

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
Direktor Univ.- Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. rer. nat. C. Plank

Vorgelegt über
Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger
Medizinische Kleintierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Univ.-Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann

**Etablierung eines murinen Lungentumormodells zur Untersuchung von ortsspezifischer
magnetischer Deposition und Ultraschall-induzierter Freisetzung von siRNA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Riitta Susanna Renner

aus
München

München, 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Koreferent/en: Prof.-Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Für Christina und Maximilian Renner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum.....	3
2.1	Bedeutung und Therapie von Lungentumoren in der Humanmedizin.....	3
2.2	Gentherapie – Grundlagen und Einsatzmöglichkeiten in der Medizin.....	4
2.3	Voraussetzungen für die Wirksamkeit von gentherapeutischen Anwendungen.....	5
2.3.1	Intravasaler Transport.....	5
2.3.2	Anatomisch- histologische Hindernisse.....	7
2.3.3	Barrieren der intrazellulären Aufnahme.....	7
2.4	Gentransfer.....	9
2.4.1	Vektoren des viralen Gentransfers.....	9
2.4.2	Vektoren des nichtviralen Gentransfers.....	11
2.4.2.1	Kationische Polymere.....	12
2.4.2.2	Lipide.....	16
2.4.2.3	Microbubbles und Ultraschall.....	19
2.4.3	Magnetofektion™ - eine effiziente Methode des „Drug Targeting“.....	26
2.5	Bedeutung und Einsatz von siRNA in der Gentherapie.....	29
2.5.1	Schlüsselexperimente und Funktion der RNA Interferenz.....	29
2.5.2	Wirkmechanismus und Anwendungsmöglichkeiten.....	31
2.5.3	Wirkdauer, Stabilität und Experimente.....	33
2.5.4	Ausblick und Potential der RNA-Interferenz.....	35
2.6	Evaluierung der Transfektionseffizienz durch Reportergene.....	37
2.6.1	Luciferase.....	37
2.6.2	Nicht invasive Imaging Methoden.....	38

3	Eigene Untersuchungen	39
3.1	Ziel und Vorgehensweise.....	39
3.2	Material und Methoden.....	41
3.2.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	41
3.2.1.1	Kultivierung der B16F10-Melanomzellen des Mausinzuchtstammes C57BL/6... 41	41
3.2.1.2	Stabile Integration des Reportergens Luciferase in B16F10-Melanomzellen durch retrovirale bzw. lentivirale Transduktion.....	41
3.2.1.3	Kryokonservierung.....	42
3.2.1.4	Luciferase-Test.....	42
3.2.1.5	Proteintest.....	43
3.2.1.6	MTT-Test.....	43
3.2.2	In-vitro-Versuche mit transduzierten B16F10-Melanomzellen	44
3.2.2.1	Abhängigkeit der Genexpression von der Konfluenz – in vitro Versuch I.....	44
3.2.2.2	Überprüfung der Expressionsstabilität von retroviral und lentiviral transduzierten Melanomzellen – in vitro Versuch II.....	44
3.2.2.3	Bestimmung der Zellmortalität in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. Citric Saline – in vitro Versuch III.....	45
3.2.2.4	Vergleich von Isotonischer Kochsalz-, 5%iger Glucose-Lösung und PBS als geeignete Suspensionslösungen – in vitro Versuch IV.....	46
3.2.3	Regulierung der Genexpression mittels siRNA in vitro	47
3.2.3.1	Magnetofektion von B16F10 RV Luc – in vitro Versuch V.....	47
3.2.3.2	Transfektion von transduzierten B16F10 durch magnetische siRNA-Microbubbles in vitro Versuche VI.....	50
3.2.3.3	Gelelektrophorese zur Stabilitätsüberprüfung der siRNA – in vitro Versuch VII.....	54
3.2.4	Anwendung des siRNA-Microbubble-Systems in vivo	56
3.2.4.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	56
3.2.4.2	Analyse des Tumorwachstums – in vivo Versuch I.....	57
3.2.4.3	Biodistributionsstudie mit ¹²⁵ Iod- markierten siRNA-Microbubbles – in vivo Versuch II.....	59

3.2.4.4	Histologie nach fluoreszenzmarkierter siRNA-Microbubble Injektion – in vivo Versuch III.....	61
3.2.4.5	Transmissions-Elektronenmikroskopie einer murinen Lunge behandelt mit siRNA Magnetobubbles – in vivo Versuch IV.....	62
3.2.4.6	Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles am Tag 12 des Tumorstadiums – in vivo Versuch V.....	63
3.2.4.7	Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles in transgene, Luciferase exprimierende Mäuse – in vivo Versuch VI.....	64
3.3	Datenauswertung und Dokumentation.....	66
3.3.1	Ergebnisse des in vitro Versuches I: Abhängigkeit der Genexpression von der Konfluenz.....	66
3.3.2	Ergebnisse des in vitro Versuches II: Überprüfung der Expressionsstabilität von retroviral und lentiviral transduzierten Melanomzellen.....	68
3.3.3	Ergebnisse des in vitro Versuches III: Bestimmung der Zellmortalität in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. Citric Saline.....	70
3.3.4	Ergebnisse des in vitro Versuches IV: Vergleich von Isotonischer Kochsalz-, 5%iger Glucose-Lösung und PBS als geeignete Suspensionslösungen.....	72
3.3.5	Ergebnisse der Regulierung der Genexpression mittels siRNA in vitro.....	73
3.3.5.1	Ergebnisse des in vitro Versuches V: Magnetofektion von B16F10 RV Luc.....	73
3.3.5.2	Ergebnisse der in vitro Versuche VI: Transfektion von transduzierten B16F10 Zellen durch magnetische siRNA Microbubbles.....	79
3.3.5.3	Ergebnisse des in vitro Versuches VII: Gelelektrophorese zur Stabilitäts- überprüfung der siRNA.....	85
3.3.6	Ergebnisse der Anwendung des siRNA-Microbubble-Systems in vivo.....	86
3.3.6.1	Ergebnisse des in vivo Versuches I: Analyse des Tumorstadiums.....	86
3.3.6.2	Ergebnisse des in vivo Versuches II: Biodistributionsstudie mit ¹²⁵ Iod- markierten siRNA-Microbubbles.....	90
3.3.6.3	Ergebnisse des in vivo Versuches III: Histologie nach fluoreszenzmarkierter siRNA-Magnetobubble Injektion.....	94
3.3.6.4	Ergebnisse des in vivo Versuches IV: Transmissions-Elektronenmikroskopie einer murinen Lunge behandelt mit siRNA-Magnetobubbles.....	96

3.3.6.5	Ergebnisse des in vivo Versuches V: Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles am Tag 12 des Tumorwachstums.....	98
3.3.6.6	Ergebnisse des in vivo Versuches VI: Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles in transgene, Luciferase exprimierende -Mäuse.....	105
4	Diskussion.....	108
4.1	Diskussion der Nachweisverfahren.....	109
4.2	Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche I und II.....	110
4.3	Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche III, IV und VII.....	111
4.4	Diskussion der Ergebnisse der Regulierung der Genexpression mittels siRNA in vitro (Versuch V und VI).....	113
4.5	Diskussion der systemischen Anwendung des siRNA-Microbubble-Systems in vivo.....	116
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	124
5	Zusammenfassung.....	126
6	Summary.....	128
7	Literaturverzeichnis.....	130
8	Verzeichnis der verwendeten Medien und Puffer.....	149
9	Tabellenverzeichnis.....	151
10	Abbildungsverzeichnis.....	153
11	Abkürzungsverzeichnis.....	156
12	Danksagung.....	158
13	Lebenslauf.....	159

1 EINLEITUNG

Ein großes Schlagwort des 21. Jahrhunderts ist die so genannte Nanotechnologie. Basierend auf wichtigen Fortschritten des letzten Jahrhunderts – unter anderem der Entwicklung der Quantenmechanik, der Erfindung des (Raster-)Elektronenmikroskops und der Entschlüsselung des menschlichen Genoms – schließen sich Wissenschaftler aus den Bereichen Chemie, Biologie, Medizin, Physik und Informatik zusammen, um neue Erkenntnisse auf molekularer und atomarer Ebene zu gewinnen und für die Menschheit nutzbar zu machen.

Ein Teilgebiet der Nanowissenschaft befasst sich mit medizinisch-pharmazeutischen Anwendungen der Nanotechnologie, unter anderem mit dem langfristigen Ziel, durch Veränderungen auf genetischer Ebene bislang unheilbare Krankheiten behandeln oder vollständig heilen zu können. Veränderungen in den Genen bzw. in ihrer Regulation spielen bei Erbkrankheiten, wie der zystischen Fibrose oder der Immunschwächekrankheit SCID-X1, sowie bei Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle.

Die Herausforderung der Gentherapie besteht deshalb darin, korrekt funktionierende Gensequenzen gezielt in Zellen einzuschleusen und durch die Expression entsprechender Proteine therapeutisch auf die zellulären Abläufe Einfluss zu nehmen.

Andererseits wäre eine gezielte Abschaltung von Krankheit verursachenden bzw. unterstützenden Genen denkbar, wie beispielsweise von solchen, die für unkontrolliertes Blutgefäßwachstum im Tumorgebiet kodieren, oder die Bekämpfung von viralen Infektionen durch Konstruktion und Einbringen von Nukleinsäuren, die mit der Expression eines Zielgens interferieren.

Schließlich sei die Entwicklung von so genannten Gen-Impfstoffen erwähnt, die als vorbeugende Maßnahme das Immunsystem stimulieren und so z. B. zu einer erhöhten Tumorabwehrreaktion führen sollen.

Das größte Problem dieser neuen Therapieansätze besteht im effektiven und gesteuerten Einschleusen der Gene in die Zielzellen. Diesem Problem wird versucht, auf zwei verschiedenen Wegen zu begegnen:

Zum einen werden modifizierte Viren dazu verwendet, das therapeutische Gen zusammen mit ihrem Erbgut in das Zellinnere zu schleusen. Eine andere Möglichkeit ist die Entwicklung

nichtviraler Genvektoren, die aus synthetischen Molekülen aufgebaut sind, die aber alle in Bezug auf ausreichende Verfügbarkeit im Zielgewebe und auf Effektivität optimiert werden müssen.

Eine neuartige Methode zum gezielten Nukleinsäuretransfer und zur ortsspezifischen Anreicherung stellt die Magnetofektion dar: Durch Koppelung von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln an Nukleinsäuren und Genvektoren ist ein physikalisch steuerbarer Gentransfer durch ein außen angelegtes Magnetfeld möglich.

Eine weitere physikalische Kraft, die im Gentransfer zu einer erhöhten Transfektionseffizienz durch Beeinflussung der Zellmembranpermeabilität und ortsspezifischer Freisetzung des Therapeutikums beitragen kann, ist der Einsatz von Ultraschall (Sonoporation). Ein völlig neuer Ansatz besteht darin, Magnetfeld und Sonoporation in einer Methode zu vereinen.

Dieses Ziel wird auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

Zunächst soll *in vitro* ein superparamagnetischer mit siRNA beladener Genvektor auf seine Effektivität hin untersucht werden. Dazu werden murine Lungenmelanomzellen durch Magnetofektion bzw. unter zusätzlicher Anwendung von Ultraschall transfiziert, um anschließend eine verringerte Expression eines gewünschten Proteins zu erreichen. Nach Erfolg versprechender Herunterregulierung der Genexpression erfolgt der Einsatz *in vivo*: Nach Etablierung eines Lungenmetastasen-Modells in der Maus wird mittels der innovativen Methode versucht, einen lokoregionären Gentransfer in Lungentumorzellen zu erzielen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Bedeutung und Therapie von Lungentumoren in der Humanmedizin

Im Jahr 2005 waren Luftröhren-, Bronchien- oder Lungenkrebs laut WHO die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Insgesamt starben deutschlandweit 42 079 Menschen an diesen Leiden, das entspricht 5,2 % der Gesamtsterblichkeit in dem genannten Jahr. Damit nimmt das Bronchialkarzinom nach den ischämischen Herzerkrankungen und zerebrovaskulären Krankheiten eine Spitzenstellung bei den 10 bedeutendsten Sterblichkeitsursachen in unserem Land ein. 22 % aller Krestoten gehen auf das Konto des Lungenkarzinoms. Während die Tendenz, an derartigem Krebs zu erkranken, bei Männern allgemein etwas rückläufig ist, steigt die Zahl erkrankter Frauen in jüngster Zeit an. Als Hauptursache gelten dabei so genannte Inhalationskarzinogene, wie v. a. Tabakrauch, Asbest, Arsen und radioaktive Stoffe. Der höchst maligne Tumor metastasiert in regionäre Lymphknoten und umgebende Strukturen wie Pleura und Perikard sowie auf hämatogenem Weg besonders in Leber, Nebennieren, Skelett und Gehirn (238).

Derzeit bestehen die wenig zufrieden stellenden Therapiemöglichkeiten je nach körperlichem Gesamtzustand des Patienten und Tumorstadium aus chirurgischer Resektion von einzelnen Lungenlappen in Kombination mit oder ausschließlich aus Strahlentherapie und Gabe von Zytostatika. Die Überlebenswahrscheinlichkeit ist sehr gering, die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt lediglich 10 %, ca. 45 % der Erkrankten sterben bereits nach einem Jahr (68). Hinzu kommen erhebliche Einschränkungen der Lebensqualität durch massive Nebenwirkungen von systemisch verabreichten Zytostatika wie Erbrechen, Inappetenz, Abgeschlagenheit, Haarausfall, Polyneuropathien und Muskelschmerzen (240).

Dies ist nur ein Beispiel von vielen Krebs- und anderen Erkrankungen (z. B. Infektionskrankheiten, Erblichen), bei denen die klassischen Therapieformen keine große Hoffnung auf eine Genesung zulassen bzw. die eigentliche Ursache nicht bekämpfen und deshalb Anlass geben für die Suche nach modernen Therapieansätzen wie der Gentherapie.

Diese muss allerdings bezüglich einer Erhöhung der biologischen Verfügbarkeit im Zielgewebe und einer Verbesserung der molekularen Spezifität optimiert werden, um einerseits deren Wirksamkeit zu erhöhen und gleichzeitig Nebenwirkungen zu verringern. Dabei spielen biologisches (verschiedene Rezeptoren, Antikörper usw.) und physikalisches Targeting (z. B. Magnetfelder, Ultraschall) eine große Rolle.

2.2 Gentherapie – Grundlagen und Einsatzmöglichkeiten in der Medizin

Auf der Suche nach neuen, für den Patienten schonenderen Therapieansätzen gewinnt die Gentherapie immer mehr an Bedeutung. Sie ist definiert als das Einbringen genetischen Materials in die Zellen eines Individuums mit dem Ziel, therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen für dieses zu erzielen (66).

Grundlage hierfür bildet die Erkenntnis, dass Nukleinsäuren in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) als Träger des genetischen Codes am Anfang einer Informationskette stehen und damit verantwortlich für die molekularen Vorgänge innerhalb einer Zelle sind. In der Basenabfolge der Nukleinsäuren ist der Bauplan für Proteine enthalten (234).

Wird der Informationsfluss innerhalb der Zelle gestört, führt dies zu nichtfunktionellen Proteinen oder womöglich zu Entartungen der zellulären Abläufe, die nach außen als Krankheit in Erscheinung treten können. Die Schlüsselrolle der Nukleinsäure zu Beginn der Informationskette kann daher sowohl therapeutisch als auch diagnostisch genutzt werden. Das Einbringen von therapeutisch nützlichen Genen von außen in Zellen wird zur Produktion des eigentlichen therapeutischen Agens – in der Regel eines Proteins – führen. Andererseits kann das Einschleusen einer Nukleinsäure mit unbekanntem Informationsgehalt durch Beobachtung der Wirkung zur Entschlüsselung der Funktion einzelner Genabschnitte beitragen.

Von diesem Hintergrund aus betrachtet wäre eine genetische Therapie jedes Mal dann sinnvoll, wenn das Genprodukt seinerseits zu einer Therapie beitragen kann. Im Gegensatz zu bislang eingesetzten Therapeutika wird der Organismus bei dieser Behandlungsform dazu gebracht, sich quasi selbst zu helfen, indem er sein körpereigenes „Medikament“ herstellt. Das Ausgangsarzneimittel muss jedoch weiterhin von außen zugeführt und an die entsprechenden Zellen heran- und in sie eingebracht werden (8, 54).

Eine andere Strategie, auf welche unter 2.5 näher eingegangen wird, setzt auf den erst vor relativ kurzer Zeit entdeckten Mechanismus der RNA-Interferenz: Kleine, nichtkodierende Ribonukleinsäuren können eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen (67). Die Schlüsselexperimente, die 1998 von A. Fire und C. Mello an Fadenwürmern durchgeführt wurden, lüfteten das bisherige Geheimnis der zuvor schon an Pflanzen und Tieren beobachteten geheimnisvollen Genabschaltung: Verantwortlich dafür sind nichtkodierende DNA-Sequenzen im Erbgut, die in RNA übersetzt werden (miRNA) und spezifisch mit fremder (z. B. viraler) oder endogener mRNA (zur Regulation der Proteinbiosynthese)

interferieren und anschließend für deren Abbau sorgen: die so genannte RNA-Interferenz (50). Durch die Funktion der miRNA als Genregulator greift sie in so wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise Wachstum, Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) ein. Daraus ergeben sich diverse denkbare Therapieansätze für beispielsweise Stoffwechselerkrankungen, Krebs oder Viruskrankheiten. Prinzipiell müsste sich jedes krankmachende Gen stilllegen lassen können (67). Voraussetzungen hierfür sind die Bekanntheit des zu unterdrückenden Gens und, wie bei der „klassischen“ Gentherapie auch, der effektive Transport der miRNA an die Zellen heran sowie die anschließende intrazelluläre Aufnahme. Ein Vorteil der RNA-Interferenz gegenüber dem Einbringen von Genen in Form von Plasmiden („klassische“ Gentherapie) ist die Tatsache, dass es sich bei Erstgenannter um einen natürlich im Organismus vorkommenden Mechanismus handelt. Weiter entfällt die Notwendigkeit, innerhalb der Zelle den Zellkern zu erreichen, da sich die entscheidenden Vorgänge der Interferenz und des mRNA-Abbaus ausschließlich im Zytoplasma abspielen (165). Was bei aller Euphorie jedoch nicht vergessen werden darf, ist die Reversibilität der Genabschaltung und damit verbunden eine wiederholte Therapienotwendigkeit, die in manchen Fällen sogar lebenslang andauern kann (165, 34).

2.3 Voraussetzungen für die Wirksamkeit von gentherapeutischen Anwendungen

2.3.1 Intravasaler Transport

Unabhängig von der Zielsetzung einer molekulargenetischen Manipulation muss das genetische Material zunächst vom Applikationsort zum Wirkort gelangen. Auf diesem Weg gilt es verschiedene Barrieren zu überwinden. Für den Transport und das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen bedient man sich so genannter Genvektoren (virale und nichtvirale), auf die unter 2.4. näher eingegangen wird.

Gelangt der Vektorkomplex (Genvektor und daran gebundene Nukleinsäure) nach intravenöser Applikation in die Blutbahn, so stellt das **Immunsystem** die erste große physiologische Hürde dar. Phagozyten in der Lunge (Alveolarmakrophagen) und Leber (Kupffersternzellen), die für die Entfernung von fremdem, korpuskulärem Material aus dem Blutstrom zuständig sind, eliminieren einen beträchtlich hohen Anteil (bis zu 90 %) an zuvor durch Blutproteine opsonierten (gebundenen) nichtviralen Vektorpartikeln (153, 177). Es wurde gezeigt, dass Plasmaproteine, wie beispielsweise Albumin oder Fibrinogen und einige Komplementfaktoren (C1, C3) für diese Opsonierung verantwortlich sind (153). Nach dieser Bindung kann der Intravasalraum aufgrund der Porengröße der Endothelzellen nicht mehr

verlassen werden, wodurch die weitere Verteilung der Genvektoren gehemmt ist. Andererseits konnten Soutschek et al. (204) die Bindung von siRNA-Cholesterol-Konjugaten an Albumin ausnutzen und auf diese Weise eine erhöhte Aufnahme der siRNA in Leberzellen bewirken („Leber-Targeting“).

Weiter eliminieren im Blutstrom zirkulierende Proteasen und Nukleasen die Vektorkomplexe bzw. setzen ihre Wirkung herab (114). So liegt z. B. die Plasma-Halbwertszeit für nackte siRNA zwischen 1 und 5 Minuten, durch chemische Modifikationen an einem oder beiden Einzelsträngen konnte sie auf 1 bis 3 Tage erhöht werden (36). Einige Studien belegen eine Aktivierung des Interferonsystems durch siRNAs, insbesondere in höheren Konzentrationen (18, 259, 195). Nach siRNA-Applikation gebunden an Liposomen wird außerdem über eine Aktivierung des Toll-like-receptor-Systems (TRL) berichtet, welches fremde RNA erkennt (82, 193). TRL-Rezeptoren erkennen spezifische, immunmodulatorische Motive in der Sequenz der eingebrachten siRNA, insbesondere GU-reiche Sequenzen (bestimmte wiederkehrende Abfolge der Basen Guanin und Uracil) (82, 70, 130) und führen bekannterweise bei Säugern durch Sekretion von Interleukinen und Stimulation von IFN- γ zu einer B-Zell-Aktivierung (105). Dadurch kann es zu unerwünschten klinischen Symptomen im Patienten kommen (250).

Die Interaktionen der Serumproteine mit Poly- oder Lipoplexen (s. 2.4.2.1 bzw. 2.4.2.2) bedingen eine klinisch unerwünschte Aktivierung des Komplementsystems, wenngleich ein Einfluss auf die Transfektionseffizienz nicht zu beobachten war (157, 49).

Insgesamt müssen geeignete Modifikationen bei der Konstruktion von Genvektoren gefunden werden, die mögliche Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen minimieren und zu keiner oder nur zu einer tolerierbaren Aktivierung des Immunsystems führen. Als eine Ausnahme diesbezüglich sei die Vakzinierung mit DNA erwähnt, bei der eine humorale Immunantwort im Sinne von Antikörperbildung gegen das Proteinprodukt des therapeutischen Gens explizit erwünscht ist und gleichzeitig zur Eliminierung der Protein produzierenden Zellen führen kann (221).

2.3.2 Anatomisch-histologische Hindernisse

Bei ihrer Zirkulation im Blut müssen Arzneistoffe und deshalb auch zirkulierendes genetisches Material die **Leber** passieren, die ihre Aufgabe als Stoffwechsel- und Entgiftungsorgan erfüllt: Negativ geladene Moleküle wie RNA oder DNA werden ebenso wie Lipoplexe (Komplexe aus Nukleinsäure und Lipiden) durch Kupffersternzellen phagozytiert (65). Wenn nicht Endothelzellen selbst Zielort sind, muss ein Austritt aus den Gefäßen (**Extravasation**) erfolgen. Da die Poren der Endothelzellen einer Kapillare durchschnittlich maximal eine Größe von ca. 100 nm aufweisen, dürfen eingesetzte, wasserlösliche Genvektoren nicht größer als dieser Durchmesser sein, um ein ungehindertes Eindringen zu ermöglichen. Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 60 000 Dalton können durch die Poren in den Extrazellularraum gelangen. Ungeladene lipidlösliche Moleküle können durch ihre lipophilen Eigenschaften durch die Kapillarwand diffundieren. Eine dritte Möglichkeit, die Gefäßwand zu überwinden, besteht für Makromoleküle durch Pinozytose (unspezifische, kontinuierliche Aufnahme durch kleine Vesikel), eine spezielle Form der Endozytose (53, 212). Außerdem existieren im Organismus noch weitere **spezielle Barrieren**, wie die Blut-Hirn-, Plazentar- und Blut-Milch-Schranke, die den Zugang zu gewissen Organen zusätzlich erschweren. Im **Gewebe** selbst kann es durch Interaktionen mit **extrazellulären** Glykosaminoglykanen zu Dissoziation von nichtviralen Genvektoren kommen, wodurch die gentherapeutische Zielsetzung gefährdet wird (177). Schließlich sei noch erwähnt, dass bei Transfektionsversuchen mit DNA der **Zustand der Zellen im Zellzyklus** eine Rolle spielen kann: Mitotische (sich teilende) Zellen konnten sich mit nichtviralen Genvektoren leichter transfizieren lassen als ruhende (27).

Aus genannten Gründen wird ersichtlich, dass nicht nur **Vektorgröße, -ladung, -oberfläche** und **-stabilität** eine bedeutende Rolle im erfolgreichen Gentransfer spielen, es gilt vielmehr die **Vektorkonzentration** am Zielort zu erhöhen und gleichzeitig die **Transferzeit** zu verkürzen (s. 2.4.3).

2.3.3 Barrieren der intrazellulären Aufnahme

Ist der Weg bis zum Zielgewebe überwunden, gilt es weitere Hürden in Form von zellulären Membranen zu nehmen.

An erster Stelle muss die negativ geladene **Plasmamembran** der Zielzelle durchdrungen werden. In der Regel geschieht dies durch Endozytose, entweder spezifisch und

rezeptorvermittelt (durch Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran) oder unspezifisch und langsamer durch Phagozytose. Hilfreich ist dabei eine kationische Überschussladung der meisten nichtviralen Vektoren nach der Komplexierung mit DNA oder RNA (243, 251, 258). Da Endozytose einen komplexen Prozess darstellt, bestehend aus Bindung an die Zellmembran, Zelleintritt, Bildung der **Endosomen**, Fusion mit Lysosomen und schließlich Lysis, muss anschließend der in das Endosom eingeschlossene Genvektor aus diesem in das Zytoplasma freigesetzt werden, um nicht von lysosomalen Enzymen abgebaut zu werden (258). Bei der Konstruktion einiger nichtviraler Vektoren versucht man virale Mechanismen der endosomalen Lyse nachzuahmen, indem beispielsweise einzelne virale endosomolytische Proteine oder Peptide (INF 7) synthetisiert und in den Genvektor eingebaut werden, die nur bei einem sauren pH-Wert innerhalb des Endosoms ihre Wirkung entfalten (231, 158). Weiter besteht die Möglichkeit, mithilfe von inaktivierten Adenoviren die endosomale Membran zu durchbrechen. Ein einfacher, aber wirkungsvoller Ansatz nutzt ionisationsfähige sekundäre und tertiäre Aminogruppen von kationischen Polymeren wie PEI (Polyethylenimin): Diese puffern den Effekt der endosomalen Protonenpumpe ab, welche H^+ -Ionen in das Lumen der Endosomen pumpt. Das bedeutet, dass in Gegenwart von PEI im Endosom mehr Protonen in das endosomale Lumen gepumpt werden müssen, um den physiologisch niedrigen pH-Wert zu erreichen. Dies hat einen erhöhten Ionen- und Wassereinstrom (Osmose) zur Folge und führt letztendlich zum Anschwellen und Platzen des Endosoms unter Freisetzung des PEI-DNA-Vektorkomplexes (239, 11, 91).

Im **Zytoplasma** angelangt muss, ähnlich wie bei einem extrazellulären Transport, die Stabilität des Genvektors gegenüber Nukleasen bzw. sich selbst (Aggregation) gewährleistet sein. Hier ist zumindest für gentherapeutische Interventionen mit siRNA der Zielort für den Ablauf weiterer Wirkungsmechanismen erreicht (s. 2.5.2).

Mit DNA beladene Genvektoren müssen hingegen eine letzte Barriere überwinden, bevor sie im Zellkern in messenger RNA übersetzt werden und im Zytoplasma die Proteinbiosynthese stattfinden kann: die doppelte **Kernmembran**. Dies kann einerseits über die Zellkernporen von ca. 10 nm Durchmesser durch aktiven, von zytoplasmatischen Transportproteinen gesteuerten (größere Moleküle) (235) oder passiven (162) Transport geschehen, wobei die Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Andererseits besteht die Möglichkeit des Einschleusens von exogener DNA in den Zellkern während der Zellteilung und der damit verbundenen Auflösung der Zellkernmembran. Im Zellkern selbst kann die transferierte DNA als Episom extrachromosomal vorliegen, wodurch die Expression des Transgens nur temporär (transient) mit einem Expressionspeak zwischen 12 und 72 Stunden anhält, da bei der

nächsten Zellteilung die Plasmid-DNA weiter verdünnt wird (27, 45). Für eine stabile Langzeitexpression ist es erforderlich, das therapeutische Gen in das Wirtszellgenom zu integrieren oder eine episomale Replikation sicherzustellen (10).

Wenn man abschließend die zahlreichen Barrieren extrazellulärer und intrazellulärer Natur betrachtet, so ist es nicht verwunderlich, dass eine **zu niedrige Konzentration von Genvektoren im Zielgewebe** für fehlenden Gentherapieerfolg verantwortlich ist. Es war und bleibt deshalb eine große Herausforderung, diese Hürden bei der Entwicklung von neuen, effizienten Genvektorsystemen zu überwinden bzw. zu umgehen.

2.4 Gentransfer

Seit den Anfängen der Forschung auf dem Gebiet der Gentherapie sind ca. 40 Jahre vergangen (216), in denen eine Vielzahl an Methoden und Techniken entwickelt wurde, den Gentransfer effektiv und medizinisch anwendbar zu realisieren. Wie bereits erwähnt, bedient man sich so genannter Genvektoren oder Genfähren, um Nukleinsäuren gezielt in Zielzellen einzuschleusen. Diese müssen über alle zuvor aufgeführten Barrieren hinweg in der Lage sein, das therapeutische Agens (DNA oder RNA) sicher und unverändert in den Zellkern bzw. in das Zytoplasma zu befördern. Dabei haben sich zwei verschiedene Ansätze entwickelt, die bis heute noch bestehen (55): Einerseits dienen modifizierte Viren als Genvektoren (**viraler Gentransfer**), auf der anderen Seite versucht man mit verschiedenen chemischen und biochemischen Formulierungen das einzubringende Gen zu verpacken und / oder unter Nutzung von physikalischen (178) Verfahren den Transfer zu optimieren (**nichtviraler Gentransfer**).

2.4.1 Vektoren des viralen Gentransfers

Bei viralen Vektoren handelt es sich meist um replikationsunfähige Viren, deren natürlicher Infektionsmechanismus noch funktioniert und für den Transfer eines therapeutischen Gens ausgenutzt wird. Die ungehinderte Vermehrung (Replikation) von Wildtypviren innerhalb der Wirtszelle wird durch den Austausch von den für die Replikation notwendigen Wildtyp-Genen durch das zu transportierende therapeutische Gen verhindert. Im optimalen Fall wird das gentechnologisch veränderte Virus das infizierte Gewebe auch nicht nachhaltig schädigen (8). Hauptsächlich kommen **Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren** und

Herpesviren zum Einsatz. Von den Genannten soll im Folgenden nur ein kurzer Einblick in Retroviren gegeben werden, da sie in Vorarbeiten eigener Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Retroviren

Zu der Familie der Retroviren gehören nach neuer Systematik 7 Genera, unter anderem das Genus Lentivirus beispielsweise mit seinem Vertreter des humanen Immunschwächevirus HIV (Erreger von AIDS), und verschiedene weitere Genera wie die Erreger von Leukämie oder Sarkomen der Katzen und Mäuse. Der Familienname besagt, dass alle Vertreter dieser Gruppe das Gen für das virusspezifische Enzym **Reverse Transkriptase** (RT) besitzen und teilweise onkogene Wirkung (Induktion einer Tumorgenese) haben. Membranhülle, einzelsträngige RNA-Viren benutzen die RT, um ihre genomische RNA in eine doppelsträngige DNA umzuschreiben, die mithilfe eines zweiten Enzyms (**Integrase**) kovalent in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird. Das bedeutet, dass nach einem einmaligen Infektionsereignis eine lebenslange Viruslatenz besteht (174).

Hier wird ein großer Vorteil der Virusfamilie ersichtlich, der andererseits auch ein biologisches Risiko beinhaltet: Ersetzt man die für die Replikation notwendigen genetischen Elemente durch Einfügen eines therapeutischen Gens, so kommt es zu einer **stabilen** Wirtszell**integration** und zu einer **Langzeitexpression** (8). Die Limitationen für die praktische Anwendung der Retroviren sind deren Stabilität, der niedrig anzüchtbare Titer und das genannte biologische Risiko. Außerdem verursacht die Einhaltung der damit verbundenen Sicherheitsvorschriften hohe Kosten. Ein weiterer Nachteil dieser Virusfamilie ist – ausgenommen bei den Lentiviren – die Fähigkeit, nur Zellen, die sich im Stadium der Teilung befinden, zu transduzieren (virales Einschleusen von Fremdgenen). Eine therapeutische Transduktion von nicht oder kaum proliferierenden Zellen wie Neuronen oder Hepatozyten ist dagegen beinahe aussichtslos (3). Lentivirale Vektoren sind sehr wohl in der Lage, nicht teilende Zellen zu transduzieren (33). Das Risiko der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren, die die Zielzelle negativ transformieren und damit zu einer Tumorinduktion im Patienten führen können, muss für klinische Anwendungen noch minimiert werden.

Insgesamt dürfen bei den leistungsfähigen viralen Genvektoren Nachteile wie Zytotoxizität, Immunstimulation, mögliche Erlangung der Replikationsfähigkeit und weitere vektorabhängige Probleme (beschränkte Verpackungskapazität, aufwendige Herstellung) nicht aus den Augen verloren werden.

2.4.2 Vektoren des nichtviralen Gentransfers

Die Suche nach sicheren und kostengünstigeren Alternativen zu viralen Genvektoren führte zur Entwicklung einer Vielzahl an Methoden chemischer und physikalischer Natur. Man versucht virale Funktionen, die die natürlichen Transportmechanismen der Zelle nutzen, durch Kombination von verschiedenen Polymer- oder Lipidkomponenten mit Plasmid-DNA nachzuahmen. Diese Wege werden als nichtvirale Gentransfermethoden bezeichnet (178).

Folgende Einteilung soll einen Überblick über die wichtigsten der zahlreichen Methoden verschaffen:

1. Chemische Methoden
 - Calcium-Phosphat-Präzipitation
 - DEAE-Dextran-Präzipitation
 - Chloroquin
 - Glycerin (membranpermeabilisierend)
 - Dimethylsulfoxid (DMSO)
2. Physikalische Methoden
 - Mikroinjektion
 - Elektroporation
 - Sonoporation
 - Partikelbombardierung („Gene Gun“)
 - Magnetofektion
3. Polyfektion
 - Poly-L-Lysin und Polylysinderivate
 - Polyethylenimin (PEI)
 - Polyamidoamin-Dendrimere
 - Polykationische Peptide
4. Lipofektion
 - Kationische Lipide
 - Liposomen

Im Folgenden soll vor allem ausführlicher auf die (neuesten) Entwicklungen von kationischen Polymeren (Polyplexe), Liposomen und kationischen Lipiden (Lipoplexe) und Trägermaterialien wie Microbubbles (und Sonoporation) und Nanopartikel (Magnetofektion) eingegangen werden.

