eine Abnahme proinflammatorischer Cytokine im Vergleich mit Lipoplexen mit unmodifizierter Plasmid DNA (Yew et al. 2002). Des Weiteren zeigte sich eine länger anhaltende Genexpression nach Transfer von CpG-reduzierter-DNA im Serum gentherapeutisch behandelter Mäuse. Außerdem konnte ein weiterer Anstieg des Reporter-Proteins nach wiederholter Applikation beobachtet werden. Es wurden Werte des Reporter-Proteins von bis zu 270% nach 49 Tagen im Vergleich zu einmaliger Applikation gemessen. Nach einmaliger Gabe von CpG-reicher-DNA kam es zu einem geringeren Anstieg und schnelleren Abfall der Konzentration des Reporterproteins im Serum. Erneute Applikation von CpG-reicher-DNA führte dagegen zu keinem erneuten Anstieg (Yew et al. 2002). Durch die Verwendung von CpG reduzierter DNA lässt sich also die Zytotoxizität von Lipoplexen bzw. Polyplexen reduzieren und eine gesteigerte Proteinexpression erreichen.

1.5 Die Lunge als Target

Die Applikation von therapeutischen Genen *in vivo* ist über verschiedene Wege wie z.B. eine intramuskuläre und intravenöse Injektion möglich. Eine weitere Option ist die pulmonale Applikation mittels Aerosol, wobei die Lunge von Erwachsenen mit einer alveolären Oberfläche von $78 \times 10^4 \text{ cm}^2$ eine große Angriffsfläche bietet. Vorteil der Aerosol-Therapie ist ihr nicht invasiver Charakter und ihre verminderte systemische Toxizität. Weiterhin werden störende Barrieren wie z.B. die Bindung der Polyplexe an Plasmaproteine nach i.v. Applikation umgangen (Gautam et al. 2003).

Mittels Druckluft bzw. Ultraschall können wässrige Lösungen zu einem Aerosol mit einer Tröpfchengröße von 0,5-5 μm vernebelt werden. Vor allem Partikel von 1-2 μm Größe erreichen den Alveolarraum, während über einer Größe von 3 μm die Partikel sich vor allem im Oropharynx und den oberen Atemwegen absetzen. Bei der Vernebelung entstehen jedoch Scherkräfte, die „nackte“ Plasmid-DNA zerstören würden. Wird DNA jedoch z.B. mit Polyethyleniminen komplexiert, erhält sich die Integrität dieser Polyplexe auch nach Vernebelung, ebenso wie die DNA, die aus diesen Polyplexen wieder gelöst wird (Rudolph et al. 2002). So konnte gezeigt werden dass PEI/pDNA Komplexe nach Vernebelung effizient Atemwegsepithelzellen von Mäusen transfizieren können (Rudolph et al. 2005).

Ein Nachteil von Polyplexen ist ihre Zytotoxizität. Densmore et al. konnten zeigen, dass nach Aerosol Applikation von Polyplexen die Konzentration von Zytokinen sowohl im Serum als auch in der bronchoalveolären Lavage signifikant niedriger waren als im Vergleich zu einer intravenösen Applikation. Weiterhin erreichte die Aerosol Applikation die höchste Expression von Reporterprotein im Lungengewebe (Gautam et al. 2001).

Für eine klinische Anwendung ist die damit erreichbare Genexpression allerdings noch zu gering. Surfactant und eine darunter liegende Schicht (airway surface liquid), bestehend aus Proteinen, Phospholipiden und Glykoproteinen beeinflussen nicht-virale Vektoren und vermindern deren Transfektionseffizienz (Rosenecker et al. 2003). Alveoläre Makrophagen, gerichteter Zilienschlag und

mukoziliäre Clearance vermindern darüber hinaus die Verweildauer der Polyplexe bzw. Lipoplexe in der Lunge und somit ihre Bioverfügbarkeit (Lombry et al. 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem *in vitro* Model untersucht werden, ob Adenokarzinomzellen der Lunge A549 als Modell für Lungenepithelzellen in der Lage sind aus fremdem genetischem Material intakte Proteine zu translatieren und in das Medium zu sezernieren. Als Reporterprotein diente hierbei mSEAP, mit dem bereits erfolgreich mittels viraler Vektoren Lebergewebe von Mäusen transfiziert und nachfolgend im Serum gemessen wurde (Mælandsmo et al. 2005). Die Basensequenz von mSEAP sollte in den Vektor CpG-depl. integriert werden, um für die folgenden *in vivo* Experimente, eine möglichst geringe Stimulation des Immunsystems durch mSEAP zu erreichen. Weiterhin sollten verschiedene nicht-virale Tranferreagenzien wie Polyethylenimine, DMRIE-C und fluidmagPEI bzw. Polymag getestet sowie ein Vergleich der Transfektionseffizienz von pDNA und mRNA jeweiligen Methoden erstellt werden.

Hintergrund der Überlegungen war, ob die Lunge als „sekretorisches Organ“ nach Applikation geeigneter Nukleinsequenzen genutzt werden kann. Aufgrund ihrer großen Oberfläche und der guten Zugänglichkeit über das Bronchialsystem könnten nach Applikation von Gentransferkomplexen therapeutische Gerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor VIII, Faktor IX, exprimiert und in die Blutbahn sezerniert werden. Vorteil dieser Methode wäre die Einfachheit der Applikationsart der Aerosoltherapie sowie ihr nicht-invasiver Charakter.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Reagenzien und Geräte

verwendete Zellen/Bakterien	Bezugsquelle
A549 humane alveolar basal Epithelzellen des Adenokarzinoms	DSMZ; Braunschweig
ElektroMAX DH 10B E.coli	Invitrogen life Technologies; Karlsruhe

verwendete Reagenzien	Bezugsquelle
1kBP Ladder	Plasmid Factory GmbH; Bielefeld
destilliertes Wasser	Delta select GmbH
Eco RI	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
FCS	PAA Paching Österreich
Gentamicin	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
Hind III	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
HpaI	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
MEM-Medium	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
PBS	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
Penicillin	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
Pme I	Bio Labs Inc
Streptomycin	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Triton X	Merck KGaA; Darmstadt
Trypsin	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
Xho I	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

Verwendete Kits	Bezugsquelle
NBT/BCIP Stock Solution	Roche Diagnostics GmbH; Penzberg
Nucleo Spin Extract II	Macherey-Nagel; Düren
QIAprep Spin Miniprep, Maxi- ; Mega-	Qiagen GmbH; Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH; Hilden
SEAP Reporter Gene Assay	Roche Diagnostics GmbH; Penzberg

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
10ml Röhrchen	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
24-Well Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
4 Chamber Slides	BD Falcon; San Jose; CA; USA
6-Well Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
75cm ² Zellkulturflaschen	BD Falcon; San Jose; CA; USA
Küvette (d=0,1cm)	Greiner Bio-One GmbH;Essen
OptiWell 96-Well Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
Tube 1,5ml	Greiner Bio-One GmbH;Essen
Tube 2,0ml	Greiner Bio-One GmbH;Essen

verwendete Geräte	
Biophotometer 6131	Eppendorf; Wesselingen-Berzdorf
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH; Hanau
EDAS 290 Gelkamera	Kodak GmbH Stuttgart
Horizon 20.25 Gelkammer	Gibco-BRL; Gaithersburgh, USA
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss; Jena
Lichtmikroskop Axioplan 2 mit Programm Axiovision	Zeiss; Jena
Wallac Victor/1420 multilabel counter	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany
Zentrifuge 5417R	Eppendorf; Wesselingen-Berzdorf
NdFeB Magnet	NeoDelta/Remanenz IBS Magnet; Berlin

Vektoren	Bezugsquelle
branched-PEI 25kD	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
DMRIE-C	Invitrogen life technologies; Karlsruhe
fluidmagPEI	Chemicell, Berlin
Polymag	Chemicell, Berlin

2.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden A549 Zellen (DSMZ; Braunschweig), die aus humanen alveolar basal Epithelzellen des Adenokarzinoms gewonnen wurden, als Modell für Typ II Pneumozyten verwendet (Nardone et al. 1979). Die Zelllinien wurden in 75cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon; San Jose; CA; USA) bei 37°C und 5% CO₂ Luftanteil in MEM-Medium (Minimal Essential Medium; Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) mit einem Anteil von 10% FCS (Fetal Calf Serum), versetzt mit Gentamicin in einer Konzentration von 50µg/ml, Penicillin und Streptomycin, je 10U/ml, in Kultur gehalten. Alle 3 - 4 Tagen wurden die Zellen passagiert. Medium wurde entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen, 1ml Trypsin (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) hinzugegeben und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche gelöst, 9 ml Medium hinzugeben und die Zellen durch Pippettieren resuspendiert. Es wurden 9 ml Medium entnommen und verworfen bzw. in 10 ml Saarestedt Röhrchen für Experimente überführt, 9 ml frisches Medium hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank kultiviert.

Vor der Durchführung der Experimente wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25/Zeiss; Jena) ausgezählt und entsprechende Zellzahl auf 6-Well, 24Well-Platten (TPP; Trasadingen, Schweiz) bzw. 4 Chamber Slides (NUNC; Rochester USA) ausgesät.

2.3 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellsuspensionen, in diesem Fall ElektroMAX DH 10B E.coli Zellen, in Gegenwart einer DNA-Lösung einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, wodurch Poren in der Zellmembran entstehen, durch diese die DNA in die Zellen gelangen kann. Durch das Anlegen einer Spannung von 0,4 - 1V entstehen zunächst durch lokale Zerstörung der Membranintegrität hydrophobe Poren, die sich bei Erreichen eines kritischen Radius spontan in stabile hydrophile Poren, mit einem Durchmesser von 0,5 - 1nm und einer Lebensdauer von einigen Sekunden bis Minuten, umwandeln. Durch Beteiligung von Proteinen können diese

Poren zu so genannten „Kompositporen“ weiter stabilisiert werden. (Gentechnische Methoden Seite 251-252 Gangolf Schrimpf; Spektrum)

In der folgenden Tabelle wird das angewandte Vorgehen beschrieben:

- ⇒ Pro Küvette (d = 0,1cm) wurden 10ng DNA verwendet
- ⇒ 1. Küvette: 50µl Aqua dest. + 5µl DNA (10ng) + 2µl ElektroMAX DH 10B E.coli
- 2. Küvette: 50µl Aqua dest. + 5µl DNA (10ng) + 2µl ElektroMAX DH 10B E.coli
- 3. Küvette: 50µl + 2µl ElektroMAX DH 10B E.coli
- ⇒ „Elektroporator conditions“: 1,8 kV, 25 µF, 100 Ω

Küvette 1 und 2 wurden zusammen, Küvette 3 separat in 2ml LB-Medium überführt und für 1h bei 37° C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden die abzentrifugierten Zellen auf LB-Medium-Ampicillin Platten (Ampicillin-Resistenz auf Plasmid kodiert (Abb. 6: bla-(Ap-R)) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterienwachstum konnte nur auf Platten mit transfizierten E.coli aufgrund der erworbenen Resistenz beobachtet werden. Auf der Kontrollplatte mit E.coli mit fehlender Resistenz aus Küvette 3 konnte kein Wachstum festgestellt werden.

Einzelne Kolonien wurden „gepickt“ und in 5ml LB-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 50 µg/ml überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels QIAprep Spin Miniprep aus den E.coli Zellen gereinigt und DNA Gehalt und Reinheit mittels Photometer gemessen.

2.4 Klonieren eines pCPG-depleted-mSEAP Vektors

Die verwendete DNA mit der Sequenz von mSEAP war eine Gabe von Robin J. Parks (Ottawa Health Research Institute; Ottawa; Ontario; Kanada). Sie war integriert in pBS (Abb. 7). Mittels Elektroporation wurde pBSmSEAP in ElektroMAX DH 10B E.coli (Invitrogen life technologies) transfiziert.

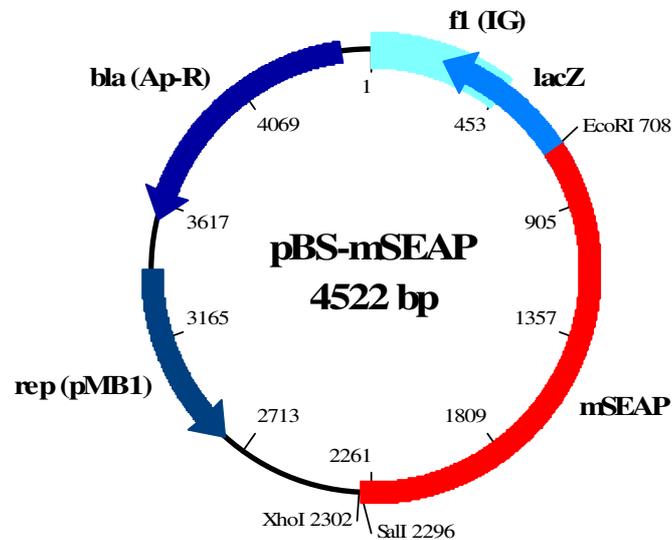


Abb. 7: pBSmSEAP (Robin J. Parks (Ottawa Health Research Institute; Ottawa; Ontario; Kanada)

Das Plasmid pVAX wurde, wie für pBS-mSEAP beschrieben, mittels Elektroporation in ElektroMAX DH 10B E.coli Zellen transfiziert, vermehrt und mit QIAprep Spin Miniprep gereinigt. Beide Plasmide, pBS und pVax, wurden mittels Restriktionsenzymen Xho I und Eco RI (Fermentas GmbH; St. Leon-Rot) geschnitten und auf ein 1% Ethidium-Bromid haltiges Agarose Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde eine 1kBP Ladder (Plasmid Factory GmbH; Bielefeld) aufgetragen. Nach ca. 2 Stunden Laufzeit bei 120V in TEA Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA) wurden Aufnahmen mittels Gelkamera (EDAS 290 Gelkamera; Kodak GmbH Stuttgart) gemacht. Entsprechende Banden von mSEAP (1594BP) und pVAX (2966BP) wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Bestrahlung möglichst exakt herausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eluiert. Isolierte DNA wurde photometrisch (Biophotometer 6131; Eppendorf) gemessen und mittels T4 DNA Ligase (Fermentas; St. Leon-Rot) über Nacht ligiert.

Das entstandene Plasmid pVAX-mSEAP wurde mittels Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel; Düren) gereinigt und wie beschrieben mittels ElektroMAX DH 10B E.coli (Invitrogen life technologies) vermehrt und mit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) gereinigt.

Das Plasmid CpGhuGFP wurde auf oben beschriebene Weise vermehrt. Beide Plasmide, CpGhuGFP und pVAX-mSEAP, wurden mit Restriktionsenzymen Pme I (Bio Labs Inc.) und Hind III (Fermentas life science) geschnitten und nach 24h Einwirkung auf ein 1% Ethidium-Bromid haltiges Agarose Gel aufgetragen (s.o.). Nach 2 Stunden Laufzeit wurden die entsprechende Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Bestrahlung herausgeschnitten und mit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert. CpG und mSEAP wurden über Nacht miteinander ligiert, mittels Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel; Düren) gereinigt und auf oben beschriebene Weise mittels Elektroporation transfiziert, vermehrt und mit QIAprep Spin Miniprep gereinigt wobei jeweils Glycerol Stocks (450 µl Bakterien-haltiges Medium + 150 µl Glycerol) angelegt wurden, welche bei -80 °C gelagert wurden. Es wurden Restriktionsanalysen von dem Plasmid CpG-mSEAP mit Hind III, Eco RI, XhoI und HpaI (Fermentas) durchgeführt und das Plasmid auf seine Größe mittels Gelelektrophorese überprüft.

In entsprechende Volumina LB-Medium, mit einer Kanamycin-Konzentration von 50 µg/ml, wurden pCpG-mSEAP enthaltene ElektroMAX DH 10B E.coli aus Glycerol Stocks übertragen, und bei 37° und 225 rpm über Nacht inkubiert. Nach 12-16h wurde die Plasmid DNA mittels Qiagen Mini-, Maxi- bzw. Mega-Prep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus E.coli gereinigt. Dabei wurde eine Menge von 10-20 µg DNA bei Mini-Prep Kit, von ca. 50 µg bei Maxi-Prep Kit und ca. 100 µg bei Mega-Prep Kit erlangt. Die gewonnene DNA wurde in EB-, bzw. TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.5 Quantifizierung und Reinheit der DNA

Die Ausbeute der isolierten DNA wird durch photometrische Messung bei 260 nm ermittelt. Zur Überprüfung der Reinheit wird ein Absorptionsspektrum zwischen 220 nm und 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 280 nm und 260 nm ist ein Maß für die Reinheit (Schimpf S.126-127). Der Quotient sollte einen Wert über 1,7 haben. Werte unter 1,7 deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine.