2.4.2.1 Kationische Polymere

Polykationen kondensieren aufgrund der elektrostatischen Interaktion ihrer positiven Ladungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuremolekülen zu kleinen, vektorgeeigneten Partikeln im Nanometerbereich (50 – 100 nm; siehe **Abb. 1**)

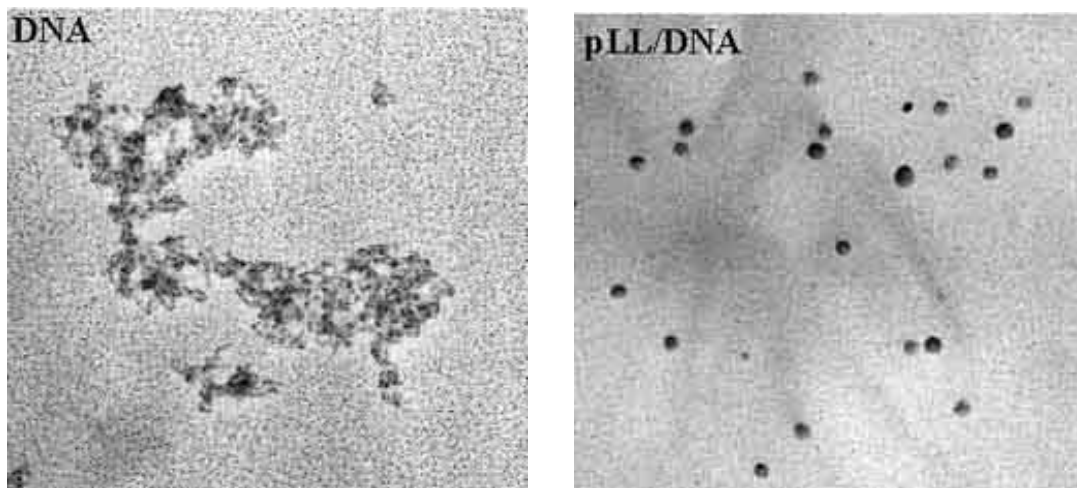
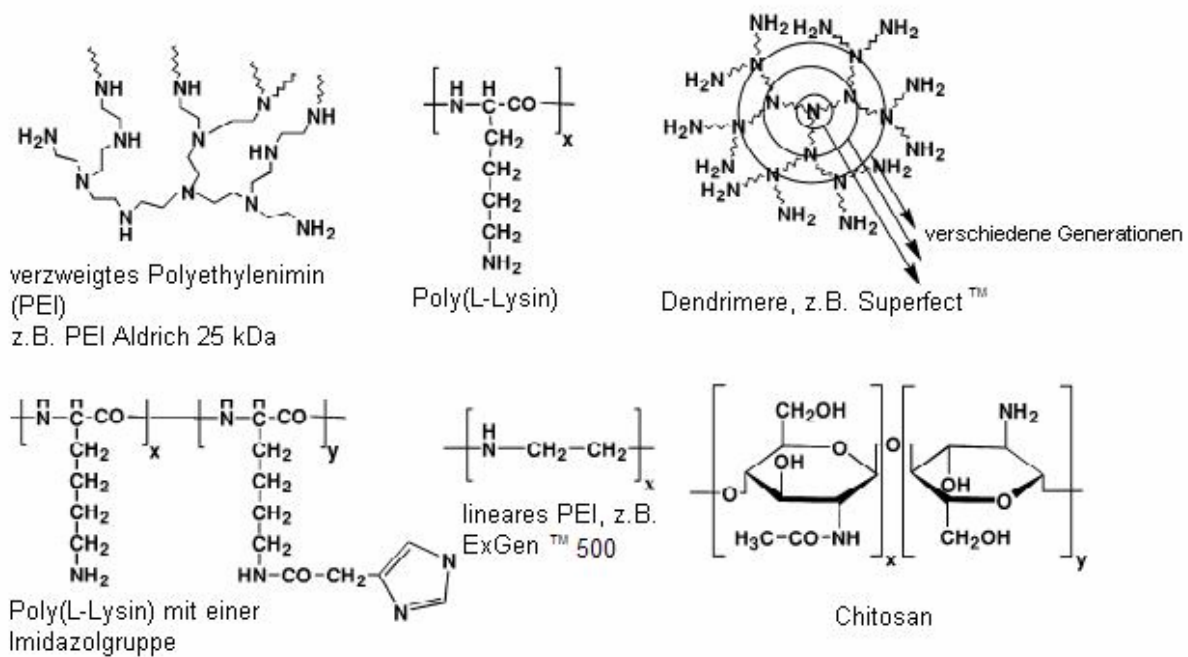


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DNA und Polylysine-DNA-Komplexen vor (links) und nach (rechts) der Kondensation (aus BRACHA (16))

Um eine vollständige Kompaktierung zu erreichen, wird meist ein Überschuss an Polykation in Bezug auf das Ladungsverhältnis, oft auch N : P-Verhältnis genannt (Verhältnis des positiv geladenen Stickstoffs im Polymer zu der negativ geladenen Phosphatgruppe im Nukleotid), eingesetzt. Die entstehenden positiv geladenen Nanopartikel können alleine durch elektrostatische Interaktionen an Zelloberflächen binden und dann endozytotisch aufgenommen werden (96, 114). Die Freisetzung aus dem Endosom geschieht in der Regel durch verschiedene pH-abhängige Mechanismen, wie die Beispiele von PEI und INF7 unter 2.3.3 zeigen. Die genauen Vorgänge, die zu einer Überwindung der Kernmembran führen, werden noch erforscht, wobei z. B. die Koppelung von Genvektoren an Kernlokalisationspeptide geeignet sein könnte (236). Der Transfektionserfolg, die Größe und die Löslichkeit von derartigen Genvektoren hängen eng mit dem genannten N/P-Verhältnis zusammen (83, 24, 241). Einen kurzen Überblick über gängige kationische Polymere gibt Abb. 2.

Abb. 2: Oft benutzte kationische Polymere für den Gentransfer (modifiziert nach MERDAN (133))



Zu den am meisten verbreiteten und untersuchten Polymeren gehört **Polyethylenimin (PEI)**, das in der Lage ist, auch große DNA-Moleküle effektiv zu komplexieren (≤ 100 nm) und vor dem Abbau durch Endonukleasen zu schützen (133, 91). Es wird häufig als stark verzweigtes Molekül mit hohem Molekulargewicht eingesetzt, wie z. B. das 25-kDa-PEI der Firma Aldrich oder das 800-kDa-PEI von der Firma Fluka, wobei neben sehr guten Transfektionserfolgen die hohe Toxizität (bedingt durch die hohe Ladungsdichte und das hohe Molekulargewicht) den limitierenden Faktor für eine Anwendung in vivo darstellt (51). Leider zeigen PEI-Polymere mit niedrigem Molekulargewicht bei geringerer Toxizität auch schlechtere Transfektionseffizienz. Eine weniger toxische Alternative steht unter dem Handelsnamen ExGen™ 500 (Euromedex, Frankreich) in Form von linearem PEI zur Verfügung. So konnten Ferrari et al. erfolgreich Lungenepithelzellen von neugeborenen und adulten Kaninchen mit den Reportergenen für Luciferase und β -Galactosidase transfizieren, ohne dass histopathologische Anzeichen einer Entzündung zu erkennen waren (47). Ein weiterer Vorteil von unverzweigten PEI-Polymeren ist die Möglichkeit, Gentransfer unabhängig vom Zellstatus auch in langsam teilende Zellen zu erzielen (258).

Poly(L-Lysin), ein Polymer mit Peptidstruktur, war eines der erstverwendeten Polymere im nichtviralen Gentransfer zusammen mit vielen seiner Derivate (251). Ideale Polylysine-DNA-Komplexe sind ca. 100 nm groß (je nach N : P-Verhältnis und Molekulargewicht) und werden

ähnlich effektiv in Zellen internalisiert wie Komplexe aus PEI und DNA. Die Effektivität des erstgenannten Vektorsystems ist jedoch um ein Vielfaches geringer (134). Die Genexpression konnte aber durch die zusätzliche Verwendung von endosomolytischen Substanzen (z. B. Chloroquin) (163) oder fusogenen und rezeptorgekoppelten Peptiden (z. B. Koppelung eines Peptids, kodierend für eine membranzerstörende Untereinheit, das Haemagglutinin HA-2 des Influenzavirus an Transferrin-Polylysin-DNA-Komplexe) (231) erhöht werden.

Weiter spielen **Aminopolysaccharide** wie Chitosan (Bestandteil des natürlich in der Schale von Krebstieren vorkommenden Biopolymers Chitin) eine interessante Rolle als Genvektoren. Unter Chitosan werden alle Polymere zusammengefasst, deren Grundgerüst aus zwei Untereinheiten (D-Glucosamin und *N*-Acetyl-D-Glucosamine) besteht, die durch eine $\beta(1, 4)$ -glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihr Molekulargewicht und ihren Deacetylierungsgrad (40 % – 98 %) (104). Maximale DNA-Bindung erhält man bei einem N : P-Verhältnis von 3, wobei maximale Transfektionseffizienz bei einem 5 : 1-Verhältnis erreicht wird und pH-abhängig ist. Bei einem sauren pH-Wert zwischen 6 und 7 sind die biokompatiblen Chitosan-DNA-Komplexe positiv geladen und können durch elektrostatische Wechselwirkung an die negative Membran von Zellen binden. Dies versucht man sich bei der Therapie von Tumoren zu Nutze zu machen, da der extrazelluläre pH-Wert im Tumorgewebe oft niedriger ist als im gesunden Gewebe. Größtmögliche Stabilität im Serum bieten Chitosan-Polymere mit einem Molekulargewicht zwischen 32 und 102 kDa (104). Erwähnenswert ist noch die Kinetik der Genexpression, die jeweils abhängig von der Zelllinie ist und sich signifikant von der des Polyethylenimins unterscheidet: Wird die maximale Genexpression bei PEI-DNA-Komplexen nach 24 bis 72 Stunden erreicht, so beträgt sie nach Chitosan-DNA-Transfektion in HeLa-Zellen 72 bis 96 Stunden, in 293-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) sogar 6 Tage. Verantwortlich dafür ist vermutlich die langsame Freisetzung des Plasmids vom physikalisch äußerst stabilen Chitosan-Komplex, was zu einem annähernd guten Erfolg wie bei Transfektionen mit PEI führen kann (104, 42).

Schließlich zählen zu der Gruppe der kationischen Polymere für den Gentransfer noch **Dendrimere**, eine Gruppe von sphärischen, stark verzweigten Polymeren, deren Struktur ähnlich der des PEI von einer Vielzahl von Aminogruppen gekennzeichnet ist. Während die Aminogruppen, die sich an der Außenseite des Polymers befinden (terminale, primäre Aminogruppen), mit der Nukleinsäure kondensieren, puffern die Aminogruppen im Inneren

des Moleküls den sauren pH-Wert im Endosom ab (gleiches Prinzip wie bei PEI-DNA-Komplexen), was wiederum zu einer effektiven Freisetzung des Komplexes aus dem Endosom führt. Häufig benutzt werden Dendrimere, die divergent synthetisiert (Startpunkt ist ein zentrales Kernmolekül) werden und zur 6. Generation der so genannten Polyamidoamine-Dendrimere (PAMAM) gehören, wie z. B. Polyfect[®] oder Superfect[®] (Starburst[™]) (133). Obwohl wenige vergleichbare Transfektionsversuche mit ähnlichen Voraussetzungen existieren (gleiche Zelldichte, DNA-Dosis, Zellkulturmedium und Inkubationszeit, optimiertes N/P-Verhältnis), zeigte die Dendrimer-Formulierung Superfect[®] in einer Studie von Gebhart und Kabanov im Vergleich zu verzweigtem PEI (25 kDa, Aldrich) eine 3,5-mal höhere Gentransfereffizienz in Cos-7-Zellen (Nierenfibroblasten von Affen) bei relativ geringer Toxizität (ca. 16 %) (56). In dieser Studie belegte Superfect[®] in der Liste der effektivsten Transfektionsreagenzien bei letztgenanntem Zelltyp Platz 1. Insgesamt nahm sie bei 10 getesteten Zelllinien direkt nach linearem PEI (ExGen[™] 500, 22 kDa) die zweitbeste Stellung ein.

Die Zahl endozytotisch aufgenommener Polyplexe kann deutlich durch Einbau einer rezeptorbindenden Einheit (Ligand) in den Genvektor verbessert werden, wie erstmals 1987 der erfolgreiche spezifische Gentransfer in Hepatozyten durch Bindung von Asialoorosomukoid (Glykoprotein) an Poly-L-Lysin-DNA-Komplexe zeigte (244). Auch Wagner et al. griffen das Thema **rezeptorvermittelter Gentransfer** auf, indem sie Transferrin als Ligand für die Ansteuerung von Tumorzellen verwendeten, die Transferrin-Rezeptoren überexprimieren (230). Inzwischen wurde für den spezifischen Gentransfer eine Reihe weiterer vielversprechender Rezeptor-Liganden untersucht: Folsäure als Ligand für unterschiedliche Tumorzellen (61, 110, 109), Zucker-Liganden (Galactose, Mannose, Lactose) zur Ansteuerung von Hepatozyten (160, 120, 137) bzw. Lungenepithelzellen (102, 44), außerdem verschiedene Wachstumsfaktoren (EGF, VEGF, FGF) (94, 176) und synthetische Peptide (41, 210). Auf diese Weise gelingt mittlerweile in unterschiedliche Zielzellpopulationen ein verbesserter Gentransfer in Bezug auf die Spezifität.

2.4.2.2 Lipide

Struktur und Vertreter

Seitdem Felgner et al. 1987 als Erste über die Verwendung des kationischen Lipids DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid) als Genvektor berichteten, sind viele verschiedene kationische Lipide für den Gentransfer synthetisiert worden (46). Aufgrund der Ladungsinteraktion bilden Nukleinsäuren mit kationischen Lipiden Komplexe, wobei mehrere Nukleinsäuren an den Partikel-ähnlichen Komplexen beteiligt sein können und durch die Lipide effektiv vor mechanischen und enzymatischen Schäden geschützt sind (233).

Das Grundgerüst der kationischen Lipide besteht aus 3 Domänen, welche dem Molekül einen **amphiphilen** Charakter verleihen: aus einer positiv geladenen polaren Kopfgruppe, einer hydrophoben (unpolaren) Kette und aus einem Linkermolekül, welches die polare Region mit der unpolaren verbindet.

Bei der **hydrophoben Kette** unterscheidet man zwischen zwei großen Gruppen: aliphatische Kohlenwasserstoffketten oder Ketten bestehend aus Cholesterol bzw. aus seinen Derivaten. Bei den aliphatischen Kohlenwasserstoffketten haben sich die einfachen Ketten im Gegensatz zu den zweifachen als weniger effektiv im Gentransfer und toxischer erwiesen (69). Problematisch bei Cholesterolabkömmlingen (z. B. DC-Chol) ist deren inhibitorische Wirkung auf das Enzym Protein Kinase C (PKC, regulatorische Funktion bei der zellulären Signaltransduktion), was wahrscheinlich mit ein Grund für deren toxische Wirkung ist. Kawakami et al. konnten jedoch durch Synthese von 3 neuen Cholesterol-Derivaten mit Galactosidrest (Gal-C4-Chol, Gal-C2-Chol, Gal-C6-Chol) humane Hepatoma-Zellen (Hep G2) erfolgreich bei nur geringer Toxizität transfizieren (88).

Die **hydrophilen Kopfgruppen** bestehen meist aus primären, sekundären, tertiären Aminogruppen oder quartären Ammoniumsalzen. Guanidin- und Imidazol-Gruppen haben sich ebenfalls bewährt. Da tertiäre und quartäre Aminogruppen ebenfalls die PKC-Aktivität behindern, versucht man die positive Ladung dieser Gruppen innerhalb der Kopfgruppe zu verteilen: Daraus resultierende kationische Lipide mit einem heterozyklischen Ring (Imidazol-, Pyridin-Ring) zeigen im Vergleich zu klassischen Transfektionssystemen eine höhere Effektivität bei gleichzeitig geringerer Toxizität (79). Ilies et al. konnten mit einem Pyridin-Lipid (1-(2,3-Dioleoyloxypropyl)-2,4,6-Trimethylpyridin lipid, 20c) verschiedene Krebszelllinien mit gleicher oder besserer Effektivität transfizieren als mit DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropanchlorid) (78).

Oben genannte **Linkermoleküle** können Ether-, Ester- oder Amidgruppen sein. Während Lipide mit Etherlinkern bessere Transfektionseffektivität zeigen, wirken sie aufgrund ihrer Stabilität und folglich schlechten biologischen Abbaubarkeit in der Zelle toxisch. Besser abbaubar und weniger toxisch sind veresterte Lipide wie z. B. DOTAP (69). Berichtet wird auch von Carbamat-verlinkten Lipiden, die nach systemischer Gabe im Blutstrom stabil sein sollen und von denen erwartet wird, dass sie intrazellulär im Endosom durch den erniedrigten pH-Wert zerfallen und die DNA freigegeben können (123).

Geometrie und Lipofektion

In einer wässrigen Phase können kationische Lipide verschiedene strukturelle Phasen einnehmen, abhängig von dem Verhältnis von der Ausdehnung der hydrophoben Gruppe im Vergleich zu der der hydrophilen Kopfgruppe. Mit Hilfe des Verpackungsparameters (P)

$P = v / a l_c$ (v = Volumen des Hydrocarbons, a = effektive Kopfgruppe, l_c = kritische Länge des Lipidschwanzes) kann die Geometrie der Lipide vorausgesagt werden. Möglich ist eine Anordnung in Form von **Micellen** (bei $P < 0.5$), eine lamellare Struktur (**Bilayer**, wenn $0,5 < P \leq 1$) oder eine invertierte hexagonale Phase ($P > 1$), welche die Zellmembran destabilisieren kann und so zu einer Internalisierung des Lipoplexes führt (233, 72). Von **Liposomen** spricht man, wenn sich unter Ultraschalleinfluss aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten (hydrophile Köpfe zeigen jeweils zur Wasserseite, im Inneren stehen sich die hydrophoben Ketten gegenüber) aufgrund der Oberflächenspannung sphärische Vesikel bilden, die zwischen 20 nm und 100 μm groß sind und einen wässrigen Innenraum besitzen. So genannte Helfer- oder **Co-Lipide** sind neutrale Lipide wie DOPE (1,2-Dioleoylglycero-3-Phosphoethanolamin), DOPC (1,2-Dioleoylphosphatidylcholine) und Cholesterin (69) oder Oligopeptide (218), die häufig in equimolaren Mengen bei der Transfektion mit Lipiden (**Lipofektion**) verwendet werden. Sie stabilisieren den Komplex und erleichtern die Fusion mit der Zellmembran bzw. destabilisieren die Endosomenmembran. DOPE scheint die Umwandlung der kationischen Lipide von der Lamellenstruktur in eine hexagonale Geometrie zu begünstigen (14, 32) und gleichzeitig die Bindung zwischen dem kationischen Lipid und der DNA zu lockern (unter anderem durch eigene Bindung an die DNA), was in einer erhöhten Transfektionseffektivität resultiert (263).

Da die Nukleinsäure üblicherweise mit einem Überschuss an positiv geladenen Lipiden komplexiert wird, kann der Komplex durch elektrostatische Wechselwirkung an die negativ geladene Zelloberfläche binden. Die Internalisierung geschieht vermutlich über verschiedene Formen der Endozytose (233): Beschrieben sind Clathrin-abhängige Endozytose (97), Endozytose über Caveolae (147) und Macropinocytose (29), wobei die Größe des Komplexes

eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So fanden Rejman et al. heraus, dass Partikel bis zu einer Größe von 250 nm beinahe ausschließlich über Clathrin-abhängige Endozytose in die Zelle gelangen, während größere Partikel (500 nm) über Caveolae (sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran) aufgenommen werden (169, 170). Die Freisetzung der DNA/RNA aus dem Endosom wird vermutlich durch zwei Mechanismen bewerkstelligt: Einerseits diffundieren negativ geladene Lipide wie Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Endosomenmembran in den Lipoplex und konkurrieren mit der Nukleinsäure um die Bindung an den kationischen Lipiden. Dadurch wird sowohl die Endosomenmembran, als auch der Lipoplex destabilisiert. Andererseits führt auch der niedrige pH-Wert im Endosom zu einer Destabilisierung des Komplexes (111, 261). Neuere Verfahren setzen zusätzlich pH-sensitive Polymere oder Peptide ein, um eine verbesserte Freisetzung ins Zytoplasma zu erzielen (158,116). Die Aufnahme von DNA in den Zellkern ist noch weitgehend ungeklärt. Höchst wahrscheinlich findet sie aber ohne Assoziation mit kationischen Lipiden statt (69).

Eine nicht zu unterschätzende Rolle bei Anwendung der Lipofektion in vivo spielt das Serum mit seinen Bestandteilen. Es wurde gezeigt, dass Serum in der Lage ist, lipidgekoppelten Gentransfer einzuschränken bzw. gänzlich zu verhindern, indem negativ geladene Serumbestandteile an den positiven Lipoplex binden und dessen Interaktion mit der Zellmembran stören (9, 262). Die Bindung an Albumin beispielsweise kann zu einer kompletten Ladungsumkehr des Lipoplexes führen (31). Diskutiert wird auch über eine mögliche Penetration des Serums in den Lipoplex und Interaktion mit der gebundenen Nukleinsäure, was zu einer Entwindung der DNA und ihrem Erscheinen / Hervorragen an der Oberfläche des Komplexes führen soll, was wiederum den Lipoplex-Zellkontakt stört (262). Lipoproteine wie LDL oder HDL interagieren ebenfalls mit Lipoplexen (aus DOTAP oder Vectamidin) und deren Lipide vermischen sich mit denen des kationischen Komplexes (214). Hüllpolymere bestehend aus Peptiden (z. B. YE5C) und Polyethylenglycol (PEG), wie sie in der Arbeitsgruppe Plank synthetisiert werden, können vor Angriffen von Serumproteinen auf Polyplexe (PEG-PEI-DNA) und Aktivierung des Komplementsystems schützen. Ähnlich verhält es sich mit PEG-Lipid-Analoga, die, in Lipoplexe eingebaut, ein frühes Erkennen und den Verdau durch Makrophagen verhindern können (201, 171). Mit PEG modifizierte Liposomen, so genannte „lang zirkulierende Liposomen“, zeigen eine verlängerte Zirkulation im Blut ($t_{1/2} > 48$ Stunden) und sind in dieser Formulierung bereits unter der Handelsbezeichnung Doxil® (Fa. Alza, Medikament zur Behandlung von Ovarialtumoren) oder Visudyne® (Fa. Novartis, zur Behandlung der altersbezogenen Makuladegeneration AMD) für die klinische Anwendung zugelassen (149).

Von einem erfolgreichen selektiven siRNA-Transfer in Leberparenchymzellen von Mäusen mit galaktosylierten Liposomen berichten Sato et al. : Nach intravenöser Injektion von 0,18 - 0,36 nmol / g Ubc13-siRNA (Ubc ist ein endogenes Gen der Leberparenchymzellen) gebunden an Gal-C4-Chol / DOPE Liposomen (N : P-Verhältnis = 2,3 : 1) konnte die Ubc-Genexpression in der Leber bis zu 60 % reduziert werden (182). Dabei stiegen die Leberenzymwerte ALT und AST (Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase; erhöhte Mengen im Blut deuten auf eine Leberschädigung, beispielsweise eine Entzündung hin) nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Gruppe an. Weiter existieren zahlreiche andere Veröffentlichungen über erfolgreichen siRNA-Transfer (v. a. in die Leber) in vivo mit PEG-modifizierten Liposomen (182). Auch konnten Kim et al. durch intranasale Instillation einer stabilen kationischen DNA-Lipid-Emulsion (Ölphase: 2 g Sojabohnenöl, 0,16 g DOTAP, 0,08 g DOPE, 0,08 g PEG₂₀₀₀ PE; Wasserphase: 0,45 g Glycerol in 20 ml Wasser) 3- mal höhere Transfektionsergebnisse in murinen Epithelzellen der Nasenhöhle nachweisen als mit kommerziell erhältlichen lipidhaltigen Transfektionsreagenzien (Lipofektin[®] bzw. Lipofectamine[™], Invitrogen GmbH, Karlsruhe) (92).

2.4.2.3 Microbubbles und Ultraschall

Definition und Einteilung von Microbubbles

Unter Microbubbles versteht man mit Gas oder Luft gefüllte Mikrobläschen in einer wässrigen Lösung. Sie wurden ursprünglich für die Anwendung als **Kontrastmittel** bei der **Ultraschalldiagnostik** hergestellt: In die Blutbahn injizierte Suspensionen von Microbubbles im Mikrometerbereich (0,5 – 10 µm) stellen ideale Ultraschallreflektoren dar, mit deren Hilfe beispielsweise Erkrankungen des Blutgefäßsystems in verschiedenen inneren Organen (z. B. im Herzen) festgestellt werden können (124, 217, 118).

In den letzten Jahren wird der Einsatz von solchen Microbubbles in Kombination mit Ultraschall als Möglichkeit einer kontrollierten Therapeutikafreisetzung intensiv diskutiert (253, 196, 197). Den schematischen Aufbau am Beispiel eines Phospholipid-Microbubbles zeigt Abb.3.

Für eine systemische Anwendung am Menschen oder am Tier sollten die Mikrobläschen eine Größe von 5 - 7 µm nicht überschreiten, um die Gefahr einer Verstopfung der Kapillaren zu vermeiden. Die **erste Generation** von Microbubbles, die mit **Luft** gefüllt war, hatte einen entscheidenden Nachteil: Die Mikrobläschen waren nicht stabil genug um in der Blutbahn längere Zeit zu zirkulieren. Die Luft diffundierte ins Blut, was einen Kontrastverlust des

Ultraschalls bzw. Verlust des Medikamenten- / Genträgers bedeutete (124). Man begann eine (Schutz-) **Hülle** zu entwickeln, bestehend aus (Phospho-)Lipiden, denaturierten Proteinen (z. B. humanes Serumalbumin), Surfactant oder synthetischen Polymeren, welche die Mikrobläschen für eine gewisse Zeit im Organismus stabilisieren (226, 124).

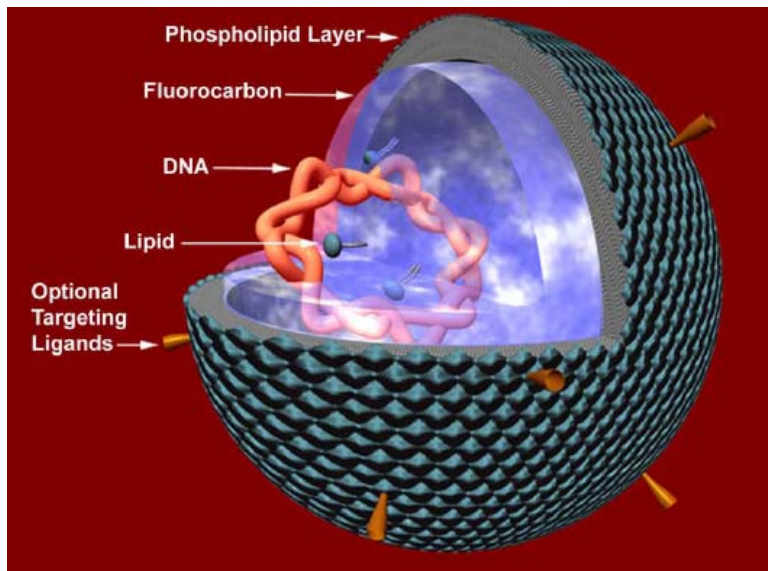


Abb. 3: Aufbau eines Perfluorocarbon-Gencarriers (Microbubble) nach UNGER (224)

Die äußere Hülle wird durch ein amphiphatisches Lipid stabilisiert. Eine Bindung von spezifischen Liganden (z. B. Transferrin) an die Kopfgruppen des Lipids ist möglich. Das genetische Material (hier die DNA) liegt zentral im Microbubble in kondensierter Form vor und ist durch kationische Lipide stabilisiert. Das Gas befindet sich innerhalb der äußeren Membran.

Da die Luft bzw. der Stickstoff dieser behüllten Microbubbles ebenfalls relativ rasch ins Blut diffundiert, beinhaltet die **zweite Generation** von Microbubbles **Perfluorocarbon** (PFC) als **Gas**, das durch seine geringe Wasserlöslichkeit und ausreichende Flüchtigkeit den Mikrobläschen mehr Stabilität verleiht: Sowohl Perfluoropropan (C_3F_8), als auch Perfluorobutan (C_4F_{10}) sind in Wasser nahezu unlöslich und liegen unterhalb der Raumtemperatur als Gas vor. Die kommerziell erhältlichen Kontrastmittel Definity® und Optison® sind mit Perfluoropentan (C_5F_{12}) gefüllt, das bei Zimmertemperatur flüssig ist, ab 29,5 °C jedoch in den gasförmigen Zustand wechselt (226). Eine Übersicht über einige kommerzielle Ultraschallkontrastmittel und ihre Zusammensetzung gibt **Tab. 1**.

Tab. 1: Vergleich verschiedener Ultraschall-Kontrastmittel (modifiziert nach LIU (124))

Produktname	Durchschnittliche Bubble Größe (Bereich)	Gas	Zusammensetzung der Hülle	Zerstörung der Microbubbles
Albunex	4,5 µm (1-10 µm)	Luft	Albumin	möglich
Levovist	2-3 µm (2-8 µm)	Luft	u. a. Galactose	möglich
Echogen	2-5 µm (1-30 µm)	Perfluoropentan	Stabilisiertes Surfactant	nicht möglich
Optison	4,7 µm (1-10µm)	Perfluoropentan	Albumin	möglich
Definity	1,5 µm (1-10 µm)	Perfluoropentan	Phospholipide	möglich
Sonovue	2,5 µm (1-10 µm)	Sulfurhexafluorid	Phospholipide	möglich
AI-700	2 µm	Perfluorocarbon	Synthetisches Polymer	nicht möglich

Neueste Kompositionen sind so genannte **PFC Nanoemulsionen** bestehend aus einer Bubblehülle gefüllt mit einem flüssigen Perfluorocarbon, welches unter bestimmten Temperaturbedingungen den Übergang von der flüssigen in eine gasförmige Phase vollzieht. Solche PFC-Nanoemulsionen erregen nicht nur wegen ihrer Größe – im Vergleich zu Microbubbles (im Durchschnitt 1 µm) können PFC Nanoemulsionen durchschnittlich mit einer Größe von nur 200 nm hergestellt werden – großes Interesse als **Gentransfersystem**. So konnten Unger et al. mit FluoroGene™ Partikeln (ca. 200 nm; bestehend aus Perfluorohexan, verschiedenen Lipiden und DNA) in vitro zwei verschiedene Zelllinien (HeLa und NIH/3T3) um ein Vielfaches effizienter transfizieren als mit kationischen DNA-Liposomen (226).

Der **Transport** kann von sowohl niedermolekularen Substanzen / Medikamenten als auch von hochmolekularen Stoffen wie Nukleinsäuren durch Bindung an Mikrobläschen erfolgen. Dabei existieren verschiedene Möglichkeiten: Das zu transportierende Medikament / Gen befindet sich durch eine kovalente oder nichtkovalente Bindung an der Microbubble **Außenseite** (umgebende Membran / Hülle / „Shell“), wird in die Microbubble**hülle integriert** oder ist **im Inneren** des Bläschens, z. B. innerhalb einer lipidhaltigen Schicht zu finden, siehe auch Abb. 4 (223, 225, 226).

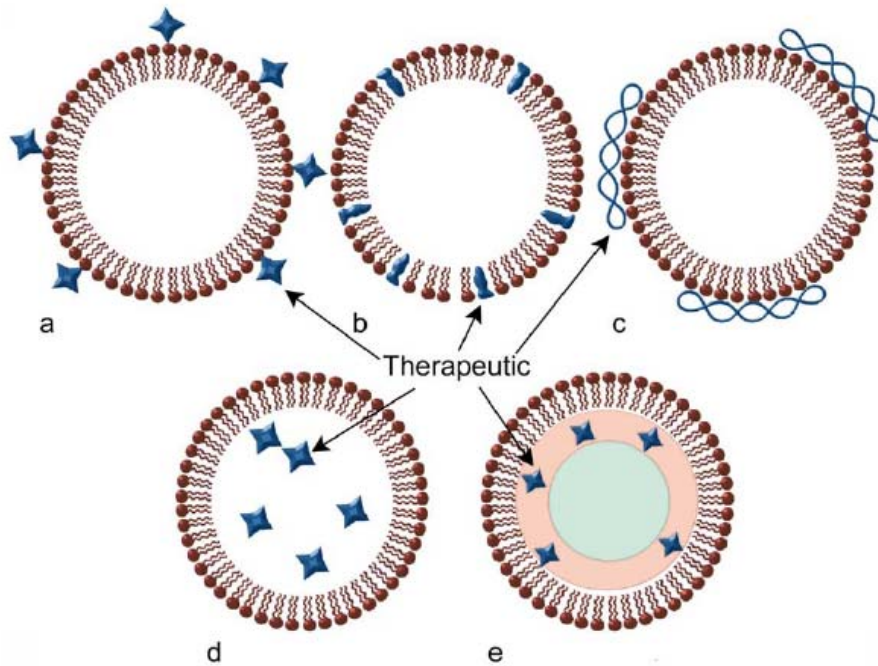


Abb. 4: Verschiedene Möglichkeiten des Medikamententransports durch Microbubbles
aus UNGER (226)

Das Therapeutikum (blau) kann a) außen an die Microbubblemembran gebunden, b) in der Membran eingebettet, c) nicht kovalent an der Microbubble Oberfläche gebunden sein (z. B. DNA), d) innerhalb des Bläschens (Gasschicht) transportiert werden oder e) sich innerhalb des Microbubbles in einer lipidhaltigen Schicht unter der äußeren Membran befinden.

Hinsichtlich der niedrigen Dichte der Microbubbles sind neben einem Einsatz als Ultraschallkontrastmittel und Transportvehikel eine Vielzahl medizinischer Anwendungen denkbar: Sie reichen von ortsspezifischer Anreicherung im Organismus, über die Behandlung von Thromben (Blutpfropf innerhalb eines Blutgefäßsystems) bis zur Ansteuerung der Lunge als Zielorgan. Für einen gezielten Gen- / Medikamententransfer mit anschließend kontrollierter Freisetzung des Therapeutikums spielt die Anwendung von Ultraschallwellen eine bedeutende Rolle (226, 124).

Zusammenspiel von Ultraschall und Microbubbles

Ultraschall (US) zählt zu den gebräuchlichsten Darstellungsverfahren in der Medizin und wird auch therapeutisch angewandt (237). Vorteile von Ultraschall sind:

- kostengünstig
- leicht verfügbar
- portabel
- gewebeschonend
- die Eigenschaft die Permeabilität von Zellmembranen zu beeinflussen.

Unter Ultraschallwellen versteht man Schallwellen oberhalb der menschlichen Hörgrenze mit Frequenzen zwischen 20 kHz und 1 GHz. Für klinische Zwecke (**diagnostischer US**) werden Frequenzen zwischen **1 MHz und 20 MHz** verwendet. Wichtig für die Anwendung ist die Tatsache, dass die Auflösung des Bildes (Fähigkeit zwei nahe beieinander liegende Objekte unterscheiden zu können) mit der Frequenz der US-Wellen positiv korreliert, die Eindringtiefe jedoch negativ. Das bedeutet, dass für die Darstellung bzw. das Erreichen von oberflächlichen Gewebestrukturen hohe Frequenzen verwendet werden. Während sich Ultraschallwellen in Festkörpern und Flüssigkeiten mit geringerer Dämpfung ausbreiten, führt Luft (wiederum stark abhängig von der Frequenz) zu einer starken Dämpfung der Wellen bis hin zur Schallauslöschung (117).

Die Schallwellen werden von unterschiedlich geformten (Linear-, Konvex-, Sektor-) Schallsonden (Transducern) entsendet und nach Empfang des Echos in 2-dimensionale Schnittbilder (**B-mode**, engl.: brightness modulated) mit unterschiedlichen Grautönen (je nach Intensität der Echos) umgewandelt. Mit der **M-mode** (engl.: motion) oder TM-mode (engl.: time motion) Methode lassen sich Bewegungsabläufe (z. B. Bewegungen der Herzklappen) eindimensional darstellen. Seit Anfang des 21. Jahrhunderts sind 3- und 4-dimensionale US-Darstellungen möglich, welche räumliche Standbilder (3D) in Echtzeit (4D) produzieren. Letztendlich können durch Ausnutzung des **Dopplereffekts** (Veränderung der gemessenen Frequenz, wenn Sender (z. B. Sonde) und Empfänger (z. B. Erythrozyt) einer Welle sich relativ zueinander bewegen) die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten im Blutgefäß detektiert und gemessen werden (durch eindimensionale pulse-wave oder continuous-wave doppler / **D-mode** bzw. zweidimensionale Farb-Doppler / **F-mode**) (144).

Microbubbles als Ultraschallkontrastmittel verstärken nicht nur das Dopplersignal wegen ihrer stark **reflektierenden Blut-Gas-Grenzfläche**, sondern schwingen den US-Wellen nach, indem sie sich im Wechsel schnell kontrahieren und wieder ausdehnen als Antwort auf die Druckänderungen der Schallwellen. Dadurch reflektieren sie die Schallwellen um ein Vielfaches mehr als Blutbestandteile und erzeugen verbesserte Signale im B-Mode oder Doppler-US (117). Außerdem werden diese „push“ und „pull“ Effekte für eine verbesserte intrazelluläre Aufnahme des einzuschleusenden Medikaments bzw. Gens verantwortlich gemacht, da pulsierende Microbubbles in direktem Kontakt zu Zellen (bei in vitro Versuchen) durch ständiges Anstoßen an die äußere Zellmembran deren **Permeabilität erhöhen** sollen (208, 99).

Die Tatsache, dass sich viele Microbubbles relativ einfach durch Ultraschallwellen mit höherer Schalleistung (aber noch im diagnostischen Bereich) zerstören lassen, macht diese Art von Trägersystem besonders interessant: Die Anwendung von Ultraschall entsprechender Energie und Frequenz an einem gewünschten Ort führt zur lokalen Freisetzung des gebundenen Therapeutikums nach dessen intravasaler Verabreichung. Treffen Ultraschallwellen auf Microbubbles so führt dies zur **Kavitation** (in der Unterdruckphase einer Schallwelle entstehen Hohlräume bzw. Gasbläschen, die in der Druckphase kollabieren), das Bläschen platzt und setzt folglich das Therapeutikum frei (siehe Abb. 5) (135, 187, 226). Je nach Microbubble-Zusammensetzung und Größe variiert die entsprechende Frequenz und Energie der Ultraschallwellen: Als optimal geeignet für diesen Effekt haben sich **niedrige US Frequenzen** im Bereich um **1 MHz** erwiesen (226, 23).

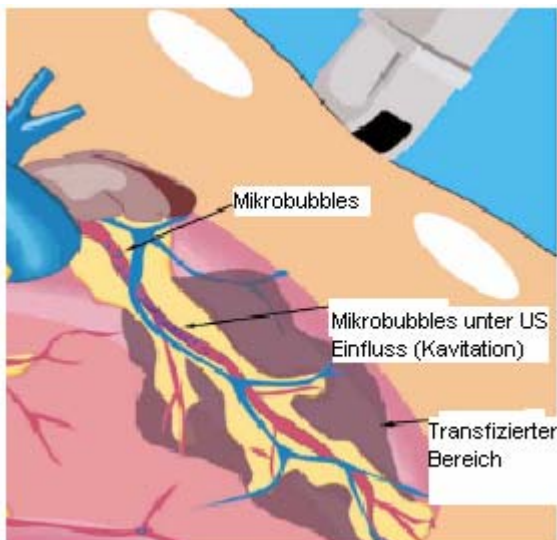


Abb. 5: Schematische Darstellung der Gentherapie am Herzen mithilfe von Ultraschall und Microbubbles:

Die US Sonde wird über dem Herz auf der Brust des Patienten platziert. Nach intravenöser Injektion des Kontrastmittels (ist zugleich Träger des genetischen Materials) verteilen sich die Microbubbles innerhalb des Blutgefäßsystems im Myokard (Herzmuskel), passieren die beschallte Region und setzen ihr genetisches Material bedingt durch Kavitationskräfte innerhalb der myokardialen Kapillaren frei (modifiziert nach LIU (124)).

Von Skyba et al. wurde bereits 1998 gezeigt, dass durch Kavitation kleinste Blutgefäße rupturieren, was eine Erhöhung der Permeabilität der endothelialen Barriere zur Folge hat (194). Diesen Effekt konnten sich Price et al. in demselben Jahr zu Nutze machen, um Nanopartikel und Erythrozyten in das interstitielle Skelettmuskelgewebe von Ratten einzuschleusen (164). Ein weiterer wichtiger Erfolg gelang der Arbeitsgruppe um Hynynen drei Jahre später: Durch transcraniellen US kombiniert mit i. v. Applikation von Microbubbles konnten ursprünglich nicht Blut-Hirn-Schranken (BHS)-gängige Makromoleküle (Gadolinium-DTPA, Fluorescein-Albumin) ins Gehirngewebe von Kaninchen gelangen und durch MRT (Magnet-Resonanz-Tomographie) dargestellt werden (76). Es konnte gezeigt werden, dass hierfür wieder die Kavitation – nicht die durch US erzeugte

Wärme – verantwortlich war, verursacht durch die Interaktion von Microbubbles und US. Histologische Untersuchungen ergaben keine Schäden an den Neuronen, im Gegensatz zu den Tieren, die mit US höherer Leistung und ohne Microbubbles behandelt wurden. Bei letztgenannter Gruppe gelang zwar die **Überwindung der BHS**, aber nur mit gleichzeitiger Schädigung von Gehirnzellen.

Die gewonnene Erkenntnis durch Einsatz von Microbubbles und US die BHS durchdringen zu können, eröffnet weitere potentielle Anwendungen im Bereich der Krebsbehandlung: Bei Patienten mit Gehirnetastasen könnten zukünftig durch zusätzlichen Einsatz von US und Microbubbles bestrahlungssensitive Chemotherapeutika ins Gehirn gelangen und durch anschließende Bestrahlungstherapie aktiviert werden. Denkbar wäre auch die Anwendung im Bereich von neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. bei Alzheimer. Mikrobäschen und US könnten hier den Therapeutika Zugang ins Gehirngewebe verschaffen.

Den wissenschaftlichen Ergebnissen zufolge kann allein die zeitgleiche Anwendung des Therapeutikums in Kombination mit US und Microbubbles ausreichend sein, um eine gewünschte lokale Anreicherung des Agens zu erreichen (226). Das würde eine Bindung des Therapeutikums an den Carrier überflüssig machen und sowohl die Herstellung als auch die medizinische Anwendung vereinfachen.

Microbubbles wurden auch erfolgreich im **Gentransfer** eingesetzt (226, 129, 52, 6, 220). Kombiniert mit US konnten auf diese Art in vitro und in vivo Nukleinsäuren in verschiedene Zelllinien bzw. Gewebe eingeschleust werden (12, 223), unter anderem in Myokardzellen (229, 192), Skelettmuskelzellen (30, 232), Nierenzellen (52, 100), Leberzellen (7) und Korneaepithelzellen bzw. Keratozyten (202).

Interessanterweise zeigen viele in vitro (107, 146, 71) und auch in vivo (7, 71) Studien, dass US alleine den Gentransfer steigert. Der genaue Mechanismus ist bis heute nicht geklärt. Tatsache jedoch ist, dass die Ultraschallenergie Nukleinsäuren bzw. Medikamente in verschiedene Gewebeformen (z. B. obere Hautschichten, Blutgerinnsel) „hineinzwingen“ kann (197), einen direkten Effekt auf die Zellmembranen (Permeabilitätsänderung) hat (187) und letztlich chemische Eigenschaften eines Medikaments verändern kann, beispielsweise eine Aktivierung von lichtsensitiven, vorerst nicht toxischen Haematoporphyrinen, die daraufhin Krebszellen abtöten können (222).

Die US-Einstellungen der verschiedenen Versuchsansätze sind sehr ähnlich und bewegen sich in einem Bereich von 1 bis 3 MHz Frequenz, 0,5 bis 2,5 W / cm² Schallintensität, 20 % bis

50 % Aussteuergrad (oder Tastgrad, engl. „duty cycle“: Verhältnis des eingeschalteten Zustands (Impulsdauer) zur Periodendauer) und einer Applikationsdauer von 5 bis 180 Sekunden (22, 35, 80, 180, 254). Einige Autoren geben zudem den mechanischen Index an: Gebräuchliche Einstellungen bewegen sich zwischen 1,0 und 2,0.

Weiter kann die gezielte Ansteuerung und Visualisierung von spezifischen Organen oder Gewebeformen (z. B. auch Tumorgewebe) durch Einsatz von **ligandengekoppelten Microbubbles** erfolgen (226). Möglicherweise ließen sich z. B. gefährliche Gefäßablagerungen durch Interaktion von – meist an der Bubbleoberfläche gebundenen – Liganden (Phosphatidylserin) mit den entsprechenden Rezeptoren an der Oberfläche von aktivierten Makrophagen und Mastzellen in einem thrombusgefährdeten Gebiet besser darstellen und mit zusätzlicher Anwendung von US (durch Kavitationsenergie) behandeln, um Erkrankungen wie dem Herzinfarkt vorzubeugen (20, 43). Lindner et al. stellten verschiedene ligandengekoppelte Microbubbles her, deren Ziel Integrine wie p-Selectin und $\alpha_v\beta_3$ waren (122) und die sich möglicherweise für die Detektion von Tumoren eignen würden. Diese Art der Tumorvisualisierung und -abgrenzung könnte für einen gezielteren Einsatz weiterer therapeutischer Maßnahmen (wie z. B. den fokussierten Hochintensitätsschall, verwendet in der Krebstherapie zur Koagulation mit anschließender Nekrose des Tumors) von großem Vorteil sein (226).

Neuere Ansätze versuchen die Vorteile von Liposomen mit denen der Microbubbles zu vereinen, um die Transfektionseffektivität weiter zu verbessern.

2.4.3 Magnetofektion™ - eine effiziente Methode des „Drug Targeting“

Eine vielversprechende physikalische Methode für einen zielgerichteten lokoregionären Gen- bzw. Medikamententransfer ist das magnetische „Drug Targeting“. Die **in vitro** durchgeführte **Magnetofektion™** basiert auf der Assoziation von Nukleinsäuren mit beschichteten Eisenoxidnanopartikeln mit einer Größe von 10 bis 1000 nm. Bei Inkubation dieser Komplexe mit den Zielzellen gelangen jene, forciert durch ein starkes Magnetfeld (in Form einer Magnetplatte (z. B. Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagnet) in unterschiedlichen Größen und Feldstärken kommerziell erhältlich), schnell an die Zelloberfläche und können endozytotisch aufgenommen werden (172, 148, 49).

Vorteile dieser Methode sind (159, 172):

- **einfach** durchführbar (Anmischen der Komplexe, Inkubation, Auswertung)
- **zeitsparend** (Sedimentation der Komplexe innerhalb von wenigen Minuten)
- **effektiv** (bis zu 90 % transfizierte Zellen)
- **ökonomisch** (geringe Mengen des Reagenzes ausreichend; kostengünstige Ausrüstung)
- **schonend** (gewebeschonendes Magnetfeld, physiologisch abbaubare Eisenpartikel)
- **vielseitige** Anwendungsmöglichkeiten (DNA, siRNA, mRNA, Oligonukleotide, Viren, Zytostatika, usw.)

Die Bindung zwischen Eisenoxidpartikeln und nicht viralen Genvektoren geschieht im einfachsten Fall durch elektrostatische Wechselwirkung: Eine polykationische Beschichtung der Nanopartikel mit beispielsweise PEI ermöglicht die Bindung von negativ geladener DNA oder RNA (159, 183). Im eigenen Labor gelang es Plank et al. auch positiv geladene Genvektoren mit ebenfalls positiv geladenen Magnetpartikeln zu assoziieren. Die treibende Kraft war hier die salzinduzierte Aggregation, wie unter 2.4.2.1 (PEI) beschrieben (159). Andererseits kann die Bindung auch auf chemischem oder biologischem Weg erfolgen: So wurden Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen (z. B. Biotin-Streptavidin) oder Antigen-Antikörper-Brücken ausgenutzt, um virale Vektoren an Magnetpartikel zu binden (73, 155). Bisher konnten durch Magnetofektion™ in vitro zahlreiche Primärzelllinien unter anderem z. B. humane Endothelzellen der Nabelvene (HUVEC), porcine Aortaendothelzellen (106), humane Keratinozyten (159) und porcine und humane Epithelzellen der Atemwege (57) erfolgreich transfiziert werden.

Erste **klinische** Anwendungen mit Ferrofluiden (Dispersion von sedimentationsstabilen, nanomagnetischen Eisenoxidpartikeln) existieren bereits: Nach intravasaler Verabreichung dienen sie beispielsweise als Kontrastmittel bei der **Kernspintomographie** (145) oder wurden mithilfe eines starken externen Magnetfeldes zur lokalen **Tumorthherapie** mit Zytostatika verwendet (128). Nach Erfüllung ihrer Transportfunktion und Beendigung der Magnetfeldeinwirkung, sind intravasal verabreichte Ferrofluide v. a. in Leber und Milz zu finden, wo sie wie physiologisch aufgenommenes Eisen verstoffwechselt werden (98). Im Bereich der **DNA-Vakzinierung** läuft am eigenen Institut seit 2002 eine veterinärmedizinische Studie zur Immunotherapie beim Fibrosarkom der Katze, bei der die Magnetofektion™ Technologie nach intratumoraler Injektion von Zytokinen der Zurückhaltung letztgenannter im Tumorgebiet dient. Das Ziel der Behandlung ist es, durch

die Expression der Zytokingene das Immunsystem gegen den Tumor soweit zu aktivieren, dass die hohe Tumorrezidivrate (75 % sechs Monate nach der chirurgischen Entfernung (Standardmethode)) reduziert werden kann. Erste Ergebnisse sind vielversprechend: So konnte in einer Phase-I-Studie mit dem humanen GM-CSF-Gen die Rezidivrate auf unter 50 % gesenkt werden (74).

Allgemeines Ziel dieser neuen Technologie ist die spezifische Anreicherung der Ferrofluide in einem bestimmten Körperkompartiment mit anschließender Freisetzung des transportierten Wirkstoffes. Auf **gentherapeutischer** Ebene ergeben sich einige Herausforderungen, die es zusätzlich zu überwinden gilt: So muss eine ausreichend stabile Bindung zwischen dem Genvektor und den Magnetpartikeln einen sicheren Transport zum Zielgewebe gewährleisten, die nach Anreicherung dennoch so labil beschaffen sein muss, dass das genetische Material intrazellulär aufgenommen werden kann. Weiter ist eine ausreichend große Menge und Größe der magnetischen Partikel notwendig, um diese durch ein externes Magnetfeld lenken zu können, andererseits darf die Anwendung zu keinen schweren Nebenwirkungen wie z. B. Gefäßablagerungen im Patienten führen. Außerdem muss die Zugänglichkeit der zu therapierenden Region für Magnetfelder gewährleistet sein: Da die Stärke eines Magnetfeldes mit zunehmenden Abstand zum Polschuh abnimmt, wäre ein Einsatz des magnetischen „Drug targeting“ zur Therapie von oberflächlich gelegenen Organen bzw. Gewebestrukturen (Haut, Gefäße, oberflächliche, solide Tumore) denkbar. Gerade kardiovaskuläre und ischämische Erkrankungen liegen im Fokus des derzeitigen Interesses. Würde es gelingen, durch den gezielten Transfer von Genen kodierend für angiogenetische Faktoren (z. B. VEGF, vascular-endothelial growth factor) die Neubildung von Blutgefäßen in ischämischen Gebieten zu initiieren, so wäre das ein Durchbruch in der Therapie für eine Vielzahl von derartigen Erkrankungen. Weiter könnte diese Methode von großem Vorteil für die Ex-vivo-Gentherapie sein (159), bei der die Zielzellen aus dem Organismus entnommen, mit dem therapeutischen Gen transfiziert oder transduziert und anschließend reimplantiert werden (186).

Die einfache Durchführbarkeit, Transfektionskinetik sowie die Gentransfereffizienz dieser Methode sprechen in der Tat dafür, diese Technologie weiter zu optimieren, insbesondere in Bezug auf die Entwicklung von geeigneten Magneten und Erforschung des physikalischen und biologischen Verhaltens der Ferrofluide. Hierbei ist, wie so oft, interdisziplinäre wissenschaftliche Zusammenarbeit gefragt.

2.5 Bedeutung und Einsatz von siRNA in der Gentherapie

Während in der „Klassischen Gentherapie“ versucht wird, Nukleinsäure in Form von DNA in Zellen einzuschleusen um therapeutischen Nutzen von dem daraufhin exprimierten Protein zu erlangen, wird durch den Einsatz der siRNA eine andere, zur Zeit unter den Wissenschaftlern sehr beliebte Strategie verfolgt: die gezielte **Genabschaltung** im Organismus (**RNA Interferenz**, RNAi) mit Hilfe von einer erst vor Kurzem entdeckten Klasse kleiner, nicht-kodierender Ribonukleinsäuren, so genannten **small interfering RNAs** (siRNAs) (165, 36). Die Entdeckung bzw. Entschlüsselung dieser Methode fand im Jahr 2006 weltweite Beachtung durch die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin an die beiden amerikanischen Genetiker A. Fire und C. Mello.

2.5.1 Schlüsselexperimente und Funktion der RNA Interferenz

Die Anfänge der RNA Interferenz liegen im Jahr 1990, als Napoli et al. (142) und van der Krol et al. (228) beschrieben, dass das Einschleusen eines pigmentproduzierenden Gens in Petunien nicht zum erhofften Erfolg (verstärkte violette Färbung der Blüten) führte, sondern zu einer blassen oder sogar weißen Blütenfarbe. Eine genauere Analyse ergab, dass die mRNA für das „Violettgen“ extrem niedrige Werte aufwies: Es schien, dass das eingeführte Gen das homologe endogene Gen abschaltete. Dieses Phänomen, das die Wissenschaftler vor 20 Jahren noch nicht richtig deuten konnten, wird heute als post-transcriptional gene silencing oder **RNA silencing** bezeichnet (165, 36).

Erst 1998 löften die beiden oben genannten Wissenschaftler Fire und Mello das Rätsel der geheimnisvollen Genabschaltung, als sie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* einzelsträngige RNA, die dazugehörige Antisense RNA und auch doppelsträngige RNA (dsRNA) eines Gens injizierten, welches Muskelkontraktionen verhindert. Dabei war die Wirkung der dsRNA um ein Vielfaches potenter, als die der einzelsträngigen RNA (Sense bzw. Antisense). Außerdem wurde die RNA Interferenz vererbt an die nächste Generation (50). Erste Versuche die RNA Interferenz auch in Säugetier- oder humanen Zellen auszulösen, scheiterten an der Länge der eingebrachten doppelsträngigen RNA-Moleküle: So weiß man heute, dass dsRNA-Moleküle von mehr als 25-30 Basen Länge die Interferonantwort in den Zellen aktivieren, eine unspezifische Immunreaktion gegen Virusinfektionen, bei der die Säugerzellen die Proteinbildung einstellen und die mRNA unspezifisch abbauen (181). Erst 2001 gelang der Arbeitsgruppe um Tuschl die genaue

Aufklärung der RNAi-Technik und deren Einsatz in menschlichen Zellen (38): Sie fanden heraus, dass RNA-Doppelstränge mit einer Länge von 21 bis 23 Basenpaaren, die als small interfering RNAs (siRNAs) bezeichnet werden, die eigentlichen Effektoren der RNA Interferenz sind. Mithilfe synthetisch hergestellter siRNA-Moleküle gelang es Tuschl et al. Gene in Säugetierzellen spezifisch stillzulegen.

Seitdem wurde RNA silencing in einer großen Anzahl von Spezies entdeckt: in Pflanzen, Pilzen (21), Würmern (50, 84), Fruchtfliegen (37, 89), bis hin zum Menschen (38, 136).

Lange Zeit galten Ribonukleinsäuren nur als **mobile Datenträger** der Zelle. Man dachte, dass ihre einzige Aufgabe darin bestünde, die in den Genen enthaltene Erbinformation in Proteine und damit in zelltypische Strukturen und Funktionen zu übersetzen (in Form der messenger RNA). Doch spätestens seit dem Abschluss des Humangenom-Projekts ist klar, dass DNA nur zu einem überraschend kleinen Teil aus Genen und damit Bauanweisungen für Proteine besteht. Rund 97 % der dazwischenliegenden Abschnitte sind nichtkodierende DNA-Sequenzen, von denen einige in RNA übersetzt werden und eine wichtige Rolle bei der **Genregulation** spielen (2). Wann welches Gen abgelesen wird liegt u. a., aber nicht ausschließlich, in der Hand von ca. 1850 Transkriptionsfaktoren (Proteine, die sich an Startsequenzen von Genen binden und dadurch die Proteinbiosynthese in Gang setzen). So schätzt man mittlerweile beim Menschen die Zahl interferierender RNA (microRNA, miRNA), die ebenfalls die Transkription beeinflussen auf mehrere Hundert. Da die regulierenden RNAs bei Säugern, im Gegensatz zu denen in Pflanzen, in der Regel zu vielen mRNAs komplementär sind, kann eine einzige miRNA die Expression mehrerer Gene beeinflussen. Das bedeutet, dass Gruppen verschiedenster Gene gemeinsam reguliert werden können bzw. ein bestimmtes Gen von unterschiedlichen miRNAs gestoppt werden kann. Dies führt zu einem komplexen Mechanismus der Genregulation, der hauptsächlich der Feinabstimmung dient (165, 2).

Die zweite Funktion der RNA Interferenz ist eine Art **Verteidigungsmechanismus** gegen **Viren** oder **Transposons**: Letztere sind mobile, virusähnliche Elemente im Genom, die die Möglichkeit besitzen ihren Ort im Genom zu verändern (Transposition) (209). Durch deren Regulation wird verhindert, dass die Transposons, die jetzt schon ca. 10 % der humanen DNA ausmachen, die Oberhand in unserem Genom gewinnen (36). In niederen Organismen, beispielsweise in Pflanzen, verhindern endogen exprimierte, komplementäre miRNA-Moleküle die virale Ausbreitung, indem sie mit der fremden, viralen Nukleinsäure einen Doppelstrang bilden, der erkannt und direkt abgebaut wird (1).

2.5.2 Wirkmechanismus und Anwendungsmöglichkeiten

Ausgehend von der wichtigen Erkenntnis, dass dsRNA der Auslöser für den spezifischen Abbau von mRNA ist, bzw. 21 bis 23 Basenpaar lange siRNA-Moleküle die eigentlichen Effektoren der RNA Interferenz sind, wurde nach und nach der biochemische Funktionsmechanismus der Genabschaltung entdeckt (252, 75, 39). Heute steht fest, es gibt **drei** verschiedene **Signalwege** in der Proteinbiosynthese, die alle durch dsRNA deaktiviert werden können: die spezifische Inaktivierung von mRNA auf transkriptionaler Ebene (RNA Interferenz durch siRNA), die Hemmung der Transkription (post-transkriptional) und die Hemmung der Translation (durch Komplexbildung von microRNA und mRNA direkt am Ribosom) (165). Da die beiden letzteren noch nicht vollständig verstanden sind und die RNA Interferenz für den Laboreinsatz der interessanteste Weg zu sein scheint, wird im Folgenden ausschließlich auf diesen eingegangen.

Bei der RNA Interferenz werden exogen zugeführte oder endogen produzierte (durch Transkription von pre-miRNA Genen im Zellkern entstehen miRNA-Moleküle) doppelsträngige RNA-Moleküle im Zytoplasma der Zelle durch eine spezielle **RNase** namens „**Dicer**“ (engl.: Zerwürfler; die humane ist 220 kDa groß) in kleine doppelsträngige RNAs von 21 bis 23 Nukleotidlänge zerschnitten. Die Besonderheit dieser siRNAs (bzw. miRNAs) ist, dass sie an beiden 3'-Enden jeweils einen einzelsträngigen Überhang von 2 Nukleotiden Länge besitzen (252, 75). Anschließend werden die siRNA-Moleküle (bzw. miRNA) durch eine weitere Domäne des „Dicer“-Enzyms, welche die Funktion einer **Helicase** besitzt, unter Energieverbrauch entwunden. Die Einzelstränge werden dann in einen **Riboprotein-Komplex** namens „RNA Induced Silencing Complex“ (**RISC**) integriert, und einer der beiden RNA-Stränge wird entfernt (das Entwinden der Stränge beginnt am thermodynamisch instabileren Ende; somit ist festgelegt welcher der beiden Stränge entfernt wird) (188, 90). Lagert sich in den aktivierten RISC-siRNA-Komplex die komplementäre messenger RNA ein, bildet sich ein Doppelstrang aus, der sofort zerschnitten wird. Das entsprechende Protein wird folglich nicht hergestellt. Wenig aktivierte RISC-Komplexe reichen bereits aus, eine große Zahl an mRNA-Molekülen zu inaktivieren (39).

Einige Organismen (z. B. Pflanzen) besitzen im Gegensatz zum Menschen das zusätzliche Enzym RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), das den Doppelstrang aus siRNA und Ziel-mRNA als Vorlage für einen neuen Doppelstrang benutzt, der wiederum von „Dicer“ erkannt und gespalten wird, so dass sich der Zyklus selbst verstärkt. In Pflanzen trägt dies zu einer weit verbreiteten Virusresistenz bei, indem die dsRNA innerhalb der somatischen Zellen

von Zelle zu Zelle übertragen wird. Für humane Zellen scheint der Mechanismus der RNA-Amplifikation durch RdRp nicht essentiell zu sein (152).

Elbashir et al. konnten 2001 zeigen, dass chemisch synthetisierte, einzelsträngige siRNA-Moleküle ebenso effektiv das Zerschneiden der Ziel-mRNA initiieren, wie doppelsträngige RNA (38). Heutzutage bieten etliche Hersteller wie z. B. Dharmacon oder Qiagen ganze Produktpaletten **synthetischer siRNAs** an, wobei zusätzlich die Option besteht mit „Pools“ von beispielsweise drei verschiedenen siRNAs gegen die gleiche mRNA zu arbeiten, um die Erfolgchancen zu erhöhen (246, 248).

Durch die Entdeckung der RNA Interferenz ist ein therapeutisch sehr interessantes Werkzeug gefunden worden, das es dem Benutzer rein theoretisch ermöglicht, jedes krankmachende Gen still zu legen. Im Fokus der Wissenschaftler stehen hier unter anderem **Krebserkrankungen**, **Virusinfektionen**, dominante **Erbkrankheiten** und **neurodegenerative Erkrankungen** (165, 36). Außerdem könnten mit Hilfe von synthetischen siRNA-Genbanken genetische Screenings mit hohem Durchsatz durchgeführt werden, um Zielgene aufzufinden und durch Stilllegung die Funktion des entsprechenden Proteins zu beurteilen. Im Gegensatz zu den heute im Labor weit verbreiteten „knock-out-Mäusen“, in denen mit hohem Aufwand gezielt einzelne Gene ausgeschaltet wurden, könnte die RNA Interferenz eine einfachere, schnellere und kostengünstigere Alternative zumindest im Bereich transienter Genabschaltung darstellen. Die **größte Barriere** im therapeutischen Gebrauch ist auch bei der RNA Interferenz ein **effektives Vektorsystem**, das die siRNA unbeschadet, **gezielt** und in ausreichender Menge zu ihrem Wirkort bringt. Dabei spielen Größe und **Stabilität** (z. B. durch chemische Modifikationen) der transportierten siRNA, sowie **Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen** (z. B. nicht spezifische Abschaltung homologer Gene oder Aktivierung des Interferonsystems) eine große Rolle.

2.5.3 Wirkdauer, Stabilität und Experimente

Studien haben zwar gezeigt, dass siRNA-Moleküle in Säugerzellen und physiologischen Flüssigkeiten stabiler sind als Antisense Oligonukleotide (13), jedoch muss man sich bewusst sein, dass die Genabschaltung durch RNA Interferenz ein **transienter** Vorgang ist (65). Die Wirkung intrazellulär eingebrachter siRNA ist **in vitro** im Durchschnitt 3 bis 7 Tage zu beobachten, abhängig von der **Zellteilungsrate** (25): So kehrten die Luciferasegehalte der mit Reporter gen stabil modifizierten Zellen in sich schnell teilenden Zellen innerhalb einer Woche wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück, in sich nicht teilenden Fibroblasten hingegen dauerte es über 3 Wochen, bis der ursprüngliche Proteingehalt wieder erreicht wurde (34). Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch **in vivo**: Ca. 10 Tage lang hielt die Proteinhemmung in subkutanen Tumorzellen an, jedoch ca. 3 bis 4 Wochen in sich nicht teilenden Hepatozyten von BALB/c Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass die Verdünnung der siRNA aufgrund der Zellteilung die Wirkdauer derselben begrenzt und weniger die intrazelluläre Halbwertszeit.

Freie siRNA-Moleküle werden durch **Nukleasen** sehr schnell auf natürlichem Weg abgebaut bzw. werden aufgrund ihrer kleinen Größe in der **Niere** glomerulär **filtriert und ausgeschieden**. Ein weiterer Grund für das schnelle Nachlassen der Wirksamkeit im Wirbeltier ist durch die **fehlende** Möglichkeit einer RNA-**Amplifikation**, wie sie in niederen Organismen auftritt, zu erklären (siehe 2.5.2).

Verschiedene Studien brachten zutage, dass die Genabschaltung in der Regel 36 bis 48 Stunden nach siRNA-Anwendung ihren Höhepunkt erreicht, nach 96 Stunden jedoch wieder abnimmt (165). Eine Aufrechterhaltung der Wirkung kann zum einen durch **wiederholte Verabreichung** von siRNA erreicht werden. Eine andere Möglichkeit ist die **chemische Modifikation** der siRNA-Moleküle, um deren Stabilität im Blutkreislauf zu erhöhen (15, 165, 36) wie z. B. die Einführung von Fluor an das 2'-Ende der Pyrimidingruppen oder das Ersetzen eines Sauerstoffatoms im Phosphordiester durch Schwefel (Phosphorthioate). Eine Beeinträchtigung der Wirkung (Genabschaltung) darf daraus jedoch nicht resultieren. Vielversprechende Resultate wurden durch die Kombination von mehreren Modifikationen erbracht: So konnten Morrissey et al. durch einen mehrfach modifizierten siRNA-Strang die Halbwertszeit der doppelsträngigen siRNA in 90 %igem Humanserum auf 3 Tage erhöhen; im Vergleich dazu betrug die Halbwertszeit unmodifizierter siRNA nur 5 Minuten (139). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Layzer et al., nachdem sie in beiden siRNA-Strängen, die gegen das Hepatitis B Virus (HBV) gerichtet waren, alle Pyrimidine modifizierten und damit die Plasmahalbwertszeit von weniger als einer Minute (für unmodifizierte siRNA) auf einen

Tag erhöhen konnten (108). Trotz dieser starken Modifikation konnten die siRNA-Moleküle sowohl in Zellkultur, als auch nach **hydrodynamischer Injektion** in HBV infizierte Mäuse die virale Replikation des Virus verhindern.

Andererseits führt eine hydrodynamische Injektion (= schnelle intravenöse Injektion von großen Volumina) zu einer Überlast im rechten Herzen, verbunden mit einem Anstieg des venösen Drucks, was wiederum die Zellplasmamembran in stark durchbluteten Organen wie Leber und Lunge vorübergehend zum Platzen bringt und deshalb eine transiente siRNA-Aufnahme ermöglicht (36, 108). Abgesehen davon, dass diese Methode für einen therapeutischen Einsatz im Menschen routinemäßig nicht angewandt wird, konnten nicht modifizierte siRNA-Moleküle auf diese Art ebenso effektiv Reporterexpression in der Leber von Mäusen reduzieren wie modifizierte siRNA (108). Dies deutet darauf hin, dass sobald die siRNA einmal intrazellulär aufgenommen ist, sie unabhängig von einer Modifikation vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt ist. Eine mögliche Ursache dafür könnte der **RISC-Komplex** sein, der den aufgenommenen siRNA-Einzelstrang **vor zellulären Nukleasen schützt**. Unterstützt wird diese Theorie durch weitere in vitro und in vivo Experimente, in denen nicht modifizierte siRNAs in sich nicht teilenden Zellen 10 Tage und länger die Genexpression reduzieren konnten (198, 199).

Insgesamt scheint bei einer **topischen** Anwendung der siRNA an verschiedensten Organen wie beispielsweise an der **Lunge** (256, 112), Vagina (154) und am **Auge** (28) die zelluläre Aufnahme der siRNA-Moleküle schnell genug zu erfolgen bzw. der Gehalt an Nukleasen niedrig genug zu sein, um eine erfolgreiche Transfektion zu gewährleisten, sodass der erwartete Nutzen von einer Modifikation bei lokaler Anwendung nicht allzu groß sein dürfte (203, 36). Erfolgreicher siRNA-Transfer in die Lunge gelang z. B. der Arbeitsgruppe um Zhang, die mit intranasaler Verabreichung nackter siRNA gegen das Enzym Hämoxxygenase-1 (generiert aus Häm Kohlenmonoxid und Bilirubin und wirkt immunsuppressiv und schützend auf kleine Blutgefäße) eine reperforationsbedingte Ischämie in der Lunge fördern konnten (256). Klinische Studien mit lokal anzuwendender siRNA existieren bereits z. B. bei altersbedingter Makuladegeneration am Auge **AMD** (engl.: „age-related macular degeneration“), die durch ein abnormal hohes Blutgefäßwachstum hinter der Retina gekennzeichnet ist (168): Ziel der Therapie ist hier die Hemmung des Gefäßwachstums durch Inhibition der Gene kodierend für Angiogenesefaktoren (VEGF) oder ihre Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2) mittels spezifischer siRNAs.

Eine weiterer Ansatzpunkt, die Halbwertszeit von siRNA-Molekülen im Blutkreislauf nach systemischer Gabe zu erhöhen, ist die Inkorporation in **Vehikelsysteme** (z. B. in Liposomen) (138) oder Modifizierungen, die zu einer **Bindung an Serumproteine** führen (z. B. durch Cholesterol- oder Antikörper-Konjugate) (203, 200), um den Faktor der renalen Ausscheidung zu umgehen. Niedermolekulares PEI konnte die siRNA ebenfalls vor dem Abbau schützen und diese nach intravenöser Injektion effektiv in subkutane Tumorzellen einschleusen (227). Weniger toxische Copolymere könnten daher für klinische Anwendungen auch gut geeignet sein.

2.5.4 Ausblick und Potential der RNA-Interferenz

Krebs entsteht häufig durch nicht angemessen exprimierte Gene, die zu einem ungehemmten Zellwachstum führen (165). Es existieren zahlreiche, darunter sehr vielversprechende Studien über das Potential der RNA-Interferenz-Technologie zur Behandlung von Krebs, in denen siRNAs eine Hemmung der Zellproliferation in tumortragenden Versuchstieren bewirken (213, 165). Angesteuerte Gene sind beispielsweise mutierte Schlüsselonkogene (K-Ras (19), p53 (131), bcr-abl (184)), antiapoptotische Gene oder Gene, die Tumore begünstigen wie z. B. Wachstums- oder Angiogenese-Faktoren bzw. ihre Rezeptoren (EGF, EGFR (257), VEGF (64, 200), VEGFR-1 und -2 (168, 185)).

Eine **antivirale** Anwendung von siRNA scheint seit den Experimenten von McCaffrey et al. prinzipiell möglich, in denen sie das Hepatitis C Virusprotein mit dem Reporter gen Luciferase koppelten und mithilfe von siRNA die Genexpression dieses Fusionsproteins unterdrückten (25). Weiter konnten in vitro die Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV), das für die AIDS-Erkrankung verantwortlich ist, sowie die Replikation von Polioviren durch spezifische siRNAs inhibiert werden (81, 151). Endogene Gene, die für den fas cell death Rezeptor und Caspase kodieren und in die Apoptose-Signalkette in der Leber nach viraler Infektion involviert sind, konnten ebenfalls angesteuert werden (86, 189). Zahlreiche andere antivirale Ansatzpunkte für siRNAs wurden identifiziert und stehen für weitere Silencingversuche zur Verfügung (165).

Die Fälle von **neurodegenerativen Erkrankungen**, wie Alzheimer oder Huntington steigen in unserer immer älter werdenden Bevölkerung an. Auch hier ist eine therapeutische Intervention mithilfe von siRNA denkbar: Erste Ergebnisse zeigen, dass die Herunterregulierung von β -Sekretase die Sekretion von β -Amyloid-Peptiden in murinen Neuronen erniedrigt und den neuronalen Zelltod reduzieren kann (85). Da das Gen kodierend

für das Enzym β -Sekretase im Gehirn von Patienten mit Alzheimer hochreguliert ist und in Mäusen nach dessen Abschaltung keine Entwicklungsabnormalitäten beobachtet wurden, könnte dieses ein potentiell Zielgen für die zukünftige Therapie von Alzheimer-Erkrankungen sein.

Schließlich sei ein sehr hoher therapeutischer Effekt von siRNA in einem amyotrophen Lateralsklerose-Mausmodell erwähnt: Amyotrophe Lateralsklerose zählt zu den **dominanten Erbkrankheiten** und ist charakterisiert durch eine Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und daraus resultierender Muskellähmung bis hin zum Tod. Mutationen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase scheinen das Absterben der Motoneuronen zu begünstigen. Die Hemmung des entsprechenden Gens (SOD1) dieses Enzyms durch verabreichte siRNA konnte sowohl den Beginn der Erkrankung verzögern, als auch die Überlebenschance der behandelten Mäuse bis zu 77 % erhöhen (166, 167). Die größte Herausforderung ist in diesem Fall zwischen mutierten mRNAs und dem Wildtyp-Transkript zu unterscheiden und nur die mutierte Variante durch siRNAs abzubauen.

Als mögliche **unerwünschte Nebenwirkungen** einer siRNA-Therapie ist Folgendes zu bedenken: SiRNA kann eine nicht spezifische Stilllegung von teilweise homologen Genen sowohl durch mRNA-Abbau, als auch durch Unterdrückung der Translation bewirken oder im Fall von längeren doppelsträngigen siRNA-Molekülen eine Interferon-Immunantwort provozieren. Diese führt zu einem zum schnelleren Abbau der siRNAs durch nicht spezifische Rnase-L, andererseits kann sie den zellulären Metabolismus soweit beeinträchtigen, dass daraus Apoptose resultiert (58, 205). Die Induktion der Interferonantwort scheint allerdings sequenzspezifisch und dosisabhängig zu sein (156). Weiter konkurrieren von außen zugeführte, synthetische siRNAs mit endogenen miRNAs um die RNA-Interferenz-Maschinerie. Mögliche Folgen einer solchen Inhibierung von miRNAs sind bis jetzt noch nicht voraussehbar. Durch den Einsatz von kleineren dsRNAs (unter 30 Basenpaaren), chemische Modifikationen (s. 2.5.3) oder an Vektoren gebundenen größeren dsRNA-Molekülen können solche unerwünschten Wirkungen umgangen werden (119).

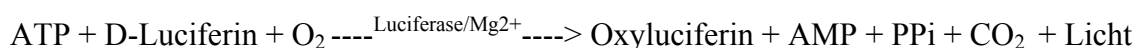
2.6 Evaluierung der Transfektionseffizienz durch Reportergene

Durch so genannte Reportergensysteme kann relativ einfach nachgewiesen werden, ob und in welchem Ausmaß eine Transfektion der behandelten Zellen stattgefunden hat. Unter Reportergenen oder Markergenen versteht man bestimmte Gene, deren Expression in einer Zielzelle oder in einem Zielorganismus durch biochemische oder histochemische Methoden nachweisbar ist. Dadurch kann, vor einem Einsatz der eigentlichen therapeutischen Gene, die Effektivität von beispielsweise verschiedenen Transfektionsreagenzien oder Vektorsystemen überprüft werden (63, 175). In *in vitro* Untersuchungen wird oft die Reporterogenaktivität in Zellhomogenisaten quantifiziert, während bei der Charakterisierung *in vivo* außerdem histologische Verfahren (93, 126) oder nicht invasive Imaging-Methoden (206, 132) die quantitativen Methoden ergänzen. Letztere erlauben es, die Reporterexpression ein- und desselben Versuchstieres über einen längeren Zeitraum zu verfolgen und eine Kinetik zu erstellen. Die Beurteilung von Zwischenergebnissen nach beispielsweise Mehrfachbehandlungen ist ebenfalls möglich.

Seit der Etablierung des ersten Reportergensystems vor 25 Jahren (Chloramphenicol-Acetyltransferase-Assay) (60), wurden zahlreiche weitere Assays, wie z. B. Green Fluorescent Protein (GFP), β -Galactosidase und Luciferase entwickelt. Auf letzteres System soll aufgrund der Anwendung in den eigenen Versuchen im Folgenden kurz näher eingegangen werden.

2.6.1 Luciferase

Das Enzym Luciferase, aus dem Nordamerikanischen Leuchtkäfer „*Photinus pyralis*“ isoliert, ist seit seiner Entdeckung 1950 sowohl in der biologischen, als auch in der klinischen Forschung weit verbreitet (207, 242). Chemisch gesehen handelt es sich um eine Monooxygenase, die bei Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP), Magnesium und dem Substrat Luciferin folgende Reaktion katalysiert (207):



ATP/AMP: Adenosintriphosphat/ Adenosinmonophosphat

O₂: Sauerstoff

CO₂ Kohlendioxid

PPi: Diphosphat

Das Substrat Luciferin wird unter ATP-Verbrauch umgesetzt, wobei Energie in Form von Photonen freigesetzt wird. Diese können in einem Luminometer bei einer Wellenlänge von 562 nm erfasst werden.