2.6 RNA (RNActive™)

Die verwendete mRNA (Abb. 8) wurde von der Firma CureVac GmbH (Tübingen) aus dem klonierten Plasmid mittels *in vitro* Transkription mit einer rekombinanten RNA Polymerase hergestellt. Die mRNA hat eine Größe von 1575 BP und wurde auf seine Größe mittels Gelelektrophorese überprüft. (Angabe von CureVac GmbH; Tübingen)

mRNA mSEAP (1575 BP)

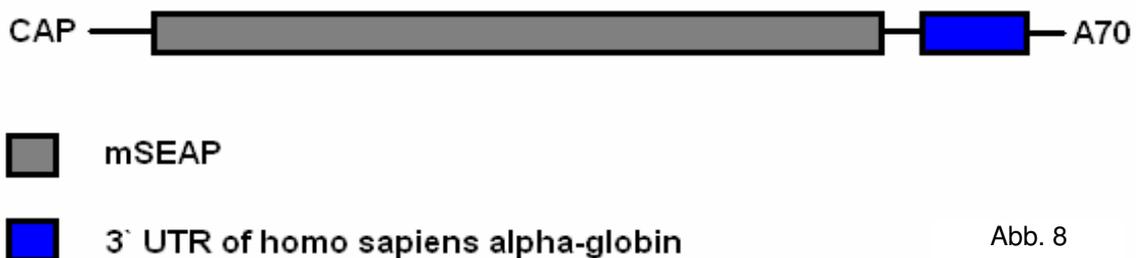


Abb. 8

RNA unterliegt durch ubiquitär vorkommende RNAsen einem ständigen Abbau. Die Stabilität der verwendeten RNA wurde im Vergleich zu „Wildtyp RNA“ durch folgende Modifikationen erhöht:

Modifizierung am 5' Ende durch eine sog „Cap-Struktur“ (modifiziertes Guanodin-Nukleotid) über die die Translokation der mRNA von Zellkern in das Zytoplasma sowie der Abbau der mRNA und die Initiation der Translation reguliert wird. Stabilisierung der RNA und Regulation der Translation sind ebenso Eigenschaften des am 3' Ende eingefügten Poly-A-Schwanzes.

Durch Steigerung des Guanin / Cytosin-Gehaltes anstatt Adenosin / Uracil konnte eine erhöhte Stabilität der mRNA erreicht werden. Aufgrund der „Degeneration des genetischen Codes“ können Codons entsprechend modifiziert werden, ohne eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins nach sich zu

ziehen. Ein Beispiel hierfür sind die Codons für die Aminosäure Prolin, CCU oder CCA, die zu CCC oder CCG mittels Substitution verändert werden können.

Weiterhin wurde die Halbwertszeit der verwendeten mRNA im Zytosol durch Einfügen einer untranslatierten Region (UTR) von humanen alpha Globulin, deren kodierende mRNA eine besonders große Halbwertszeit besitzt, am 3´Ende erhöht.

Die Translationseffizienz wurde ebenfalls durch Verwendung alternativer Codons für „häufig in der Zelle vorkommende tRNAs“ im Vergleich zu „seltenen“ tRNAs, die die gleiche Aminosäure tragen, verbessert. (Europäische Patentschrift, Veröffentlichungsnummer: EP 1 392 341 B1; CureVac GmbH)

2.7 Verwendete Vektoren

Als Vektoren wurden für die Transfektionen das kationische Polymer branched-PEI 25kD (Sigma-Aldrich; Schnelldorf), fluidmagPEI (chemicell, Berlin), Polymag (Chemicell, Berlin) und das kationischen Lipid DMRIE-C (Invitrogen life technologies) verwendet.

2.8 N/P Verhältnis

Der Faktor N/P gibt das Verhältnis von Stickstoff in dem kationischen Polymer b-PEI zu Phosphat von verwendeter Plasmid DNA an. Es wird wie folgt berechnet:

- Für DNA als verwendete Nukleinsäure:
$$N/P = (m(\text{PEI}) / 43,069 \text{ g mol}^{-1}) \cdot (330 \text{ g mol}^{-1} / m(\text{DNA}))$$
- Für mRNA als verwendete Nukleinsäure:
$$N/P = (m(\text{PEI}) / 43,069 \text{ g mol}^{-1}) \cdot (340 \text{ g mol}^{-1} / m(\text{RNA}))$$

Hierbei gibt 330 g mol^{-1} für DNA und 340 g mol^{-1} für RNA den Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden (negative Ladung tragenden)

Einheit der DNA bzw. RNA, dem Desoxynukleotid bzw. Ribonukleotid an. $43,069 \text{ g mol}^{-1}$ ist der Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden (mögliche positive Ladung tragenden) Einheit des Polymers PEI: $-\text{N}(\text{CH}_2)^2$.

Für Transfektionen von pDNA wurde z.B. eine pDNA Menge von $1,2 \mu\text{g}$ (siehe unten) nach experimenteller Erfahrung festgelegt und ein N/P Verhältnis von 7 gewählt. Hieraus lässt sich die notwendige Menge an b-PEI wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned} m(\text{PEI}) &= \text{N/P} \cdot m(\text{DNA}) \cdot 43,069 \text{ g mol}^{-1} / 330 \text{ g mol}^{-1} = \\ &= 7 \cdot 1,2 \mu\text{g} \cdot 43,069 \text{ g mol}^{-1} / 330 \text{ g mol}^{-1} = 1,096 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Aufgrund des BP Verhältnisses von pDNA zu mRNA von $4605 \text{ BP} / 1575 \text{ BP} = 2,92$ wurden $0,4 \mu\text{g}$ mRNA verwendet, um gleiche Anzahl an kodierenden Sequenzen von mSEAP zu erhalten (siehe unten). Bei gleichen N/P Verhältnis von 7 ergibt sich eine Menge von b-PEI für die Transfektion von mRNA wie folgt:

$$\begin{aligned} m(\text{PEI}) &= \text{N/P} \cdot m(\text{RNA}) \cdot 43,069 \text{ g mol}^{-1} / 340 \text{ g mol}^{-1} = \\ &= 7 \cdot 0,4 \mu\text{g} \cdot 43,069 \text{ g mol}^{-1} / 340 \text{ g mol}^{-1} = 0,36 \mu\text{g} \end{aligned}$$

2.9 Transfektion mit pCpG-depleted-mSEAP/b-PEI

Transfektionen wurden auf 6 Well Platten (TPP; Trasadingen, Schweiz) und 4 Chamber Slides (NUNC; Rochester USA) für lichtmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Dafür wurden A549 Zellen am Vortag sequenziert (siehe oben), in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25/Zeiss; Jena) ausgezählt, und ca. 500.000 pro Well (6-Well Platte) bzw. 100.000 Zellen pro Chamber ausgesät. Es wurden $1000 \mu\text{l}$ (6Well) bzw. $500 \mu\text{l}$ (Chamber-Slides) 10% FCS haltiges MEM-Medium, mit einer Antibiotika Konzentration von Gentamicin $50 \mu\text{g/ml}$, Penicillin und Streptomycin, je 10 U/ml , hinzugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ in Kultur gehalten.

Die DNA-PEI Komplexe wurden alle in PBS (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) hergestellt. Es wurde ein N/P Verhältnis von 8 gewählt. Die entsprechende Menge

PEI bzw. DNA wurde je in 50 µl PBS verdünnt, miteinander gemischt und für 20 min inkubiert. Dabei bilden sich durch elektrostatische Anziehungskräfte stabile DNA(-) - PEI(+) Komplexe aus.

Das Medium wurde entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen, und durch 1000 µl (6Well) bzw. 400 µl (Chamber) MEM Medium ohne FCS ersetzt. Bestandteile von FCS können mit den Genvektoren interagieren und bei Transfektionsversuchen einen störenden Einfluss besitzen. Es wurden jeweils 100µl (6Well) bzw. 40µl (Chamber) Komplex-Lösung pro Well hinzugegeben, die Platten leicht geschwenkt und bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 4h Inkubationszeit wurde das Medium entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch 1ml bzw. 400 µl MEM-Medium (+ 10%FCS+ Antibiotika) ersetzt, und die Zellen bis zur Vermessung in Kultur gehalten.

2.10 Magnetofektion

Magnetofektionen wurden auf 24 Well Platten durchgeführt. Es wurden am Vortag ca. 100.000 A549 Zellen pro Well ausgesät und mit 500 µl MEM Medium (+10%FCS und Antibiotika) in Kultur gehalten. Bei der Durchführung der Magnetofektion konnte durch Sichtkontrolle mit einem Lichtmikroskop eine Konfluenz von 50-60% festgestellt werden. Zur Durchführung der Experimente wurde das Medium durch 400 µl MEM-Medium ohne FCS ersetzt (s.o.).

Pro Well wurde je 1 µg DNA verwendet, die in einem N/P Verhältnis von 10 mit PEI (25kD; dialysiert gegen H₂O) komplexiert wurde. Es wurde hierfür 1 µg DNA und 1,3 µg PEI jeweils in 25 µl PBS verdünnt, gemischt, und für 20 min inkubiert. In einem Verhältnis von 1/15 DNA/fluidmagPEI wurden die Komplexe mit fluidmagPEI, gelöst in PBS, vermischt und für weitere 15 min komplexiert. Das so entstandene, Komplexe enthaltende Gesamtvolumen von je 100µl wurde den Wells hinzugegeben und die 24 Well-Platte bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit auf einer gesinterten NdFeB Magneten tragenden Platte inkubiert. Die Magneten sind zylindrisch und auf einer Acrylglasplatte im Format einer 24 Well-Platte eingelassen, wobei nur jedes zweite Well einen Magneten trägt. Nach 15 min wurde das Medium

entnommen die Zellen mit PBS gewaschen und 350µl MEM Medium(+10%FCS und Antibiotika) hinzugegeben, und die Zellen in Kultur gehalten.

2.11 Vergleich der Transfektionseffizienz von pDNA und mRNA mit b-PEI, Polymag und DMRIE-C

Folgende Versuche wurde auf 24-well Platten durchgeführt. Pro Well wurden 100.000 A549 Zellen am Vortag der Transfektion ausgesät, so dass eine Konfluenz der Zellen von 70% am Tag der Transfektion bestand. Das Verhältnis der Basen von pCpG-depleted-mSEAP und der mRNA von mSEAP beträgt 4605 BP/ 1575 BP = 2,92. Hieraus folgt, dass 0,4 µg mRNA von mSEAP ca. 1,2 µg DNA von pCpG-depleted-mSEAP gleich vielen kodierenden Kopien entspricht. Komplexe mit b-PEI und DNA/mRNA wurden in 40 µl PBS mit einem Verhältnis von N/P = 7 wie beschrieben hergestellt und transfiziert. Für mRNA wurde RNase freies Material verwendet.

Polymag ist eine gebrauchsfertige Mischung aus transMAG-PEI und freiem PEI und wurde in einem Verhältnis von 2:1 (Polymag/DNA bzw. RNA) in 40µl PBS gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Magnetofektion wurde für 20 Minuten in 400µl MEM ohne FCS bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit auf einer gesinterten NdFeB Magnet-tragenden Platte durchgeführt. Nach Magnetofektion wurde das Medium entnommen die Zellen mit PBS gewaschen und 400µl MEM mit 10%FCS hinzugegeben.

Komplexe von DNA/mRNA und DMRIE-C wurden in 40 µl Opti-MEM (vom Hersteller empfohlen) im Verhältnis 2:1 DMRIE-C:DNA bzw. RNA hergestellt. Transfektionen wurden in 400 µl Opti-MEM bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Nach 4h wurden Zellen mit PBS gewaschen und MEM mit 10% FCS hinzugegeben.

Messungen der Aktivität von mSEAP im Medium wurden nach 24h, 48h und 72h durchgeführt, lichtmikroskopische Bilder nach 24h.

2.12 Messung der mSEAP Aktivität im Medium

Für die Messung der Aktivität der murinen sekretorischen alkalischen Phosphatase wurde ein Kit der Firma Roche (Roche Diagnostics GmbH; Penzberg, Germany) „SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent“ verwendet. Das Testprinzip beruht auf der Dephosphorylierung des Substrates CSPD [3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'(5'-chloro)-tricyclo(3.3.1.1)decane]-4-yl)phenyl phosphate] durch die alkalische Phosphatase. Das entstandene anionische Dioxetan zerfällt in zwei weitere Produkte, wobei Licht, mit einem Maximum einer Wellenlänge von 477 nm, emittiert wird (siehe Abb. 9), welches sich proportional zur Konzentration von mSEAP verhält. (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent, Roche)

Alle Messungen wurden auf schwarzen 96-Well Platten (Opti Well) in einem Wallac Victor/1420 multilabel counter (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany) durchgeführt und sind in RLU (Relativ Light Units) angegeben.

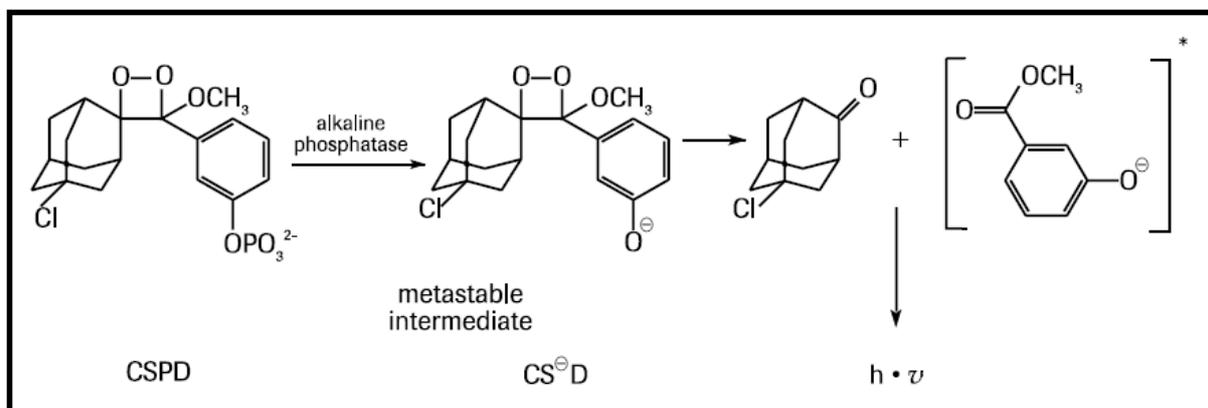


Abb. 9: Testprinzip aus SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent; Instruction Manual

Es wurde nach 24h, 48h und 72h jeweils 50 µl Medium unter sterilen Bedingungen entnommen, nach dem angegebenen Protokoll behandelt und vermessen. Dabei wurde vor der Zugabe des Substrates eine Background Messung durchgeführt, deren Ergebnis von der Aktivitätsmessung subtrahiert wurde. Zusätzlich wurde zu jedem Experiment eine zugehörige Eichungs-Messkurve erstellt, indem eine Verdünnungsreihe einer alkalischen Phosphatase angelegt und nach dem

vorgegebenen Protokoll vermessen wurde. Abb. 10 zeigt eine auf beschriebenen Weise ermittelte Eichkurve von AP in Konzentrationen von 0,1pg-1 μ g.

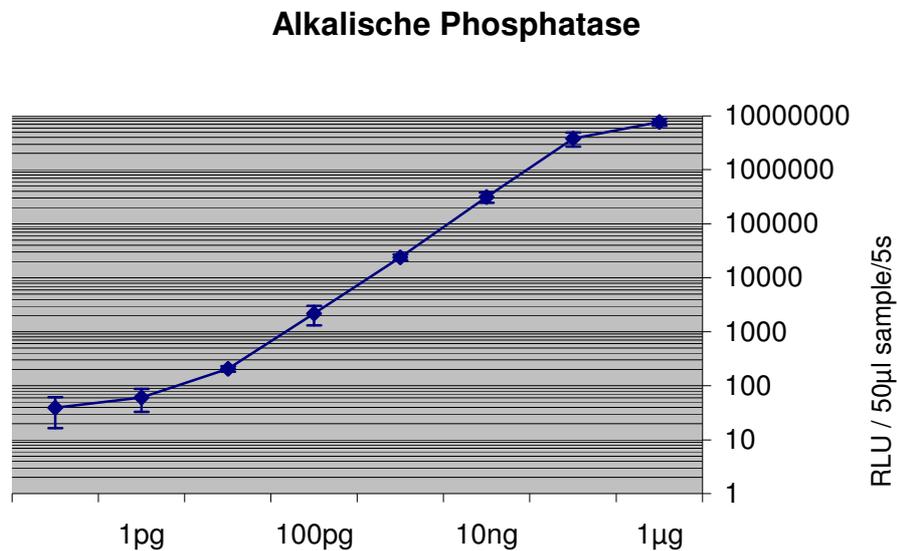


Abb. 10: Eichmesskurve von AP

2.13 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Für die Mikroskopie wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10-20 min mit 1ml NBT/BCIP Lösung (NBT/BCIP Stock Solution; Roche Diagnostics GmbH; Penzberg; Germany) bedeckt und nach Sichtkontrolle unter einem Lichtmikroskop mit 4% Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Bei der Reaktion wird das Substrat BCIP durch die Phosphatase umgesetzt. Das entstandene Produkt geht eine Redoxreaktion mit dem gelblichen NBT ein, wodurch bläulich gefärbte Produkte entstehen (Abb. 11). Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Aufnahmen wurden mittels Digitalkamera und Lichtmikroskop erstellt.