Für quantitative Messungen *in vitro* bedeutet dies, dass das Luciferase Enzym aus den Zellen vollständig extrahiert und gleichzeitig in seiner Funktion stabilisiert werden muss. Das wird durch verschiedene Reagenzien im Lysepuffer, wie z. B. Tris-Phosphat und Triton X-100 gewährleistet. Für die quantitative Bestimmung der Luciferase Aktivität in verschiedenen Organen muss das Gewebe zuvor homogenisiert werden (17, 186).

2.6.2 Nicht invasive Imaging Methoden

Die Kombination von modernen Bildgebungsverfahren mit der Reportergentechnologie brachte für die experimentelle biomedizinische Forschung in den letzten 10 Jahren entscheidende Vorteile: So ist es heutzutage möglich, biologische Prozesse auf molekularer Ebene in komplex aufgebauten Organismen zu verfolgen, ohne das Versuchstier töten zu müssen. Außer der Einsparung von Versuchstieren erlauben diese modernen Technologien die wiederholte Messung und Beurteilung des Tumorwachstums, die Lokalisation von Mikro- und Makrometastasen im zeitlichen Verlauf, sowie Langzeitstudien am einzelnen Tier zur Beurteilung von therapeutischen Effekten durch eine entsprechende Behandlung (179). Zu den häufig eingesetzten Reportern gehören neben lumineszenten (z. B. Luciferase) und fluoreszenten (z. B. GFP) Proteinen auch radioaktive Tracer und Proteine (z. B. Ferritin Ketten), die paramagnetische Verbindungen akkumulieren (z. B. Eisen). Die Bildgebung kann beispielsweise durch optisches Imaging, Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen (179).

Das in den eigenen Untersuchungen verwendete Imaging-Gerät (Ivis™ 100 Imaging System, Xenogen) zählt zu den optischen Imagingverfahren und bietet den Benutzern die Möglichkeit sowohl fluoreszente als auch biolumineszente Reporter *in vitro* und *in vivo* zu erfassen. Es zeichnet sich durch hohe Sensitivität der Kamera und einen justierbaren, großen Aufnahmebereich aus. Eine beheizbare Ablageplatte sowie Anschlüsse für ein Inhalationsgas erleichtern das Versuchstier-Handling. Neben einer Anwendung in der gentherapeutischen Forschung, kann dieses Gerät für toxologische Versuche, Medikamenten-Metabolismus-Studien, in der Krebsforschung oder zur Erforschung von Infektionen oder Entzündungsgeschehen eingesetzt werden (245).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Ziel und Vorgehensweise

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung und Nutzung eines murinen Lungentumormodells zur Untersuchung von ortsspezifischer magnetischer Deposition und ultraschallinduzierter Freisetzung von siRNA in der Lunge. Als Genvektoren dienen magnetische Microbubbles („Magnetobubbles“), die im Gegensatz zu kommerziellen Microbubbles in ihrer äußeren Hülle superparamagnetische Eisenpartikel enthalten.

B16F10-Mausmelanomzellen werden für diesen Zweck stabil mit dem Reportergen Luciferase transduziert und über die Schwanzvene in Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 injiziert. In den sich entwickelnden Lungentumoren wird nach Gabe von, gegen Luciferase gerichteten, siRNA beladenen Microbubbles die Luciferase-Aktivität durch zwei verschiedene Methoden gemessen: Einerseits erfasst ein hoch empfindliches optisches Imaging-System das Lichtsignal am lebendem Tier, andererseits kann die Enzymaktivität in der homogenisierten Lunge nach dessen Entnahme durch ein Luminometer quantifiziert werden. Eine Reduktion der Enzymaktivität, gemessen in Form des Lichtsignals, dient als Maß für die (therapeutische) Wirksamkeit der so verabreichten Anti-Luciferase-siRNA. Auf diese Weise soll die Frage geklärt werden, ob Magnetobubbletechnologie grundsätzlich in der Lage ist, siRNA funktionell in Lungentumoren nach systemischer Anwendung zu deponieren.

Der erste Schritt hierzu ist die virale Transduktion der B16F10-Tumorzellen. Da spätere in vivo Versuche Melanomzellen mit möglichst hoher Luciferaseexpression erfordern, werden der „klassische“ Retrovirus, sowie ein lentiviraler Virustyp getestet. Das zweite wichtige Kriterium ist die Persistenz der Enzymexpression. Diese wird über mehrere Zellkulturpassagen beobachtet und hinsichtlich der Konfluenz der transduzierten Melanomzellen beurteilt. Kulturen, welche die gewünschten Eigenschaften zeigen, werden anschließend in ausreichender Menge für Magnetobubble Experimente in vitro und in vivo expandiert und kryokonserviert.

Für die eigentliche Etablierung des murinen Lungentumormodells muss zunächst ein geeignetes Ablösemedium und Transportmedium für die Zellen gefunden werden. Dies geschieht durch Toxizitätstests in Zellkultur. Nach erfolgversprechenden siRNA-

Magnetobubble-Transfektionen von transduzierten B16F10-Zellen *in vitro*, wird zunächst das Tumorwachstum in zwei Mausgruppen, denen verschiedene Zelldosen intravenös appliziert werden, evaluiert. Dies soll insbesondere Auskunft darüber geben, zu welchem Zeitpunkt nach Injektion der Tumorzellen eine Intervention mit siRNA-Magnetobubbles sinnvoll ist. In diesem Zeitfenster darf einerseits die Tumormasse noch nicht zu hoch sein, dass eine „therapeutische“ Wirksamkeit von vornherein unwahrscheinlich erscheint, andererseits sollte im Imagingsystem ein deutliches, reproduzierbares Signal festzustellen sein.

Die anschließende Biodistributionsstudie mit radioaktiv markierten siRNA-Magnetobubbles in C57/BL6 Mäusen soll klären, ob die anzuwendende Bubblepräparation grundsätzlich in der Lage ist, siRNA in der Lunge zu deponieren bzw. wie sich das Verteilungsmuster der Nukleinsäure durch den neuartigen Genvektor im Organismus darstellt. Durch Einteilung in vier verschiedene Behandlungsgruppen kann zusätzlich evaluiert werden, ob durch Magnetfeld und Ultraschall eine erhöhte Disposition in der Lunge stattfindet. Für diese Untersuchungen sind gesunde, nicht tumortragende Mäuse ausreichend.

Histologische Schnitte und elektronenmikroskopische Aufnahmen von sowohl Tumorklungen, als auch gesunden Lungen nach *i.v.* Applikation von siRNA-Magnetobubbles, geben zusätzlich Einblick wo im Lungengewebe selbst (intrazellulär, extrazellulär, intravasal, usw.) und in welcher Form (intakte Bubbles, Bubblekomponenten, usw.) siRNA-Magnetobubbles nach Anwendung von Magnetfeld und Ultraschall vorzufinden sind.

Schließlich gilt es zu zeigen, ob nach systemischer Verabreichung ein derartiges Genvektorsystem wie die Magnetobubbles (kombiniert mit physikalischen Kräften), in der Lage ist, das aktive Agens siRNA wirksam in Lungenmetastasen einzuschleusen. Aus diesem Grund werden, wie bereits oben erwähnt, Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles zu einem bestimmten Zeitpunkt des Tumorwachstums in melanomtragende Tiere (*in vivo* Versuch V) und transgene (Luciferase exprimierende) Mäuse (*in vivo* Versuch VI) intravenös appliziert. Nach 48 Stunden erfolgt die Auswertung durch Imaging (*in vivo* Versuch V), bzw. nach Tötung und Organentnahme im Luminometer (beide Versuche).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung der B16F10-Melanomzellen des Mauseinzuchtstammes C57BL/6

Basis für alle Experimente dieser Arbeit bilden vitale Tumorzellen der murinen Melanomzelllinie B16F10 (Fa. ATCC-LGC Promochem, Wesel, Katalog-Nr. CRL-6475) des Mauseinzuchtstammes C57BL/6. Als Medium dient gepuffertes DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Fa. Biochrom, Berlin, s. Anhang) mit Zusatz von 10%igem fötalen Kälberserum (Fetal Bovine Serum, Fa. Biochrom AG, Berlin, s. Anhang). Die Kultivierung erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) in einem mit CO₂ (pCO₂: 5,3 %) begasten Brutschrank (CO₂ Water Jacketed Incubator, Fa. Life Sciences International GmbH) bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchte von 99 %. Alle zwei bis drei Tage erfolgt die Kontrolle der Besiedelungsdichte und bei einer Konfluenz von ca. 70 % Ablösen mit Trypsin (Fa. Biochrom AG, Berlin, s. Anhang) und Splitten der Zellen eins zu zehn.

3.2.1.2 Stabile Integration des Reportergens Luciferase in B16F10-Melanomzellen durch retrovirale bzw. lentivirale Transduktion

Die retrovirale bzw. lentivirale Transduktion von B16F10-Zellen mit dem Reportergen für Luciferase (firefly Luciferase: Plasmid p55pCMV-IVS-luc⁺, Fa. Plasmid Factory, Bielefeld, unter der Kontrolle vom Cytomegalievirus (CMV) Promotor) erfolgt freundlicherweise durch die AG M. Anton am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar, München nach bereits publiziertem Standardprotokoll (5). Diese Zellen werden in folgenden Versuchen mit 2 Passagezahlen bezeichnet: beispielsweise (B16F10 RV Luc) P 3+6. Die erste Ziffer gibt die Passage der Melanomzellen zum Zeitpunkt der Transduktion an (hier 3), die Zahl nach dem Plus steht für die Zellpassage nach der Transduktion.

3.2.1.3 Kryokonservierung

Die so erhaltenen transduzierten B16F10-Melanomzellen werden für spätere Verwendungszwecke zu je 1 Million Zellen aliquotiert und in einem 90 % FCS- und 10 % DMSO-haltigen (Dimethylsulphoxide Hybri-Max®, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Einfriermedium kryokonserviert (bei -190 °C im flüssigen Stickstoff).

3.2.1.4 Luciferase-Test

Zur Überprüfung der Expressionsstabilität der transduzierten Melanomzellen sowie zur Evaluation des Einflusses der Besiedlungsdichte, wird bei jedem Splittvorgang ein Luciferasetest durchgeführt.

Triplikate von je 5×10^4 transduzierten B16F10-Zellen werden in Eppendorfgläsern mit 150 µl PBS (Fa. Biochrom AG, Berlin) gewaschen, bei 1100 Umdrehungen für drei Minuten bei 21°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge EBA 12R, Fa. Hettich, Tuttlingen) und 100 µl Lysepuffer (s. Anhang) zugegeben. Nach zehn Minuten werden je 50 µl des Zelllysates entnommen und in die Vertiefung einer Costar® 96-Loch-Platte (opaque plate-solid black 96 well, Fa. Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl Luciferase-Substrat-Puffer (s. Anhang) erfolgt unverzüglich die Messung der Lichtemission mit dem Microplate Scintillation & Luminescence Counter „Top Count“ (Fa. Canberra Packard, Groningen, Niederlande). Die Messzeit beträgt 20 Sekunden, es gibt keine Messverzögerung und Hintergrundwerte werden automatisch abgezogen.

Als Referenz zur Quantifizierung der Lichtintensität (RLU = Relative Light Units) dient ein Kontrollstandard aus reiner Luciferase (Fa. Roche, Mannheim) in Nano- bis Picogrammengen und dem dazugehörigen Rekonstitutionspuffer. Je 200, 100, 50, 25, 12,6, 6,25, 3,13, 1,57, 0,78, 0,39, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,013 und 0 ng Luciferase in je 50 µl Lysepuffer werden unter gleichen Bedingungen wie die Proben gemessen. Durch die erstellte Eichkurve kann jeder gemessene Probenwert in ng Luciferase bestimmt werden, unabhängig von variierenden systemischen Faktoren.

3.2.1.5 Proteintest

Bei der Überprüfung der Expressionsstabilität dient die Zellzahl als Bezug zu den ermittelten RLU-Werten. In den in vitro Transfektionsversuchen wird der Proteingehalt der Zellen bestimmt und in Beziehung zu den ermittelten Nanogrammengen Luciferase gesetzt.

Dafür werden je 5 µl des verbleibenden Zelllysates in die Vertiefungen einer TPP® 96-Loch-Testplatte (Zellkultur Testplatte 96F, Nr. 92096, Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) pipettiert, je 155 µl steriles Wasser und 40 µl BioRad-Reagenz (Bio Rad-Protein-Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zugegeben und im IKA®-Schüttler (MTS 2, Fa. IKA Labortechnik, Staufen) vorsichtig gemischt. Der Standard besteht aus 1,45 mg/ml BSA (Albumin from bovine serum, Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und dient, ähnlich wie der Standard im Luciferase-Test, zur Quantifizierung der Lichtabsorption der Proben. Nach Erstellung einer Eichkurve mit Konzentrationen von 50, 33.3, 22.3, 15, 9.9, 6.6, 4.4, 2.9, 2.0, 1.3, 0.9 und 0 ng BSA /µl kann der Proteingehalt der Proben in mg angegeben werden. Die Absorptionsmessung der Standardkurve und der Proben erfolgt mit dem Photometer (Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter, Fa. Wallac, Turku, Finnland) bei 590 nm und 0,1 Sekunden.

3.2.1.6 MTT-Test

Zur Überprüfung der Zellvitalität (mitochondriale Aktivität) nach siRNA Transfektion in vitro kommt ein MTT-Test (Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromide, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zum Einsatz. Prinzip des Tests ist eine Formazankristallbildung von lebenden Zellen mit dem MTT-Reagenz ca. zwei bis vier Stunden nach Inkubation. Nach Auflösung der Kristalle durch MTT Solubilization Solution, wird die Lichtabsorption der gelösten Formazankristalle bei einer Wellenlänge von 590 nm (0,1 sec) am Photometer bestimmt. Geschädigte Zellen mit niedriger metabolischer Aktivität bilden weniger Kristalle, sodass die gemessene Absorption niedriger ist als bei gesunden Zellen.

Zur Herstellung des MTT-Reagenz werden 1 mg MTT und 5 mg Glucose pro ml PBS gelöst. Nach Absaugen des Mediums, werden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und mit je 100 µl des MTT-Reagenz bis zur Kristallbildung (ca. zwei bis vier Stunden) inkubiert und 100 µl MTT Solubilization Solution pro well pipettiert. Die Zellkulturplatte wird über Nacht auf einem Certomat® U Shaker (Fa. Braun Biotech International) bei 37 °C geschüttelt und nach vollständiger Auflösung der Kristalle am Photometer wie oben beschrieben gemessen.

Als Kontrolle dienen lebende, nicht transfizierte Zellen mit Medium. Außerdem werden wells nur mit 100 µl MTT-Reagenz und 100 µl MTT- Solubilization Solution als Hintergrund vermessen. Die Zellatmungsaktivität berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Absorption der Proben} - \text{Absorption des Hintergrundes}}{\text{Absorption der unbehandelten Kontrollen} - \text{Absorption des Hintergrundes}} \times 100 \%$$

3.2.2 In vitro Versuche mit transduzierten B16F10-Melanomzellen

3.2.2.1 Abhängigkeit der Genexpression von der Konfluenz - in vitro Versuch I

Um einen Einfluss der Zelldichte auf die Genexpression zu evaluieren, werden retroviral transduzierte B16F10 P 6 + 5 Zellen in 75 cm² Flaschen in Kultur genommen (s. 3.2.1.1) und zu bestimmten Zeitpunkten beim Splitten ein Luciferase-Test (Triplikate) und der entsprechende Proteintest wie in 3.2.1.4 und 3.2.1.5 beschrieben, durchgeführt. Als Zeitintervall werden 2 bzw. 5 Tage gewählt, nach denen die Zellen immer 1:10 gesplittet werden. Die ermittelten Luciferasewerte (in ng pro mg Protein) werden miteinander verglichen.

3.2.2.2 Überprüfung der Expressionsstabilität von retroviral und lentiviral transduzierten Melanomzellen - in vitro Versuch II

Sowohl für spätere in vitro, als auch in vivo Versuche ist die Stabilität der Luciferaseexpression der viral transduzierten Melanomzellen Voraussetzung für die Einschätzung eines funktionellen siRNA-Vektorsystems.

Aus diesem Grund wird von den kultivierten Zellen bei jedem Splittvorgang ein Luciferasetest wie in 3.2.1.4 beschrieben angefertigt. Da nur eine große Abnahme der Expression oder erhebliche Schwankungen von Interesse sind, kann in diesem Fall auf eine Quantifizierung mittels Standard verzichtet werden. Um pufferbedingte Differenzen der RLU-Werte auszuschließen, findet ein vorportionierter, bei -20°C aufbewahrter Luciferase-Substratpuffer Verwendung, der zu Beginn auf seine volle Funktionsfähigkeit überprüft wurde. Für jede Messung wird ausschließlichschließlich ein solcher frisch aufgetauter, lichtgeschützter Puffer eingesetzt.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellmortalität in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. Citric Saline - in vitro Versuch III

Zur Ermittlung eines schonenden Ablösemediums für die Zellen werden folgende Versuche durchgeführt:

Zwei gleichwertige 75 cm² Zellkulturflaschen mit ca. 70 % konfluent gewachsenen retroviral transduzierten B16F10-Melanomzellen werden nach Entfernen des Kulturmediums mit 5 ml PBS gewaschen. In eine Flasche werden anschließend 3 ml Trypsin (s. Anhang) zugegeben und nach gleichmäßiger Verteilung (vorsichtiges Schwenken) dieses wieder abgesaugt. Es verbleibt ein dünner Trypsinfilmm auf den Zellen. Nach drei Minuten werden durch sacht Klopfen am Flaschenrand noch festhaftende Zellen vom Boden gelöst und durch mehrmaliges Spülen in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird anschließend in einem 15 ml Polypropylenröhrchen (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) bei 1100 Umdrehungen zentrifugiert und das Pellet mit 10 ml frischem PBS resuspendiert.

In die zweite Flasche wird nach Absaugen des Mediums 5 ml einer 1%igen Citric Saline-Lösung (s. Anhang) zugegeben und bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach vorsichtigem Klopfen und Zugabe von 5 ml PBS werden die gelösten Zellen in ein 15 ml Polypropylenröhrchen übergeführt, bei 1100 Umdrehungen zentrifugiert und das Pellet mit 10 ml frischem PBS resuspendiert.

Die Zellsuspensionen beider Flaschen werden in je zwei 15 ml Röhrchen aufgeteilt, wobei eine Probe der jeweiligen Zellen auf Eis gelagert wird. Die beiden anderen verbleiben bei Raumtemperatur. Direkt anschließend wird von den trypsinisierten bzw. mit Citric Saline behandelten Zellen je 10 µl Zellsuspension entnommen (in Triplikaten), mit einem äquivalenten Volumen Trypanblau (Trypan blue Solution 0,4%, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in einem Eppendorfgefäß vermischt und 10µl des Gemisches auf eine vorbereitete (Deckglas) Neubauer-Zählkammer verbracht. Unter einem Lichtmikroskop wird bei 10-fachem Objektiv sowohl die Zahl von lebenden (ungefärbten), als auch blau gefärbten toten Zellen bestimmt. Bei Auszählung von 2x16 Quadraten und unter Einbeziehung der eins zu zwei Verdünnung (Trypanblau) entspricht der Mittelwert der Quadrate einer Zellzahl von $10^4 \times 2$ pro Milliliter.

Die Zellmortalität berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl der toten Zellen}}{\text{Anzahl der toten + Anzahl der lebenden Zellen}} \times 100 \%$$

Nach 30 und 60 Minuten werden aus den Tubes, die auf Eis standen Triplikate entnommen und wie oben beschrieben ausgezählt. Ebenso wird mit den Proben nach 60 Minuten bei Raumtemperatur verfahren.

3.2.2.4 Vergleich von Isotonischer Kochsalz-, 5%iger Glucose-Lösung und PBS als geeignete Suspensionslösungen - in vitro Versuch IV

Da die Melanomzellen nach ihrer Ablösung nicht direkt in Mäuse injiziert werden, sondern einen Transport mit anschließender Verweildauer von ca. zwei Stunden möglichst ohne Zellverluste überstehen sollen, wird die Zellmortalität in drei verschiedenen Suspensionslösungen nach 60, 120 bzw. 180 Minuten bestimmt.

Nach Trypsinisierung von (ca. 70% konfluent gewachsenen) B16F10 RV Luc (P6+3) aus einer 75 cm² Zellkulturflasche, werden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen, in äquivalenten Mengen auf 3 Eppendorfgefäße verteilt und diese zentrifugiert (1100 U, 3 min). Die Zellpellets werden mit 1 ml eines möglichen Transportmediums resuspendiert. Diese sind:

- 5% Glucose Lösung (Fa. Delta Select GmbH, Pfullingen)
- Isotonische NaCl-Infusionslösung (Fa. Delta Select GmbH, Pfullingen)
- PBS (Phosphate buffered saline, Fa. Biochrom KG, Berlin)

Die Proben werden auf Eis gestellt, nach 60, 120 und 180 Minuten aus den jeweiligen Zellsuspensionen 10 µl entnommen und die Zellmortalität nach der in 3.2.2.3 beschriebenen Methode mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

3.2.3 Regulierung der Genexpression mittels siRNA in vitro

Nachdem in vorangegangenen Versuchen einige charakteristische Eigenschaften der Luciferase exprimierenden Melanomzellen untersucht wurden, soll mit den folgenden Experimenten versucht werden, eine Regulierung der Genexpression dieser Zellen mittels spezifischer siRNA in vitro zu erreichen.

In einem ersten Versuchsansatz werden 24, 48 und 72 Stunden nach Magnetofektion die Luciferaseexpression der Zellen ermittelt. Das Verfahren besteht aus Inkubation der Zellen mit einem Gemisch aus, an superparamagnetische Eisenpartikel gebundene siRNA, Metafektene™ Pro und DMEM-Medium und anschließendem Verweilen der Zellkulturplatte auf einer 96-Loch-Magnetplatte.

Der darauf folgende Versuch soll Aufschluss geben über die Funktionalität und Eignung der magnetischen Microbubbles als neuartiges Transportvehikel für die einzuschleußende siRNA. Zur Überprüfung der Stabilität der in magnetische Microbubbles eingebauten siRNA nach deren Herstellung (Schüttelvorgang) bzw. nach Ultraschallanwendung wird eine Gelelektrophorese mit radioaktiv markierter siRNA durchgeführt.

3.2.3.1 Magnetofektion von B16F10 RV Luc - in vitro Versuch V

Zur Evaluierung der Transfizierbarkeit der retroviral transduzierten Zellen soll mithilfe der Magnetofektion eine gegen Luciferase kodierende siRNA in die Zellen gebracht werden. Hierzu werden Komplexe bestehend aus 3 verschiedenen superparamagnetischen Eisenpartikeln und 8 verschiedenen siRNA-Konzentrationen getestet. Als Kontrolle dienen zum einen unbehandelte Zellen sowie Zellen einer zweiten Platte, die anstatt mit einer Anti-Luciferase-siRNA mit einer Kontroll-siRNA mit den entsprechenden Magnetpartikeln inkubiert werden.

Es werden zunächst 2 schwarzwandige, am Boden durchsichtige 96-Loch-Zellkulturplatten (Lot. 655090, Greiner Bio-One GmbH, Solingen) mit einer 0,005 %igen Polyethylenimin (PEI) Lösung beschichtet, die für ein besseres Anwachsen der Zellen sorgt. Unter der Sterilbank werden 125 µl einer 0,5 %igen PEI-Lösung (Molekulargewicht 600 000 - 1 Mio Da, Lot. 03880, Fluka / Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zu 12,5 ml sterilem Wasser gegeben und davon 50 µl in jedes well der 2 Platten pipettiert. Nach 40 minütiger Inkubation werden die wells 3-mal mit je 200 µl sterilem Wasser gewaschen und anschließend 30 Minuten im Lyophilisator getrocknet. Dann werden pro well der zwei

beschichteten Platten 7000 B16F10 RV Luc-Zellen der Passage 22+5 in je 150 µl DMEM ausgelegt.

Da die Transfektion in Triplikaten (mit je 3 verschiedenen Magnetpartikeln) stattfindet und die höchste siRNA Konzentration pro well 200 nmol in 200 µl Endvolumen betragen soll (150 µl DMEM Medium + 50 µl fertige Transfektionslösung), wird am folgenden Tag zunächst 1,1 ml einer siRNA-Lösung für eine Verdünnungsreihe hergestellt:

1.) siRNA-Lösung: 48 µl einer 20 µM anti-luc siRNA (siRNA luc GL3 dupl, Zielsequenz AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA, 20 µM, Qiagen GmbH, Hilden) wird zu 1052 µl DMEM Medium ohne Zusätze gegeben. Auf die gleiche Weise werden 1,1 ml einer Kontroll-siRNA-Lösung (control-siRNA, D-001210-01, 20 µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA) hergestellt.

In je 330 µl dieser Lösungen befinden sich 14,4 µl siRNA, was bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht der siRNA von 14 000 g / mol, 4,032 µg entsprechen. Bei späterer Zugabe von 30 µl Magnetpartikellösung erhält man das Startvolumen von 360 µl in der ersten Reihe einer 96-well-Platte. Nach Vorlage von 180 µl DMEM Medium in den anderen wells, transferiert man jeweils 180 µl des Startvolumens weiter, verwirft jeweils die letzten 180 µl und erhält somit 3-mal 50 µl (30 µl Rest) Transfektionslösung mit absteigender siRNA Konzentration und der gewünschten Ausgangskonzentration von 200 nM pro well in der ersten Reihe (2,016 µg siRNA in 180 µl => 7,2 µl in 180 µl => 2 µl in 50 µl => 2 µl in 200 µl Gesamtvolumen im well = 1:100 Verdünnung der 20 µM siRNA = 200 nM).

2.) Herstellung der Magnetpartikelsuspensionen

Zum Einsatz kommen 3 verschiedene Magnetpartikelsuspensionen (Synthese von S9 und S30 in unserem Labor durch Dr. O. Mykhaelik (141):

- S9 (2,5 mg Eisen / ml; Herstellung am 01.04.2005)
- S30 (0,9 mg Eisen /ml; 01.05.2006)
- CombiMAG (Fa. Chemicell GmbH, Berlin : 1 mg Eisen / ml; Lot. 061/01)

Das Verhältnis Eisen zu siRNA wird mit 1:1 festgelegt (4,032 µg), das Verhältnis des „Enhancers“ Metafectene™ Pro (Biontex Laboratories, Martinsried, Lot. AD 1.13) zu Eisen soll 4:1 betragen. Insgesamt werden pro Magnetpartikelsuspension 80 µl hergestellt (2 x 30 µl für 2 Platten + 20 µl Rest), wobei nach Zugabe von MetafektinPro™ zu den einzelnen

Magnetpartikeln mit DMEM Medium (ohne Zusätze) auf das Endvolumen von 80 µl aufgefüllt wird. Folgende Lösungen werden nach vorherigem Vortexen der Magnetpartikel in je einem Eppendorfgefäß hergestellt:

- 1.) 4,3 µl S9 + 43 µl MfPro + 32,70 µl DMEM
- 2.) 11,94 µl S30 + 43 µl MfPro + 25,06 µl DMEM
- 3.) 10,75 µl CombiMAG + 43 µl MfPro + 26,25 µl DMEM

Zu je 30 µl dieser Magnetpartikelsuspensionen werden in einer TPP® 96-Loch Zellkulturplatte 330 µl (A2-A4) der Anti-luc siRNA- (für die erste Platte) bzw. der Kontroll-siRNA-Lösung (A10-A12; für die zweite Platte) gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 wells (A1 + A9) erhalten nur 360 µl DMEM ohne Zusätze. In B1 bis H4 bzw. B9 bis H12 werden jeweils 180 µl DMEM pipettiert und nach Ende der Inkubationszeit jeweils 180 µl der Transfektionslösung aus der Reihe A in die darunterfolgende Reihe (B) transferiert, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und wiederum 180 µl in die Reihe C eingebracht (1:2-Verdünnungsreihe). Dies geschieht bis zur Reihe H, die letzten 180 µl werden verworfen. Anschließend werden von der erstellten Verdünnungsreihe (180 µl / well) jeweils 50 µl auf die 150 µl Zellsuspension der 2 schwarzen Platten transferiert (in Triplikaten). Das Gesamtvolumen beträgt jetzt 200 µl in jedem well und die siRNA Konzentration 200 nmol (in Reihe A), 100 nmol (in B), 50 nmol (in C), 25 nmol (in D), 12,5 nmol (in E), 6,25 nmol (in F), 3,1 nmol (in G) und 1,5 nmol (in H). Beide Zellkulturplatten werden im Brutschrank für 15 Minuten auf eine 96-Loch-Magnetplatte (Chemicell GmbH, Berlin) gestellt, was einer Remanenz von 130 - 240 mT entspricht. Nach Entfernen der Magnetplatten verbleiben die Zellen ohne Medienwechsel für 24 Stunden im Inkubator.

Dann erfolgt zunächst eine rein subjektive Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop anhand ihrer Morphologie. Das Medium wird schließlich entfernt und pro well 150 µl einer 30 µmolaren Luciferinlösung [17,94 µl Luciferin-Stoke (15 mg / ml) + 982,06 µl PBS + 31 ml PBS = 32 ml] einpipettiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit werden die Platten wie unter 3.2.1.4 beschrieben am Luminometer vermessen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 µl frisches DMEM pro well aufgefüllt. Nach 48 und 72 Stunden erfolgen ebenfalls eine Morphologiebeurteilung sowie die Messung der Luciferaseaktivität.

3.2.3.2 Transfektion von transduzierten B16F10 durch magnetische siRNA-Microbubbles - in vitro Versuche VI

Um die Eignung des neuartigen Transportvehikels für die einzuschleusende siRNA zu evaluieren, werden Luciferase exprimierende Melanomzellen in vitro mit magnetischen Microbubbles, die gegen Luciferase codierende siRNA enthalten (in fünf verschiedenen Konzentrationen) inkubiert, 30 Minuten auf einem Magnetfeld belassen und die Hälfte der Zellen (in Triplikaten) zusätzlich mit Ultraschall definierter Frequenz (s. u.) behandelt. Als Kontrolle werden unbehandelte Zellen vermessen, sowie Melanomzellen, die mit Kontroll-siRNA-Microbubbles (gleiche Verdünnungsreihe der siRNA) inkubiert wurden. Nach Mediumwechsel und einer Inkubationszeit von 48 Stunden erfolgt die Auswertung.

Herstellung der verwendeten Microbubbles

Da für die Transfektion in Zellkultur nur eine geringe Menge benötigt wird, werden zunächst jeweils 250 µl Microbubbles hergestellt. Die jeweilige siRNA (custom siRNA luc GL3 dupl, 20 µM, Zielsequenz AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA, Qiagen GmbH, Hilden bzw. control-siRNA, D-001210-01, 20 µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA) wird auf Eis gestellt. Nach Entnahme einer kleineren Menge (ca. 1 ml) der Magnetpartikel (fluid MAG-Tween 60, 90 mg / ml, Lot: 0531/04, Chemicell GmbH) in ein Eppendorfgefäß wird dieses für 5 Minuten in ein Ultraschallbad bei 35 kHz, 1,2 A und 480 W (Sonorex Digitec DT/102 H, Fa. Bandelin Electronic, Berlin) gestellt, anschließend gut gevortext und 2,8 µl der homogenen Lösung in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 22,6 µl des Lipid-Stocks (Metafectin / DOPE 1 : 2,03, Biontex Laboratories, Martinsried) wird die Mischung erneut gevortext. In einem zweiten Eppendorfgefäß werden 33,75 µl (entspricht 10 µg) der Anti-Luciferase-siRNA (bzw. 35,7 µl (10 µg) der Kontroll-siRNA in einem zweiten Ansatz) mit 178,4 µl Microbubblepuffer (bzw. 176,4 µl im zweiten Ansatz) vorsichtig mit einer Pipette gemischt und unter Auf- und Abpipettieren zu dem vorbereiteten Magnetpartikel-Lipidgemisch gegeben. 12,5 µl eines in der Mikrowelle erwärmten Sojabohnenöls (leichter zu pipettieren) wird in einem sialinisierten Glasfläschchen (Supelco, 2 ml Clear Vial, Srew top, Polypropylene Hide Cap with PTFE/Red Rubber Septa, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) mit der soeben hergestellten Magnetpartikel-Lipid-siRNA-Suspension vermischt und das Fläschchen verschlossen. Anschließend wird ca. 5 ml eines Octafluorpropan-Gases (Chargennr. 1882, Linde Gas AG, Unterschleißheim) mittels einer

Spritze mit aufgesetzter Kanüle durch den Gummistopfen im Deckel in das Fläschchen eingebracht, wobei die Luft durch eine zweite Kanüle entweichen kann. Zum Schluss erfolgt ein einminütiger Schüttelvorgang bei 2500 RPM im Mini-beadbeater® (Fa. Biospec Products, Inc., Bartlesville, USA).

Lässt man die derart hergestellte Suspension einige Minuten bei Raumtemperatur stehen, so kann man eine braune Schichtbildung auf der Oberfläche einer fast farblosen Flüssigkeit erkennen: Die magnetischen Microbubbles steigen aufgrund ihres Gasgehaltes auf.

Insgesamt enthalten diese Microbubbles 1 mg Magnetpartikel, 40 µg siRNA, 90,4 µl Lipid und 50 µl Sojabohnenöl pro 1 ml Magnetobubbleformulierung (s. Tab. 2 und 3).

Tab. 2: Zusammensetzung der anti-luc-siRNA-Microbubbles

Komponenten	µl
fluid Mag-Tween 60 (90 mg/ml)	2,8
Lipid stock Biontex	22,6
Microbubble-Puffer	178,35
siRNA luc GL3 dupl (20µM)	33,75
Sojabohnenöl	12,5
gesamt	250

Tab. 3: Zusammensetzung der Kontroll-siRNA-Microbubbles

Komponenten	µl
fluid Mag-Tween 60 (90 mg/ml)	2,8
Lipid stock Biontex	22,6
Microbubble-Puffer	176,4
Control-siRNA (20 µM)	35,7
Sojabohnenöl	12,5
gesamt	250

Allen weiteren Experimenten liegen folgende Berechnungen zugrunde:

Das gewünschte Stickstoff : Phosphat-Verhältnis (N : P-Verhältnis) beträgt 3 : 1. Es ist das molare Verhältnis von Stickstoffatomen (positiv geladen) im Lipid-Stock zu den negativen Ladungen der Phosphate der Nukleotide der siRNA. Der Lipid-Stock besteht aus 2,64 mg Metafektene™ und 5,36 mg DOPE in 2 ml, die Konzentration positiver Ladung ist 4,224 mmol / l.

Die negative Ladung (in mol) der gewünschten siRNA Menge berechnet sich wie folgt:

$$\text{Negative Ladung (mol)} = \frac{\text{Menge siRNA im Endvolumen (g)}}{\text{Molekulargewicht siRNA (g/mol)} \times 42}$$

Die positive Ladung (in mol) für das gewünschte N : P-Verhältnis (3 : 1) beträgt dann:

$$\text{Positive Ladung (mol)} = \text{Negative Ladung (mol)} \times 3$$

Das Endvolumen (in μl) der einzusetzenden siRNA erhält man folgendermaßen:

$$\text{siRNA } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Menge siRNA im Endvolumen } (\mu\text{g})}{\text{Molekulargewicht siRNA (g/mol)} \times \text{Konzentration siRNA stock (mol/l)}}$$

Das Endvolumen (in μl) des Lipid-Stocks berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Lipid-Stock } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Positive Ladung für gewünschtes N/P (mol)} \times 10^6}{\text{Konzentration positiver Ladung in Lipid-Stock (mol/l)}}$$

Das Volumen an einzusetzenden Magnetpartikeln beträgt:

$$\text{FluidMAG-Tween60 } (\mu\text{l}) = \frac{[\text{Endvolumen Microbubbles } (\mu\text{l}) : 1000] \times 1000}{\text{Konzentration fluidMAG-Tween60 (mg/ml)}}$$

Das Endvolumen an Sojabohnenöl (in μl) berechnet sich wie folgt:

$$\text{Sojabohnenöl } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Endvolumen Microbubbles } (\mu\text{l}) \times \text{gewünschte Menge an Sojaöl / ml}}{1000}$$

Durch Subtraktion der Summe aller Komponenten (siRNA, Lipid-Stock, Magnetpartikel und Sojabohnenöl) von dem gewünschten Endvolumen der Microbubbles berechnet sich das Volumen (in μl) des Microbubble-Puffers.

Transfektion in Zellkultur

Am Vortag werden zwei 96-Loch-Platten mit je 7000 B16F10 RV Luc P6+5 in 150 µl DMEM Medium pro well ausgelegt. Eine Platte dient der Toxizitätsbestimmung mittels MTT-Test (s. 3.2.1.6), an der zweiten werden ein Luciferase- und Proteintest (s. 3.2.1.4 und 3.2.1.5) durchgeführt. Das gleiche Experiment wird zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt und mit den Ergebnissen des ersten verglichen.