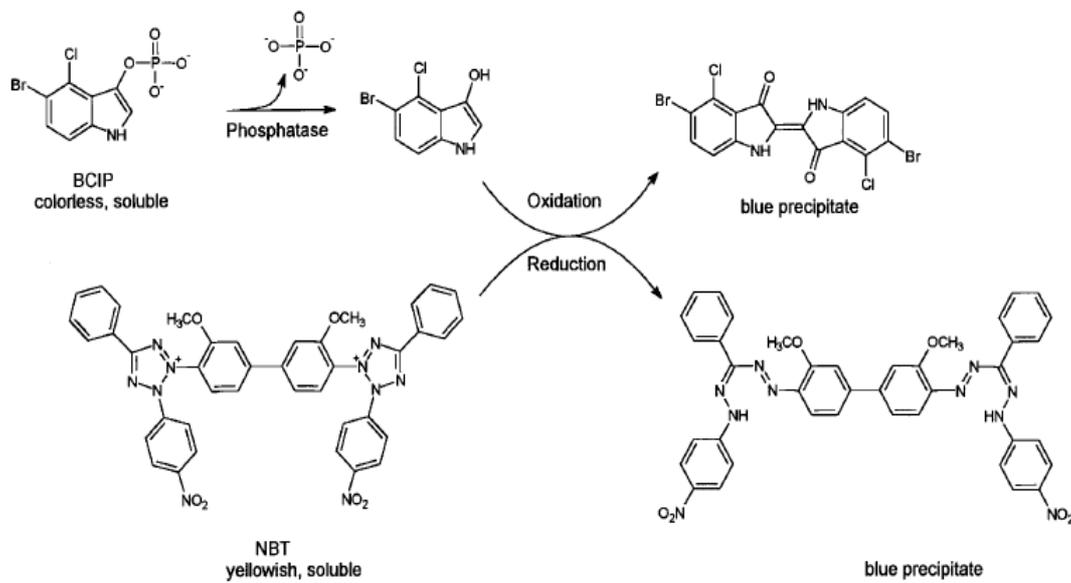


Abb. 11: Testprinzip: aus NBT/BCIP Stock Solution; Instruktion Manual

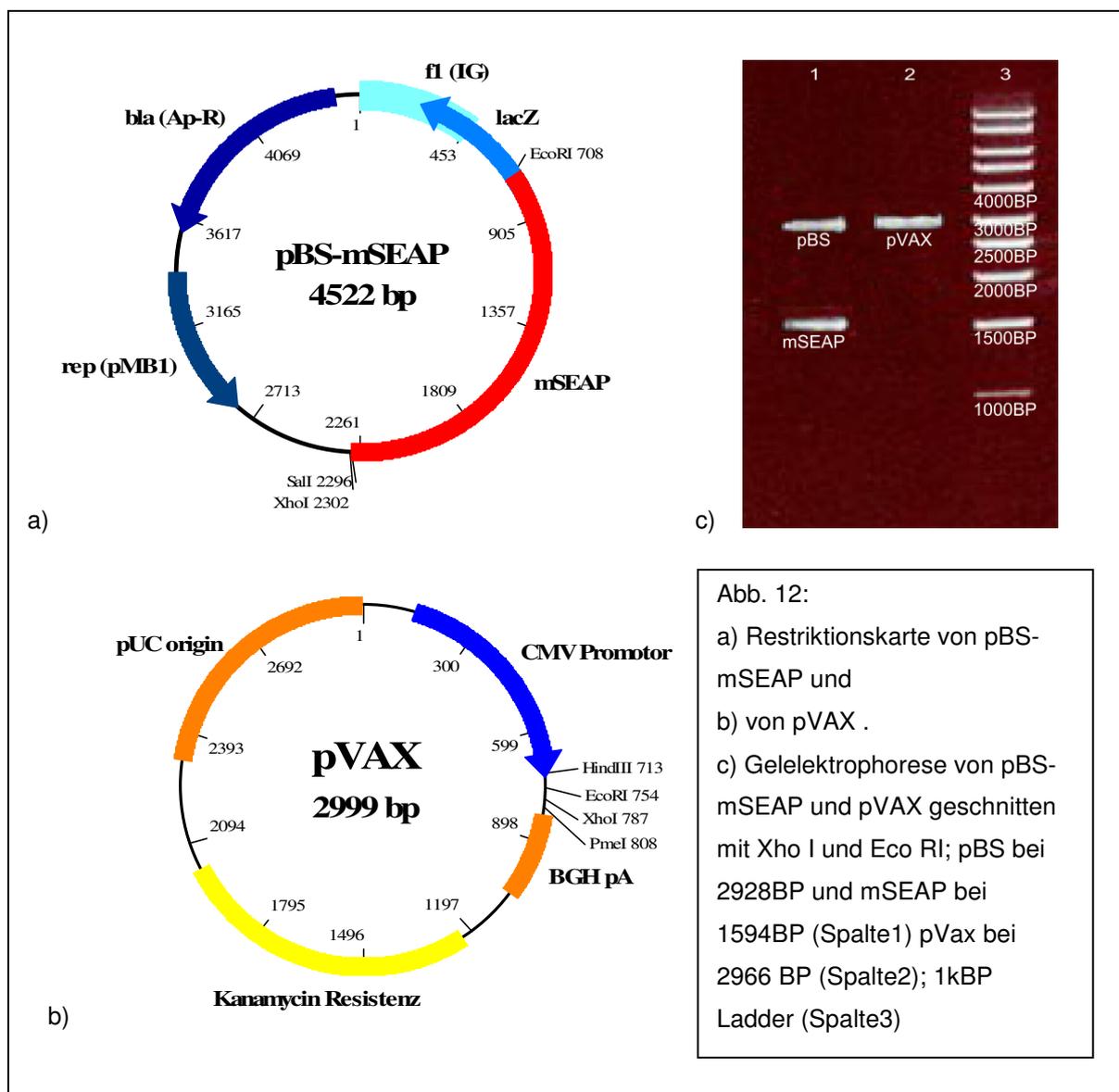
2.14 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte und „standard error of the mean“ (SEM) aus drei Experimenten angegeben. Die Signifikanz wurde mittels Student's T-Test für ungepaarte Gruppen überprüft und wurde als signifikant (*) betrachtet wenn $p < 0,05$ und als sehr signifikant (**) wenn $p < 0,01$. Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel 2002 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Klonieren des Vektors pCpG-depl.-mSEAP

Die Plasmide pBS-mSEAP und pVAX wurden mit den Restriktionsenzymen Xho I und Eco RI geschnitten um gleiche überhängende Endungen („sticky end“) von pVax und mSEAP zu erhalten. Abb. 12 a) und b) zeigen die Restriktionskarten von pBS-mSEAP bzw. pVAX. Abb. 12 c) zeigt Gelelektrophorese der geschnittenen Plasmide auf einem Ethidium-bromid haltigen 1% Agarose-Gel mit Banden von pBS, mSEAP und pVAX.



pVAX und mSEAP wurden wie beschrieben (siehe Materialien und Methoden) aus dem Gel eluiert, miteinander ligiert und das neue Plasmid pVAX-mSEAP in ElektroMAX DH 10B E.coli nach Elektroporation vermehrt. Die erreichte Konzentration nach QIAprep Spin Miniprep betrug 0,32µg/µl.

pVAX-mSEAP und pCpG-depl.-GFP wurden wiederum mit den Restriktionsenzymen Pme I und Hind III geschnitten. Abb. 13a) und b) zeigen die Restriktionskarten von pVAX-mSEAP bzw. pCpG-depl.-GFP, Abb.13 c) zeigt die Gelelektrophorese nach Verdau mit Restriktionsenzymen.

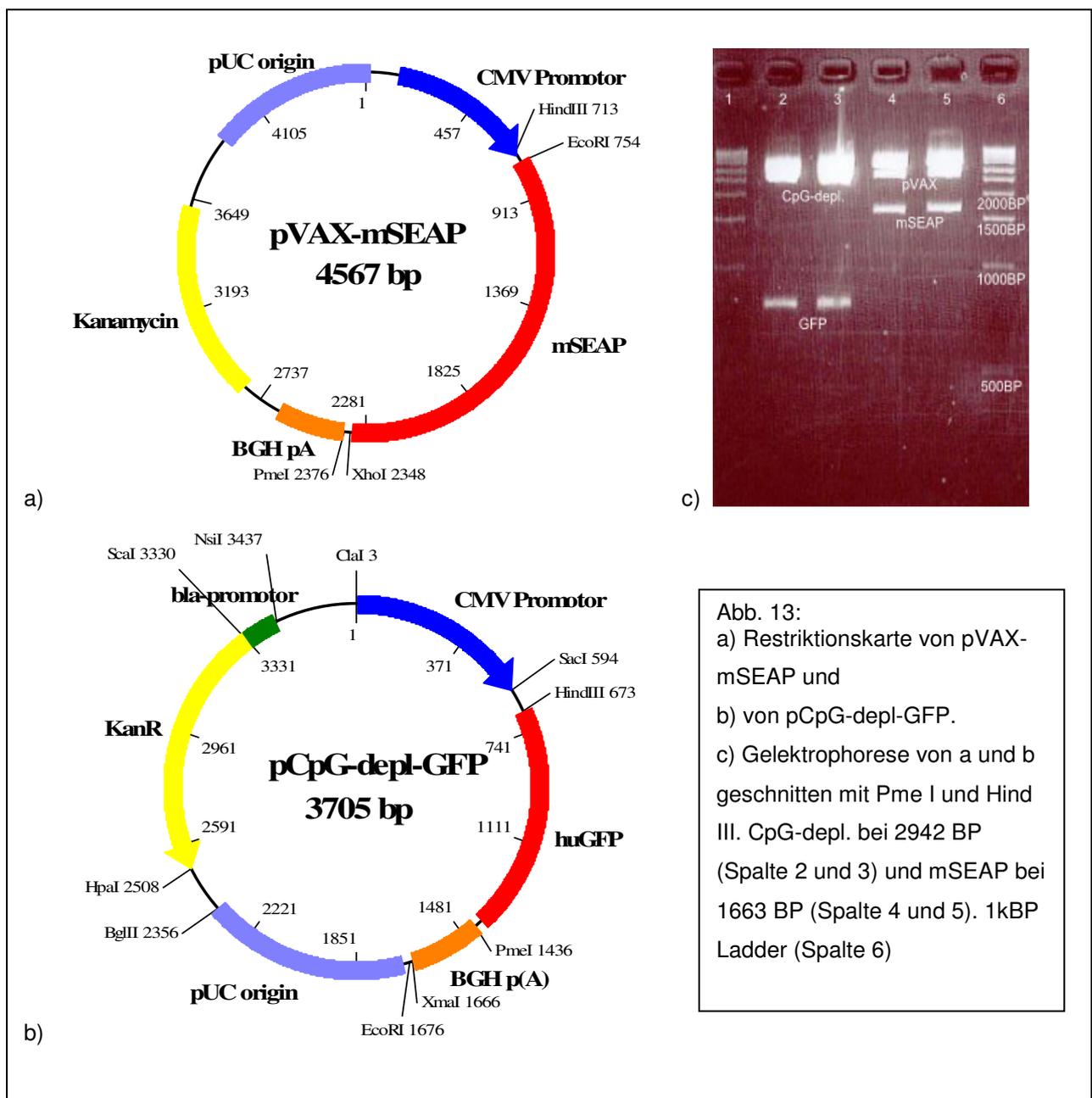


Abb. 13:
 a) Restriktionskarte von pVAX-mSEAP und
 b) von pCpG-depl.-GFP.
 c) Gelelektrophorese von a und b geschnitten mit Pme I und Hind III. CpG-depl. bei 2942 BP (Spalte 2 und 3) und mSEAP bei 1663 BP (Spalte 4 und 5). 1kBP Ladder (Spalte 6)

Entsprechende Banden von pCpG-depl. und mSEAP wurden aus dem Gel gereinigt (siehe Materialien und Methoden). Die mittels Photometrie gemessenen DNA Konzentrationen betragen: pCpG-depl. 0,4µg/µl bzw. 0,3µg/µl und mSEAP 0,5µg/µl bzw. 0,4µg/µl. In einem Verhältnis von 3:1 (pCpG-depl.:mSEAP) wurden diese miteinander ligiert und als Plasmid pCpG-depl.-mSEAP vermehrt. Abb.14 zeigt eine Restriktionskarte von pCpG-depl.-mSEAP.

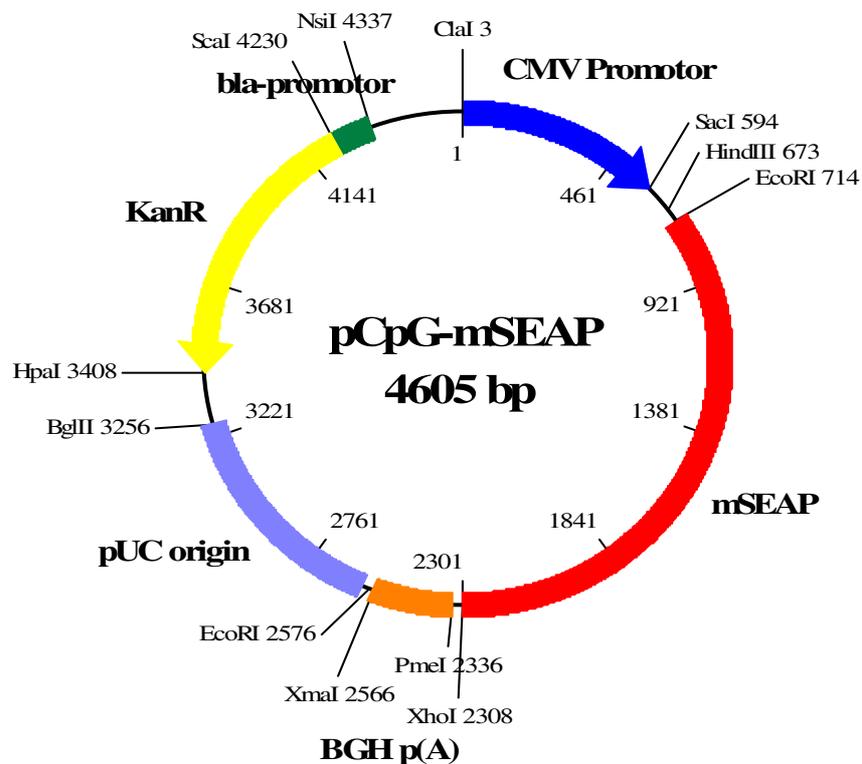


Abb. 14: Restriktionskarte von pCpG-mSEAP (4605 BP)

3.2 Restriktionsanalyse

Anhand von Restriktionsanalysen wurde pCpG-depl.-mSEAP bzw. Fragmente auf die korrekte Größe überprüft. Im ersten Ansatz wurde 0,8 µg pCpG-depl.-mSEAP mit EcoRI und Puffer RI in H₂O über Nacht bei 37 °C inkubiert. EcoRI schneidet pCpG-depl.-mSEAP an Position 714 und 2576, zu erwartende Fragmente liegen bei 1861BP und 2744 BP. XhoI schneidet einmalig an Position 2308 so dass eine Bande bei 4605BP zu erwarten ist. Im dritten Ansatz wurde pCpG-depl.-mSEAP mit XhoI und HpaI (Position 3408) geschnitten. Zu erwartende Banden liegen bei 1100BP und 3506BP. In Abb.13 konnten die zu erwartenden Fragmente gezeigt werden. In Spalte 8 und 9 konnte eine zusätzliche Bande im Bereich von ca. 4600BP festgestellt werden, die auf eine ungenügende Spaltung durch eines der zwei Restriktionsenzyme zurückzuführen ist und der linearen Form von pCpG-mSEAP entspricht.



Abb. 15: Gelelektrophorese von CpG-mSEAP geschnitten mit EcoRI Bande 2 und 3; XhoI Bande 5 und 6; XhoI und HpaI Bande 8 und 9; Bande 1, 4, 7, 10 1kBP Ladder

3.3 Vorversuche

Im Vorfeld der nachfolgenden Versuche wurden Transfektionen mit verschiedenen Konfluenzen der zu transfizierenden Zellen durchgeführt. Hierbei wurde eine Konfluenzdichte von 30% bis 90% getestet. Bei einer Konfluenz von ca. 90% konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Vor allem bei der Transfektion von pDNA, bei der eine Zellteilung für den notwendigen Schritt der Kernlokalisierung notwendig erscheint (siehe oben), konnte keine relevante Konzentration von mSEAP im Medium der Zellen gemessen werden. Bei niedrigeren Konfluenzen konnten erhöhte Transfektionsraten beobachtet werden. Da der Versuchsaufbau als Modell für Lungenepithelgewebe gedacht war, wurde eine Konfluenz von ca. 70% gewählt, was annähernd einem regenerativen Gewebe entspricht. Eine geringere Zelldichte würde einem schnell wachsenden Gewebe wie z.B. Tumorgewebe entsprechen.

Weiterhin wurden erste Versuche ohne Antibiotikazusatz zum Medium durchgeführt, wodurch es bei längeren Versuchsaufbauten wiederholt zu Kontaminationen der Zellkultur kam. Deswegen wurden nachfolgend dargestellte Versuche unter Zusatz von Antibiotika in den angegebenen Mengen durchgeführt, um eine erneute Kontamination zu vermeiden.