Je 250 µl der magnetischen Microbubbles (mit custom siRNA luc GL3 dupl bzw. control-siRNA) werden wie oben beschrieben hergestellt. Jede Präparation enthält jeweils 10 µg siRNA in 250 µl. Davon werden je 120 µl mit 1080 µl Bubble-Puffer verdünnt (1:10; 2 Ansätze für 2 Platten) und pro Ansatz die verschiedenen Verdünnungsreihen mit DMEM Medium in einem Eppendorfgefäß hergestellt (insgesamt 20 Eppendorfgefäße mit je 2 x 5 Verdünnungen der anti-luc- bzw. der Kontroll-siRNA-Microbubbles für 2 Platten). Folgende Konzentrationen an siRNA pro well werden getestet: 60 nM, 40 nM, 20 nM, 8 nM und 4 nM. Dabei wird von einem Volumen von 100 µl Transfektionslösung ausgegangen, das auf 150 µl schon vorhandenen Medium auf den Zellen pipetiert wird, d. h. von einem Endvolumen von 250 µl im well. Die Herstellung der Verdünnungen erfolgt für je 8 wells (800 µl) und damit jeweils für Triplikate von Zellen, die mit bzw. ohne Ultraschall behandelt werden (200 µl Rest).

Nach langsamen Auftropfen von 100 µl der Microbubble-Verdünnungen (anti-luc-siRNA bzw. Kontroll-siRNA) auf die einzelnen wells in Triplikaten, werden die beiden Zellkulturplatten für 15 Minuten auf eine 96-Loch- Magnetplatte (s. 3.2.3.1) gestellt. Anschließend werden - ohne Entfernen der Magnetplatte - jeweils 3 wells pro Verdünnungsstufe für je 30 Sekunden beschallt (2 Watt / cm², 1 MHz, 50 % duty cycle), indem die große Sonde des Ultraschallgerätes (Sonitron® 2000, Fa. Richmar, USA) in das obere Drittel eines jeden wells eingetaucht wird. Die restlichen Triplikate bleiben unbeschallt. Nach Entfernen der Magnetplatte nach weiteren 15 Minuten wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 150 µl frischem DMEM versorgt.

Nach 48 Stunden wird an einer Platte ein Luciferase-Test mit anschließendem Proteintest durchgeführt. Dafür wird das Medium abgesaugt, die Zellen 2 Mal mit je 100 µl PBS pro well gewaschen, 100 µl Lysepuffer pro well zugegeben und nach 10 Minuten jeweils 50 µl des Lysats in die Vertiefung einer Costar® 96-Loch-Platte pipetiert. Nach Zugabe von je 100 µl Luciferase-Substrat-Puffer wird die Platte wie unter 3.2.1.4 beschrieben am Lumineszenz-messgerät gemessen. Der Proteingehalt wird mit jeweils 5 µl der verbleibenden Zelllysate

mittels Proteintest (s. 3.2.1.5) ermittelt und in Bezug zu den gemessenen Lumineszenzwerten gesetzt.

Zur Einschätzung der Toxizität hoher siRNA-Konzentrationen bzw. Ultraschall auf die Zellen wird die mitochondriale Aktivität an den Zellen der zweiten transfizierten Platte mittels MTT-Test (s.3.2.1.6) nach ebenfalls 48 Stunden bestimmt.

3.2.3.3 Gelelektrophorese zur Stabilitätsüberprüfung der siRNA - in vitro Versuch VII

Am Ende der Herstellung von Magnetobubbles wird die Suspension eine Minute lang geschüttelt (siehe 3.2.3.2). Sowohl dieser Vorgang als auch die Anwendung von Ultraschallwellen in folgenden Versuchen darf die Stabilität und Funktion der eingebauten siRNA nicht beeinflussen. Aus diesem Grund wird durch Gelelektrophorese native siRNA und siRNA enthaltende Microbubbles ohne bzw. mit Beschallung jeweils mit und ohne 1% SDS (Natriumdodecylsulfat) aufgetrennt und miteinander verglichen.

Dazu werden zwei Magnetobubbleproben (Herstellung s. 3.2.3.2) mit je 250 µl Gesamtvolumen und mit jeweils 3,75 µg control-siRNA (D-001210-01, 20 µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA) hergestellt (Zusammensetzung s. Tab. 4). Eine der Proben wird anschließend mit Ultraschall behandelt (2 Watt / cm², 1 MHz, 50 % duty cycle, 30 Sekunden). Die eingestellten Parameter entsprechen denen, die für die Zellkulturversuche benutzt wurden (s. 3.2.3.2).

Für die Herstellung eines 1%igen TBE-Agarose-Gels (Trisborat) werden 0,06 g Agarose-Pulver mit 60 ml TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Das flüssige Gel wird in eine vorbereitete, RNase freie (mit 2% Absolv und destilliertem Wasser gewaschene) Elektrophorese-Kammer gegossen und 2,5 µl Ethidiumbromid mit einer Pipette gleichmäßig in dem Gel verteilt. Nach 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur ist das Gel fest und nach Auffüllen der Kammer mit TBE-Puffer anwendungsbereit.

Um vergleichbare Banden zu erhalten, werden immer die gleichen Mengen (0,3 µg) an siRNA verwendet (siehe Tab. 5). In die erste Geltasche wird nach Verdünnung und Zugabe von Ladungspuffer eine native siRNA pipettiert, die zweite Tasche enthält siRNA und SDS (Kontrolle). Die Taschen 3 bis 6 enthalten jeweils siRNA-Magnetobubbles (20 µl, entsprechend 0,3 µg siRNA), wobei 3 und 4 ohne Ultraschallanwendung und 5 und 6 nach Beschallung (Parameter siehe oben) aufgetragen wurden. In den Taschen 4 und 6 befinden sich zusätzlich 1% SDS um die Magnetobubbles zu zerstören und die enthaltene siRNA freizusetzen. Etwa 15 Minuten nach Start der Elektrophorese (80 V, 500 mA, 250 W) wird

diese gestoppt und die nach Größe aufgetrennten siRNA Banden fotografiert (positiv-negativ-Kontrast) und analysiert.

Tab. 4: Zusammensetzung der Kontroll-siRNA-Magnetobubbles

Komponenten	μl
fluid Mag-Tween 60 (90 mg/ml)	2,8
Lipid stock Biontex	7,5
Microbubble-Puffer	214,8
Control-siRNA (20 μM)	12,5
Sojabohnenöl	12,5
Gesamt	250

Tab. 5: Zusammensetzung der Elektrophorese-Proben

Gel-tasche	Substanz	US	contr-siRNA bzw. mb (μl)	Gesamtmenge siRNA (μg)	Ladungspuffer (μl)	Wasser (μl)	SDS (1%) (μl)	Gesamtvolumen (μl)
1	contr-siRNA	-	1,0	0,3	4	19	0	24
2	contr-siRNA + SDS	-	1,0	0,3	4	16	3	24
3	siRNA-mb	-	20	0,3	4	0	0	24
4	siRNA-mb + SDS	-	20	0,3	4	0	3	27
5	siRNA-mb	+	20	0,3	4	0	0	24
6	siRNA-mb +SDS	+	20	0,3	4	0	3	27

3.2.4 Anwendung des siRNA-Microbubble-Systems in vivo

3.2.4.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In allen in vivo Versuchen dienen 9 bis 10 Wochen alte, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6, J-nRj, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20 g als Versuchstiere (Bezug von Janvier, le Genest-St.-Isle, Frankreich).

Die Mäuse leben gruppenweise in IVC-Typ-II-long-Käfigen (Individual Ventilated Cages, Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg) mit einer maximalen Belegungsdichte von 5 Tieren pro Käfig. Den Tieren stehen täglich frisches, angesäuertes Wasser (Phosphorsäure, pH 2,6-2,8) aus Nippeltränken und Haltungsfutterpellets (Fa. Ssniff, Soest) ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgt auf entkeimten Naturfaser-Compound (Lignocel, Fa. J. Rettenmaier & Söhne, Wilburgstetten), das einmal wöchentlich gewechselt wird. Daneben dienen den Tieren Nestlets aus reiner, sterilisierter Baumwollfaser (Fa. Plexx-Emsicon Jung, Vaterstetten) als wärmedämmendes, nicht verdaubares Nestbaumaterial, welche die Luftzirkulation im Käfig nicht blockieren. Die Käfige sind gemäß den Vorgaben der Versuchstierhaltung in einem speziellen Tierhaltungsraum in der ZVH (Zentrale Versuchstierhaltung) am Klinikum der Universität München, Standort Innenstadt untergebracht. In diesem Optimierten Hygiene-Bereich (OHB) gelangt man nur mit einer speziellen Zutrittskarte durch ein Schleusensystem unter Verwendung von Kopf-, Mundschutz, Bereichsschutzkleidung, weißen Überziehsocken, grünen Bereichsschuhen und mit alkoholischer Desinfektionslösung (Aseptoman®, Desomed-Dr. Trippen GmbH, Freiburg) desinfizierte Dermatril®-Schutzhandschuhen. Im Raum herrscht Überdruck, jeder einzelne Käfig verfügt über eine separate Zu- und Ablufteinheit (siehe IVC). Die Raumtemperatur beträgt durchschnittlich 22°C, bei einer Luftfeuchte von 60 bis 70 %. Die Beleuchtung erfolgt im jeweils 12 Stunden dauernden Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtintensität von 100 Lux. Auf die Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche nach Anlieferung wird streng geachtet.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Insgesamt werden 80 Mäuse im Versuch eingesetzt.

3.2.4.2 Analyse des Tumorwachstums - in vivo Versuch I

Zur Bestimmung des Tumorwachstums werden jeweils 9 Mäuse mit 1×10^5 bzw. 2×10^5 B16F10 RV Luc i.v. injiziert. Einer Maus wird die höhere Dosis zur Kontrolle der Vitalität der Zellen subcutan appliziert. Nach 6, 14 und 21 Tagen (nach 26 Tagen bei der niedrigeren Dosisgruppe) wird von ausgewählten Tieren mit dem Ivis™ 100 Imaging System (Xenogen Corporation, California 94501, USA) Bilder erstellt, um den Verlauf des Tumorwachstums am lebenden Tier festzuhalten. Von je 3 Mäusen wird an oben genannten Zeitpunkten nach Tötung und Organentnahme die Tumorzahl und -größe in der Lunge bestimmt und nach Probenaufbereitung und Messung am Luminometer die Luciferasegehalte pro Gramm Lungengewebe berechnet. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Intravenöse Injektion der transduzierten Tumorzellen

Die Mäuse werden nach Verbringen in einen geeigneten OHB-Raum der ZVH 10 Minuten mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um den vasodilatatorischen Effekt für die folgende Injektion auszunutzen. Zur Fixation der Maus kommt eine fixierte 50 ml Spritze ohne Kolben zum Einsatz, in dessen Hinterseite von oben ein ca. 5 mm breiter Spalt gesägt wurde, durch den der Schwanz herausgelagert werden kann. Nach der Hautdesinfektion mit Cutasept® F (Fa. Bode Chemie, Hamburg) erfolgt der Einstich im mittleren Schwanzdrittel in kranialer Richtung mit einer 500 µl fassenden Insulinspritze (Micro-Fine, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Ohne vorherige Stauung der Schwanzvene und ohne Aspiration werden die retroviral transduzierten B16F10-Melanomzellen der Passage 6+5 (B16F10 RV Luc) in 5 %iger Glucoselösung (Gesamtvolumen 200 µl) intravenös injiziert. Nach Injektion wird die Kanüle herausgezogen und die Injektionsstelle mittels eines Gazetupfers komprimiert. Für die objektive Auswertung der Ergebnisse ist die streng intravenöse Applikation notwendig. Anschließend werden die Tiere noch bis zu zwei Stunden beobachtet, um im Fall einer Störung des Allgemeinbefindens gegebenenfalls einzugreifen.

Vorbereitung der Tiere für das Real-Time-Imaging

Am Tag des Imagings wird das Luciferase-Substrat jeweils frisch hergestellt. Zur Sicherheit erfolgt die Herstellung für 3 bis 4 zusätzliche Mäuse pro Versuchsansatz. Pro Maus werden 3mg Luciferin (D-Luciferin freeacid 99%, Fa. Synchem Laborgemeinschaft OHG, Felsberg)

zu 100 µl Aqua ad injectabilia (Fa. Delta Select GmbH, Pfullingen) gegeben und durch tropfenweise Zugabe einer 5 molaren Natronlauge gelöst, bis eine klare, gelbe Lösung entsteht. Der pH-Wert wird mittels NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt.

Die Mäuse werden mit einer Kombination aus 0,5 mg/kg Medetomidin (Domitor, Pfizer GmbH, Karlsruhe), 5 mg/kg Midazolam (Dormicum, Ratiopharm GmbH, Ulm) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl 25, Delta Select GmbH, Pfullingen) i.p. anästhesiert (50 µl/ Maus). Um eine Abschwächung der Lichtemission bei der späteren Messung zu vermeiden, wird den Tieren das schwarze Fell über dem gesamten Thoraxbereich mittels Enthaarungscreme (Pilca, Fa. Glaxo Smith Kline Consumer Healthcare, Bühl) entfernt. Anschließend werden jeder Maus 100 µl des Luciferin-Substrates i.p. injiziert und in Dorsallage unter die Kamera des IVIS-Systems verbracht. Nach 10 Minuten Wartezeit erfolgt die Messung: Die Maus befindet sich auf Ebene A (11 cm Abstand zwischen Kamera und Objekt), die Expositionszeit beträgt 5 Minuten, ein festgelegter Standardhintergrund ist eingegeben und die Bildauflösung entspricht dem im Manual angegebenen Vorschlag für in vivo Messungen (binning = middle).

Sind die Tiere nicht für eine Messung am Luminometer bestimmt, werden sie mit einer Kombination von Antidota s.c. antagonisiert: 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan, Pfizer GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Flumazenil (Anexate, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) und 1,2 mg/kg Naloxon (Narcanti, Delta Select GmbH, Pfullingen).

Zur Messung der RLU-Werte am Luminometer und anschließender Berechnung der Luciferasegehalte pro Gramm Lungengewebe wird folgendermaßen vorgegangen:

Organentnahme und Probenaufbereitung

Nach cervikaler Dislokation wird die Bauchhöhle durch einen medianen, präumbilical beginnenden und bis zum Manubrium sterni reichenden Scherenschlag eröffnet. Entlang der letzten Rippen werden seitlich zwei Entlastungsschnitte durchgeführt. Durch das Durchtrennen der Knochen-Knorpel-Grenze der Rippen wird die Brusthöhle eröffnet und das Sternum nach cranial und oben geklappt. Um ein möglichst blutarmes Lungengewebe zu erhalten (Hämoglobin stört die sich anschließende Luciferase-Messung), werden die Mäuse perfundiert: Die freigelegte V. cava caudalis wird durchtrennt und in die rechte Herzkammer mittels einer Kanüle (BD Microlance™ 23 G) solange 5 bis 10 ml einer Perfusionslösung verbracht (1000 ml isotonische NaCl-Infusionslösung, Fa. Delta-Select GmbH, Pfullingen

versetzt mit 25000 I.E. Heparin-Na, Fa. ratiopharm® GmbH, Ulm/Donautal) bis sich die Lunge deutlich entfärbt. Diese wird anschließend entnommen, in PBS-Puffer gewaschen und jeweils in vorbereitete, beschriftete Homogenisierröhrchen (disposable / conical 2,0 ml screw cap tube with cap, VWR scientific products, West Chester, USA) gegeben. Die Röhrchen wurden zuvor mit Homogenisierkugeln (Zirkonia Beads, 2,4 mm Dia, Biospec Products, Inc., Bartlesville, USA) bis zur 0,3 ml Markierung gefüllt und je 500 µl Lysepuffer für Tierversuche [10 ml 5 x Reporter Lysis Buffer (Promega Corporation, Madison, USA) + 40 ml dd H₂O + 1 Tablette Protease-Inhibitor (Complete™, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)] zugegeben. Die eisgekühlten Organproben werden im Mini-beadbeater® 2 x 20 Sekunden homogenisiert und anschließend bei 14000 Umdrehungen und 4°C 10 Minuten zentrifugiert (Kühlzentrifuge).

Luciferase-Test

Pro Röhrchen werden 50 µl aus dem Überstand entnommen, in verschiedene Vertiefungen einer Costar® 96-Loch-Platte pipettiert und jeweils 100 µl Luciferin-Substrat-Puffer (Promega Luciferase Assay System, Fa. Promega Corporation, Madison, USA) zugegeben. Die Messung der Lichtemission erfolgt unverzüglich am Luminometer unter den gleichen Bedingungen wie in 3.2.1.4 beschrieben, mit der Ausnahme, dass für die Erstellung einer Standardkurve in diesem Fall der Luciferin-Substrat-Puffer der Fa. Promega als Rekonstitutionspuffer dient.

3.2.4.3 Biodistributionsstudie mit ¹²⁵Iod-markierten siRNA-Microbubbles – in vivo Versuch II

Um eine Verteilung der magnetischen Microbubbles bzw. der gebundenen siRNA im Organismus verfolgen zu können, werden 50 µg einer siRNA ohne Zielsequenz (control-siRNA, D-001210-01, 20 µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA) radioaktiv mit ¹²⁵Iod markiert (gelabelt).

Die Markierung erfolgt in unserem Labor gemäß der in der Literatur publizierten Methode (140). Für die Markierung von 50 µg siRNA wird Natriumiodid (Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig) mit einer Radioaktivität von 250 µCi eingesetzt. Nach Zugabe von 108,1 µl unmarkierter siRNA zu 228,4 µl markierter siRNA werden Microbubbles wie unter 3.2.3.2 beschrieben hergestellt (s. Tab. 7). Insgesamt werden 16 Tiere mit einem Microbubble-

Injektionsvolumen von je 125 μ l und 20 μ g siRNA pro Maus i.v. injiziert, was einer Aktivität von 500 000 CPM (counts per minute) pro Tier entspricht.

Folgende Behandlungsgruppen werden gebildet (s. Tab. 6):

Tabelle 6: Behandlungsprotokoll der Biodistributionsstudie

Mausnr.	Gruppe	Injektionsvolumen (μ l)	Menge an injizierter siRNA (μ g)	Zusätzliche Anwendungen
1 bis 4	1	125	20	keine
5 bis 8	2	125	20	Magnetfeld (rechte Lunge)
9 bis 12	3	125	20	Ultraschall (rechte Lunge)
13 bis 16	4	125	20	Magnetfeld + Ultraschall

Nach intraperitonealer Allgemeinanästhesie (s.o.) werden die Mäuse der Gruppen 2, 3 und 4 in Dorsallage verbracht und das Fell über dem Brustkorb für einen besseren Kontakt mit der Ultraschallsonde entfernt. Nach Auftragen eines Kontaktgels (Ultraschallgel, TMP Tüshaus Medical Produkte GmbH, Velen-Ramsdorf) über dem rechten Brustkorb und Vorbereitung der Ultraschalleinstellungen (6 x 6 mm Sonde, 4 W/cm², 1 MHz, 100% duty cycle, 5 min) werden die radioaktiv markierten Microbubbles in die laterale Schwanzvene injiziert und ohne zeitliche Verzögerung der Ultraschall gestartet. Für die Anwendung des Magnetfeldes (Gruppe 2 und 4) werden die narkotisierten Tiere innerhalb der Spule eines Elektromagneten (Nicole II Magnet, B max 0.9 T, T. Wey, B. Gleich, TU München) fixiert, der ab dem Injektionszeitpunkt mit 7 Volt und 5 Ampere für 10 Minuten betrieben wird und dessen Polschuh über der rechten Thoraxhälfte platziert wird. Mäuse der Gruppe 1 erhalten nach i.v. Injektion keine weitere Behandlung.

Nach 15 Minuten post injectionem werden alle Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narkoren®, Merial GmbH, Halbergmoos) euthanasiert, die folgenden Gewebe bzw. Körperteile entnommen und in zuvor abgewogene Szintillationsröhrchen (20 ml Plastic vials, Fa. Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) verteilt: rechte Lungenhälfte, linke Lungenhälfte, Herz, 0,5 ml Blut (cardial entnommen), Leber, Milz, Magen-Darm-Trakt, Nieren, Injektionsstelle (gesamter Schwanz), C1 (Kopfbereich nach Dekapitation), C2 (Thorax mit Vordergliedmaßen), und C3 (kaudaler Körperbereich mit Beckengliedmaßen). Für die spätere Auswertung in CPM/g Gewebe erfolgt die Messung der rückgewogenen Proben im γ -Counter (1480 Wizard™3, Fa. Wallac, Turku, Finnland).

In einem zweiten Versuchsansatz werden siRNA-Magnetobubbles, die anstatt der herkömmlichen 5 % nur 1 % Sojabohnenöl enthalten (10 μ l Sojabohnenöl in 1000 μ l

Gesamtvolumen Microbubbles) in die Schwanzvene von 16 Mäusen injiziert. Die siRNA-Menge, das Injektionsvolumen, das Behandlungsschema und die Probenaufbereitung sind die gleichen.

Tab. 7: Zusammensetzung der ¹²⁵Iod markierten siRNA Microbubbles

Komponenten	µl
Fluid Mag-Tween 60 (90 mg/ml)	11,1
Lipid stock Biontex	90,5
Microbubble-Puffer	512
markierte siRNA	228,4
unmarkierte siRNA	108,1
Sojabohnenöl	50
Gesamt	1000

3.2.4.4 Histologie nach fluoreszenzmarkierter siRNA-Microbubble-Injektion

– in vivo Versuch III

Um eine qualitative Aussage über die Verteilung und den Verbleib der siRNA-Microbubbles in der Lunge treffen zu können, wird für die histologische Beurteilung fluoreszenzmarkierte siRNA (custom si-RNA 1027020, Luc-GL3-Cy3, Zielsequenz AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA, 20 µM, Qiagen GmbH, Hilden) in Microbubbles inkorporiert (Tab. 8).

2 Mäuse werden 14 Tage nach Inokulation von 2×10^5 B16F10 RV Luc-Melanomzellen anästhesiert und unter Magnetfeldeinfluss sowie Ultraschallapplikation (siehe unter 3.2.4.3) mit je 200 µl markierter Bubblesuspension (20 µg siRNA-Cy3) i.v. injiziert. Die Injektion und Narkose erfolgt wie bereits unter 3.2.4.2 beschrieben. Eine weitere Maus dient als Negativkontrolle bzw. zur Erkennung einer physiologischen Lungenstruktur und wird aus diesem Grund ohne vorherige Tumorinokulation mit Kontroll-siRNA beladenen Standard-Microbubbles (20 µg control-siRNA, D-001210-01, 20 µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA, s. Tab. 3 unter 3.2.3.2) injiziert. Alle drei Tiere werden nach 60 Minuten euthanasiert und jeweils eine Hälfte der Organe (Lunge, Leber, Milz, Nieren, Herz, Injektionsstelle) in 2,5 ml fassende Probenbehälter (Dose 32 x 14 mm PE mit Deckel, Schubert & Weiss Omnilab GmbH & Co. KG, München) gebettet, die bereits zu zwei Drittel mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium™, Sakura Finetek Germany GmbH,

Heppenheim) gefüllt sind. Nach vollständiger Überschichtung der Gewebe mit dem Einbettmedium werden die Proben sofort auf Trockeneis gestellt und anschließend bei -20 °C tiefgefroren. Nach vollendeter Konservierung werden ebenfalls bei -20 °C Kryoschnitte von durchschnittlich 10 µm angefertigt. Die Schnitte sind weiterhin bei -20 °C lichtgeschützt zu lagern, um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

Mit den anderen Organhälften wird nach Fixierung in 6 % Formalin und Einbettung der Schnitte Färbungen nach Hämatoxylin-Eosin und Berliner Blau (Eisenfärbung) durchgeführt.

Tab. 8: Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten siRNA-Microbubbles

Komponenten	µl
fluid Mag-Tween 60 (90 mg/ml)	11,1
Lipid stock Biontex	191,5
Microbubble-Puffer	426,4
siRNA luc GL3-Cy3 (20 µM)	321
Sojabohnenöl	50
gesamt	1000

3.2.4.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie der murinen Lunge behandelt mit siRNA-Magnetobubbles – in vivo Versuch IV

Zum Zweck einer exakteren optischen Beurteilung, wo genau innerhalb des Lungengewebes und in welchem Zustand der mit Nukleinsäure beladene Genvektor deponiert, wird zeitgleich eine gesunde Maus anästhesiert und unter Magnetfeldeinfluss und Ultraschallapplikation (siehe unter 3.2.4.3) 200 µl der gleichen fluoreszenzmarkierten siRNA-Magnetobubblesuspension (entsprechend 20 µg siRNA-Cy3) wie im Histologieversuch (Komposition siehe Tab. 8 unter 3.2.4.4) i.v. injiziert. Narkose und Injektion erfolgen wie unter 3.2.4.2 beschrieben. Nach 15 Minuten wird die Lunge durch tracheale Instillation von 3 %igem Glutaraldehyd in situ fixiert, anschließend entnommen und weiter über 48 h in 3 %igem Glutaraldehyd gelagert. Die weitere Verarbeitung, bestehend aus Nachfixierung, Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Einbettung in Epon und Anfertigung der Schnitte erfolgt freundlicherweise durch Fr. Jennen am Institut für Pathologie, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), München, nach etablierten

Standardprotokoll. Aus den polymerisierten Eponproben werden zunächst für eine bessere Übersicht mit dem Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) Semidünnschnitte (ca. 1 μm dick) hergestellt und mit Toluidinblau gefärbt. Mikroskopiert wird am Lichtmikroskop Gerätetyp DM R (Fa. Leica, Wetzlar). Geeignete Magnetobubbles enthaltende Lungenschnitte werden anschließend zur besseren Charakterisierung mit Berliner Blau nachgefärbt (Eisenfärbung).

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen werden anhand der Semidünnschnitte charakteristische Eponblöcke ausgewählt und ca. 70 bis 80 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Diese werden auf Kupfer-Grids (Plano GmbH, Wetzlar) aufgezogen und mit 0,5% wässrigem Uranylacetat und 0,3 % wässrigem Bleicitrat kontrastiert. Die Auswertung erfolgt am Transmissions-Elektronenmikroskop Modell EM 10 CR (Fa. Zeiss, Jena).

3.2.4.6 Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles am Tag 12 des Tumorwachstums – in vivo Versuch V

Für die Beurteilung der Funktionalität des siRNA-Microbubble-Systems werden 18 Mäuse wie unter 3.2.4.2 beschrieben mit 2×10^5 B16F10 RV Luc-Melanomzellen i.v. injiziert. Am Tag 12 post injectionem werden von allen Tieren zunächst Lumineszenz-Aufnahmen der Lungen im Imaging-System erstellt. Die Vorbereitung der Mäuse entspricht der im bereits beschriebenen in vivo Versuch I. Die Einteilung erfolgt in 3 Gruppen (s. Tab. 9).

Tab. 9: Versuchsplan des in vivo Versuchs V

Gruppe	Anzahl der Tiere	verwendete siRNA (20 μg /Maus)	zusätzliche Anwendungen
1	6	custom siRNA luc GL 3 duplex	Magnetfeld + Ultraschall
2	6	GFP-22 siRNA (Kontrolle)	Magnetfeld + Ultraschall
3	6	keine	keine

6 Mäuse (Gruppe 1) erhalten 200 μl Microbubbles der Standardpräparation (s. 3.2.3.2: Tab. 2) mit je 20 μg gegen Luciferase kodierende siRNA i.v. (custom siRNA luc GL3 dupl, Zielsequenz AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA, 20 μM , Qiagen GmbH, Hilden), 6 Tiere werden mit Kontroll-siRNA-Microbubbles (GFP-22 siRNA, Zielsequenz CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT, 20 μM , Qiagen GmbH, Hilden; 20 μg /Maus) behandelt (Gruppe 2; zwei Mäuse sterben nach der Injektion), während 6 Tiere unbehandelt bleiben (Gruppe 3). Bei den Tieren der ersten beiden Gruppen kommt direkt nach der Microbubbleinjektion

Ultraschall über der rechten Lunge mit den gleichen Parametern wie in der Biodistributionsstudie (s. 3.2.4.3) zur Anwendung. Außerdem wird bei letztgenannten Gruppen wegen Transportschwierigkeiten und Hygienevorschriften der ZVH anstatt des Elektromagneten folgende Permanentmagnet-Anordnung für 10 Minuten je Tier verwendet (s. Abb. 6):

Am Ende eines stabförmigen Aluminium-Nickel-Cobalt Magnetkernes (A2012, 20 x 120 mm, Remanenz: 1120 mT) sind 2 Eisen-Bor-Neodym-Rundmagnete (Neo Delta Typ NE205, 20 x 5 mm, Remanenz: 1080 mT - 1120 mT) angebracht, an denen wiederum 2 weitere, längere Eisen-Bor-Neodym-Rundmagnete (Typ NE105, 10x 10 mm, Remanenz: 1080 mT - 1120 mT) befestigt sind.

Abb. 6: Permanentmagnet-Anordnung für den in vivo Versuch V



Im Anschluss an die „Behandlung“ erfolgt die Antidotgabe. Nach 2 Tagen werden nach cervikaler Dislokation Lunge und Herz entnommen. Die Probenaufbereitung und Lumineszenzmessung am Photometer erfolgt wie unter 3.2.4.2 beschrieben.

3.2.4.7 Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles in transgene, Luciferase exprimierende Mäuse - in vivo Versuch VI

Ein weiterer Versuch der klären soll, ob Magnetobubbletechnologie grundsätzlich in der Lage ist, siRNA funktionell in der Lunge oder in einem anderen Organ nach systemischer Anwendung zu deponieren, findet an 8 Wochen alten, transgenen, stabil Luciferase exprimierenden Mäusen statt (E14 NF-kB-Luciferase-Reporter Mäuse, Bezug von AG Culmsee, Departement Pharmazie, LMU, München). Diese Tiere weisen Luciferaseexpression in allen Organen auf.

Zu diesem Zweck wird eine Gruppe von 4 Tieren nach Allgemeinanästhesie (s.o.) mit je 200 µl Microbubbles der Standardpräparation (s. 3.2.3.2: Tab. 2 und 3) und entsprechend

20 µg gegen Luciferase kodierende siRNA (custom siRNA luc GL3 dupl, Zielsequenz AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA, 20µM, Qiagen GmbH, Hilden) intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe, bestehend aus ebenfalls 4 Mäusen erhält 200 µl Microbubbles mit je 20 µg Kontroll-siRNA pro Tier (control-siRNA, D-001210-01, 20µM, Fa. Dharmacon Inc., Chicago, IL 60693, USA) i.v.. Beide Versuchstiergruppen (s. Tab. 10) werden während der Injektion und anschließend für 10 Minuten einem Magnetfeld des unter 3.2.4.3 genannten Elektromagneten (bei 7 Volt und 5 Ampere; Hauptausrichtung über rechter Thoraxhälfte) ausgesetzt. Zusätzlich werden alle Mäuse über dem enthaarten rechten Brustkorb 10 Minuten beschallt (4 Watt / cm², 1 MHz, 100% duty cycle). Nach Antagonisierung der Narkose verbleiben die Tiere für 48 Stunden im Käfig. Anschließend werden nach cervikaler Dislokation folgende Organe aller Tiere entnommen: Herz, rechter und linker Lungenflügel, Leber, Milz, rechte und linke Niere, Injektionsstelle (Schwanzteil, in den die Injektion erfolgte). Die Probenaufbereitung, Messung der Lumineszenz und die Umrechnung der Ergebnisse in ng Luciferase pro Gramm Gewebe erfolgt nach der unter 3.2.4.2 beschriebenen Methode.

Tab. 10: Versuchsplan des in vivo Versuchs VI

Gruppe	Anzahl der Tiere	verwendete si-RNA (20 µg/Maus)	zusätzliche Anwendungen
1	4	custom siRNA luc GL 3 duplex	Magnetfeld + Ultraschall
2	4	control-siRNA, D-001210-01	Magnetfeld + Ultraschall

3.3 Datenauswertung und Dokumentation

Einzelwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des Datenmaterials werden je Versuch tabellarisch aufgeführt. Die Mittelwerte der *in vitro* und *in vivo* Versuche werden graphisch in einem Säulendiagramm dargestellt, wobei bei den Ergebnissen des Tumorwachstums (s. Abb. 23) die logarithmische Skalierung gewählt wurde. Die entsprechenden Standardabweichungen sind ebenfalls in den Diagrammen enthalten.

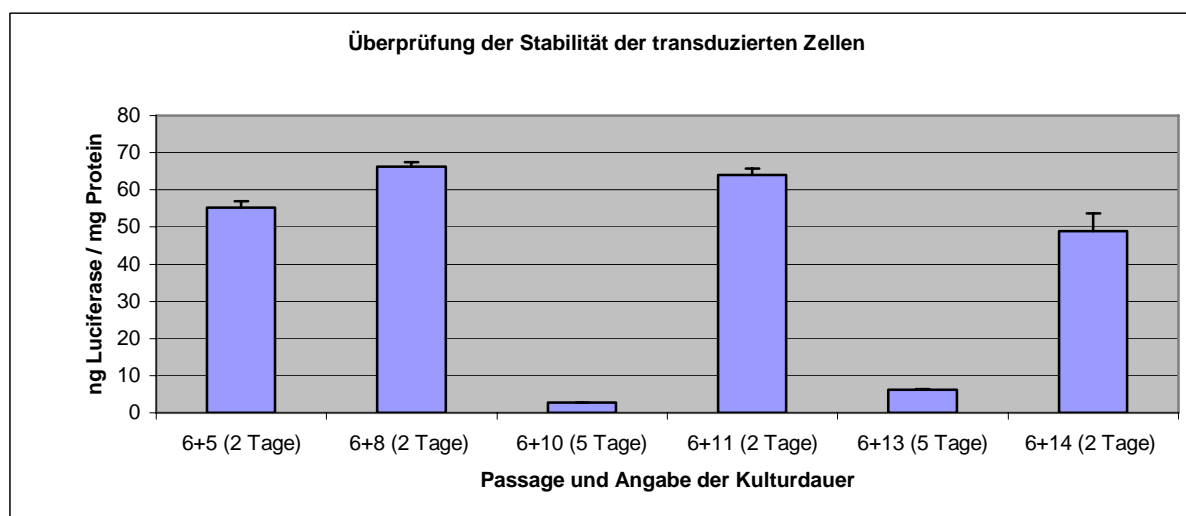
Das Allgemeinbefinden der Tiere in allen Versuchen ist ungestört, sofern nicht im Speziellen darauf verwiesen wird.

3.3.1 Ergebnisse des *in vitro* Versuches I: Abhängigkeit der Genexpression von der Konfluenz

Um evaluieren zu können, welchen Einfluss die Konfluenz der viral transduzierten Zellen auf die Expression der Luciferase hat, werden retroviral transduzierte B16F10-Melanomzellen der Passage 6+5 unter standardisierten Bedingungen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten (nach der 5., 8., 10., 11., 13. und 14. Passage) der Luciferase- und Proteingehalt von Zellproben in Triplikaten bestimmt. Das Zeitintervall beträgt 2 bzw. 5 Tage, nach denen die Zellen jeweils 1: 10 gesplittet werden.

Bei Splitten der Zellen alle 2 Tage im Verhältnis 1:10 (entspricht einer Zellkonfluenz von ca. 70 %) sind die ermittelten Genexpressionswerte konstant hoch, bei gleichzeitig niedrigen Standardabweichungen (siehe Abb. 7 und Tab. 11). Werden hingegen die transduzierten Zellen 5 Tage lang nicht gesplittet ist eine deutliche Abnahme der Genexpressionswerte zu erkennen (ca. 24-fach von Passage 6+8 zu P 6+10 bzw. ca. 10-fach von P 6+11 zu 6+13). Zu diesen Zeitpunkten sind die Zellen zu 100 % konfluent und es befinden sich viele abgelöste Zellen im Medium. Werden die Zellen nach diesem großen Zeitintervall (5 Tage) wieder schon nach 2 Tagen, und damit zu ihrer optimalen Populationsdichte gesplittet, erholen sich die Genexpressionswerte der folgenden Zellpassage, jedoch ohne ihren hohen Ausgangswert zu erreichen. Dies betrifft besonders Zellen höherer Passagezahl (siehe P6+14 in Abb. 7).

Abb. 7: Darstellung der Genexpression des Reportergens Luciferase in retroviral transduzierten Melanomzellen in Abhängigkeit vom Splittingintervall



Tab. 11: Quantitative Genexpression der retroviral transduzierten Zellen zu unterschiedlichen Passagezeiten

Zellpassage	Tage nach letztem Split	ng Luciferase / mg Protein			MW	SD
6+5	2	53,81	57,23	54,46	55,17	1,81
6+8	2	67,56	65,02	65,98	66,18	1,28
6+10	5	2,71	2,65	2,718	2,70	0,04
6+11	2	63,46	62,42	65,99	63,96	1,83
6+13	5	6,22	5,92	6,30	6,15	0,20
6+14	2	54,35	45,61	46,40	48,79	4,83

MW = Mittelwert

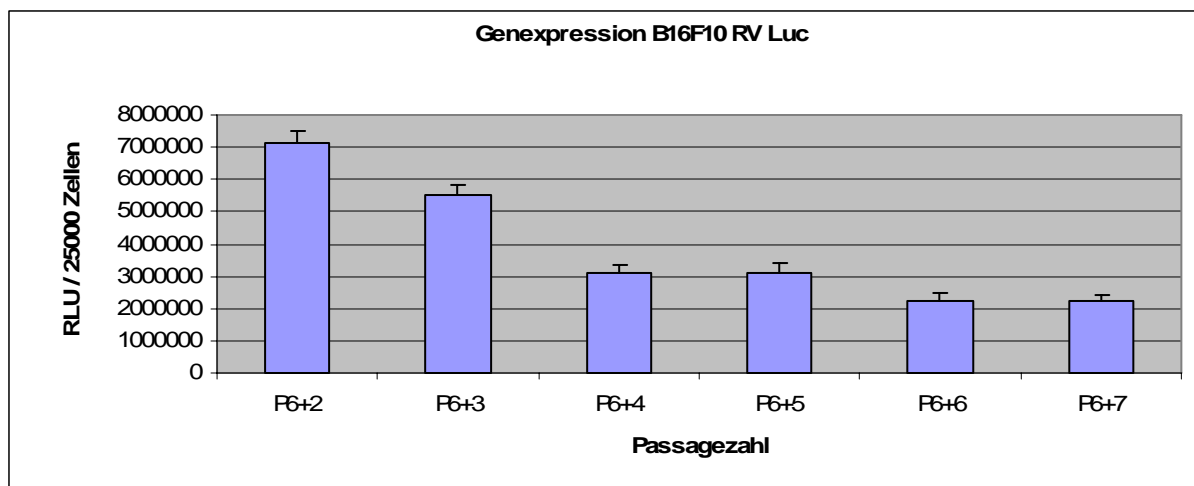
SD = Standardabweichung

3.3.2 Ergebnisse des in vitro Versuches II: Überprüfung der Expressionsstabilität von retroviral und lentiviral transduzierten Melanomzellen

Da für folgende Zellkultur- und in vivo Versuche stabil transduzierte B16F10-Melanomzellen mit möglichst hoher Luciferaseexpression notwendig sind, werden von beiden viral transduzierten (retroviral und lentiviral) Zellen bei jeder Passage Triplikate von 25 000 Zellen entnommen (beginnend mit Passage 6+2 (retroviral) bzw. Passage 7+3 (lentiviral)) und im Luminometer (Luciferasetest s. 3.2.1.4) die Lichtintensität (in RLU = relative light units) des, durch das Enzym Luciferase umgesetzten Substrates, gemessen.

Die retroviral transduzierten Zellen weisen direkt nach der Transduktion ca. 3,5-fach höhere Genexpressionswerte auf (ca. 7 Mio RLU / 25 000 Zellen), als die lentiviral transduzierten Melanomzellen (ca. 2 Mio RLU / 25 000 Zellen) zu Beginn der Messungen (s. Abb. 8 und 9 bzw. Tab. 12 und 13). Die Luciferasewerte beider Zelllinien fallen innerhalb der ersten 3 Zellpassagen um ihr 4-faches (retroviral transduzierte Zellen) bzw. ca. 2-faches (lentiviral transduzierte Zellen) ab. Trotz größerem Abfall der RLU-Werte der retroviral transduzierten Melanomzellen innerhalb der ersten Woche, weisen diese 2 Wochen nach Beginn der Untersuchungen und nach 6 Passagen, ca. 2-fach höhere Expressionswerte (ca. 2 Mio RLU) auf, im Vergleich zu den lentiviral transduzierten Zellen (ca. 700 000 RLU). Ab der dritten Zellpassage beider Zelllinien, und damit einem Zeitraum von ca. einer Woche, ist eine Stabilisierung der im Luminometer gemessenen RLU-Werten zu erkennen. Diese bleiben bei relativ geringen Standardabweichungen auf einem konstanten Niveau.

Abb. 8: Darstellung der Genexpression der retroviral transduzierten Melanomzellen im zeitlichem Verlauf



RLU = relative light units

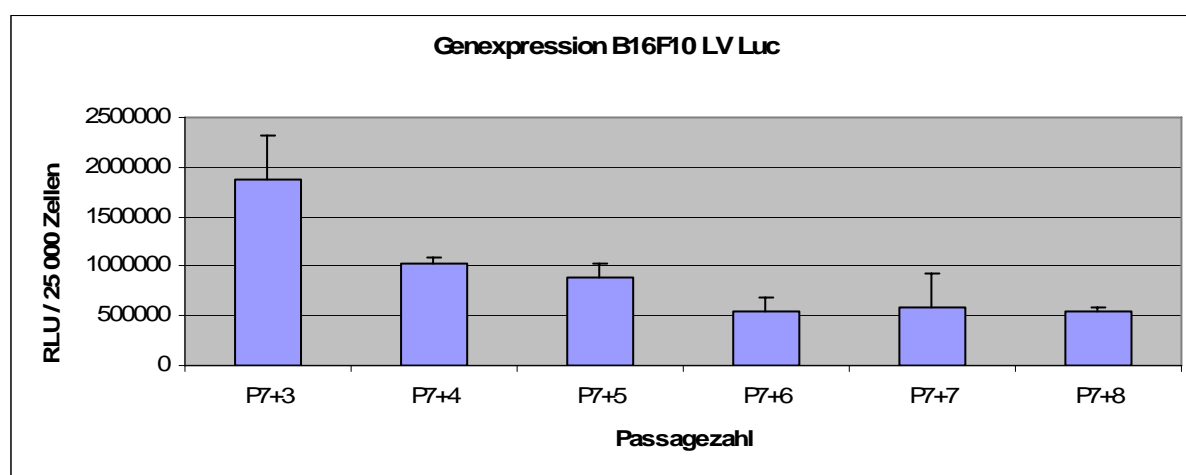
Tab. 12: Genexpression der retroviral transduzierten Melanomzellen zu den verschiedenen Passagezeiten

Zellpassage	RLU / 25 000 Zellen			MW	SD
P6+2	7112185	7505875	6866230	7161430	322653
P6+3	5283925	5797080	5557490	5546165	256765
P6+4	2837990	3231120	3286120	3118410	244403
P6+5	3434915	2945490	2979695	3120033	273231
P6+6	2027510	2448445	2301445	2259133	213634
P6+7	2418065	2183315	2097435	2232938	165975

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Abb. 9: Darstellung der Genexpression der lentiviral transduzierten Melanomzellen im zeitlichem Verlauf



RLU = relative light units

Tab. 13: Genexpression der lentiviral transduzierten Melanomzellen zu den verschiedenen Passagezeiten

Zellpassage	RLU / 25 000 Zellen			MW	SD
P7+3	2051210	1370570	2190855	1710890	481285
P7+4	1089360	1003515	979445	1046438	60702
P7+5	1041760	764655	836325	903208	195943
P7+6	450025	460910	704705	455468	7697
P7+7	175415	707645	843335	441530	376343
P7+8	585600	524705	546880	555153	43059

MW = Mittelwert

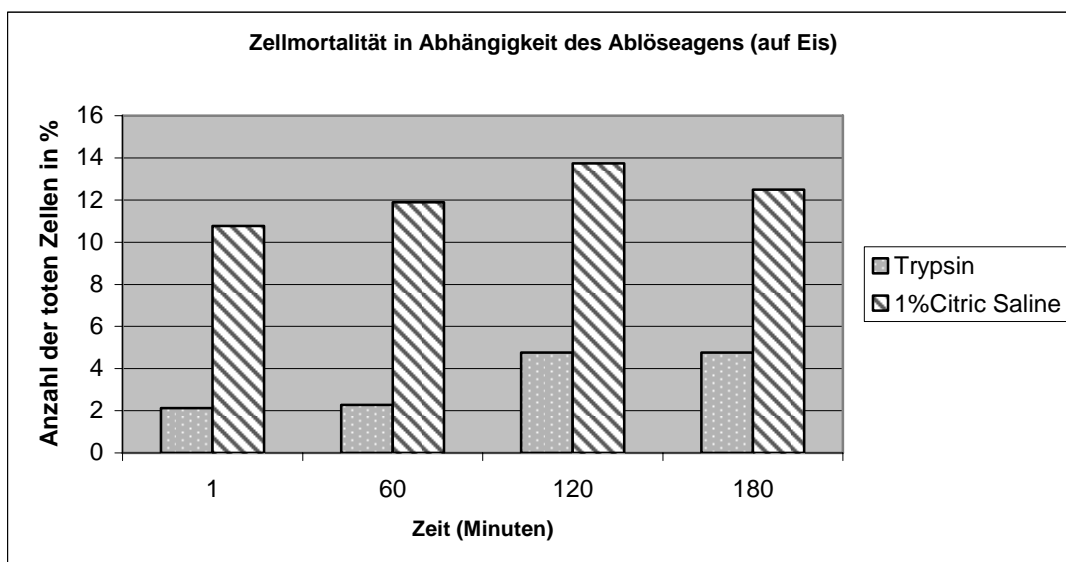
SD = Standardabweichung

3.3.3 Ergebnisse des in vitro Versuches III: Bestimmung der Zellmortalität in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. Citric Saline

Werden die abgelösten und in PBS resuspendierten Zellen sofort auf Eis verbracht, beträgt die Zellmortalität für Zellen, die mit Trypsin abgelöst wurden, zwischen 2,27 % (nach 1 Stunde) und 4,76 % (nach 3 Stunden) (s. Abb. 10 und Tab. 14) und damit deutlich weniger als bei den trypsinisierten Zellen, die bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden: 8,73 % Zellmortalität nach 1 Stunde bzw. 11,74 % nach 3 Stunden (s. Abb. 11 und Tab. 15). Betrachtet man die Werte der mit 1 % Citric Saline abgelösten Zellen, so ist auch hier eine deutliche Zunahme der Zellmortalität zu erkennen, wenn diese nach dem Ablösen bei Raumtemperatur, anstatt auf Eis verbleiben.

Der absolute Höchstwert der Zellmortalität kann nach Ablösen mit Citric Saline und anschließendem Verbleiben der Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur festgestellt werden: Über 28 % der Zellen sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vital (siehe Abb. 11 und Tab. 15).

Abb. 10: Darstellung der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. 1% Citric Saline im zeitlichen Verlauf (Zellen auf Eis)



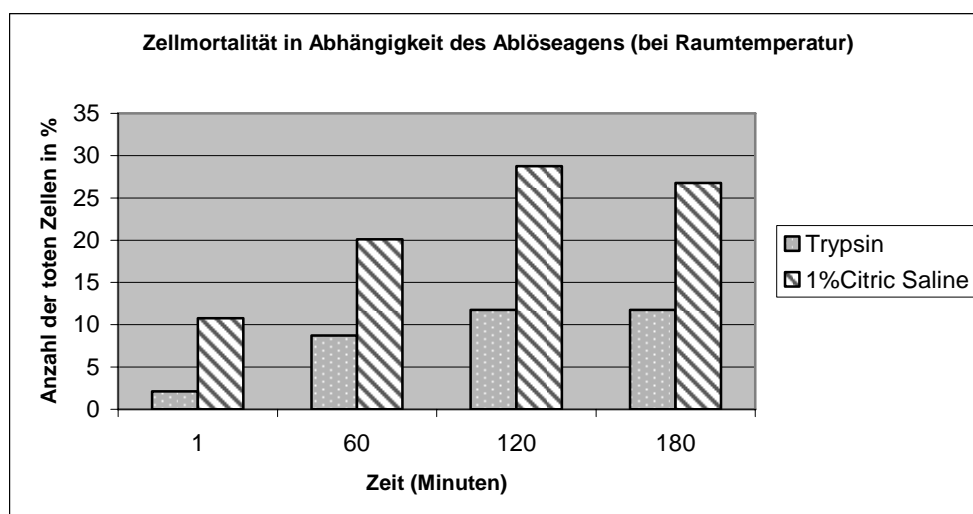
Tab. 14: Ergebnisse der Ablöseversuche durch Trypsin bzw. Citric Saline mit Bestimmung der Zellmortalität in PBS; Zellen auf Eis

Zeit (min)	Ablösereagenz	Zellzahl x10 ⁴ / ml								% Tote
		Einzelwerte Lebende			MW Lebende	Einzelwerte Tote			MW Tote	
1	Trypsin	44	48	46	46	1	1	1	1	2,12
1	1 %Citric Saline	40	43	41	41	5	6	5	5	10,77
60	Trypsin	41	48	40	43	1	1	0	1	2,27
60	1 %Citric Saline	38	40	42	40	9	5	8	7	11,89
120	Trypsin	60	64	57	60	3	2	3	3	4,76
120	1 %Citric Saline	41	39	40	40	6	5	7	6	13,74
180	Trypsin	60	61	58	60	2	3	3	3	4,76
180	1 %Citric Saline	40	42	43	42	5	5	7	6	12,50

MW = Mittelwert

Bei den auf Eis aufbewahrten Zellen unterscheiden sich die Mortalitätsraten der durch die beiden Reagenzien abgelösten Zellen signifikant voneinander: Deutlich bessere Ergebnisse, im Sinne einer größeren Menge an vitalen Zellen, befinden sich unter den mit Trypsin abgelösten Zellen. Des Weiteren steigt die Mortalitätsrate von dem Zeitpunkt 120 Minuten zum Zeitpunkt 180 Minuten nach dem Ablösen der Zellen, innerhalb der jeweiligen Gruppen nicht weiter an. Dies gilt auch für die bei Raumtemperatur aufbewahrten Zellen.

Abb. 11: Darstellung der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. 1% Citric Saline im zeitlichen Verlauf (Zellen bei Raumtemperatur)



Tab. 15: Ergebnisse der Ablöseversuche durch Trypsin bzw. Citric Saline mit Bestimmung der Zellmortalität in PBS; Zellen bei Raumtemperatur

Zeit (min)	Ablösereagenz	Zellzahl x10 ⁴ / ml								% Tote
		Einzelwerte Lebende			MW Lebende	Einzelwerte Tote			MW Tote	
1	Trypsin	44	48	46	46	1	1	1	1	2,12
1	1 %Citric Saline	40	43	41	41	5	6	5	5	10,76
60	Trypsin	63	55	47	55	6	5	4	5	8,73
60	1 %Citric Saline	39	40	38	39	10	9	12	10	20,11
120	Trypsin	45	46	49	46	5	5	7	6	11,74
120	1 %Citric Saline	39	30	36	35	10	19	12	14	28,77
180	Trypsin	46	48	45	46	6	5	7	6	11,74
180	1 %Citric Saline	35	36	30	33	12	11	13	12	26,76

MW = Mittelwert

3.3.4 Ergebnisse des in vitro Versuches IV: Vergleich von Isotonischer Kochsalz-, 5%Glucose-Lösung und PBS als geeignete Suspensionslösungen

Ziel des letzten in vitro Vorversuches ist das Finden einer geeigneten Suspensionslösung für retroviral transduzierte Melanomzellen, die es ermöglicht, zu injizierende Zellen möglichst ohne große Verluste bis zu 2 Stunden zu transportieren bzw. aufzubewahren. Dazu werden gewaschene transduzierte Melanomzellen (B16F10 RV Luc P 6+3) in drei verschiedenen Suspensionslösungen resuspendiert, auf Eis gestellt und jeweils stündlich nach Trypanblaufärbung die Zellmortalität berechnet (s. Tab.16).

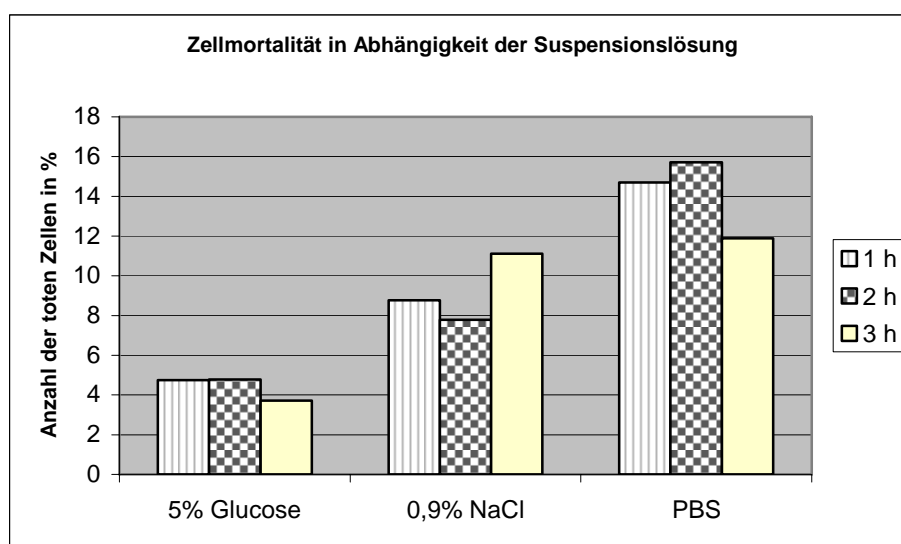
Tab.16: Ergebnisse der Mortalitätsstudien von retroviral transduzierten Melanomzellen in verschiedenen Suspensionslösungen und im zeitlichen Verlauf

Zeit (Stunden)	Suspensionslösung	Zellzahl x10 ⁴ / ml								% Tote
		Einzelwerte Lebende			MW Lebende	Einzelwerte Tote			MW Tote	
1	5 % Glucose	45	38	44	42	3	1	1	2	4,74
1	0,9 % NaCl	32	33	31	32	4	3	3	3	8,77
1	PBS	58	37	44	46	7	7	9	8	14,71
2	5 % Glucose	54	44	44	47	1	1	3	2	4,78
2	0,9 % NaCl	40	33	31	35	4	3	3	3	7,79
2	PBS	35	40	36	37	7	6	7	7	15,71
3	5 % Glucose	55	44	47	49	2	1	3	2	3,72
3	0,9 % NaCl	29	36	27	31	4	4	3	4	11,12
3	PBS	43	37	41	40	6	6	10	7	11,89

MW = Mittelwert

Wie aus Abb. 12 ersichtlich, befinden sich unter den in 5 %iger Glucose resuspendierten Melanomzellen die geringsten Zellverluste: Die Mortalität beträgt hier nach 1 Stunde im Mittel nur ca. 5 %. Ein ähnliches Ergebnis erhält man nach 3 Stunden Verweildauer (ca. 4 %). Doppelt bis 3-fach höhere Zellverluste dagegen zeigen sich unter den Zellen, die sich in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) befinden. Auch hier sind die Schwankungen der Mittelwerte innerhalb der 3 Stunden gering (s. Abb. 12 und Tab. 16). Die eindeutig ungeeignetste Suspensionslösung ist, mit bis zu 15,71 % Zellmortalität, die PBS-Lösung. Das bedeutet mit anderen Worten, dass nach 2 Stunden nur ca. 84 % vitale Zellen übrig sind. Ein weiteres Mal zeigt sich, dass bereits nach einer Stunde Zellverluste auftreten, deren Wert innerhalb der nächsten 2 Stunden nur minimal ansteigt bzw. abfällt (15,71 % bzw. 11,89 %).

Abb. 12: Vergleich der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in verschiedenen Suspensionslösungen und im zeitlichen Verlauf



3.3.5 Ergebnisse der Regulierung der Genexpression mittels siRNA in vitro

3.3.5.1 Ergebnisse des in vitro Versuches V- Magnetofektion von B16F10 RV Luc

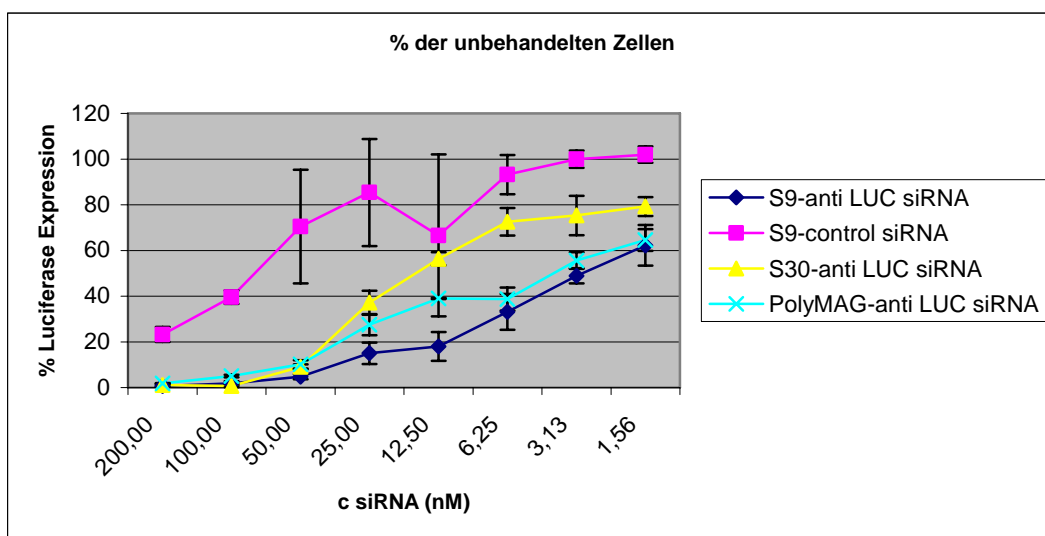
Ziel folgenden Versuches ist die Beantwortung der Frage, ob eine Herunterregulierung der Expression des Gens kodierend für das Enzym Luciferase in den transduzierten Melanomzellen gelingt. Dies wird zunächst mittels spezifischer siRNA (Anti-Luciferase siRNA, in 8 verschiedenen Konzentrationen) komplexiert jeweils mit einem von 3 verschiedenen superparamagnetischen Eisenpartikeln und der Magnetofektions-Methode überprüft.

Die visuelle Überprüfung der Zellen unter dem Mikroskop ergibt eine deutliche Morphologieänderung und Zunahme der Zellmortalität bei ansteigender siRNA-Konzentration: Bis zu einer siRNA-Konzentration von 25 nM pro well erscheinen die behandelten Melanomzellen vital.

Wie aus den Abbildungen 13 bis 15 ersichtlich, ist die Expression des Reportergens nach siRNA-Transfektion einerseits zeitabhängig, andererseits abhängig von der Konzentration der eingesetzten siRNA-Menge. Die größtmögliche Herunterregulierung der Genexpression lässt sich 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion feststellen (s. Tab. 17). Dabei zeigen Zellen, die mit Transfektionskomplexen behandelt wurden, die S9-Magnetpartikel enthalten, die größte Abnahme der Luciferaseexpression: Die Enzymexpression beträgt zwischen 62 % und 15 %, je nach eingesetzter siRNA-Menge (1,56 bzw. 25 nM). Während Zellen, die mit PolyMag-siRNA-Komplexen behandelt wurden, 24 Stunden nach Transfektion 27 % Luciferase Expression zeigen (bei einer siRNA Konzentration von 25 nM), sind S30-Komplexe bei gleicher siRNA Konzentration weniger wirksam: Hier beträgt die Genexpression 37 % (s. Tab. 17).

Auffällig ist, dass die mit S9-Partikeln komplexierte Kontroll-siRNA, besonders in höheren Konzentrationen, ebenfalls die Genexpression herabsetzt: Besonders deutlich ist die Abnahme der Genexpression 48 und 72 Stunden nach Transfektion (s. Abb. 14 und 15 bzw. Tab. 18 und 19).

Abb. 13: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 24 h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression stabil Reporter gen exprimierender Zellen („unbehandelt“) und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration



c siRNA = Konzentration der siRNA

Tab. 17: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % 24 h nach siRNA-Magnetofektion

c siRNA (nM)	% Luciferase Expression							
	S9-anti LUC		S30-anti LUC		PolyMag-anti LUC		S9-control	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
200,00	0,69	0,45	1,09	0,47	1,83	0,09	23,28	3,34
100,00	1,80	0,98	0,70	0,63	5,05	0,59	39,61	2,91
50,00	4,77	1,14	9,09	1,18	10,17	1,80	70,54	24,89
25,00	15,07	4,69	37,13	5,26	27,54	4,67	85,39	23,48
12,50	18,09	6,28	56,43	2,87	38,97	0,27	66,62	35,48
6,25	33,17	7,81	72,57	6,02	38,77	5,02	93,26	8,62
3,13	48,95	3,42	75,37	8,59	55,67	3,59	100,02	3,82
1,56	62,29	8,93	79,26	4,11	64,60	4,75	101,99	3,54

c siRNA = Konzentration der siRNA

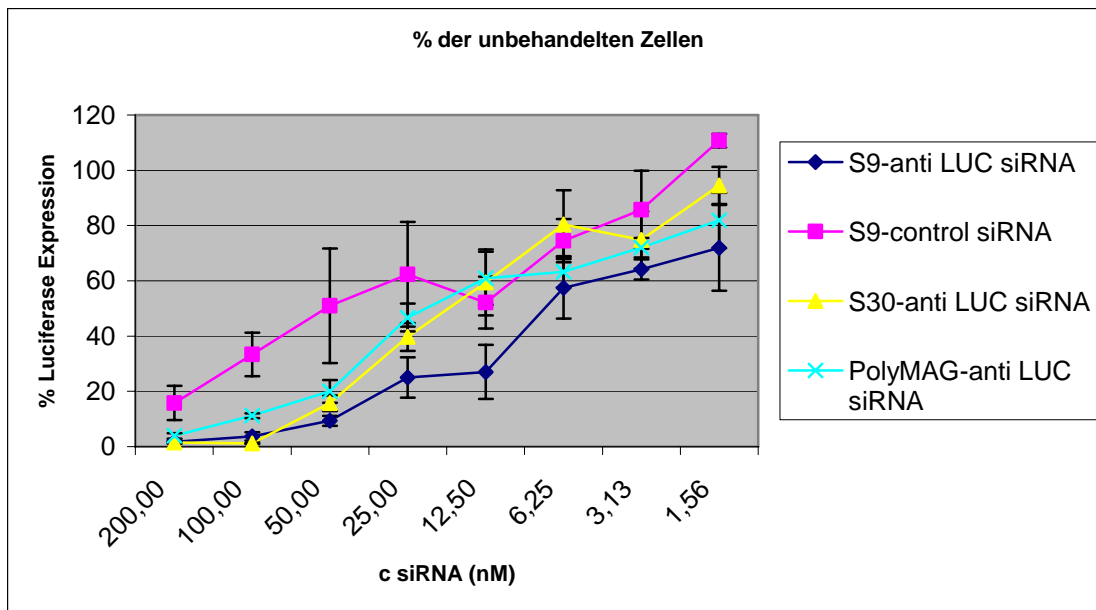
S9- bzw. S30- bzw. PolyMag-anti LUC = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9 / S30 / PolyMag) und Anti-Luciferase siRNA

S9-control = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9) und Kontroll-siRNA

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Abb. 14: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc Zellen (P22+5) 48 h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression unbehandelter Zellen und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration



c siRNA = Konzentration der siRNA

Tab. 18: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % 48h nach siRNA-Magnetofektion

c siRNA (nM)	% Luciferase Expression							
	S9-anti LUC		S30-anti LUC		PolyMag-anti LUC		S9-control	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
200,00	1,75	0,53	1,46	0,37	3,88	1,00	15,81	6,20
100,00	3,70	1,51	1,18	0,21	11,19	0,83	33,35	7,87
50,00	9,33	1,77	15,74	2,85	20,02	4,11	50,96	20,71
25,00	24,98	7,30	39,71	5,05	46,69	5,04	62,37	18,94
12,50	27,01	9,80	59,43	11,91	60,95	9,64	52,11	9,40
6,25	57,46	11,07	80,34	12,43	63,26	5,66	74,51	7,80
3,13	64,12	3,65	74,77	10,35	72,01	3,52	85,72	14,11
1,56	71,96	15,51	94,57	6,71	81,87	10,02	110,73	2,44

c siRNA = Konzentration der siRNA

S9- bzw. S30- bzw. PolyMag-anti LUC = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9 / S30 / PolyMag) und Anti-Luciferase siRNA

S9-control = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9) und Kontroll-siRNA

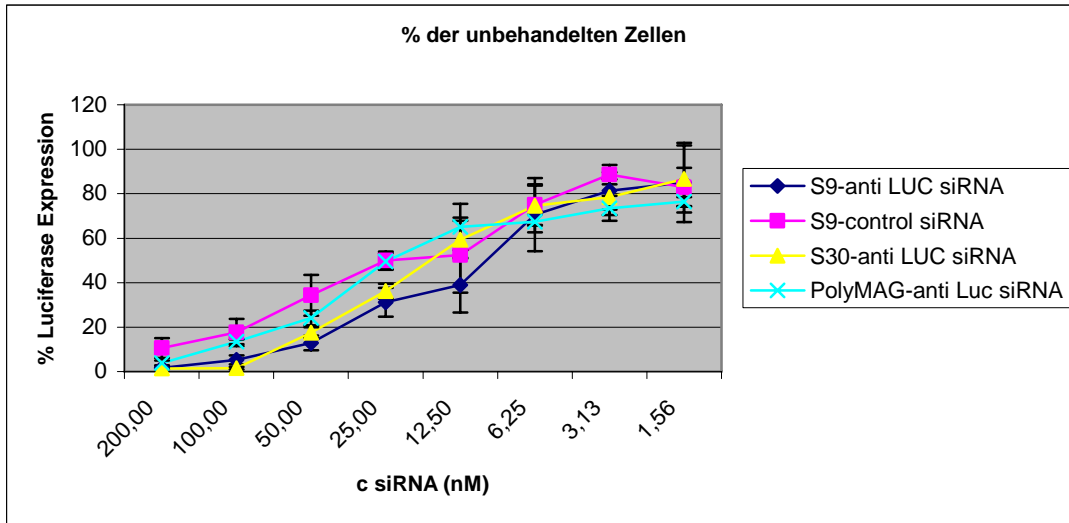
MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

72 Stunden nach siRNA-Transfektion steigen die Genexpressionswerte von allen behandelten Zellen wieder an. Die Herunterregulierung der Luciferaseexpression ist reversibel (s. Abb. 15).

Bei einer eingesetzten siRNA-Konzentration von 25 nM zeigen die Zellen, welche mit S9-Komplexen inkubiert wurden, die geringste Genexpression bzw. die höchste Herunterregulation. Ab einer Konzentration von 6,25 nM siRNA und weniger, sind keine großen Unterschiede in der Luciferaseexpression zwischen den verschiedenen behandelten Zellen detektierbar (s. Tab. 19). Die Luciferaseexpression der Zellen, die mit den verschiedenen Magnetpartikel-siRNA-Komplexen behandelt wurden, ist in dem genannten siRNA-Konzentrationsbereich vergleichbar hoch mit der Luciferase Expression der mit S9-Kontroll-siRNA behandelten Zellen (s. Tab. 19 und Abb. 15).

Abb. 15: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 72 h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression unbehandelter Zellen und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration



c siRNA = Konzentration der siRNA

Tab. 19: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in %, 72h nach siRNA-Magnetofektion

c siRNA (nM)	% Luciferase Expression							
	S9-anti LUC		S30-anti LUC		PolyMag-anti LUC		S9-control	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
200,00	1,74	0,30	1,41	0,33	3,94	1,11	10,59	4,45
100,00	5,28	2,02	1,52	0,57	13,47	1,06	17,61	6,07
50,00	12,96	3,30	17,51	2,41	24,14	3,33	34,38	9,18
25,00	31,17	6,43	36,18	3,34	49,58	3,73	50,07	3,94
12,50	38,92	12,35	59,37	8,46	65,08	10,41	52,42	16,86
6,25	70,63	16,47	74,61	8,96	67,38	4,70	75,08	9,14
3,13	81,28	8,35	78,50	8,07	73,50	5,61	88,64	4,40
1,56	85,09	17,79	86,65	15,10	76,41	2,02	82,94	8,80

c siRNA = Konzentration der siRNA

S9- bzw. S30- bzw. PolyMag-anti LUC = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9 / S30 / PolyMag) und Anti-Luciferase-siRNA

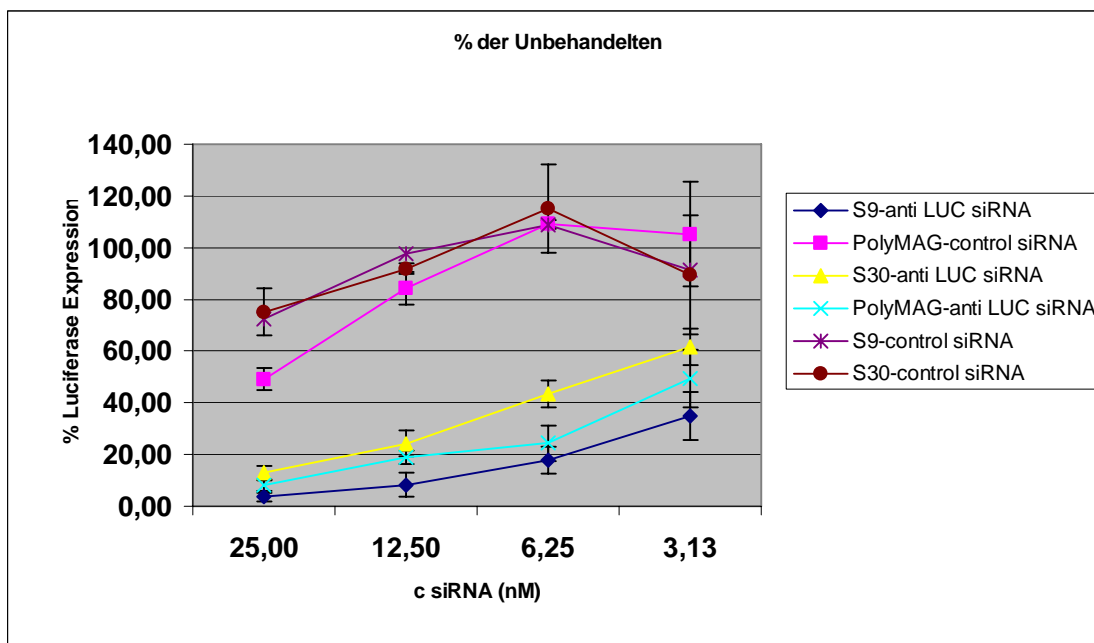
S9-control = Komplexe aus Eisenoxidnanopartikeln (S9) und Kontroll-siRNA

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Vergleicht man die Expressionswerte von Melanomzellen, die mit Kontroll-siRNA, komplexiert mit verschiedenen Magnetpartikeln, behandelt wurden, mit denen von mit Anti-Luciferase-siRNA-Komplexen behandelten Zellen, so zeigt sich insbesondere bei Einsatz von höheren siRNA-Konzentrationen ebenfalls eine Erniedrigung der Expressionswerte bei Verwendung der verschiedenen Kontroll-siRNAs (s. Abb. 16 und Tab. 20). Am größten ist dieser Effekt bei PolyMag-Kontroll-siRNA-Komplexen sichtbar, die die Luciferaseexpression nach 24 Stunden bis auf die Hälfte reduzieren (49,2 %, bei einer siRNA-Konzentration von 25 nM). In einem Konzentrationsbereich von 3 bis 10 nM Anti-Luciferase- bzw. Kontroll-siRNA pro well ist eine Herunterregulation von Luciferase bis zu 80 % (s. in Tab. 20: S9-anti LUC siRNA) bei gleichzeitig geringer bis keiner Auswirkung der Kontroll- siRNA auf die Genexpression ersichtlich. Dabei zeigen Anti-Luciferase-siRNA-Komplexe mit S9-Partikeln den größten Einfluss auf eine Erniedrigung der Genexpressionswerte.

Abb. 16: Vergleichende Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 24 h nach Magnetofektion mit Anti-Luciferase- bzw. Kontroll-siRNA und verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln, bezogen auf die Genexpression unbehandelter Zellen



Tab. 20: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 24 h nach Magnetofektion mit Anti-Luciferase- bzw. Kontroll-siRNA

c siRNA (nM)	% Luciferase Expression					
	S9-anti LUC		S30-anti LUC		PolyMag-anti LUC	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
25	3,67	1,64	12,99	2,63	8,01	2,06
12,5	8,35	4,57	24,22	5,01	18,89	2,69
6,25	17,68	5,23	43,37	5,15	24,37	6,96
3,13	34,98	9,23	61,77	7,02	49,56	11,15
c siRNA (nM)	S9-control		S30-control		PolyMag-control	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	25	72,28	24,38	75,08	9,13	49,20
12,5	97,61	3,98	91,80	2,07	84,35	6,42
6,25	108,62	10,33	115,25	17,06	109,04	1,64
3,13	91,34	15,43	89,49	22,90	105,18	20,24

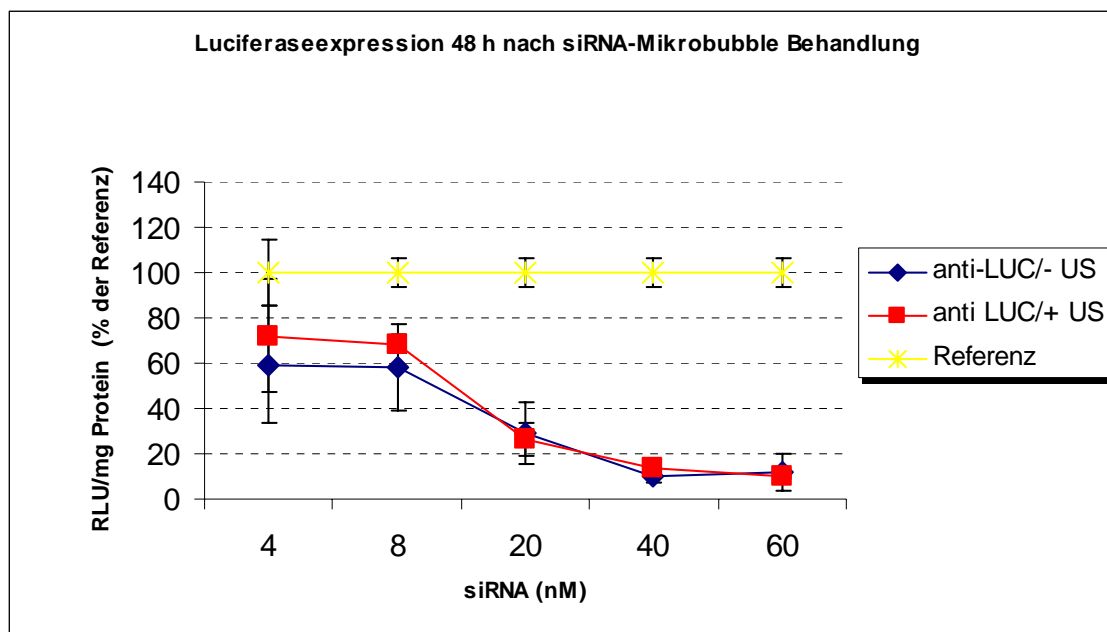
3.3.5.2 Ergebnisse der in vitro Versuche VI - Transfektion von transduzierten B16F10-Zellen durch magnetische siRNA Microbubbles

Ziel dieser Versuche ist es, zu klären, ob magnetische Microbubbles ihre erwünschte Funktion als Transportvehikel für die einzuschleußende siRNA erfüllen und die Ergebnisse mit denen der Magnetofektion zu vergleichen. Außerdem wird der Einfluss von Ultraschall auf die Transfektionseffizienz evaluiert. Mittels paralleler Messung der mitochondrialen Aktivität der transfizierten Zellen, kann zusätzlich die Zellvitalität bestimmt werden.