3.4 Messung von mSEAP im Medium nach Transfektion von pCpG-depl.-mSEAP mit b-PEI

Bei dem folgenden Versuch wurden A549 Zellen in 6 Well Platten mit je 2 µg DNA in einem N/P Verhältnis von 8 mit b-PEI transfiziert. Bei der photometrischen Quantifizierung der verwendeten DNA zeigte sich ein Quotient von 1,75 (260nm / 280nm), wodurch Verunreinigung der DNA ausgeschlossen werden konnten. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit gleicher Menge unkomplexierten b-PEI inkubiert.

Die Aktivität von mSEAP wurde nach 24h, 48h und 72h in je 50 µl Medium wie beschrieben vermessen. Dabei konnte eine zunehmende Signalintensität im Medium

der transfizierten Zellen im Gegensatz zur Negativ-Kontrolle festgestellt werden (Abb.16), die auf eine Produktion und Sekretion von mSEAP durch A549 schließen lässt. Geringe Aktivität der Negativ-Kontrolle lässt sich auf eine Restaktivität der alkalischen Phosphatase, die in Kulturmedien vorkommt, nach Hitzeinaktivierung und Zugabe spezifischer Inhibitoren, zurückführen (SEAP Reporter Gene Assay Manual).

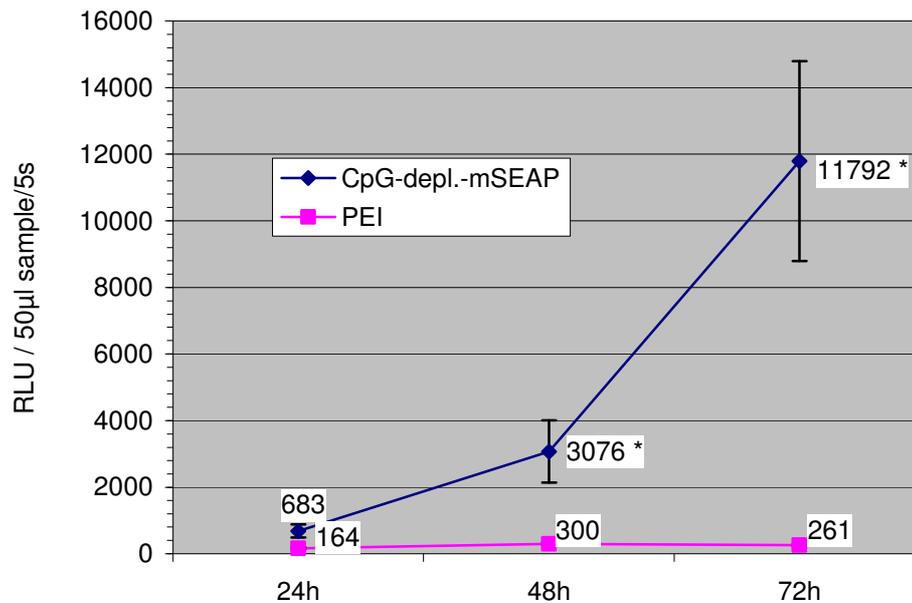


Abb.16: mSEAP-Aktivität nach Transfektion mit b-PEI angegeben in RLU/50µl Medium/5sec gemessen nach 24h, 48h und 72h mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)). Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus drei Experimenten. $p < 0,05$ (*) für CpG-depl.-mSEAP/PEI zu PEI (48h, 72h)

Anhand einer Verdünnungsreihe alkalischer Phosphatase (Abb.17), kann auf Konzentrationen im Medium der transfizierten Zellen geschlossen werden. So ergibt sich nach 24h eine geringe Konzentration im Mittel von ca. 1 pg/µl, nach 48h von ca. 4 pg/µl und nach 72h von ca. 14 pg/µl, woraus eine Akkumulation von SEAP im Medium anzunehmen ist.

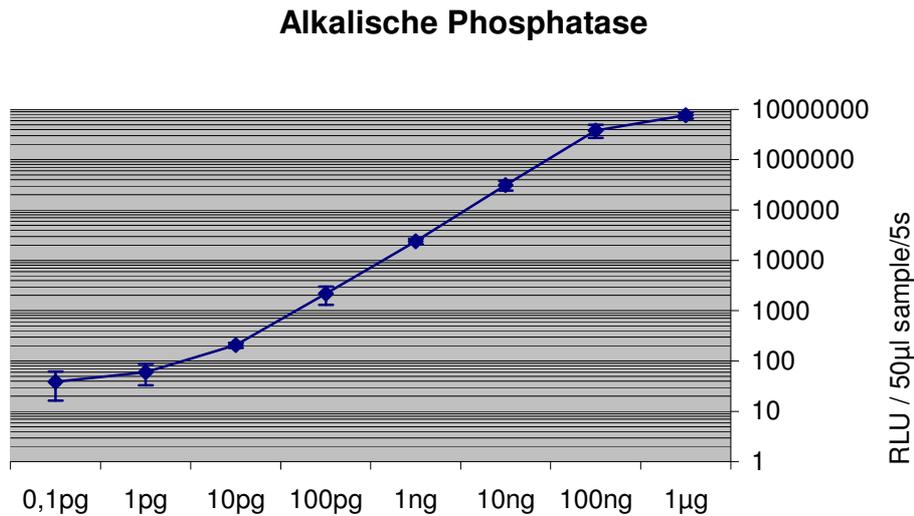


Abb.17: Verdünnungsreihe von alkalischer Phosphatase in je 50µl Wasser, vermessen mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche). Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus drei Experimenten.

3.5 Mikroskopischer Nachweis von mSEAP in A549 nach Transfektion mit b-PEI

Zu A459 Zellen wurde, 24h nach Transfektion mit DNA/b-PEI Komplexen, NBT/BCIP Lösung (NBT/BCIP Stock Solution; Roche Diagnostics GmbH) hinzugegeben und nach ausreichendem Farbumschlag von gelblich nach blau mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Deutlich sind bei 64-facher Vergrößerung blau gefärbte Zellen zu erkennen (Abb.18), die mSEAP exprimieren, im Gegensatz zu Negativkontrolle (Abb.19), bei der keine Reaktion in Zellen beobachtet werden konnte. Es wurden aus drei repräsentativen Ausschnitten Gesamtzellzahl sowie positive Zellen ausgezählt. Nach Transfektion von pDNA mit b-PEI exprimieren im Mittel 13,3% aller Zellen mSEAP.

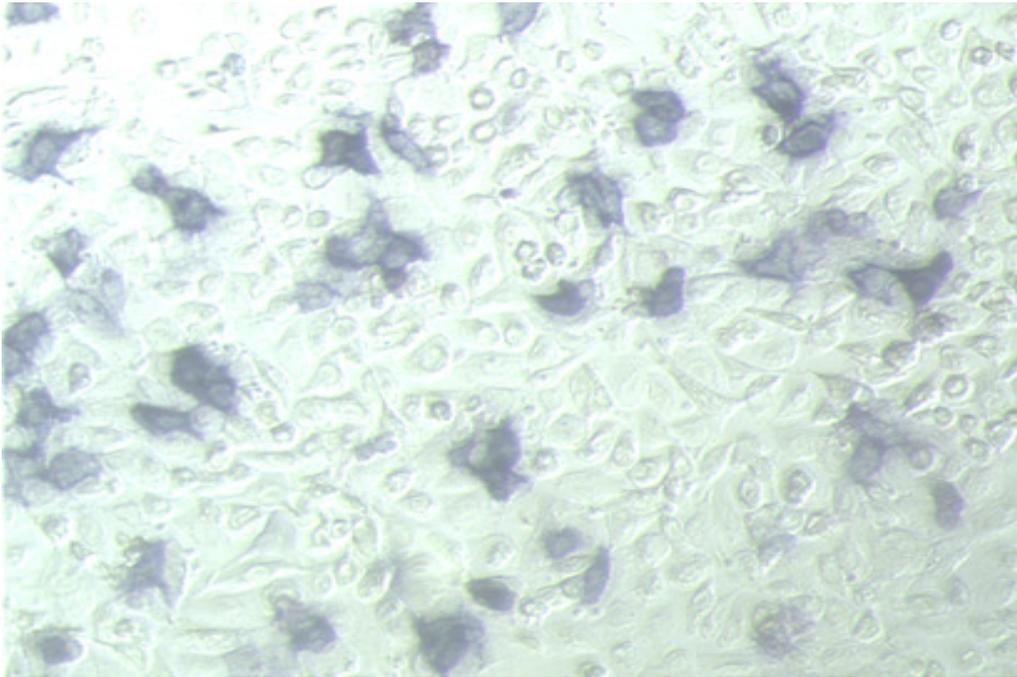


Abb.18: A549 24h nach Transfektion mit DNA/b-PEI Komplexen, nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung.



Abb.19: A549 24h nach Transfektion mit b-PEI, nach 24h nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung

3.6 Messung von mSEAP im Medium und im Zelllysat

Es stellte sich weiterhin die Frage, wie sich die Verteilung von mSEAP auf die verschiedenen Kompartimente im Medium oder im Zytoplasma der Zellen verhält. Hierfür wurden Transfektionen von 1,5 µg DNA mit b-PEI durchgeführt. Nach 24h, 48h und 72h wurde mSEAP in 50 µl von 1000 µl gesamt Medium gemessen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Zellschaber vorsichtig von dem Untergrund gelöst, in 1000 µl PBS aufgenommen und in ein 2ml Eppendorf Röhrchen überführt. Das Well wurde erneut mit 1000 µl PBS gewaschen und ebenfalls in das Röhrchen überführt. Die Zellen wurden in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zellen wurden mit 1000 µl Triton X für 30 min inkubiert, erneut zentrifugiert um Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und davon je 50µl vermessen.

Anhand einer Verdünnungsreihe von AP in Wasser und in Lysepuffer Triton X konnte gezeigt werden, dass Triton X keinen Einfluss auf die Messung alkalischer Phosphatase mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche) besitzt (Abb. 20).

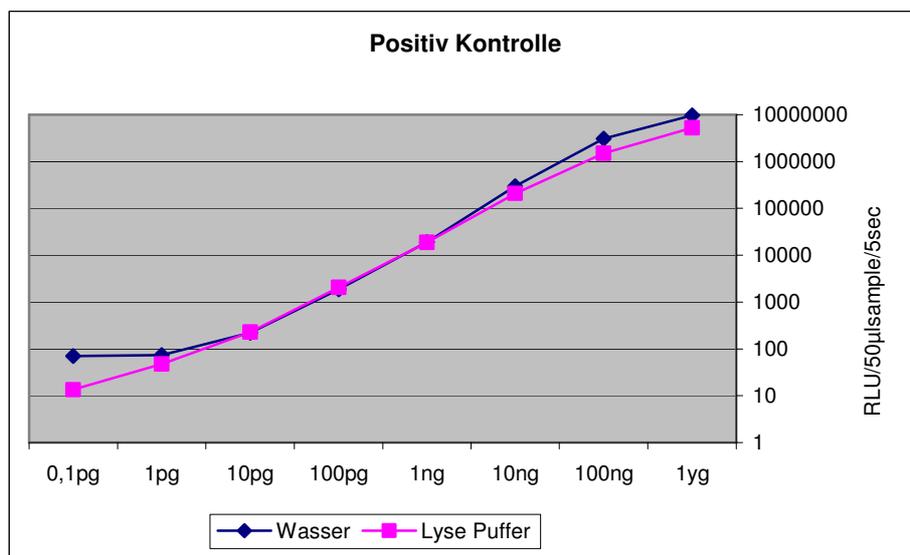


Abb. 20: Positiv Kontrolle AP verdünnt in je 50µl Aquadest bzw. Lysepuffer Triton X, gemessen mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)

Messungen von mSEAP in 50 μ l Medium ergaben nach 24h 48h und 72h tendenziell höhere Konzentrationen als im Zelllysat. In Abb. 21 sind drei ausgewählte Messungen von Medium und Lysat dargestellt. Es zeigten sich allerdings auch vereinzelt größere und annähernd gleiche Konzentrationen im Zelllysat als im Medium (Daten nicht gezeigt).

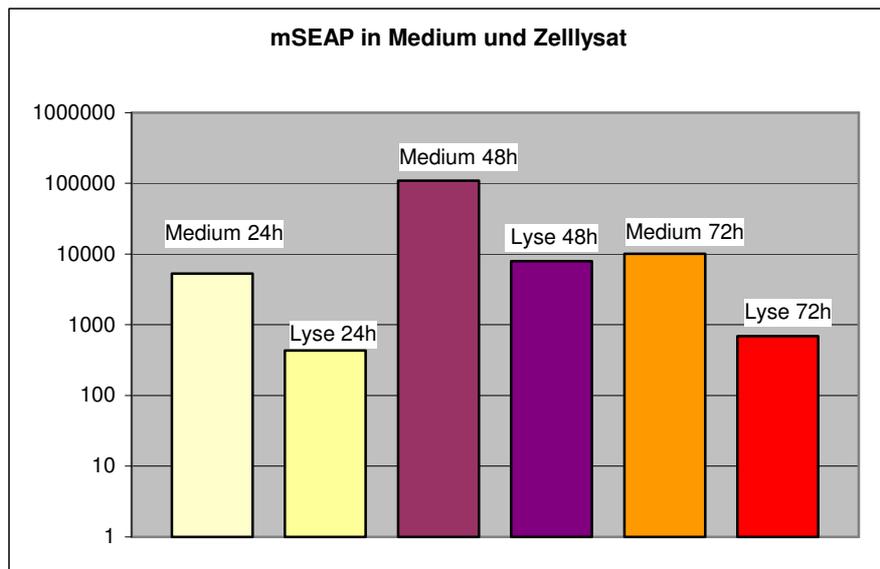


Abb. 21: Messung von mSEAP in Medium und Zelllysat nach 24h, 48h und 72h nach Transfektion mit 1,5 μ DNA mit b-PEI im Verhältnis N/P = 8. Dargestellt sind Messungen von je einem Well gemessen mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche).

Dies legt den Schluss nahe, dass eine aktive Sekretion von mSEAP in das Medium stattfindet und nicht Konzentrationen von mSEAP in Medium durch absterbende Zellen, die intrazelluläres mSEAP freisetzen, zu begründen ist. Andernfalls müssten wesentlich höhere Konzentrationen im Lysat als im Medium gemessen werden. Weiterhin konnte keine erhöhte Zellnekroserate in der Zellkultur beobachtet werden.

Abweichende Messungen könnten durch unterschiedliche Bedingungen der Zellen, wie z.B. Sequenz Reihe der Zellen, Zelldichte usw., und dadurch unterschiedliches Sekretionsverhalten begründet sein.

3.7 Transgenexpression in Abhängigkeit steigender Plasmid-DNA Konzentration

Im folgenden Versuch wurde die Menge an pDNA variiert. Auf 6 Well Platten wurden ca. 500.000 Zellen ausgesät, und nach 24h mit 1 µg, 1,5 µg, bzw. 2 µg pDNA mit ebenso steigender bPEI-Konzentration von 1,1 µg, 1,6 µg und 2,1 µg, bei konstanten N/P Verhältnis von 8, transfiziert. Abb. 22 zeigt die Aktivität von mSEAP in 50µl Medium gemessen nach 24h.

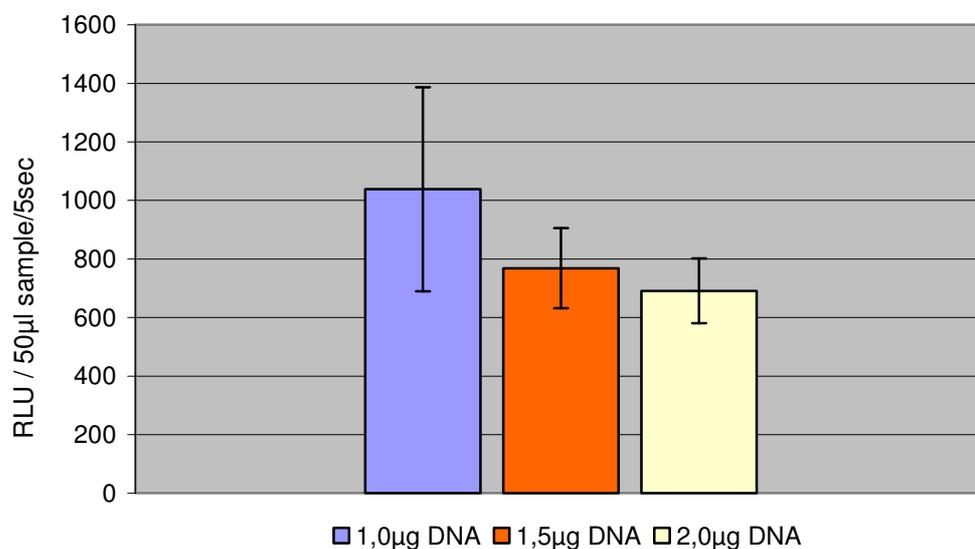


Abb.22: mSEAP-Aktivität angegeben in RLU/50µl Medium/5sec gemessen nach 24h mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)). Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus drei Experimenten.

$p > 0,05$ für 1,0µg DNA bzw. 1,5µg DNA zu 2,0µg DNA

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Verwendung von 1,0 µg, 1,5 µg bzw. 2,0 µg DNA. Da sich trotz größerer pDNA Menge keine Steigerung der Transgenexpression erreichen ließ, wurden im Folgenden geringere pDNA -Mengen und folglich geringere b-PEI Konzentrationen gewählt, um die Zytotoxizität des Vektors zu verringern.

Huth et al (unpublished data) konnten zeigen, dass mit einer Menge mRNA von 250 ng-500 ng gute Transfektionsergebnisse erreicht werden können. Deswegen wurde für folgende Versuche die Menge von mRNA auf 400 ng und entsprechend die

pDNA Menge von ca. 1,2 µg festgelegt, um eine gleiche Anzahl an kodierenden Kopien bei einem BP Verhältnis von 2,92 zu gewährleisten. (siehe oben).

3.8 Vergleich der Transfektionseffizienz von b-PEI und der Magnetofektion

Da in den Vorversuchen keine Steigerung der Transgenexpression nach erhöhter pDNA Konzentrationen zu erreichen war, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich durch die Methode der Magnetofektion eine Steigerung der Transgenexpression erreichen lässt.

In einer Reihe an Experimenten wurde gezeigt, dass die Magnetofektion eine höhere Transfektions-Effizienz als herkömmliche nicht-virale Vektoren besitzt. Dies ist auf eine schnellere Sedimentation des applizierten Komplexes auf die Zelloberfläche zurückzuführen. Die zelluläre Aufnahme der Komplexe bei der Magnetofektion scheint ebenso wie bei der Transfektion mit PEI über Endozytose von Komplexen zu erfolgen (Huth et al. 2004).

Die Konfluenz der Zellen betrug am Tag der Transfektion bzw. Magnetofektion ca. 70%. In Abb. 23 sind die Ergebnisse der Magnetofektion anhand der Aktivität von mSEAP in 50µl Medium im Vergleich mit b-PEI vermittelten Gentransfers dargestellt. Auch in diesen Experimenten konnte mit der Magnetofektion eine signifikant höhere Transfektionsrate erzielt werden.

Anhand der gemessene Verdünnungsreihe der AP (Daten nicht gezeigt) konnte bei diesem Experiment auf eine Konzentration von mSEAP im Medium von ca. 1 pg/µl mSEAP nach Transfektion der DNA mit b-PEI und ca. 8 pg/µl mSEAP nach Magnetofektion geschlossen werden.

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse der mSEAP-Aktivität im zeitlichen Verlauf. Es konnte ebenfalls eine größere Transfektionseffizienz der Magnetofektion gezeigt werden, wobei die absolute Menge an mSEAP im Vergleich zum vorausgegangenen Experiment geringer ausgefallen ist. Diese Magnetofektion wurde mit Polymag

durchgeführt. Dies könnte die insgesamt geringer ausfallende Transgenexpression im Vergleich zum vorausgegangenem Experiment erklären.

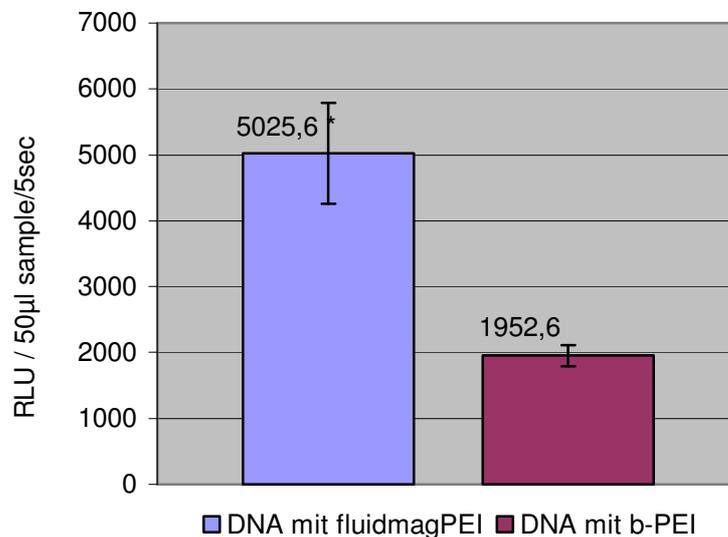


Abb. 23: mSEAP-Aktivität nach Transfektion bzw. Magnetofektion angegeben in RLU/50µl Medium/5sec gemessen nach 24h mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)). Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus drei Experimenten.
 $p < 0,05$ (*) für DNA mit fluidmagPEI zu DNA mit b-PEI

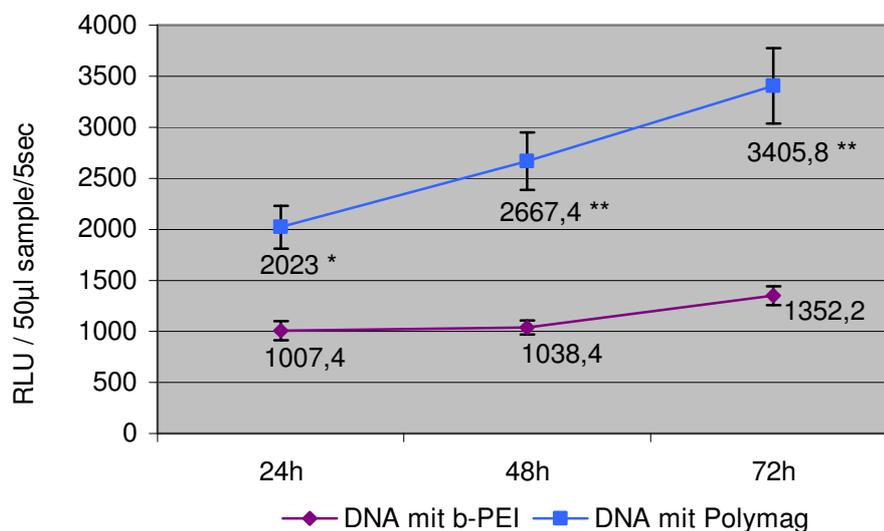


Abb. 24: mSEAP-Aktivität nach Transfektion bzw. Magnetofektion angegeben in RLU/50µl Medium/5sec 24h, 48h und 72h gemessen mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)) Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus vier Experimenten.

$p < 0,05$ (*) 24h $p < 0,01$ (**) 48h und 72h für DNA/Polymag zu DNA/b-PEI

3.9 Erhöhte Proteinexpression nach Transfektion von mRNA

Aufgrund von theoretischen Überlegungen sollte in folgenden Experimenten geklärt werden, ob durch den Einsatz von mRNA eine Steigerung der Transgenexpression im Vergleich zu pDNA als verwendeter Nukleinsäure möglich ist. Bei der Verwendung von mRNA war eine erhöhte Expression von mSEAP zu erwarten, da Schritte wie Kernlokalisierung der pDNA sowie Transkription entfallen. Aufgrund von ubiquitär vorkommenden RNAsen unterliegt mRNA jedoch auch einem stärkeren Abbau als DNA. Die verwendete mRNA wurde von der Firma CureVac GmbH (Tübingen) aus der klonierten DNA hergestellt und nach beschriebenen Methoden stabilisiert.

Die Gentransferstudien wurden mit kationischen Lipiden (DMRIE-C) und kationischen Polymeren (b-PEI, Polymag) auf 24 Well Platten durchgeführt. Am Vortag der Transfektion wurden ca. 100.000 Zellen ausgesät und über Nacht in Kultur gehalten. Am Tag der Transfektion bestand eine Konfluenz von durchschnittlich 70%.

Es zeigte sich unabhängig vom Vektor eine größere Transfektionseffizienz von Komplexen mit mRNA im Gegensatz zu pDNA (Abb.26-28). Anhand einer Verdünnungsreihe von AP von 1 µg-10 pg in 50 µl Aquadest. (Abb.25) konnte auf Konzentrationen von mSEAP im Medium von 10 pg, 15 pg und 50 pg in je 50 µl Medium nach 24h, 48h und 72h nach Transfektion von mRNA/b-PEI Komplexen geschlossen werden. Für die Magnetofektion von mRNA ergeben sich Mengen von ca. 150 pg, 250 pg und 400 pg in je 50 µl Medium nach 24h, 48h und 72h. Größte Transfektionseffizienz zeigten mRNA/DMRIE-C Komplexe mit Konzentrationen von 1 ng/50 µl nach 24h, ca. 5 ng/50 µl nach 48h und ca. 7,5 ng/50 µl nach 72h. Für die Plasmid-DNA Transfektion mit DMRIE-C ergaben sich Konzentrationen für mSEAP von 400 pg/50 µl nach 24h, 700 pg/50 µl nach 48h und 800 pg/50 µl nach 72h.

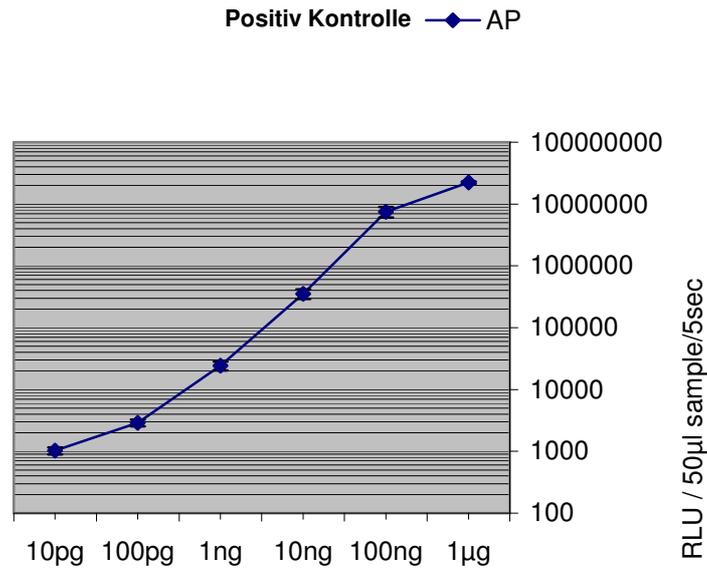


Abb. 25: Verdünnungsreihe von alkalischer Phosphatase in je 50µl Wasser, vermessen mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche). Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus drei Experimenten.

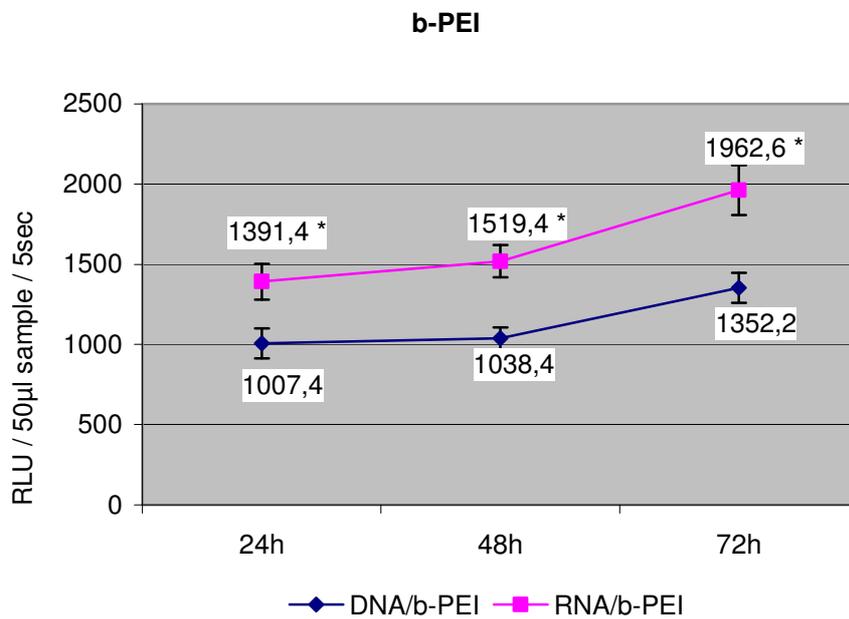


Abb. 26: mSEAP-Aktivität nach Transfektion von pDNA bzw. mRNA mit b-PEI angegeben in RLU/50µl Medium/5sec 24h, 48h und 72h gemessen mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)) Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus vier Experimenten.
 $p < 0,05$ (*) 24h, 48h und 72h für mRNA/b-PEI zu DNA/b-PEI

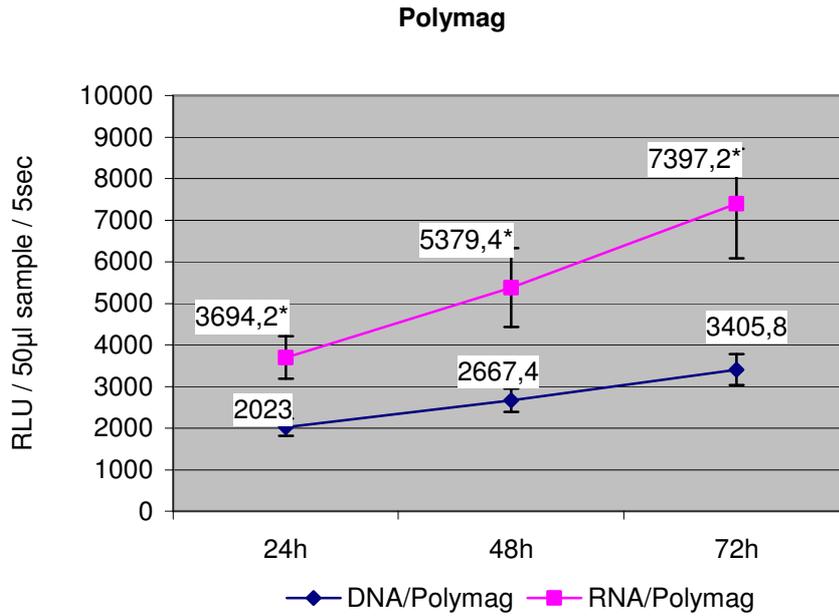


Abb. 27: mSEAP-Aktivität nach Transfektion von pDNA bzw. mRNA mit Polymag angegeben in RLU/50µl Medium/5sec 24h, 48h und 72h gemessen mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)) Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus vier Experimenten.

$p < 0,05$ (*) 24h, 48h und 72h für mRNA/Polymag zu pDNA/Polymag

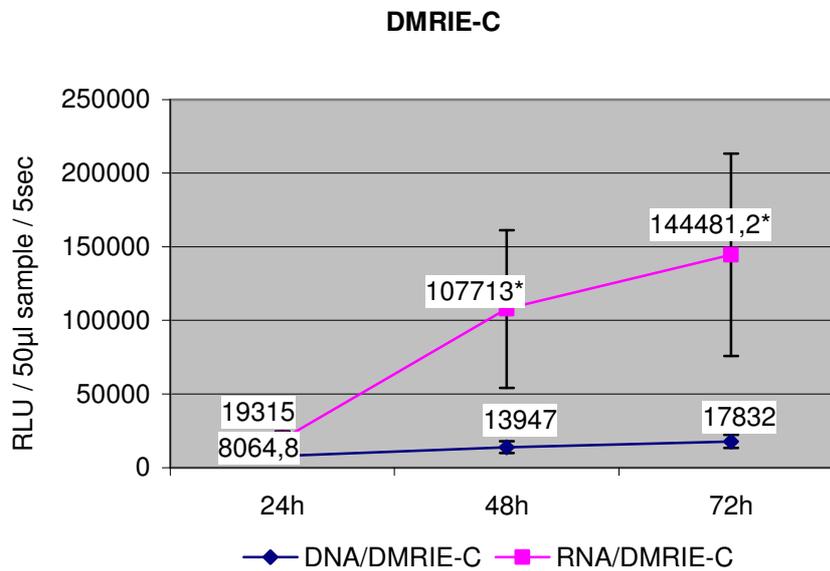


Abb. 28: mSEAP-Aktivität nach Transfektion von pDNA bzw. mRNA mit DMRIE-C angegeben in RLU/50µl Medium/5sec 24h, 48h und 72h gemessen mit einem Chemiluminescent Assay (SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)) Angegeben sind Mittelwerte sowie SEM aus vier Experimenten.

$p < 0,05$ (*) 48h und 72h für mRNA/DMRIE-C zu pDNA/DMRIE-C

Abb. 26-28: Es zeigte sich jeweils eine höhere Expression von mSEAP im Medium bei der Verwendung von mRNA im Gegensatz zu DNA. Es zeigten sich die größte Transfektionseffizienz bei der Verwendung von RNA-DMRIE-C Komplexen mit Konzentrationen von mSEAP im Medium von 1ng/50µl nach 24h, ca. 5ng/50µl nach 48h und ca. 7,5ng/50µl. Werte ermittelt anhand Verdünnungsreihe von AP von 1µg-10pg in 50µl Aquadest. (Abb25) gemessen mit SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche) in Wallac Victor/1420 multilabel counter (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany).