48 Stunden nach Transfektion von transduzierten B16F10-Melanomzellen der Passage P6+5 (Versuch 1) bzw. P6+7 (Versuch 2) gelingt eine Reduzierung der Luciferaseexpression in den behandelten Zellen mit Anti-Luciferase-siRNA beladenen Magnetobubbles in Abhängigkeit von der eingesetzten siRNA Konzentration (s. Tab. 21 und 22 bzw. Abb. 17 und 18): Im Vergleich zur Genexpression un behandelter Zellen, zeigen B16F10 RV Luc-Melanomzellen bei einer eingebrachten siRNA-Konzentration von 4 nM bzw. 8 nM nur noch 60 % bzw. 58% Luciferaseexpression (Versuch 1) bzw. 81 % und 50 % (Versuch 2; Werte ohne Ultraschallanwendung). Während im ersten Versuchsansatz bei diesen siRNA-Konzentrationen und gleichzeitiger Beschallung (30 sec, 2 Watt / cm², 1 MHz, 50 % duty cycle) die Zellen nach 48 Stunden noch 72 % bzw. 69 % Expression des Reportergens zeigen

und damit höhere Werte als ohne Ultraschallanwendung, exprimieren die beschallten Zellen im zweiten Versuchsansatz noch 65 % bis 62 % (s. Tab. 22). Das bedeutet nur im Konzentrationsbereich der siRNA von 4 nM und nur im zweiten Versuchsansatz sind die Luciferaseexpressionswerte durch Ultraschall niedriger verglichen mit der Expression unbeschallter Zellen mit gleicher siRNA-Konzentration. Mit ansteigender siRNA-Konzentration zeigt sich eine Abnahme der Genexpression transfizierter Zellen, jedoch bleiben die Werte nicht beschallter Zellen unter denen der beschallten Zellen.

Abb. 17: Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P6+5) 48 h nach Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubble Anwendung (Versuch 1)



RLU = relative light units

anti-LUC = Anti-Luciferase-siRNA

- US = ohne Ultraschallanwendung

+ US = mit Ultraschallanwendung

Referenz = unbehandelte Zellen

Tab. 21: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P6+5) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 48 h nach Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall (Versuch 1)

c siRNA (nM)	% Luciferase Expression			
	ohne US		mit US	
	MW	SD	MW	SD
4	59,51	25,97	72,25	24,58
8	58,04	18,88	68,63	4,18
20	28,89	13,76	26,35	7,44
40	10,37	2,74	13,45	3,43
80	11,57	8,08	9,82	0,62

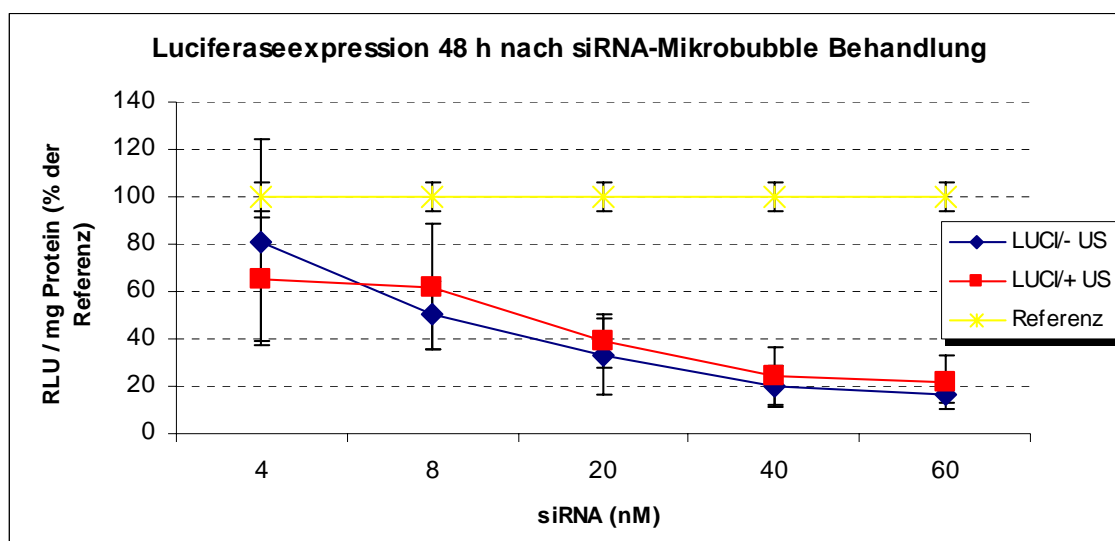
c siRNA = Konzentration der siRNA

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

US = Ultraschall Anwendung

Abb. 18: Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P6+7) 48 h nach Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubble Anwendung (Versuch 2)



RLU = relative light units

LUCI = Anti-Luciferase-siRNA

- US = ohne Ultraschallanwendung

+ US = mit Ultraschallanwendung

Referenz = unbehandelte Zellen

Tab. 22: Luciferaseexpression der B16F10 RV Luc-Zellen (P6+7) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 48 h nach Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall (Versuch 2)

c siRNA	% Luciferase Expression			
	ohne US		mit US	
	MW	SD	MW	SD
4	81,06	43,47	64,97	25,95
8	50,13	14,52	62,16	26,67
20	32,97	16,1	39,12	11,68
40	20	8,51	24,56	12,04
60	16,16	3,52	21,77	11,57

c siRNA = Konzentration der siRNA

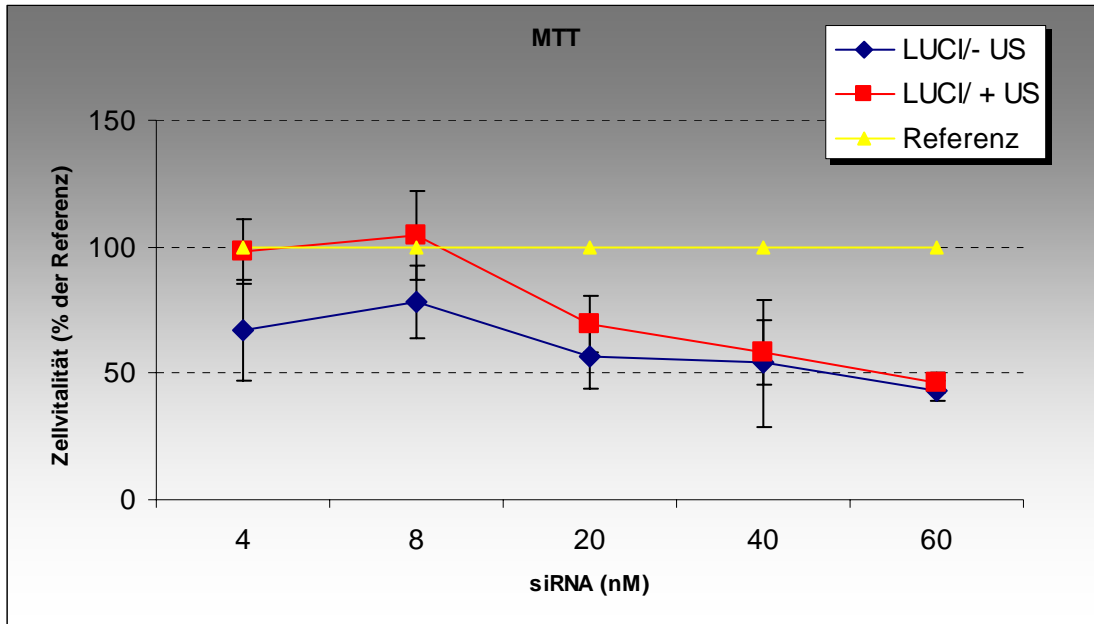
MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

US = Ultraschallanwendung

Unter dem Mikroskop betrachtet, erscheinen die Zellreihen, welche mit einer siRNA-Konzentration bis zu 20 nM behandelt wurden, im Vergleich zu der Kontrolle (unbehandelte Zellen) hinsichtlich ihrer Morphologie unverändert und vital. Die Zellvitalität, gemessen an der mitochondrialen Aktivität mittels MTT-Test (s. Abb. 19 und 20 bzw. Tab. 23 und 24), ist hingegen bereits bei niedriger siRNA-Konzentration (ab 4 nM) eingeschränkt. Je höher die siRNA-Konzentration in den verwendeten Magnetobubbles ist, desto toxischer ist die Wirkung auf die Zellen. Während sich die Toxizität im zweiten Versuch durch Ultraschallanwendung auf die Zellen nur in geringem Maß verstärkt (s. Abb. 20), sind die Vitalitätswerte derjenigen Zellen, die im ersten Versuch mit Ultraschall behandelt wurden, sogar höher, als die der nicht beschallten Zellen (s. Abb. 19). Ab einer siRNA-Konzentration von 20 nM sind laut MTT-Test nur 69 % (ohne Ultraschall) und 57 % (mit Ultraschall) in Versuch 1, bzw. 44 % (ohne Ultraschall) und 37 % (mit Ultraschall) der transfizierten Zellen vital.

Abb. 19: Zellvitalität der transfizierten B16F10 RV Luc-Zellen (P 6+5) gemessen mittels MTT-Test 48 h nach Transfektion (Versuch 1) (Angaben in % der Referenz)



LUCI = Anti-Luciferase-siRNA

- US = ohne Ultraschallanwendung

+ US = mit Ultraschallanwendung

Referenz = unbehandelte Zellen

Tab. 23: Zellvitalität in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) der transfizierten B16F10 RV Luc Zellen (P 6+5) 48 h nach Transfektion (Versuch 1)

c siRNA	Zellvitalität in %			
	ohne US		mit US	
	MW	SD	MW	SD
4	66,98	19,86	98,02	12,66
8	78,51	14,33	104,22	17,61
20	56,92	13,4	69,34	10,94
40	53,96	25,02	58,23	12,7
60	43,22	3,95	46,56	3,95

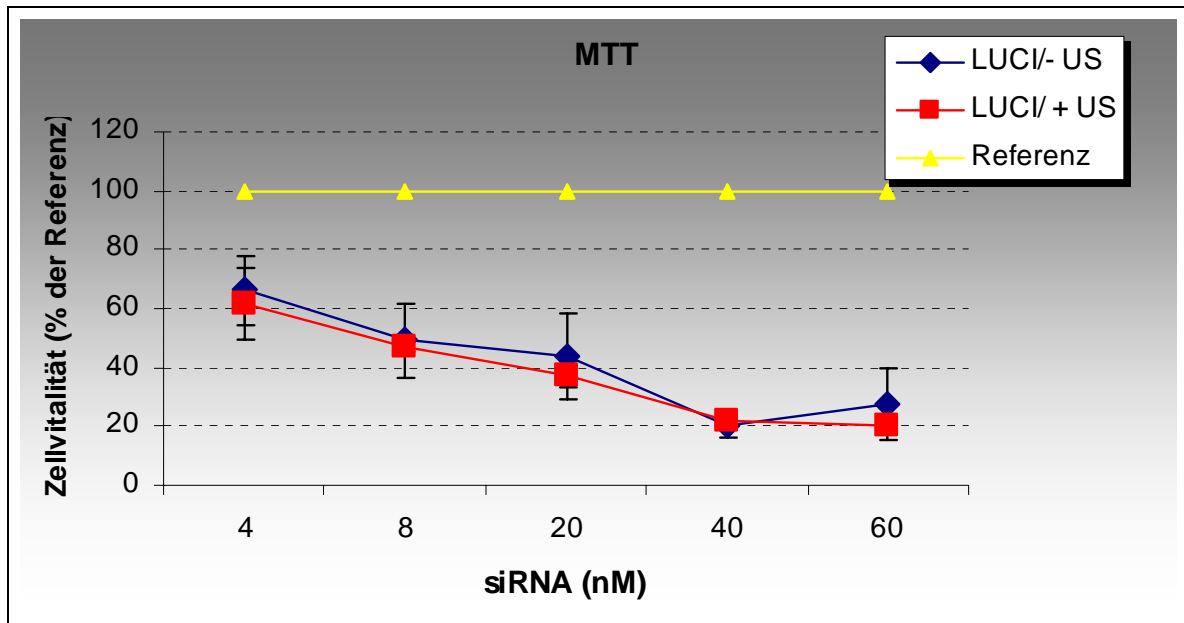
c siRNA = Konzentration der siRNA

US = Ultraschall

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Abb. 20: Zellvitalität der transfizierten B16F10 RV Luc-Zellen (P 6+7) gemessen mittels MTT-Test 48 h nach Transfektion (Versuch 2) (Angaben in % der Referenz)



LUCI = Anti-Luciferase-siRNA

- US = ohne Ultraschallanwendung

+ US = mit Ultraschallanwendung

Referenz = unbehandelte Zellen

Tab. 24: Zellvitalität in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) der transfizierten B16F10 RV Luc-Zellen (P 6+7) 48 h nach Transfektion (Versuch 2)

c siRNA	Zellvitalität in %			
	ohne US		mit US	
	MW	SD	MW	SD
4	66,4	11,7	61,58	12,13
8	49,27	12,55	47,32	1,91
20	44,08	14,69	37,42	4,47
40	20,33	3,75	21,65	0,98
60	27,57	11,93	20,18	2

c siRNA = Konzentration der siRNA

US = Ultraschall

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

3.3.5.3 Ergebnisse des in vitro Versuches VII: Gelelektrophorese zur Stabilitätsüberprüfung der siRNA

Die Fragestellung des folgenden Versuches zielte darauf ab, die Stabilität der siRNA nach dem Schüttelvorgang bei der Herstellung der Magnetobubbles bzw. nach Ultraschallanwendung zu überprüfen. Eine intakte siRNA ist eine wichtige Voraussetzung für ein funktionelles siRNA-Vektorsystem.

Abb. 21: Gelelektrophorese nativer siRNA im Vergleich zu siRNA aus Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall



Standardkontrast: Banden hell bis weiß

1 = Spur von nativer siRNA

2 = Spur von nativer siRNA mit 1 % SDS

3 = Spur von siRNA-Magnetobubbles ohne vorausgehende Ultraschallanwendung und ohne SDS

4 = Spur von siRNA-Magnetobubbles ohne vorausgehende Ultraschallanwendung und mit 1 % SDS

5 = Spur von siRNA-Magnetobubbles mit vorausgehender Ultraschallanwendung und ohne SDS

6 = Spur von siRNA-Magnetobubbles mit vorausgehender Ultraschallanwendung und mit 1 % SDS

Abbildung 21 zeigt, dass die Bande von nativer siRNA (1) auch bei Zugabe von 1 % SDS (2) vergleichbar ist und es zu keinen Veränderungen im Bandenmuster kommt. Die Banden der siRNA- Magnetobubble-Proben, bei welchen kein Ultraschall zur Anwendung kam (3 und 4), zeigen schwächere untere Banden. Die siRNA-Magnetobubbles, welche vorher beschallt wurden (5 und 6) zeigen hingegen deutlicher jene untere Bande auf Höhe der Banden von nativer siRNA (1 und 2). Bei allen 6 aufgetragenen Proben zeigt sich eine unspezifische Verschattung im Standardkontrast bzw. eine Aufhellung vor der unteren Bande. Insgesamt sind die Banden der siRNA-Magnetobubble-Proben (3 bis 6) alle mit derjenigen der nativen siRNA (1) vergleichbar. Der Schüttelvorgang bei der Microbubbleherstellung zeigt bei diesem Versuchsansatz keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der siRNA. Ultraschall scheint die Auftrennung und Darstellung der siRNA mittels Gelelektrophorese positiv zu beeinflussen, möglicherweise durch vermehrte Freisetzung der siRNA aus den Magnetobubbles.

3.3.6 Ergebnisse der Anwendung des siRNA-microbubble-Systems in vivo

3.3.6.1 Ergebnisse des in vivo Versuches I: Analyse des Tumorwachstums

Folgende in vivo Versuche, einschließlich der Biodistribution, Histologie und Elektronenmikroskopie, dienen der eigentlichen Etablierung eines B16F10-Lungenmelanom-Tiermodells, an dem anschließend ortsspezifische magnetische Deposition, ultraschallinduzierte Freisetzung von siRNA und schließlich therapeutische Wirksamkeit von Anti-Luciferase-Magnetobubbles untersucht werden können. Dazu wird zunächst das Tumorwachstum in der Lunge von C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Injektion von mit Luciferase transduzierten B16F10-Melanomzellen in zwei verschiedenen Dosisgruppen bestimmt.

Die Messung des Signals mit Hilfe des Imaging-Systems gelingt erst ab Tag 14. Das Signal ist zu diesem Zeitpunkt schwach und sehr diffus. Erst als am Tag 21 vor der Messung die Tiere rasiert werden, wird das Signal deutlicher.

Nach Opferung der ersten 6 Tiere (jeweils 3 pro Dosisgruppe) am Tag 6 des Tumorwachstums, können makroskopisch keine sichtbaren Lungenmetastasen in beiden Dosisgruppen festgestellt werden (s. Tab. 25). Die Messung der Luciferaseexpression am Luminometer der homogenisierten Lunge zeigt jedoch bereits eine geringe Genexpression im Bereich zwischen 0 und 31 pg Luciferase pro Gramm Gewebe. 14 Tage nach Tumorinokulation unterscheiden sich die Lungen der beiden Dosisgruppen auch

makroskopisch deutlich voneinander (s. Tab. 25 und Abb. 22, Bild a und c): Während in der Lunge derjenigen Tiere, welchen 100 000 transduzierte Melanomzellen injiziert worden war, nur 1 bis maximal 4 Tumore festzustellen sind, entwickelten die Tiere der höheren Dosisgruppe (200 000 Zellen) bis zu diesem Zeitpunkt 12 bis 23 einzelne Tumore.

Tab. 25: Vergleichende Darstellung von Anzahl und Größe der Lungenmetastasen zu verschiedenen Zeitpunkten (2 Dosisgruppen) und Luciferaseexpression in der Lunge

Mausnr.	Dosisgruppe	Anzahl Metastasen in Lunge	pg Luciferase / g Lungengewebe
Tag 6			
1	I	keine	12
2	I	keine	3
3	I	keine	0
4	II	keine	31
5	II	keine	11
6	II	keine	7
Tag 14			
1	I	1 m	23
2	I	4 k	2
3	I	1 m	0
4	II	23 (3g 7m13k)	1408
5	II	21 (5g 5m11k)	2240
6	II	12 (1g 6m 5k)	33
Tag 21			
1	I	13 (5g 3m 5k)	8089
2	I	4 (1g 3m)	14827
3	I	9 (4g 4m1k)	4542
4	II	24 (5g 2m17k)	18222
5	II	27 (4g 6m17k)	14925
6	II	33 (14g 7m 12k)	17310

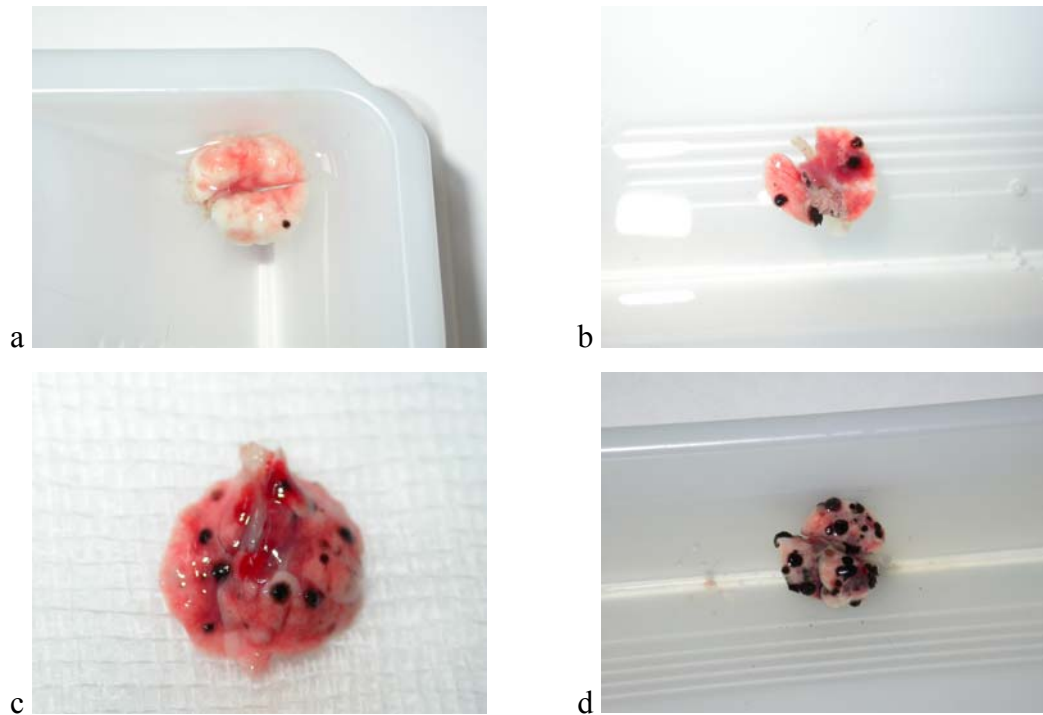
Mausnr. = Mausnummer

Dosisgruppe I = 100 000 applizierte B16F10 RV Luc Zellen

Dosisgruppe II = 200 000 applizierte B16F10 RV Luc Zellen

g = groß ; m = mittelgroß; k = klein

Abb. 22: Beispiele von entnommenen Lungen mit makroskopisch sichtbaren Melanomen zu verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums



a = Tag 14, 100 000 B16F10 RV Luc Zellen i.v.

b = Tag 21, 100 000 B16F10 RV Luc Zellen i.v.

c = Tag 14, 200 000 B16F10 RV Luc Zellen i.v.

d = Tag 21, 200 000 B16F10 RV Luc Zellen i.v.

Auch die umgerechneten Luciferasewerte (in pg) bewegen sich bei letztgenannter Gruppe im 4-stelligen Bereich, die Genexpression der Niedrig-Dosisgruppe hingegen bleibt vergleichsweise gering (s. Tab. 25). Am Tag 21 des Tumorwachstums zeigen die Tiere beider Dosisgruppen große Varianz in der Anzahl der Lungenmetastasen. Im Durchschnitt sind in den Lungen der Dosisgruppe II 28 einzelne Tumore detektierbar, bei der Dosisgruppe I nur 9. Das bedeutet eine 3-fach höhere Tumoranzahl in der Gruppe II im Vergleich zur Gruppe I, 21 Tage nach intravenöser Injektion der transduzierten Melanomzellen. In allen Lungen kann Luciferaseexpression im Luminometer gemessen werden. Während die Luciferasemengen (in pg) innerhalb der höheren Dosisgruppe wenig Varianzen zeigen und sich im 5-stelligen Bereich bewegen, ist die Luciferaseexpression der Niedrig-Dosisgruppe variabel und insgesamt geringer. Bei einem Tier der Niedrig-Dosisgruppe kann bei nur 4 sichtbaren Tumoren eine relativ hohe Genexpression (14827 pg/g) festgestellt werden.

Vergleicht man die Genexpressionswerte wichtiger entnommener Organe (s. Tab. 26), so können in beiden Dosisgruppen am Tag 6 keine bzw. sehr geringe Luciferasewerte in den Organen Herz, Leber, Milz und Niere gemessen werden. Dieses Bild ändert sich auch nicht am Tag 14 und 21 (Werte nicht dargestellt). Bei fast allen Mäusen (5 von 6) kommt es zu einer Expression des Reportergens an der Injektionsstelle. Die größten Luciferasewerte jedoch sind in der Lunge zu finden. Diese Tatsache und die als unauffällig zu beurteilenden anderen Organe, lassen den Schluss zu, dass sich die intravenös injizierten Melanomzellen fast ausnahmslos in der Lunge ansiedeln.

Tab. 26: Luciferaseexpression in verschiedenen Organen 6 Tage nach Tumorzell-inokulation

Mausnr.	Dosisgruppe	pg Luciferase / g Gewebe					
		Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere	Injektionsst.
1	I	0,06	12,10	0,02	0,00	0,03	3,22
2	I	0,00	3,09	0,01	0,00	0,00	9,37
3	I	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
MW	I	0,02	5,07	0,01	0,00	0,01	4,20
SD	I	0,03	6,28	0,02	0,00	0,02	4,76
1	II	0,03	31,08	0,01	0,00	0,00	0,04
2	II	0,01	10,60	0,02	0,00	0,00	0,02
3	II	0,00	7,47	0,00	0,00	0,00	8,16
MW	II	0,01	16,38	0,01	0,00	0,00	2,74
SD	II	0,01	12,82	0,01	0,00	0,00	4,70

Mausnr. = Mausnummer

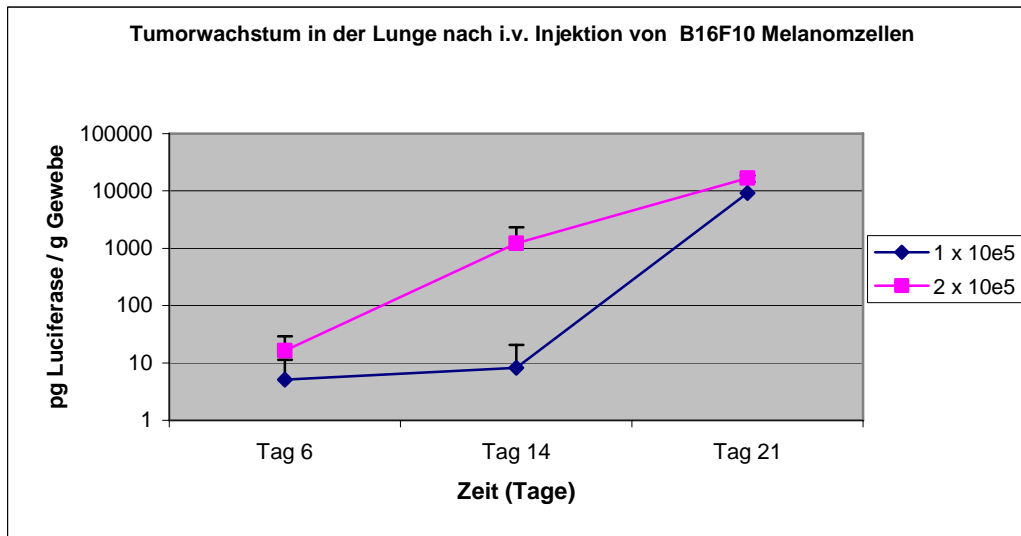
Injektionsst. = Injektionsstelle

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Die Expression des Reportergens Luciferase in der Lunge entwickelt sich bei der höheren Dosisgruppe von Tag 6 an annähernd exponentiell ansteigend mit geringer Standardabweichung (s. Abb. 23 und Tab. 27). Die Tiere der Niedrig-Dosisgruppe dagegen zeigen zu Beginn (bis Tag 14) eine relativ geringe Zunahme der Genexpression. Von Tag 14 bis zu Tag 21 kommt es anschließend in dieser Gruppe zu einer starken Zunahme der Luciferasewerte.

Abb. 23: Logarithmische Darstellung der Genexpression des Reportergens Luciferase in der Lunge nach Applikation von 1×10^5 bzw. 2×10^5 B16F10 RV Luc-Zellen im zeitlichen Verlauf



Tab. 27: Tumorwachstum und Genexpression in der Lunge in Abhängigkeit von der injizierten Menge an B16F10 RV Luc-Zellen

Tag	Dosisgruppe	pg Luciferase / g Lungengewebe (n=3)			MW	SD
		12	3	0		
6	I	12	3	0	5	6
14	I	23	2	0	8	13
21	I	8089	14827	4542	9152	5224
6	II	5	31	11	16	13
14	II	1408	2240	33	1227	115
21	II	18222	14925	17310	16819	1702

Dosisgruppe I = 100 000 applizierte B16F10 RV Luc-Zellen

Dosisgruppe II = 200 000 applizierte B16F10 RV Luc-Zellen

MW = Mittelwert

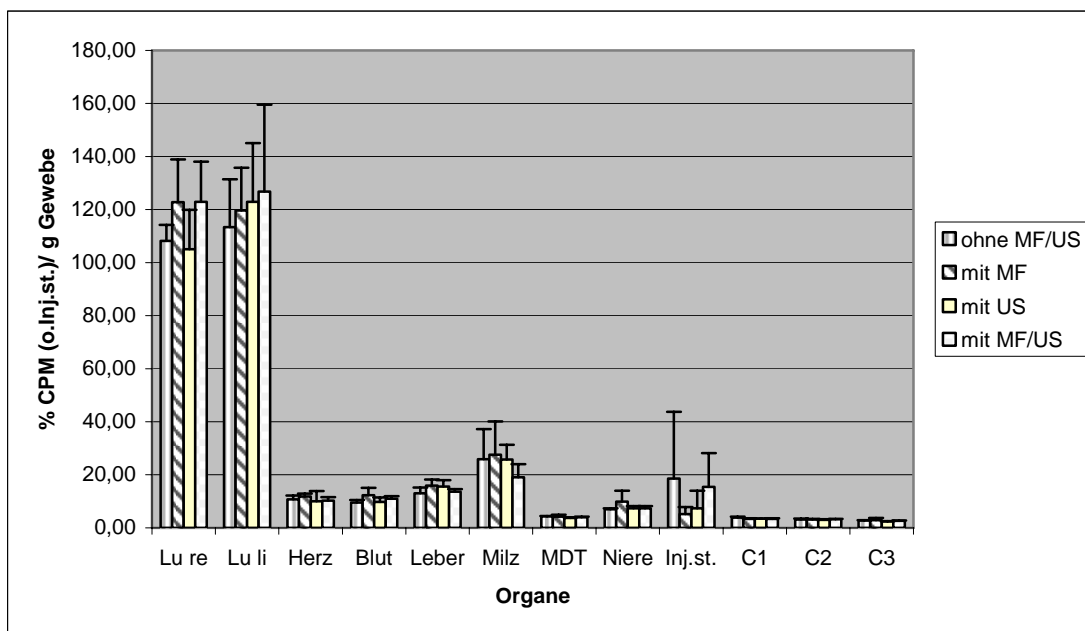
SD = Standardabweichung

3.3.6.2 Ergebnisse des in vivo Versuches II: Biodistributionsstudie mit ¹²⁵Iod-markierten siRNA-Microbubbles

Ziel dieser Untersuchung war, die Organverteilung der mit siRNA beladenen Magnetobubbles zu verfolgen und zu evaluieren, ob die Anwendung von Magnetfeld und bzw. oder Ultraschall die Deposition der aktiven Agenzien in der Lunge verbessert. Dazu wurden nicht tumortragende Mäuse, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, einer Kurzzeitbiodistribution unterzogen.

Unabhängig von der Anwendung eines Magnetfeldes oder des Ultraschalls ist jeweils über 100 % der siRNA (Relativwerte, bezogen auf Gramm Gewebe ; s. Abb. 24 und Tab. 28) nach 15 Minuten in der Lunge zu finden. Ein großer Anteil von 19 bis 27 % reichert sich in der Milz an. Im Lebergewebe befinden sich zu diesem Zeitpunkt zwischen 13 und 15 %, während im Blut noch ca. 10 % bis 13 % der eingesetzten Dosis zirkuliert. Ähnliche Anteile finden sich im Herzen wieder (10 % bis 12 %). Während in der Niere noch zwischen 7 % und 10 % der Dosis zu detektieren ist, befindet sich nur ein geringer Prozentsatz der siRNA in den übrigen Körperkompartimenten (C1, C2 und C3 jeweils ca. 3 %, s. Abb. 24).

Abb. 24: Relative Verteilung der radioaktiv (^{125}J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten nach Injektion (i.v.) der siRNA-Microbubbles mit 5 % Sojabohnenöl (Angaben der Mittelwerte in % CPM ohne Injektionsstelle / g Gewebe); n = 4; Magnetfeld bzw. Ultraschall Anwendung über der rechten Lunge



MF = Magnetfeld; US = Ultraschall

CPM = Counts per minute

Inj.st. = Injektionsstelle, hier gesamter Schwanz

Lu re / li = rechte / linke Lunge

MDT = Magen-Darm-Trakt

C1 = Kopfbereich

C2 = Thorax mit Vordergliedmaßen

C3 = kaudaler Körperbereich mit Beckengliedmaßen, Gastrointestinaltrakt und Harnblase

Diejenige Mausgruppe, bei welcher über der rechten Thoraxhälfte das Magnetfeld zum Einsatz kam, zeigt eine geringgradig höhere Anreicherung der markierten siRNA in der behandelten rechten Lungenhälfte (s. Tab. 28), die aber wegen der großen Varianz zwischen den einzelnen Tieren nicht signifikant ist. Ultraschall alleine bzw. der Einsatz von Ultraschall kombiniert mit Magnetfeld zeigt in diesen beiden Gruppen keine Wirkung: Auf der behandelten rechten Lungenhälfte deponiert relativ gesehen weniger als in der unbehandelten linken Lungenhälfte. Betrachtet man aber die siRNA-Deposition in der gesamten Lunge, so findet sich der größte siRNA-Anteil in den Lungen derjenigen Gruppe, welche die Vollbehandlung (MF + US) erhielt, gefolgt von der mit Magnetfeld behandelten Mausgruppe.

Tab. 28: Relative Verteilung der radioaktiv (^{125}J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten post injectionem (5 % Sojabohnenöl; Angaben der Mittelwerte in % CPM / g Gewebe und ohne Injektionsstelle); n = 4

Organ	% CPM (ohne Inj.st.) / g Gewebe			
	ohne MF/US	mit MF (re Lu)	mit US (re Lu)	mit MF/US (re Lu)
Rechte Lunge	108,21	122,77	105,02	122,91
Linke Lunge	113,33	119,66	122,94	126,80
Herz	10,73	11,79	9,95	10,22
Blut	9,53	12,33	9,70	10,99
Leber	12,97	15,86	15,49	13,63
Milz	25,89	27,56	25,73	19,01
Magen-Darm-Trakt	4,30	4,18	3,74	3,99
Niere	6,95	9,83	7,34	7,31
C1	3,89	3,32	3,49	3,37
C2	3,19	3,12	3,07	3,22
C3	2,71	2,92	2,47	2,62

MF = Magnetfeld

US = Ultraschall

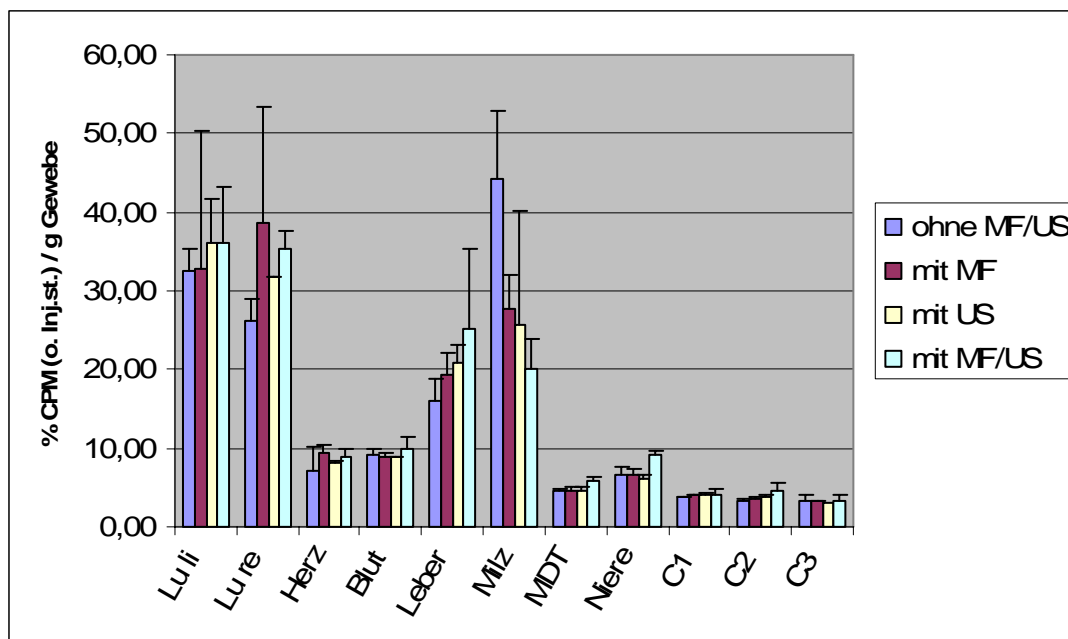
Die Ergebnisse des zweiten Versuchsansatzes mit siRNA-Magnetobubbles, die nur 1 % Sojabohnenöl enthielten und deshalb bedeutend kleiner (ca. 1 bis 5 μm) sind, sind folgende (s. Abb. 25 und Tab. 29):

Der größte Anteil der eingesetzten siRNA-Microbubblendosis deponiert wieder in der Lunge (26 % bis 38 %), dieses Mal aber mit geringem Unterschied zu dem in der Milz (20 % bis 44 % ohne Magnetfeld und Ultraschall Anwendung) und Leber (16 % bis 25 %) verbliebenen, ebenfalls großen Anteil. Im Vergleich zu der Organverteilung der siRNA-Microbubbles mit

5 % Sojabohnenöl zirkuliert jetzt eine etwas geringere Menge im Blut (9 % bis 10 %). Die Werte detektierbarer siRNA in Herz (7 % bis 9 %), Niere (6 % bis 9 %) und C1, C2 und C3 (3 % bis 4 %) sind ähnlich gering wie bei der Bubblekomposition mit höherem Sojabohnenanteil.