3.10 Mikroskopischer Vergleich nach Transfektion von pDNA und mRNA

Mikroskopische Bilder wurden von A549 Zellen 24h nach Transfektion von DNA/b-PEI Komplexen, Magnetofektion von DNA/Polymag Komplexen, DNA/DMRIE-C Komplexen sowie mRNA/DMRIE-C Komplexen in 64facher Vergrößerung erstellt (Abb. 30-33). Aus je drei repräsentativen Ausschnitten wurde mittels Raster Gesamtzellzahl sowie mSEAP-positive Zellen ausgezählt. Es ergaben sich Mittelwerte von 13% mSEAP-positive Zellen nach Transfektion von DNA/b-PEI Komplexen, 15% bei der Verwendung von DNA/DMRIE-C und 24% nach Magnetofektion von DNA. Es zeigte sich eine 3fache Steigerung der Transfektionseffizienz bei DMRIE-C bei der Verwendung von RNA statt DNA von 15% auf 45% positiver Zellen. (Abb.29)

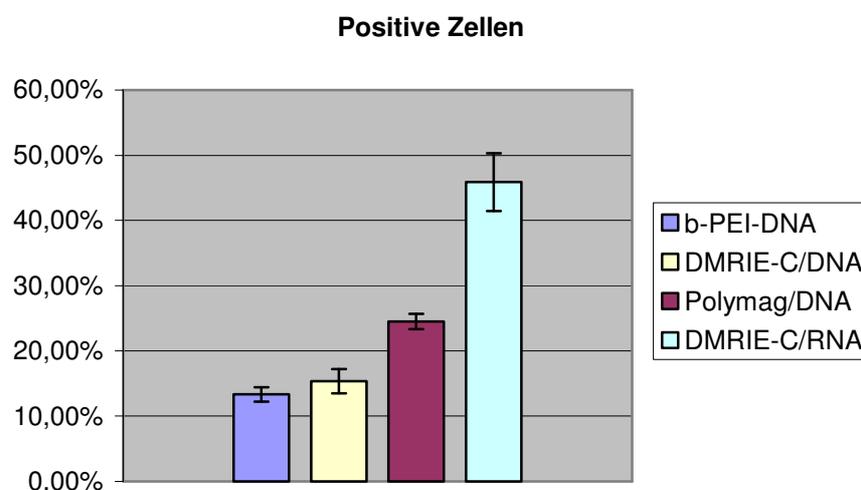


Abb. 29: Prozent positiver Zellen von der Gesamtzellzahl 24h nach Transfektion bzw. Magnetofektion. Angegeben sind Mittelwerte aus drei repräsentativen Abschnitten sowie SEM.

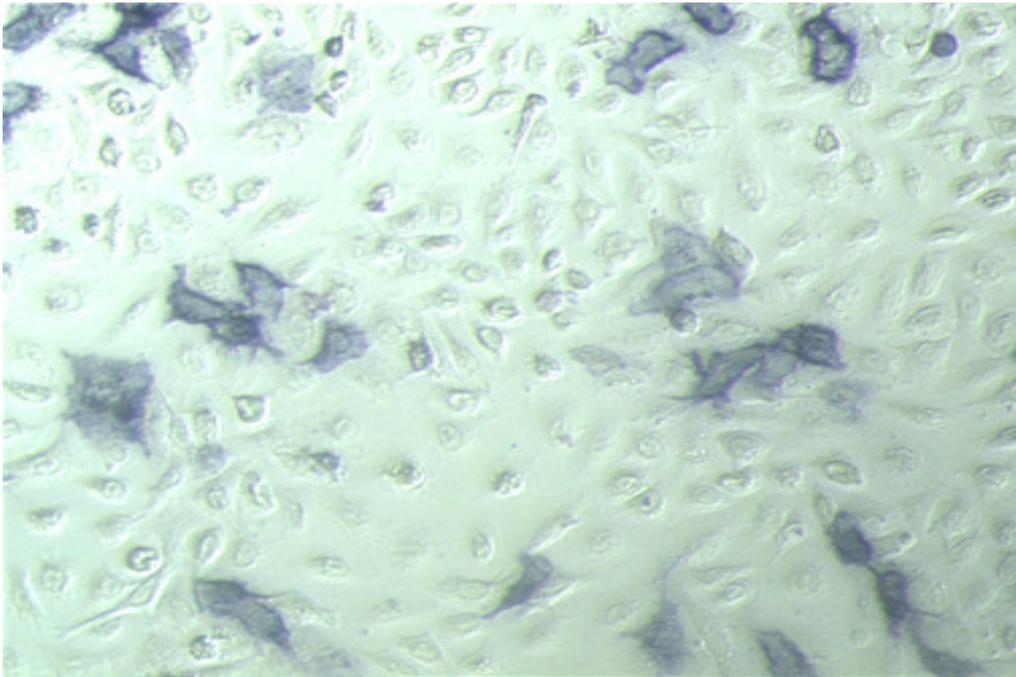


Abb. 30: A549 24h nach Transfektion mit DNA/b-PEI Komplexen, nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung.

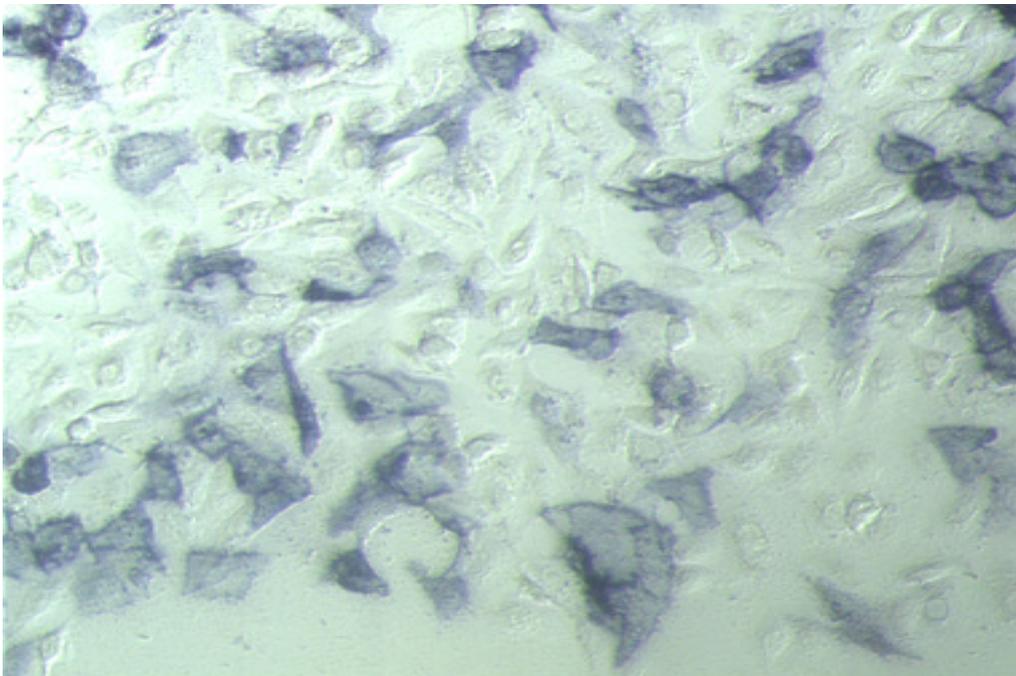


Abb. 31: A549 24h nach Magnetofektion von DNA/Polymag Komplexen, nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung.

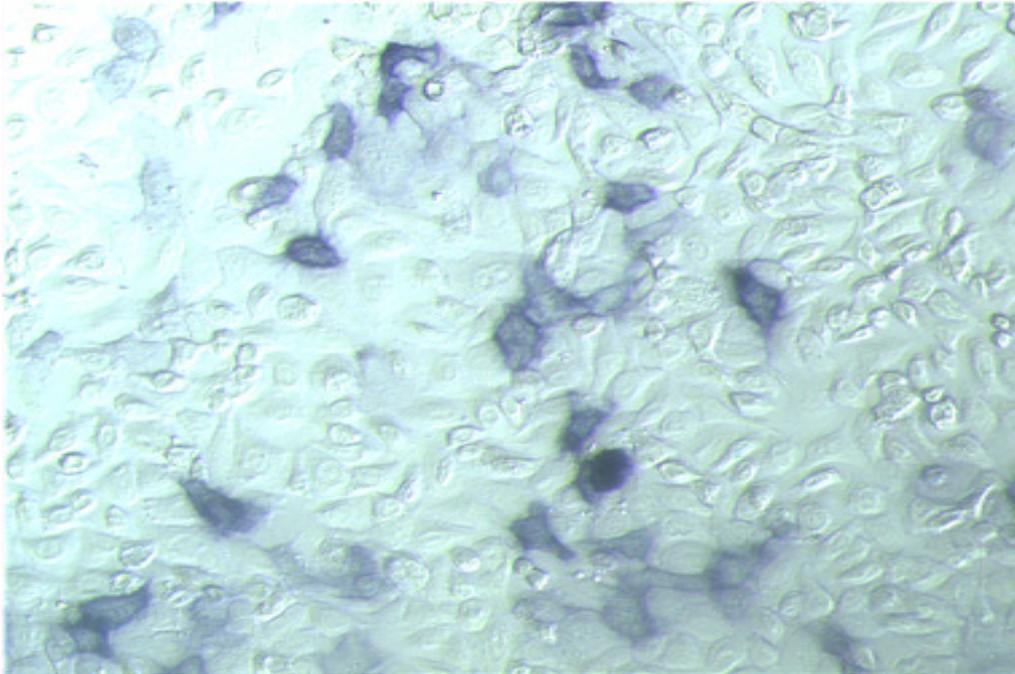


Abb. 32: A549 24h nach Transfektion mit DNA/DMRIE-C Komplexen, nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung.

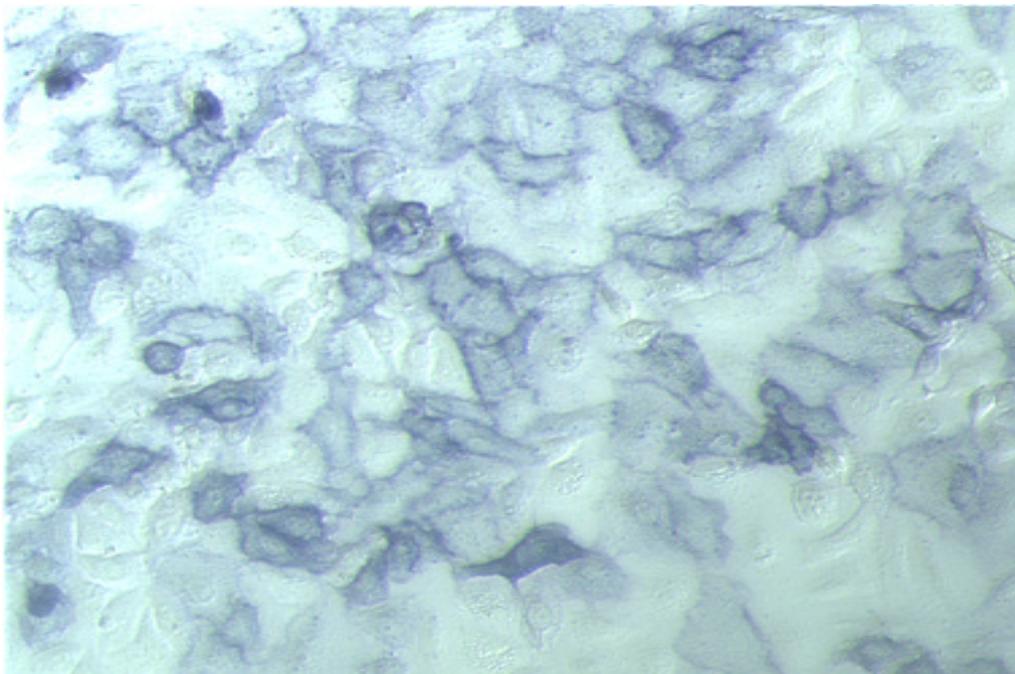


Abb. 33: A549 24h nach Transfektion mit RNA/DMRIE-C Komplexen, nach Inkubation mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) und fixiert mit 4% Paraformaldehyd, in 64facher Vergrößerung.

Als Negativ Kontrolle wurden Transfektion bzw. Magnetofektion ohne DNA bzw. RNA durchgeführt und nach 24h mit NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH) behandelt und fixiert mit 4%Paraformaldehyd. Es zeigten sich keine positiven Zellen (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Bei dem Transfer von Nukleinsäuren in eukariontische Zellen mittels nicht-viralen Genvektoren bestehen einige Barrieren, die die Effizienz des Gentransfers mindern können. Zu diesen Barrieren gehören z.B. für die mRNA und die pDNA der „endosomale/lysosomale escape“ (siehe Einleitung) und für die pDNA der Eintritt in den Zellkern. Letzteres zeigt sich als ein limitierender Faktor des nicht-viralen Gentransfers, da pDNA hauptsächlich während der Mitose-Phase, wenn die Membran des Zellkerns ihre strukturelle Integrität verliert, in diesen gelangt (Brunner et al. 2000). Dieser Aspekt spielt vor allem bei der *in vivo* Applikation von Polyplexen bzw. Lipoplexen eine bedeutende Rolle, da - im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen - die Zielzellen sich vor allem in stationären Phasen des Zellzyklus befinden.

Bei der Verwendung von mRNA ist dieser Schritt nicht notwendig, da die Translation der mRNA an den Ribosomen im Zytoplasma der Zelle stattfindet (siehe Abb. 6 Seite 19), und somit eine Kernlokalisierung nicht notwendig ist. Weiterhin besteht bei der Verwendung von mRNA kein Risiko der insertionellen Mutagenese da mRNA nicht in das Genom eingebaut werden kann, was zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen führen könnte, wie es z.B. der Fall in klinischen Studien zur viralen Gentherapie von X-SCID war. (siehe Abschnitt: virale Genvektoren und klinische Studien Seite 5-8) (Kormann, Rosenecker 2007).

Die Verwendung von mRNA für den Gentransfer ist bislang wenig untersucht, da die Meinung vorherrschte, dass mRNA instabil sei. Ein weiterer Punkt der gegen mRNA als genetisches Material für den Transfer von mRNA sprach war der Kostenfaktor. Mittlerweile stehen jedoch kostengünstigere *in vitro* Transkriptionsverfahren bei der Herstellung von mRNA zur Verfügung. Des Weiteren konnte durch Modifikationen die mRNA stabiler und die Translation effektiver gestaltet werden. (siehe auch Methoden; RActive) (Kormann, Rosenecker 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden ob „Lungenepithelzellen“ nach nicht-viralem Gentransfer fremde Proteine aus dem transfizierten genetischen Material exprimieren und sezernieren können. Hierfür wurden als Target A549, eine von einem humanen Alveolarzellkarzinom gewonnene Epithelzelllinie, und als Modell

für ein sekretorisches Protein die murine sekretorische alkalische Phosphatase (mSEAP) ausgewählt. Hintergrund der Überlegungen war es, ob zukünftig Erkrankungen, denen eine verminderte Konzentration von Serumproteinen zugrunde liegt, z.B. Hämophilie A/B, mittels pulmonaler Applikation genetischen Materials therapeutisch beeinflusst werden können.

Mittels Transfektion mit Polyplexen bestehend aus branched-PEI und pCpG-mSEAP konnte eine Akkumulation von mSEAP im Medium der behandelten A549 Zellen gezeigt werden, wobei Konzentrationen bis zu 14pg/ μ l erreicht wurden (Abb.16). Es ist folglich aus diesen Ergebnissen anzunehmen, dass A549 als Modell für Lungenepithelzellen in der Lage ist, aus fremdem genetischem Material intakte Proteine zu translatieren und diese zu sezernieren.

Weiterhin wurden steigende Konzentrationen an pCpG-mSEAP mit b-PEI transfiziert, mit dem Gedanken, eine Steigerung der Proteinkonzentration im Medium zu erreichen. Das N/P Verhältnis wurde dabei konstant gehalten. Demzufolge wurden bei steigenden pDNA Mengen auch größere Mengen an b-PEI benötigt. Anzunehmen wäre, dass ein gesteigertes Angebot an pDNA auch zu einer gesteigerten Transkription und Translation von mSEAP führen könnte. In den vorliegenden Versuchen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der mSEAP Konzentration im Medium nach Transfektion von 1,0 μ g, 1,5 μ g bzw. 2,0 μ g pDNA mit b-PEI gezeigt werden. Dies könnte an der steigenden Toxizität von b-PEI, welche die Zellfunktionen der transfizierten Zellen beeinträchtigt, liegen. Moein Moghimi zeigte, dass steigende Konzentrationen von b-PEI 25kd mit einer erhöhten LDH Aktivität im Medium einhergehen. Weiterhin wurde eine erhöhte Konzentration von Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran, als Zeichen von Apoptose bzw. Nekrose von Zellen, sowie eine erhöhte Aktivität von Caspase 3, als ein Enzym der Apoptose, festgestellt (Moghimi et al. 2005).

Bei den vorliegenden Versuchen kann nicht zwischen apikaler und basaler Sekretion differenziert werden. Es besteht theoretisch die Möglichkeit einer rein apikalen Sekretion. Toropainen et al. zeigten in einem Modell für das menschliche Cornea-Epithel, dass eine Sekretion sowohl an der apikalen wie auch an der basalen Zellseite nach Transfektion pCMV-SEAP2 mit Polyplexen/Lipoplexten stattfindet.

Dabei wurde zwischen Konzentrationen in Medien unterschieden, die einerseits an der apikalen andererseits an der basalen Seite der Zellschicht gemessen wurden. Eine Diffusion des Proteins SEAP von der apikalen zur basalen Seite konnte nach Applikation des Proteins auf die apikale Seite und anschließender Vermessung in beiden Medien ausgeschlossen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei *in vivo* Versuchen beobachtet werden (Toropainen et al. 2007). Eine Entwicklung eines vergleichbaren Modells mit Zellen von Lungenepithel könnte Aufschluss darüber bringen, in welchem Verhältnis mSEAP auf der apikalen Seite, also in den Alveolarraum, und der basalen Seite, was der Sekretion in die Lungenstrombahn entsprechen würde, sezerniert wird. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Weitere Überlegungen zielten auf eine Steigerung der Transfektionseffizienz ab. Durch die Methode der Magnetofektion (siehe Einleitung) lässt sich erstens die Transfektionsdauer deutlich verkürzen und zweitens eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreichen, wodurch geringere Mengen an DNA und Vektor notwendig werden, um vergleichbare Konzentrationen des therapeutischen Proteins zu erreichen. Weiterhin könnte durch ein gezieltes Anlegen des Magnetfeldes, das gewünschte Zielgewebe angesteuert werden (Dobson 2006).

Im Vergleich zwischen Magnetofektion und Transfektion konnte eine Steigerung der Transfektionsrate bei verkürzter Inkubationsdauer (von 4h auf 15min) deutlich gezeigt werden. Nach 24h wurde mit der Methode der Magnetofektion eine 8-fache Steigerung von 8 pg/μl, im Gegensatz zu 1 pg/μl nach Transfektion, erreicht (siehe Ergebnisse Abb. 23). Auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proteinsekretion in das Medium (siehe Ergebnisse Abb. 24). *In vitro* Ergebnisse sprechen demzufolge für eine Anwendung der Magnetofektion, um eine gesteigerte Konzentration des gewünschten Proteins zu erhalten.

Die Methode der Magnetofektion von *in vitro* auf *in vivo* zu übertragen, zeigt sich allerdings als relativ ineffizient. Bis jetzt konnte zwar ein gesteigerter Gentransfer in gastrointestinalen Epithelien von Mäusen nachgewiesen werden (Scherer et al. 2002) sowie eine Anreicherung von antisense ODN in Blutgefäßen des M. Cremaster nach Injektion in die Femoralarterie (Krötz et al. 2003). Auch eine zielgerichtete

Anreicherung mittels Magnetfeld nach Aerosolapplikation von supermagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln (SPION) in einem definierten Lungengebiet sowie eine Anreicherung von pDNA komplexiert mit SPION-PEI im angesteuerten Lungengewebe konnte gezeigt werden. Allerdings zeigte sich eine signifikant geringere pDNA Anreicherung ebenso wie eine geringere Genexpression des Reporterproteins Luciferase im Vergleich zu Aerosolapplikation von pDNA-PEI Komplexen (Dames 2007a) (Dames et al. 2007b). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Xenariou et al. nach intranasaler Installation im Mausmodell beobachtet (Xenariou et al. 2006). Als Ursachen für den verminderten Gentransfer wurden Partikelgrößen und Verhältnis von SPION zu pDNA, und daraus resultierende Komplexeigenschaften diskutiert, sowie eine Hemmung der Endozytose über Heparan-Sulfat Proteoglykane der Zelloberfläche durch positiv geladene SPION Teilchen (Dames 2007a) (siehe Abschnitt: Intrazelluläre Wege von Polyethylenimine / DNA Komplexen (Polyplexe) S. 14-19).

Malone et al. berichteten erstmals 1989 über einen erfolgreichen mRNA Transfer mit dem kationischen Lipid DOTMA (Malone et al. 1989). Weiterhin zeigte sich im Vergleich der Transfektionseffizienz verschiedener nicht-viraler Vektoren DMRIE-C bei der Transfektion von mRNA - kodierend für das Reporterprotein Luciferase - als besonders effektiv (Huth et al. unpublished data). Folglich wurden als Transfektionsreagenz sowohl das kationische Polymer branched-PEI 25kD, die Methode der Magnetofektion sowie DMRIE-C als kationisches Lipid für weitere Transfektionsexperimente mit mRNA gewählt.

Messungen von mSEAP im Medium ergaben eine bis zu 9-fache Steigerung der Konzentration von 800 pg / 50 µl auf 7,5 ng / 50 µl nach Transfektion von mRNA im Vergleich zu pDNA jeweils komplexiert mit DMRIE-C. Eine Steigerung zeigte sich auch nach Transfektion mit b-PEI von ca. 15 pg / 50µl auf 50 pg / 50 µl, allerdings nur um den Faktor 3,3, ebenso wie nach Magnetofektion von 100 pg / 50 µl auf 400 pg / 50 µl um den Faktor 4. Auch in mikroskopischen Bildern konnte die deutliche Steigerung von 15% auf 45% positiver Zellen nach Transfektion von pDNA bzw. mRNA mit DMRIE-C beobachtet werden. (siehe auch Ergebnisse: Abb. 29-33)

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Effizienz der verwendeten Vektoren könnte in dem unterschiedlichen intrazellulären Verhalten liegen (siehe

auch Abb. 6, Seite 19). Bettinger et al. zeigten ebenfalls effektive Expression nach Transfektion von mRNA kodierend für Luciferase mit dem kationischen Lipid DOTAP. Nach Transfektionen mit b-PEI 25kD und L-PEI 22 kD konnte allerdings keine Proteinexpression festgestellt werden (Bettinger et al. 2001). Unterschiedliche Ergebnisse könnten auf die Stabilität der Komplexe bei einem N/P Verhältnis von 10 im Vergleich zu 7 in der vorliegenden Arbeit zurückgeführt werden, worauf weiter unten eingegangen wird.

Kationische Lipide zeigen Wechselwirkungen mit anionischen Lipiden der endosomalen Membran, sogenannter „flip-flop“, mit folgender Freisetzung unkomplexierter mRNA in das Cytosol (siehe auch Einleitung, kationische Lipide, Abb. 3, Seite 11) und freien Zugang von Ribosomen an die mRNA. Im Gegensatz dazu gelangen Polyplexe durch den „protone sponge“ Effekt als intakter Komplex in das Zytosol, wodurch die Translation erschwert ist. Interessanterweise kam es bei Bettinger et al. zu einer deutlichen Expression nach Transfektion mit PEI 2kD kombiniert mit Melletin, einem Membran-aktiven Peptid aus dem Gift der Honigbiene, durch welches der endosomale escape auch für niedermolekulare Polyethylenimine ermöglicht wird. Als Grund für diese Expression wird die geringere Stabilität und folgendliche Dekomplexierung der Komplexe im Zytosol diskutiert (Bettinger et al. 2001).

Im Gegensatz zu Bettinger et al. konnte in der vorliegenden Arbeit auch nach Transfektion mit 25kD b-PEI eine erhöhte Proteinexpression festgestellt werden. Dies könnte durch die unterschiedlich gewählten N/P Verhältnissen begründet sein. Verschiedene anionische Komponenten wie cytoplasmatische Proteine, endogene RNA sowie cytoplasmatische Salze führen zu einer Destabilisierung der Komplexe.

Huth et al demonstrierten durch Zugabe von Zelllysate eine Destabilisierung von Polyethylenimine/pDNA Komplexen, wobei vor allem RNA als Faktor isoliert wurde. Allerdings konnte dieses Phänomen vor allem bei Polyplexen mit L-PEI und PLL beobachtet werden, während sich Polyplexe mit b-PEI als stabiler erwiesen (Huth et al. 2006). Bertschinger et al. zeigten eine Dekomplexierung von b-PEI/pDNA Komplexen durch lösliche Proteine bei einem N/P Verhältnis von 2,7 (Bertschinger et al. 2006) ebenso wie Okuda et al. für jetPEI/pDNA Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 2,5. (Okuda et al. 2004).

Die erhöhte Proteinexpression könnte demzufolge auf einer partiellen Dissoziation von PEI und mRNA zurückzuführen sein. Ebenso denkbar ist eine Blockade der Translation bei höheren N/P Verhältnissen in Analogie zur Transkription wie sie von Honore et al. festgestellt wurden. (siehe Kapitel: Zelluläre Aufnahme und intrazellulärer Weg von Polyethylenimine/DNA Komplexen (Polyplexe) (Honore et al. 2005). Hier zitierte Ergebnisse zeigten allerdings das Verhalten von PEI/pDNA Komplexen und nicht von Polyplexen mit mRNA. Diese könnten ein anderes Verhalten in Bezug auf Dissoziation im Cytoplasma der Zelle aufweisen. Weiterführende Versuche über die Stabilität und Dissoziation von Polyplexen bestehend aus Polyethylenimininen und mRNA sowie *in vitro* Translation bei verschiedenen N/P Verhältnissen könnten Aufschluss über intrazelluläre Vorgänge nach Transfektion von mRNA bringen.

A549 Zellen wurden in Hinsicht auf eine pulmonale Applikation der Polyplexe gewählt. Bei der Vernebelung von Polyplexen/Lipoplexen entstehen Scherkräfte die zu einer Degradierung der mRNA führen könnten. Huth et al. zeigten, dass die Transfektionseffizienz von Lipoplexen, bestehend aus mRNA kodierend für Luciferase und DMRIE-C, nach Vernebelung *in vitro* nur eine sehr geringe Abnahme der Transfektionseffizienz im Vergleich zu nicht vernebelten Komplexen aufweist. Weiterhin zeigten Polyplexe bei einem N/P Verhältnis von 5 einen stärkeren Verlust der Proteinexpression nach Vernebelung als bei einem N/P Verhältnis von 9. (Huth unpublished data). Für weiterführende *in vivo* Versuche im Mausmodell empfiehlt sich demzufolge vor allem die Verwendung von DMRIE-C, das geeigneter für nicht-viralen Gentransfer von mRNA als kationische Polymere wie Polyethylenimine erscheint, da es effektiver zu einer Steigerung der Genexpression führt.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Betrachtung der Ergebnisse ist unter anderem, dass durch die geringere Größe der mRNA im Vergleich zur pDNA ca. 66% weniger Transferreagenz benötigt wurde. Dies würde bei einer pulmonalen Applikation zu einer weiteren Minderung der Zytotoxizität von Polyplexen bzw. Lipoplexen führen.

Aufgrund der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass humane alveolare Epithelzellen des Adenokarzinoms (A549), welche als Modell für Lungenepithel-

zellen gewählt wurden, in der Lage sind, aus genetischem Material intakte Proteine herzustellen und diese zu sezernieren. Dies könnte als ein Ansatz für die Therapie von Hämophilie A/B mittels Aerosolapplikation als nicht-invasive Methode genutzt werden. Aufgrund der Größe der kodierenden Nukleinsequenz von Gerinnungsfaktor VIII mit ca. 8kB kommen virale Vektoren an ihre Kapazitätsgrenze. Dies zeigt sich auch deutlich anhand des Verhältnisses der Anzahl gentherapeutischer Studien von Hämophilie A zu B, die Viren als Vektoren verwenden. Die Anzahl von Studien zur Therapie von Hämophilie B überwiegt aufgrund der geringeren Größe der kodierenden Sequenz des therapeutischen Gens mit ca. 1,4kB deutlich.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Therapie von Hämophilie ist die große therapeutische Breite des Faktors VIII. Bereits ein Anstieg der Serumkonzentration auf 2-3% der normalen Konzentration im Serum, führt zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Bildes. Bei ca. 30% Serumkonzentration sind behandelte Patienten in den meisten Situationen phänotypisch unauffällig und bei bis zu 150% der normalen Konzentration wären keine schwerwiegenden Komplikationen zu erwarten (Murphy et al. 2008).

Die oben genannten Aspekte können hinsichtlich der Wahl des Vektors für einen gentherapeutischen Ansatz eine Rolle spielen. So besteht bei der Verwendung von nicht-viralen Vektoren keine Einschränkung in der Größe der Nukleinsequenz und aufgrund der großen therapeutischen Breite fällt die relativ geringere Effektivität von nicht-viralen Vektoren nicht so stark ins Gewicht.

Nicht nur die erhöhte Genexpression, sondern auch die Tatsache, dass bei der Verwendung von mRNA kein Risiko einer insertionellen Mutagenese besteht, spricht für die Verwendung von mRNA als therapeutischem genetischem Material. Die nötige Dosis an nicht-viralen Vektoren kann aufgrund der geringeren Größe von mRNA im Vergleich zu pDNA ebenfalls vermindert werden, wodurch negative Eigenschaften wie die Zytotoxizität gemildert werden.

Wegen des kontinuierlichen Abbaus der mRNA durch Nukleasen wäre allerdings eine wiederholte Applikation von mRNA notwendig, um zu gewährleisten, dass nicht nur eine vorübergehende Synthese des gewünschten Proteins stattfindet.

Wiederholte Applikationen könnten wiederum über Toll-like Rezeptoren z.B. TLR 3, (Kariko et al. 2004) (siehe Einleitung CpG Motive in Plasmid DNA) ebenso wie dies für pDNA bereits beschrieben wurde, zur Stimulation des Immunsystems führen. Dies würde zu einer Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten führen.

Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich des mRNA vermittelten Gentransfers ist in der Dauer und Höhe der erreichten Transgen-Expression zu sehen. Nach dem aktuellen Stand der Erkenntnisse gilt mRNA als wenig stabiles Molekül, das einer raschen Inaktivierung durch ubiquitär vorkommenden RNAsen unterliegt. Die im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten zeigen aber eine Zunahme der Transgen-Expression im zeitlichen Verlauf. Da der Versuchsaufbau lediglich eine Messung bis max. 72h nach Transfektion vorsieht, ist es denkbar, dass noch höhere Werte der Transgen-Expression zu späteren Zeitpunkten auftreten könnten. Zeitlich länger angelegte Versuchsaufbauten könnten Aufschluss über die Dauer der Proteinexpression von mSEAP geben. Hierbei ist allerdings evident, dass es nach der Transfektion von mRNA nur zu einer vorübergehenden Proteinexpression kommen kann, da kein Einbau genetischen Materials in das Zellgenom vorgenommen wird. Dies hat einerseits den Vorteil, dass es zu keiner insertionellen Mutagenese kommen kann, andererseits den Nachteil, dass eine dauerhafte Therapie durch den Transfer genetischen Materials wiederholte Applikation von mRNA notwendig machen würde.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden A549 Zellen, als Modell für Epithelzellen der Lunge, mittels nicht-viralen Gentransfers mit pDNA bzw. mRNA kodierend für das sekretorische Protein mSEAP transfiziert. Die höchste Transgen-Expression konnte durch den mRNA-vermittelten Gentransfer erreicht werden, unabhängig von dem verwendeten Genvektor. Die Messung der Aktivität von mSEAP im Medium nach mRNA Transfektion mit Liposomen ergab eine Konzentration von maximal 1 ng/50 μ l nach 24h, 5 ng/50 μ l nach 48h und 7,5 ng/50 μ l nach 72h. Für die pDNA Transfektion ergaben sich Konzentrationen für mSEAP von 400 pg/50 μ l nach 24 h, 700 pg/50 μ l nach 48 h und 800pg/50 μ l nach 72 h. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Verwendung von mRNA - vor allem nach Transfektion mit dem kationischen Lipid DMRIE-C - zu einer 9-fachen Steigerung der Proteinsekretion in das Medium der kultivierten Zellen kommt. Weiterhin waren ca. 45% der Zellen bei Verwendung von Lipoplexen mit DMRIE-C/mRNA im Gegensatz zu 15% nach Transfektion von pDNA positiv für mSEAP.

Nach Transfektion der mRNA mit dem kationische Polymer b-PEI konnten Konzentrationen von mSEAP im Medium von 10pg, 15pg und 50pg in 50 μ l Medium nach 24h, 48h und 72h gemessen werden. Für die Magnetofektion von mRNA ergeben sich Mengen von ca. 150pg, 250pg und 400pg in 50 μ l Medium nach 24h, 48h und 72h. Dies entspricht im Vergleich zur Verwendung von pDNA einer 3,3-fachen Steigerung nach Transfektion von mRNA/b-PEI Komplexen, mit der Methode der Magnetofektion einer 4-fachen Steigerung der Proteinexpression.

Die erhöhte Proteinexpression kann auf die intrazelluläre Barriere des nukleären Imports von pDNA, welche bei der Verwendung von mRNA nicht notwendig ist, zurückgeführt werden. Die Unterschiede des endosomalen „Escape“ - und dem daraus resultierenden Verhältnis freier mRNA zu komplexierter mRNA im Zytoplasma - könnte eine Erklärung für die geringere Effizienz von Polyethylenimin im Vergleich zu kationischen Lipiden bei dem Transfer von mRNA sein.

Weiterhin konnte mit diesem Modell gezeigt werden, dass humane alveolare Epithelzellen des Adenokarzinoms (A549) - als Modell für humane

Lungenepithelzellen - imstande sind, zellfremde Proteine nach Transfer genetischen Materials zu translatieren und zu sezernieren. Eine pulmonale Applikation von therapeutischen Genen kodierend für sekretorische Proteine mittels Vernebelung könnte als nicht-invasive Methode z.B. für die Therapie von Hämophilie A oder B eine Rolle spielen. Weiterführende *in vivo* Versuche könnten Aufschluss über Serumkonzentrationen des sekretorischen Proteins nach pulmonaler Applikation bringen.

Die Verwendung von mRNA als therapeutischem genetischem Material zeigt hierbei Vorteile gegenüber von pDNA, aufgrund der gesteigerten Transgen - Expression, der verminderten Dosis an Transferreagenz, sowie dem fast gänzlich ausgeschlossenen Risiko der insertionellen Mutagenese.

6. Literatur

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G., Bordignon, C. (2002) Correction of ADA-SCID by Stem Cell Gene Therapy Combined with Nonmyeloablative Conditioning; *Science* 296:2410-2413

Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A. M., Langer, R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis; *J Gene Med* 7:657–663

Bauer, M., Heeg, K., Wagner, H., Lipford, G.B. (1999) DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner; *Immunology* 97:699-705

Bennett, M. J., Nantz, M. H., Balasubramaniam, R. P., Gruenert, D. C., Malone R. W. (1995) Cholesterol Enhances Cationic Liposome- Mediated DNA Transfection of Human Respiratory Epithelial Cells; *Bioscience Reports* 15(1):47-53

Bertschinger, M., Backliwal, G., Schertenleib, A., Jordan, M., Hacker, D. L., Wurm, F. M. (2006) Disassembly of polyethylenimine-DNA particles *in vitro*: Implications for Polyethylenimine-mediated DNA delivery; *Journal of Controlled Release* 116:96–104

Bessis, N., FJ GarciaCozar, F.J. and M-C Boissier, M. (2004) Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms; *Gene Therapy* 11:10–17

Bettinger, T., Carlisle, R. C., Read, M. L., Ogris, M., Seymour, L. W. (2001) Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells; *Nucleic Acids Research* 29(18):3882-3891

Boussif, O., Lezoualcht, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Schermant, D., Demeneix, B., Behr J.-P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine; *Biochemistry* 92:7297-7301

Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M., Wagner, E., (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus; *Gene Therapy* 7:401–407

Dames, P. (2007a) Untersuchung zum nichtviralen Gentransfer in die Lunge im Mausmodell- Einfluss der Applikationsart, Molekularbiologischer Faktoren und Magnetischer Drug Targetingmechanismen; *Dissertations-Schrift*; Kapitel 5;

Dames, P., Gleich, B., Flemmer, A., Hajek, K., Seidl, N., Wiekhorst, F., Eberbeck, D., Bittmann, I., Bergemann, C., Weyh, T., Trahms, L., Rosenecker J., Rudolph, C., (2007b) Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung; *Nature Nanotechnology* 2:495-499

Dobson, J. (2006) Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery; *Gene Therapy* 13:283–287

Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V., Rojanasakul, Y. (2000) Oxygen Radical-Mediated Pulmonary Toxicity Induced by Some Cationic Liposomes *Pharmaceutical Research* 17(5):521-525

Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Jo Wixon, J. (2007) Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an Update *The Journal of Gene Medicine* 9:833–842

Europäische Patentschrift, Veröffentlichungsnummer: EP 1 392 341 B1; CureVac GmbH

Farhood, H., Serbina, N., Huang, J. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer; *Biochimica et Biophysica Acta* 1235:289-295

Favrot, P. C. M. C., Hurbin, A., Coll, J.-L. (2002) Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine–DNA complexes; *The Journal of Gene Medicine* 4:84–91

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure; *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417

Ferrari, S., Pettenazzo, A., Garbatia, N., Zacchello, F., Behr, J.-P., Scarpa, M. (1999) Polyethylenimine shows properties of interest for cystic fibrosis gene therapy; *Biochimica et Biophysica Acta* 1447:219-225

Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P., Kissel, T. (1999) A Novel Non-Viral Vektor for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on transfection Efficiency and Cytotoxicity; *Pharmaceutical Research* 16(8):1273-1279

Gao, X., Kim, K.-S., Liu, D. (2007) Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next; *The AAPS Journal* 9 (1):E92- E104

Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M.A., Christensen, H. O., al Ghonaium, A., White, H. N., Smith, J. L., Levinsky, R.J., Ali, R. R., Kinnon, C., Thrasher, A. J. (2004) Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector; *Lancet* 364:2181–87

Gautam, A., Densmore C.L., Waldrep J.C. (2001) Pulmonary cytokine responses associated with PEI–DNA aerosol gene therapy; *Gene Therapy* 8:254–257

Gautam, A., Waldrep, J. C., Densmore, C. L. (2003) Aerosol Gene Therapy *Molecular Biotechnology* 23:51-60

Gersdorff, K. v., Sanders, N. N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S. C., Wagner, E., Ogris, M. (2006) The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type; *Molecular Therapy* 14(5):745-753

Gersting, S. W., Schillinger, U., Lausier, J., Nicklaus, P., Rudolph, C., Plank, C., Reinhardt, D., Rosenecker, J. (2004) Gene delivery to respiratory epithelial cells by Magnetofection; *J Gene Med* 6:913–922

Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5177–5181

Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G., (1999) Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle; *Journal of biomedical material research* 45(3):268-75.

Grosse, S., Aron, Y., Thévenot, G., Monsigny, M., Fajac, I. (2007) Cytoskeletal involvement in the cellular trafficking of plasmid/PEI derivative complexes; *Journal of Controlled Release* 122:111–117

Grosse, S., Thevenot, G., Monsigny, M., Fajac, I., (2006) Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *J Gene Med* 8:845–851

Hacein-Bey-Abina, S. A., Ledest, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., Villartay, J.-P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Depuis-Girod, S., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2002) Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex vivo Gene Therapy; *New England Journal of Medicine*, 346(16):1185-1195

Hacein-Bey-Abina, S. A., von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2003) LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1; *Science* 302:415-419

Hemi, H., Takeuchi O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hashino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira S. (2000) A toll-like receptor recognizes bacterial DNA; *Nature* 408:740-745

Hoekstra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F., Zuhorn, I. (2007) Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome; *Biochemical Society Transactions* 35(1):68- 71

Honore, I., Grosse, S., Frison, N., Favatier, F., Monsigny, M., Fajac, I. (2005) Transcription of plasmid DNA: Influence of plasmid DNA/polyethylenimine complex formation; *Journal of Controlled Release* 107:537–546

Huth, S., Hoffmann, F., von Gersdorff, K., Laner, A., Reinhardt, D., Rosenecker, J., Rudolph, C. (2006) Interaction of polyamine gene vectors with RNA leads to the dissociation of plasmid DNA-carrier complexes; *J Gene Med* 8:1416–1424

- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S. W., Rudolph, C., Plank C., Welsch, U., Rosenecker, J. (2004) Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer; *J Gene Med* 6:923–936
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., Weissman D. (2004) mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3; *The Journal of Biological Chemistry* 279(13):12542–12550
- Kay, M. A., High, K. (1999) Gene therapy for the hemophilias; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(18):9973–9975
- Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H. (2006) Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery; *Pharmacol Rev* 58:32–45
- Kikuchi, A., Aoki, Y., Sugaya, S., Serikawa, T., Takakuwa, K., Tanaka, K., Suzuki, N., Kikuchi, H. (1999) Development of Novel Cationic Liposomes for Efficient Gene Transfer into Peritoneal Disseminated Tumor; *Human Gene Therapy* 10:947- 955
- Kircheis, R., Wightman, L., Wagner, E., (2001) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines; *Advanced Drug Delivery Reviews* 53:341–358.
- Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J. O., Safinya C. R. (1998) An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome–DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery; *Science* 281:78-81
- Kopatz, I., Remy, J.-S., Behr, J.-P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin; *The Journal of Gene Medicine* 6:769–776
- Kormann, M., Rosenecker, J. (2007) RNA as a human therapeutic tool? *Curr Opin Mol Ther* 9(5):422
- Krötz, F., de Wit, C., Sohn, H.-Y., Zahler, S., Gloe, T., Pohl, U., Plank, C., (2003) Magnetofection—A Highly Efficient Tool for Antisense Oligonucleotide Delivery *in Vitro* and *in Vivo*; *Mol Ther* 7:700–710
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S. (2008) TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA; *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:795–804
- Li, S.-D., Huang, L. (2007) Non-viral is superior to viral gene delivery; *Journal of Controlled Release* 123:181–183
- Lombry, C., Edwards, D. A. , Pr eat, V., Vanbever, R. (2004) Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules; *Am J Physiol Lung; Cell Mol Physiol* 286(5):1002–1008
- Malone, R. W., Felgner, P. L., Verma M. I. (1989) Cationic liposome-mediated RNA transfection; *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081.

- Mælandsmo, G. M., Ross, P. J., Pavliv, M., Meulenbroek, R. A., Evelegh, C., Muruve, D. A., Graham, F. L., Parks, R. J. (2005) Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice, *J Gene Med* 7:307–315
- Medina-Kauwe, L. K., Xie, J., Hamm-Alvarez S. (2005) Intracellular trafficking of nonviral vectors; *Gene Therapy* 12:1734–1751
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and Molecular Sorting; *Annu. Rev Cell Dev. Biol* 12:575–625
- Moghim, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., Szewczyk A. (2005) A Two-Stage Poly(ethylenimine)-Mediated Cytotoxicity: Implications for Gene Transfer/Therapy; *Molecular Therapy* 11(6):990-995
- Murphy, S. L., High, K. A., (2008) Gene therapy for haemophilia; *Br J Haemophilia* 140(5):479-87;
- Nardone, L. L., Andrews, S. B. (1979) Cell Line A549 as a Model of the type II Pneumocyte; *Biochimica et Biophysica Acta*, 573:276-295
- Nguyen, L. T., Atobe, K., Barichello, J. M., Ishida, T., Kiwada, H. (2007) Complex Formation with Plasmid DNA Increases the Cytotoxicity of Cationic Liposomes; *Biol. Pharm. Bull.* 30(4):751—757
- Norman, J., Denham, W., Denham, D., Yang, J., Carter, G., Abouhamze, A., Tannahill, C. L., MacKay, S. L. D., Moldawer L. L. (2000) Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation; *Gene Therapy* 7:1425–1430
- Okudaa, T., Niidomeb, T., Aoyagi, H., (2004) Cytosolic soluble proteins induce DNA release from DNA–gene carrier complexes; *Journal of Controlled Release* 98:325-332
- Paris, S., Burlacu, A., Durocher Y. (2008) Opposing Roles of Syndecan-1 and Syndecan-2 in Polyethyleneimine-mediated Gene Delivery; *The Journal of Biological Chemistry* 283(12):7697–7704
- Pelkmans, L., Helenius, A. (2002) Endocytosis Via Caveolae Traffic 3:311-320
- Pike-Overzet, K., van der Burg, M., Wagemaker, G., van Dongen, J., Staal, F. (2007) New Insights and Unresolved Issues Regarding Insertional Mutagenesis in X-linked SCID Gene Therapy; *Molecular Therapy* 15(11):1910–1916
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J. M. and Batshaw, M. L. (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithinetranscarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer; *Molecular Genetics and Metabolism* 80:148–158
- Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Propert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, N. A., Wilson, J. M., Batshaw, M. L. (2002) A Pilot Study of *In*

Vivo Liver-Directed Gene Transfer with an Adenoviral Vector in Partial Ornithine Transcarbamylase Deficiency; Human Gene Therapy 13:163–175

Rejman, J., Bragonzi, A., Conese M. (2005) Role of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis in Gene Transfer Mediated by Lipo- and Polyplexes; Molecular Therapy 12(3):468-474

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis; Biochem. J. 377:159–169

Rosenecker, J (2007) Therapie der Krankheiten im Kindes und Jugendalter, Kapitel 175, Reinhardt, Dietrich; Springer Verlag

Rosenecker, J., Naundorf, S., Gersting, S. W., Hauck, R. W., Gessner, A., Nicklaus, P., Müller, R. H., Rudolph, C. (2003) Interaction of bronchoalveolar lavage fluid with polyplexes and lipoplexes: analysing the role of proteins and glycoproteins; J Gene Med 5(1):49–60.

Rudolph, C., Müller, R. H., Rosenecker, J. (2002) Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and *in vitro* gene delivery efficiency; J Gene Med 4(1):66-74.

Rudolph, C., Ortiz, A., Schillinger, U., Jauernig, J., Plank, C., Rosenecker, J. (2005) Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application; J Gene Med 7(1):59-66

Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., Gänsbacher, B., Plank, C. (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*; Gene Therapy 9:102–109

Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*; Gene Therapy 9:102–109

Schrimpf, Gangolf; Gentechnische Methoden; Spektrum

SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent, Roche Cat. No. 11 779 842 001

Sonawane, N. D., Szoka, F. C. Jr., Verkman, A. S. (2003) Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes; The journal of biological chemistry 278(45):44826–44831

Suh, J., Wirtz, D., Hanes, J. (2003) Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus; PNAS 100(7):3878–3882

Tang, M.X., Szoka, F.C. (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes; Gene Therapy 4:823–832

Tiera, M. J., Winnik, F. M., Fernandes, J. C. (2006) Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives; *Current Gene Therapy* 6:59-71

Toropainen, E., Hornof, M., Kaarniranta, K., Johansson, P., Urtti, A. (2007) Corneal epithelium as a platform for secretion of transgene products after transfection with liposomal gene eyedrops; *J Gene Med*; 9:208–216

van der Aa, M. A. E. M., Huth, U. S., Häfele, S. Y., Schubert, R., Oosting, R. S., Mastrobattista, E., Hennink, W. E., Peschka-Süss, R., Koning, G. A., Crommelin, D. J. A. (2007) Cellular Uptake of Cationic Polymer-DNA Complexes Via Caveolae Plays a Pivotal Role in Gene Transfection in COS-7 Cells; *Pharmaceutical Research* 24(8):1590-1598

van der Aa, M. A. E. M., Mastrobattista, E., Oosting, R. S., Hennink, W. E., Koning, G. A., Crommelin, D. J. A. (2006) The Nuclear Pore Complex: The Gateway to Successful Nonviral Gene Delivery; *Pharmaceutical Research* 23(3):447-459

Xenariou, S., Griesenbach, U., Ferrari, S., Dean, P., Scheule, R.K., Cheng, S.H., Geddes, D.M., Plank C., Alton, E.W.F.W. (2006) Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium *in vivo*; *Gene Therapy* 13:1545–1552

Xu, Y., Szoka, F. C. Jr., (1996) Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection; *Biochemistry* 35:5616-5623

Yew, N. S., Zhao, H., Wu, I-H., Song, A., Tousignant, J. D., Przybylska, M., Cheng S. H. (2000) Reduced inflammatory response to plasmid DNA by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG Motifs; *Molecular Therapy* 1(3):255-262

Yew, S., Zhao, H., Wu, I-H., Przybylska, M., Tousignant, J. D., Scheule, R. K., Cheng, S. H. (2002) CpG-Depleted Plasmid DNA Vectors with enhanced safety and long-term Gene expression; *Molecular Therapy* 5(6):731-738

Zepp, T., Friedrich, W., (2003) *Pädiatrie, Grundlagen und Praxis*, 2. Auflage, Lentze Schaub, Schulte, Springer; Springer Verlag, S604-S607

7. Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosindesaminase
AP	Alkalische Phosphatase
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BP	Basen Paare
b-PEI	branched-PEI
CpG	Cytosin-phosphatidy-Guanosin
CSPD	[3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'(5'-chloro)-tricyclo(3.3.1.1 ^{3,7}) decane]-4-yl)phenyl phosphate]
DMRIE-C	(1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide) – Cholesterol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoyl-phosphotidylethanolamin
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
FCS	Fetal Calf Serum
IL	Interleukin
IL2RG	Interleukin 2 Rezeptor Gen
LDH	Lactatdehydrogenase
L-PEI	lineares-PEI
MEM-Medium	Minimal Essential Medium
mRNA	messenger RNA
mSEAP	murine sekretorisch alkalische Phosphatase
N/P	Nitrogen/Phosphat
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NPC	Nuclear Pore Complex
NLS	Nuclear Localization Signal
ODN	Oligodeoxyribonukleotide
PBS	Phosphate buffered saline
pDNA	Plasmid DNA
PEI	Polyethylenimine
PLL	Polylysin

RLU	Relativ Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
SEM	standart error of the mean
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrose Faktor α

Lebenslauf

Personalien

Name: Friedemann Roos
 Geburtstag: 19.01.1980
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung

09/1968-07/1990 Grundschule Nadistraße, München
 09/1990- 06/1999 Städt. Luisengymnasium, München
 06/1999 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/2000-03/2003 Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt,
 LMU München
 03/2003 Ärztliche Vorprüfung
 04/2003-03/2008 Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt, TU
 München
 07.12.2007 Ärztliche Prüfung

Pflegepraktikum, Famulaturen und Praktisches Jahr

09/1999-10/1999 Pflegepraktikum Dr. von Haunerschen Kinderspital,
 München, Station Intern 2
 08/2003 Famulatur, Hämatologie/Onkologie ,
 Krankenhaus Neukölln, Berlin
 08/2004 Famulatur, Chirurgie, Fakultna Nemocnica, Bratislava
 09/2005 Famulatur, Kardiologie, Marienkrankenhaus, Hamburg

03/2006	Famulatur, Dermatologie und Allergologie, Praxis Dr. med. Saal
28.08.2006-15.12.2006	PJ, Terial Innere, Hämatologie/Onkologie, Klinikum Schwabing
18.12.2006-09.02.2007	PJ, Terial Chirurgie, Gefäßchirurgie, MRI
12.02.2007-06.04.2007	PJ, Terial Chirurgie, Korle-Bu Teaching Hospital, Department of Surgery, University of Ghana - medical school, Accra, Ghana
09.04.2007-27.07.2007	PJ, Terial Pädiatrie (Wahlfach), Kinder- und Poliklinik MRI München-Schwabing
seit 01.10..2008	Assistenzarzt am Rotkreuzkrankenhaus München, Innere, 1.Medizinische Abteilung