Wieder zeigt sich, ähnlich wie im ersten Versuchsansatz, bei Vergleich der mit Magnetfeld behandelten rechten Lungenseite gegenüber der linken unbehandelten Lungenhälfte innerhalb dieser Gruppe eine größere Deposition rechts. Aufgrund großer Varianzen resultiert auch hier eine hohe Standardabweichung. Diejenige Gruppe, die mit Magnetfeld und Ultraschall behandelt wurde, zeigt wieder im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen die größte Deposition der Dosis bezogen auf die gesamte Lunge, ebenfalls ohne Signifikanz.

Abb. 25.: Relative Verteilung der radioaktiv (^{125}J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten nach Injektion (i.v.) der siRNA-Microbubbles mit 1 % Sojabohnenöl (Angaben der Mittelwerte in % CPM ohne Injektionsstelle / g Gewebe); n = 4; Magnetfeld bzw. Ultraschall Anwendung über der rechten Lunge



MF = Magnetfeld; US = Ultraschall

CPM = Counts per minute

Inj.st. = Injektionsstelle, hier gesamter Schwanz

Lu re / li = rechte / linke Lunge

MDT = Magen-Darm-Trakt

C1 bzw. C2 = Kopfbereich bzw. Thorax mit Vordergliedmaßen

C3 = kaudaler Körperbereich mit Beckengliedmaßen, Gastrointestinaltrakt und Harnblase

Tab. 29: Relative Verteilung der radioaktiv (^{125}J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten post injectionem (1 % Sojabohnenöl; Angaben der Mittelwerte in % CPM / g Gewebe und ohne Injektionsstelle); n = 4

Organ	% CPM (ohne Inj.st.) / g Gewebe			
	ohne MF/US	mit MF (re Lu)	mit US (re Lu)	mit MF/US (re Lu)
Linke Lunge	32,56	32,87	36,15	36,07
Rechte Lunge	26,28	38,54	31,85	35,37
Herz	7,14	9,48	8,15	8,79
Blut	9,05	8,96	8,80	9,81
Leber	16,09	19,34	20,90	25,17
Milz	44,28	27,59	25,70	20,05
Magen-Darm-Trakt	4,67	4,45	4,69	5,76
Niere	6,73	6,73	6,08	9,10
C1	3,84	3,96	4,06	4,13
C2	3,43	3,64	3,82	4,48
C3	3,41	3,32	2,98	3,42

MF = Magnetfeld

US = Ultraschall

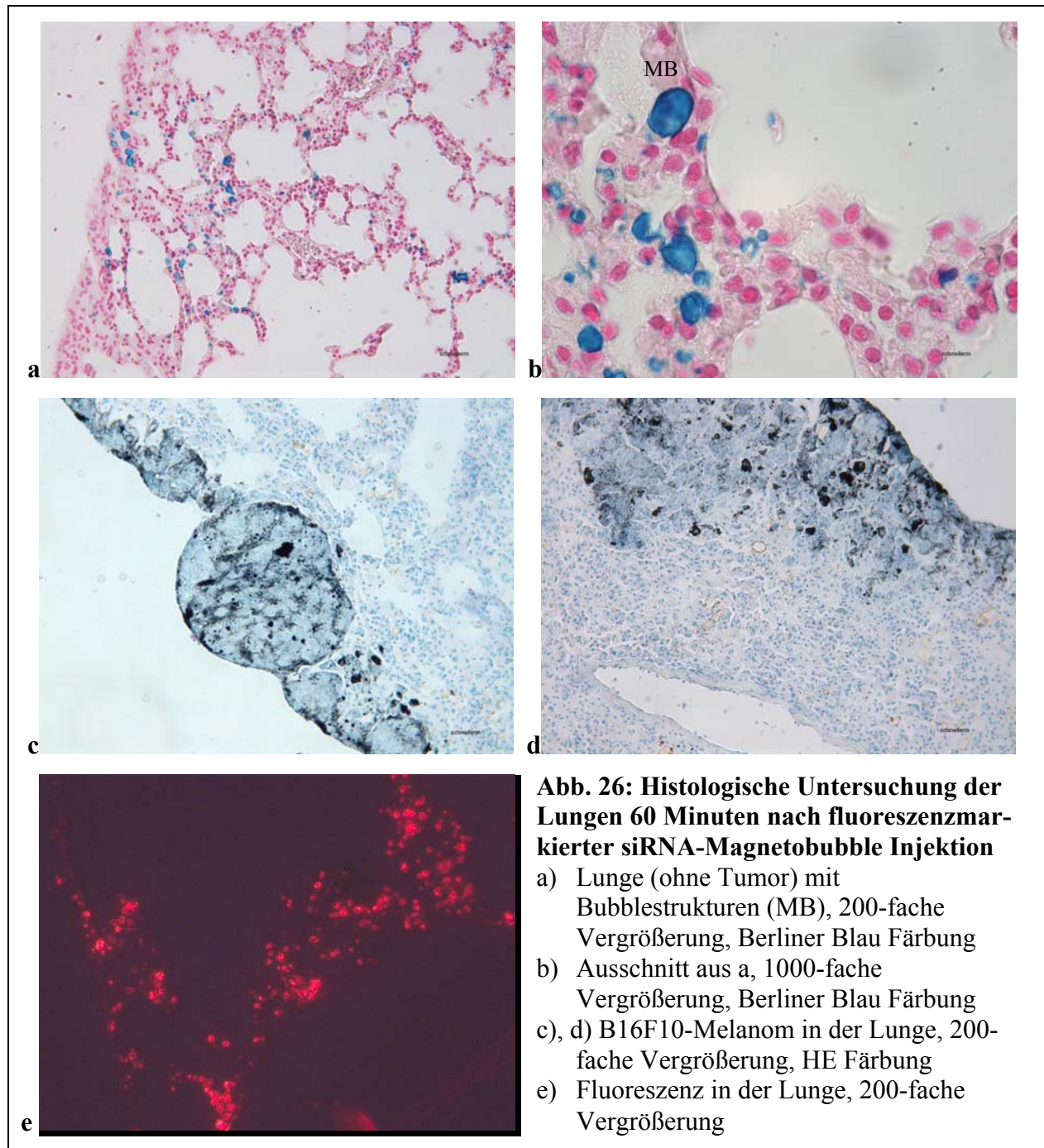
3.3.6.3 Ergebnisse des in vivo Versuches III: Histologie nach fluoreszenzmarkierter siRNA-Magnetobubble Injektion

Bei der Entnahme der kollabierten Lungen, sind auf der Lungenoberfläche der beiden mit Tumorzellen behandelten Mäuse bereits makroskopisch schwarze Tumorknötchen bzw. schwarz verfärbte Areale zu erkennen. Dies bestätigt sich in den lichtmikroskopischen Aufnahmen, auf denen einerseits einzelne „Tumormetastasen“ in Form von rundlichen Knoten auf der Lungenoberfläche (s. Abb. 26c) zu sehen sind, andererseits Lungengewebe, das von dem Melanin produzierendem Tumor regelrecht durchzogen ist (Abb. 26d).

Auffällig ist die Verdichtung der Lungenstruktur, speziell in den tumortragenden Lungen (Abb. 26c und 26d). Die Alveolarräume sind verengt, in den Blutgefäßen befinden sich zum Teil große Mengen an Magnetobubblematerial, das in einigen Arealen zu Embolie und Arterienspasmus führt. Erythrozyten sind sowohl in der nicht tumorösen Lunge, als auch in den Melanomlungen frei außerhalb der Gefäße im Alveolarraum sichtbar. Die teilweise erheblich an Größe zugenommenen, eisenhaltigen Strukturen (10 μm - 20 μm) sind vermehrt in den Blutgefäßen und im Bereich der Melanome detektierbar. Eine Aussage über einen eventuellen Übertritt der Magnetobubbles aus den Blutgefäßen und Aufnahme in andere Zellen (z. B. Makrophagen oder Epithelzellen) kann im Rahmen dieser Untersuchung nicht

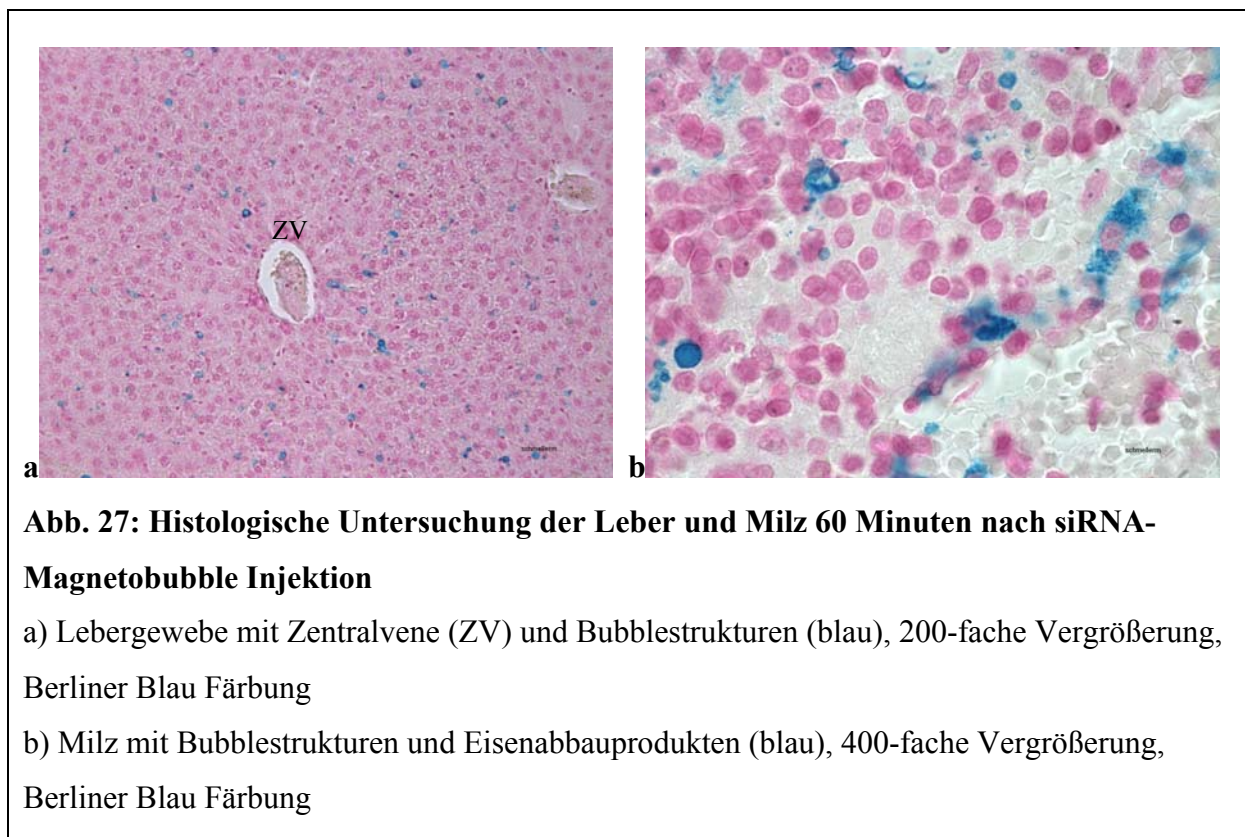
getroffen werden (wegen der Dichte der Lungenstruktur und der zweidimensionalen Aufnahmen).

Bei Betrachtung der Rotfluoreszenz (s. Abb. 26e), ausgehend von der Cy-3-markierter siRNA, lässt sich im Vergleich zu allen anderen entnommenen Organen eine Häufung in der Lunge beobachten. Diese ist jedoch aufgrund der Autofluoreszenz des Gewebes (v.a. knorpelhaltige Bronchien) nicht einwandfrei von letztgenannter zu unterscheiden.



Auf Berliner Blau gefärbten Schnitten der Leber und der Milz (s. Abb. 27a und 27b) ist zahlreiches, eisenhaltiges und deshalb blau gefärbtes Material zu erkennen. Dabei dürfte es sich größtenteils um intakte, eisenhaltige Magnetobubbles (rundliche Struktur und Größe zwischen 5 μm und 20 μm) bzw. deren Abbauprodukte handeln. Weiter bleibt die anatomische Struktur dieser Organe ohne besonderen Befund.

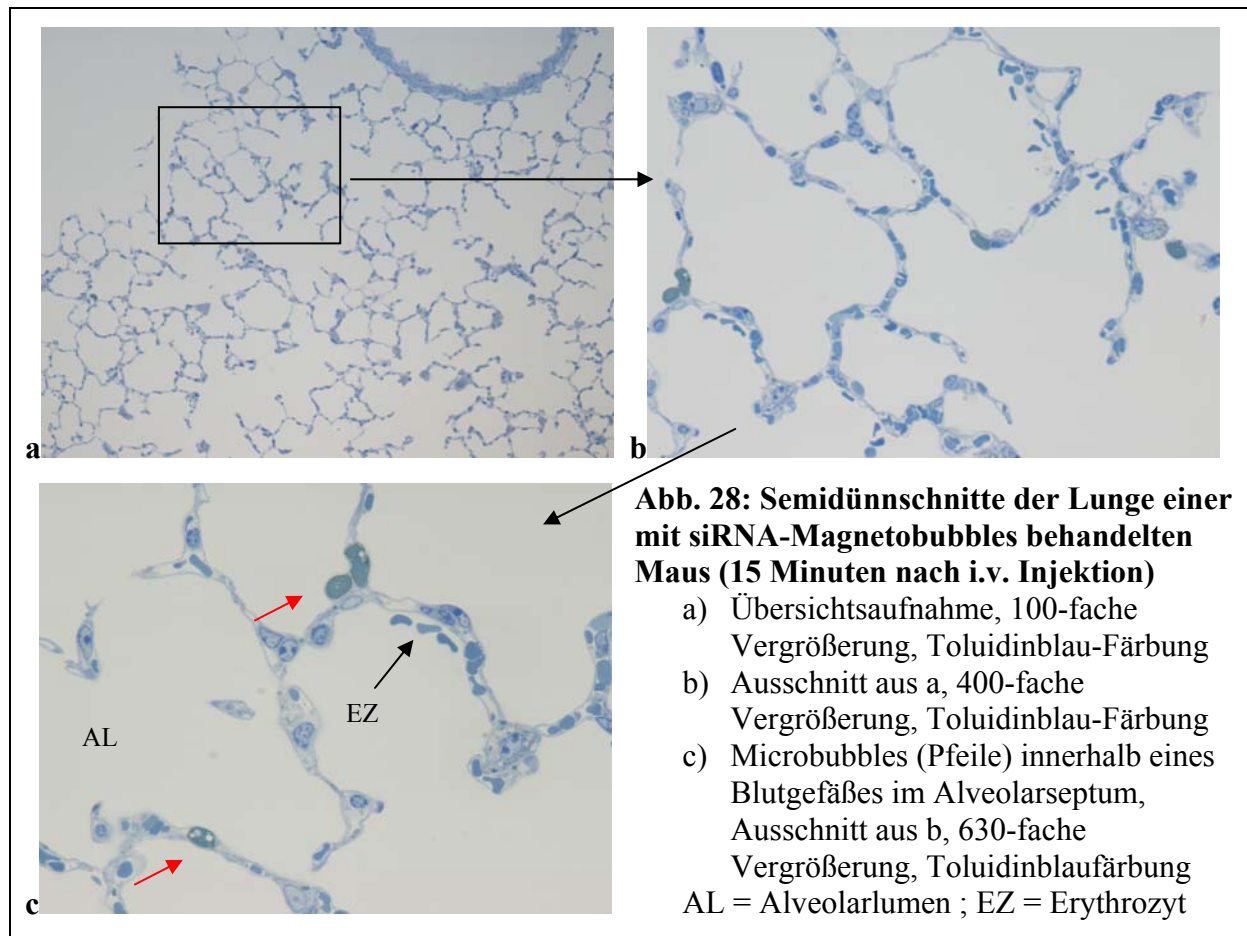
In den Organen Herz und Niere befindet sich nur zu einem geringen Anteil eisenhaltiges Microbubblematerial innerhalb der Blutgefäße. An der Injektionsstelle selbst ist verbliebenes, rot fluoreszierendes siRNA-Material sichtbar.



3.3.6.4 Ergebnisse des *in vivo* Versuches IV: Transmissions-Elektronenmikroskopie einer murinen Lunge behandelt mit siRNA-Magnetobubbles

Bereits unter dem Lichtmikroskop zeigt sich an den Semidünnschnitten (s. Abb. 28) die Struktur der *in situ* fixierten Lunge gut belüftet und weniger dicht, im Vergleich zu den Lungen im letztem Versuch. In den Alveolarvolumina befinden sich vereinzelt freie Erythrozyten. Innerhalb der Lungenkapillaren sind trotz angewandtem Ultraschall intakte

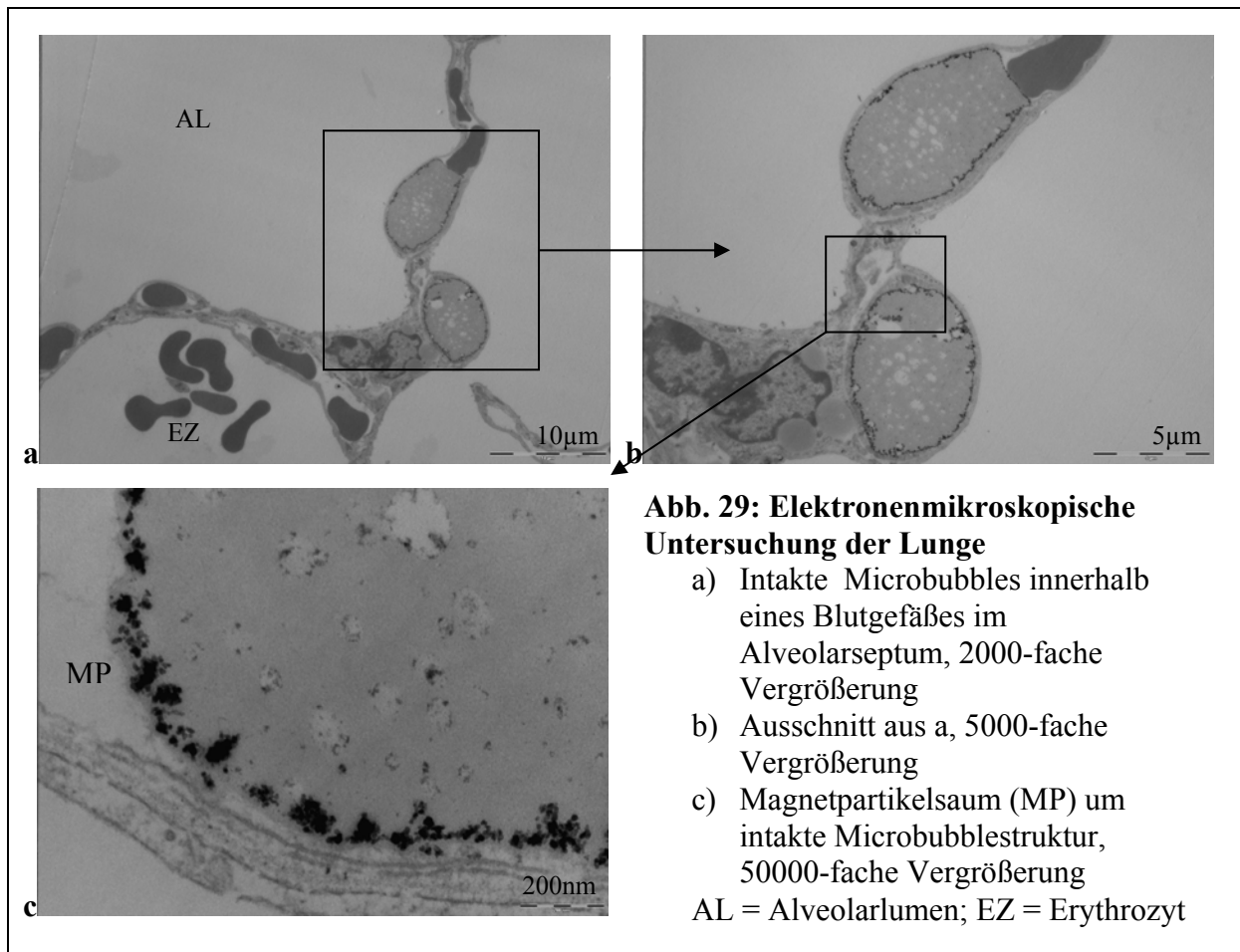
Microbubbles zu erkennen (s. Abb. 28c). In Epithel- oder Blutzellen aufgenommenes Microbubblematerial lässt sich nicht feststellen.



Nach der anschließenden elektronenmikroskopische Untersuchung dieser murinen, tumorfreien Lungenschnitte lässt sich 15 Minuten nach erfolgter siRNA-Microbubble Injektion Folgendes feststellen (s. Abb. 29):

Vorhandene Magnetobubbles befinden sich ausschließlich im Kapillarsystem und besitzen eine intakte, meist ovale Struktur. Sie sind durchschnittlich ca. 10 μm groß und mit Magnetpartikeln voll beladen. Die Magnetpartikel (im elektronenmikroskopischen Bild Kontrast gebend und deshalb schwarz sichtbar) liegen hauptsächlich als Aggregate von einzelnen Partikeln vor und umgeben die Bubblestruktur meist als Saum oder Kranz (s. Abb. 29b und 29c). Das Innere der Magnetobubbles erscheint inhomogen mit vielen, unterschiedlich großen, nicht elektronendichten „Blasen“ (es müsste sich um Gas oder Luft handeln), die ihrerseits auch mit Eisenpartikeln beladen sind. Außerhalb der Magnetpartikelkonglomerate konnten einzelne Partikel vermessen werden: Ihre Größe beträgt

zwischen 8 nm und 12 nm, was sich mit der Angabe des Herstellers (Chemicell GmbH, Berlin) deckt.



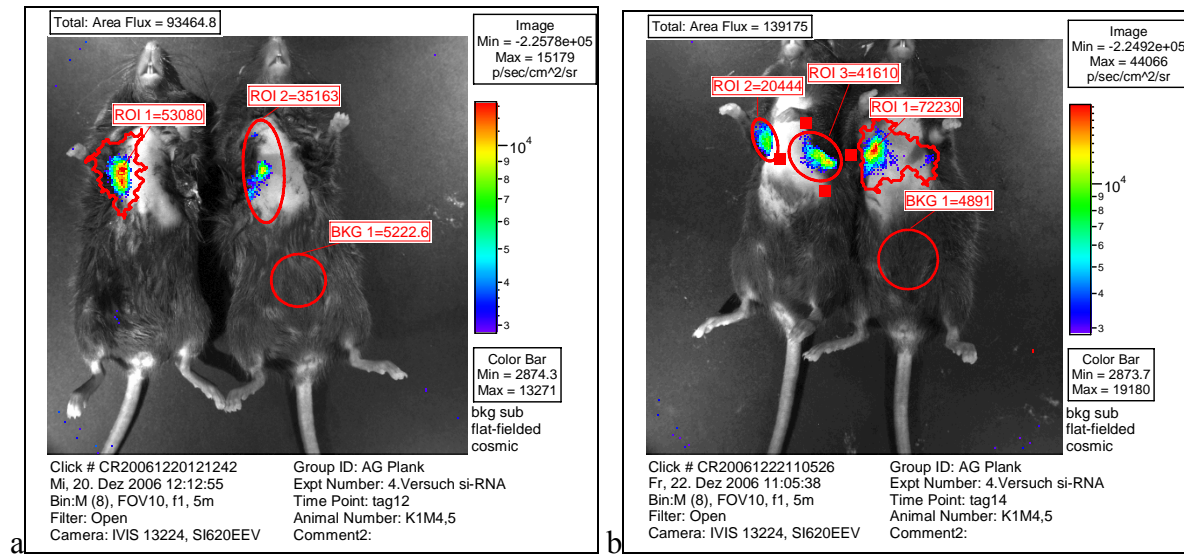
3.3.6.5 Ergebnisse des in vivo Versuches V: Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles am Tag 12 des Tumorwachstums

Folgender Versuch dient der Evaluierung der Funktionalität des siRNA-Microbubblesystems in vivo.

Die Lumineszenzaufnahmen der meisten murinen Lungen im Imagingsystem zeigen vor Beginn der Behandlung (12 Tage nach Tumorinokulation) ein gut detektierbares Signal im Thoraxbereich. Bei 4 der 16 Tiere kann zu diesem Zeitpunkt kein Signal detektiert werden (s. Tab. 30). Das quantifizierte Signal (in Photonen pro Sekunde pro Quadratzentimeter) ist, bis auf zwei Ausnahmen, im 5-stelligen Bereich zu sehen, mit größeren Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren. Zusätzlich kann bei einigen Tieren ein Signal im Bereich der Injektionsstelle am Schwanz festgestellt werden.

Kurz nach Injektion von 200 µl Kontroll-siRNA-Microbubbles zeigen zwei Mäuse Schnappatmung und versterben innerhalb einiger Minuten trotz sofort einsetzender Wiederbelebungsmaßnahmen.

Abb. 30: Biolumineszenz in der Lunge (Luciferase exprimierendes Melanom) am Beispiel zweier Mäuse vor (a) und 48 h nach (b) der Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles (i.v.); Aufnahme mit dem Ivis™ 100 Imagingsystem



ROI = region of interest = Erfassung der Lumineszenz innerhalb der eingezeichneten Fläche

BKG = background = Lumineszenz des Hintergrundes; wird automatisch von den ROIs abgezogen

$\text{p/sec/cm}^2 = \text{Photonen} / \text{Sekunde} / \text{cm}^2$ (Einheit)

a) ROI 1 (linke Maus): 53080; ROI 2 (rechte Maus): 35163

b) ROI 2+3 (linke Maus): 20444 + 41610; ROI 1 (rechte Maus): 72230

Zwei Tage nach intravenöser Injektion der siRNA-Magnetobubbles zeigen alle Tiere ein Biolumineszenzsignal über dem Thoraxbereich. Dieses hat bei jedem Tier im Vergleich zu der letzten Messung deutlich zugenommen (s. Tab. 30 und Abb. 30 und 31). Während die Tiere der unbehandelten Gruppe (Signal durch Luciferase produzierende transduzierte B16F10-Tumorzellen) durchschnittlich eine 7,3-fache Signalzunahme zeigen, beträgt die Signalerhöhung der mit Kontroll-siRNA-Microbubbles behandelten Versuchsgruppe ca. das 6,4-Fache. Die Tiergruppe, welche hingegen mit Anti-Luciferase-Magnetobubbles behandelt wurde, zeigt die geringste Signalzunahme (durchschnittlich 3,5-fach) innerhalb von 48 Stunden. Die großen Abweichungen innerhalb der drei Gruppen bedingen jedoch große Standardabweichungen.

In Abb. 31 sind die Lumineszenzzunahmen im Zeitverlauf dargestellt: Die mit Anti-Luciferase-Magnetobubbles behandelte Tiergruppe zeigt, im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe, eine schwächer ansteigende Kurve, während die Kurve der mit Kontroll-siRNA-Microbubbles behandelten Tiere deutlich steiler ansteigt, als die der Unbehandelten.

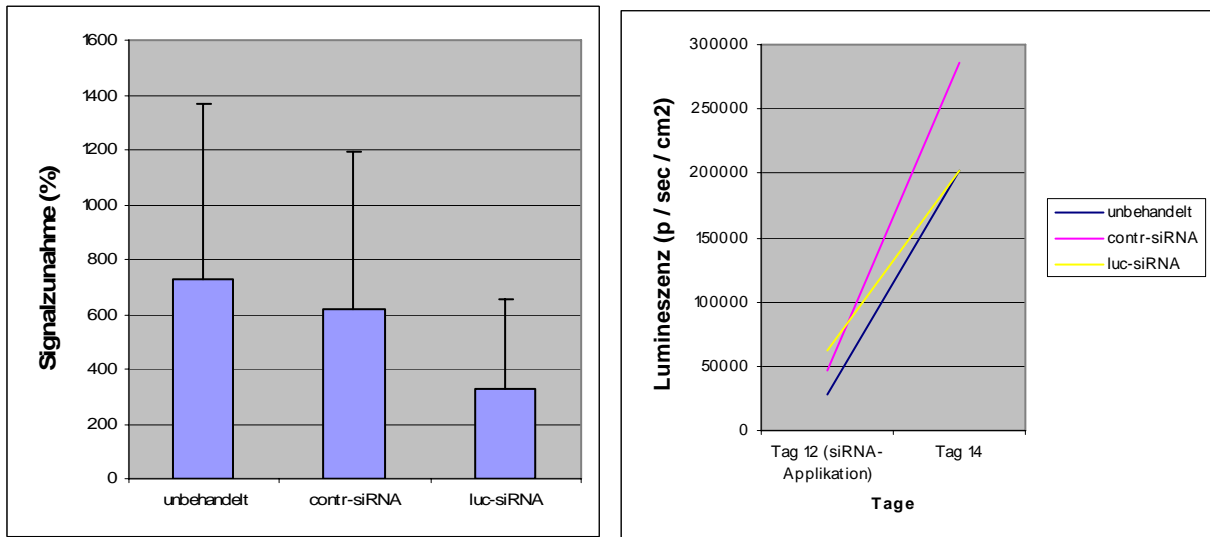
Ingesamt weisen die Ergebnisse der in vivo Biolumineszenzmessungen (Signalzunahme) trotz fehlender Signifikanz auf eine Funktionalität der eingesetzten Anti-Luciferase-siRNA Microbubbles im Sinne einer Herunterregulierung der Genexpression hin. Andererseits scheinen auch unspezifische siRNA-Sequenzen (Kontroll-siRNA) einen Einfluss auf die Regulation der Luciferaseexpression zu haben.

Tab. 30: Biolumineszenz in der Lunge als Maß für die Luciferase Aktivität vor und 48 h nach siRNA-Microbubble Applikation; Messung mit dem Ivis Imagingssystem (in vivo)

Mausnr.	p / sec / cm ²		Signalzunahme (%)
	Tag 12	Tag 14	
unbehandelt			
1	37475	106910	285
2	25995	135960	523
3	0	87043	
4	60471	468820	775
5	43293	312180	721
6	0	106080	
n = 6			
MW	27872	202832	728
SD	24290	154368	636
contr-siRNA			
7	24065	182990	760
8	116306	196765	169
9	48092	724520	1507
10	0	95188	
n = 4			
MW	47116	299866	636
SD	50131	286655	572
luc-siRNA			
11	58073	173920	299
12	58168	280000	481
13	103910	241530	232
14	53080	246054	464
15	35163	72230	205
16	0	76240	
n = 6			
MW	51399	181662	353
SD	25426	82482	324

MW = Mittelwert
SD = Standardabweichung
n = Anzahl der Versuchstiere
contr-siRNA = Kontroll-siRNA
luc-siRNA = Anti-Luciferase-siRNA

Abb. 31: Biolumineszenzzunahme in der Lunge (in %) (linke Abb.) bzw. im Verlauf (rechte Abb.) 48 h nach siRNA-Microbubble Applikation; Messung mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo)



unbehandelt = nur Tumorwachstum; n=6

contr-siRNA = Behandlung mit Kontroll-siRNA; n=4

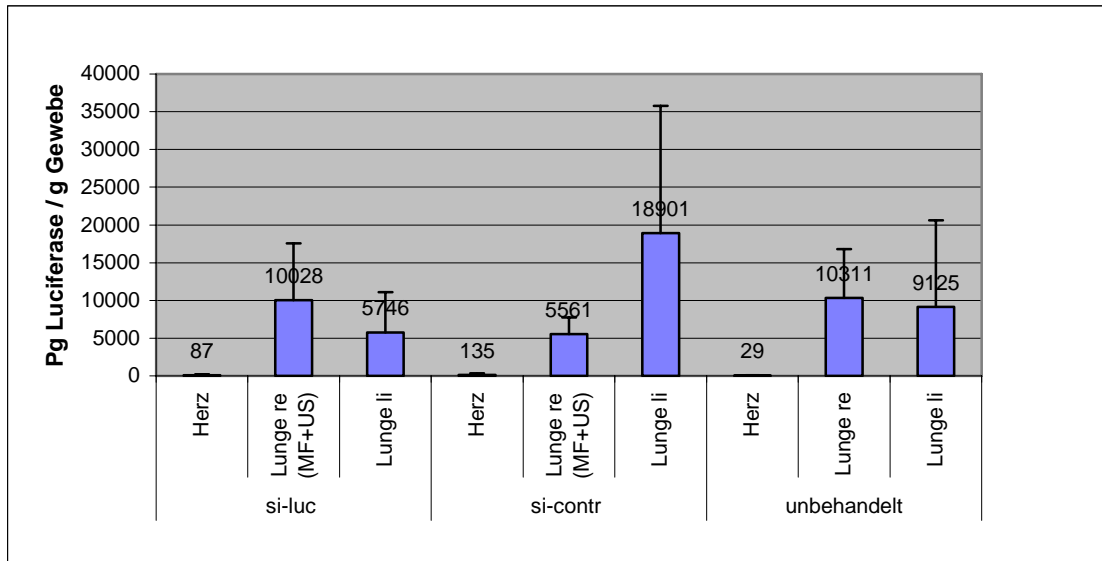
luc-siRNA = Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA; n= 6

p / sec / cm² = Photonen / Sekunde / Quadratzentimeter

Die ex vivo Messung der Gewebekomponenten am Luminometer 48 Stunden nach siRNA-Microbubble Injektion führt zu folgenden Ergebnissen:

Betrachtet man die quantitative Reporterexpression in der gesamten Lunge (rechter, mit Magnetfeld und Ultraschall behandelter und linker, unbehaltener Lungenflügel), so ist sie in der mit Anti-Luciferase-Magnetobubbles behandelten Mausgruppe (Mittelwert) am niedrigsten (s. Abb. 33 und Tab. 31). Vergleichbar den Lumineszenzmessungen in vivo, sind auch hier große Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren festzustellen, so dass sich die Standardabweichungen der verschiedenen Behandlungsgruppen überschneiden. In der mit funktioneller Anti-Luciferase-siRNA behandelten Gruppe zeigen 3 von 6 Mäusen Luciferasewerte im nur 4-stelligen Bereich, während in der unbehaltener Kontrollgruppe 5 von 6 Mäusen höhere (5-stellige) Luciferasewerte aufweisen (s. Tab. 31). Insgesamt ist die Luciferasemenge (Mittelwert) in den Lungen der mit Kontroll-siRNA-Microbubbles behandelten Tiere am höchsten, wobei 2 Tiere von 4 (Maus 7 und 9) sehr hohe Mengen aufweisen, die anderen zwei Mäuse hingegen niedrige Werte, die unter den Luciferasewerten der unbehaltener Tiere liegen.

Abb. 32: Luciferase Aktivität in den Lungenflügeln und im Herzen (ex vivo) 48 h nach siRNA-Microbubble Injektion (20 µg siRNA / Maus, i.v.)



si-luc = Behandlung mit anti-Luciferase-siRNA; n=6

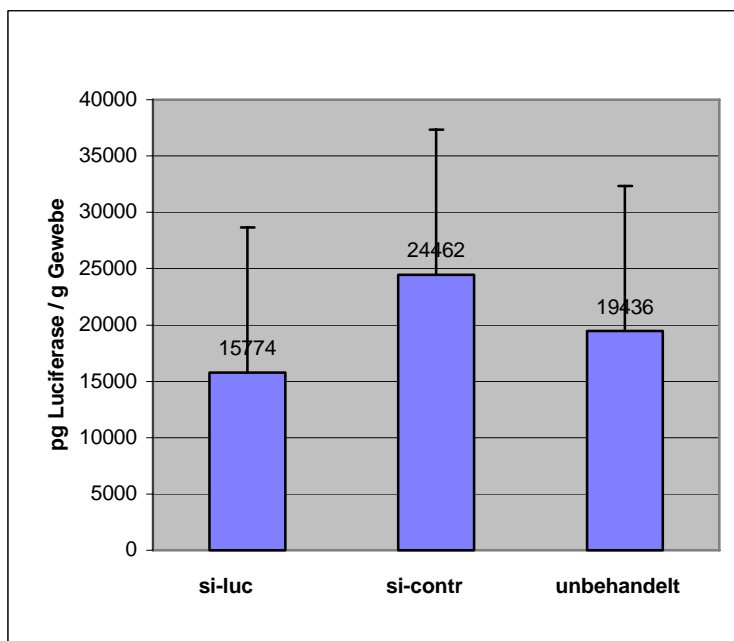
si-contr = Behandlung mit Kontroll-siRNA; n=4

unbehandelt = nur Tumorwachstum; n=6

Lunge re (MF+US) = rechter Lungenflügel, Applikation von Magnetfeld und Ultraschall

Lunge li = linker (unbehandelter) Lungenflügel

Abb. 33: Luciferase Aktivität in der gesamten Lunge 48 h nach siRNA-Microbubble Injektion (20µg siRNA / Maus, i.v.); Messung des Gewebehomogenisates am Luminometer (ex vivo): Mittelwerte



si-luc = Behandlung mit

Anti-Luciferase-siRNA; n=6

si-contr = Behandlung mit

Kontroll-siRNA; n=4

unbehandelt = Tumorwachstum;

n=6

Der Vergleich der quantitativen Luciferasewerte der mit Magnetfeld und Ultraschall behandelten rechten Lungenhälfte der jeweiligen Behandlungsgruppen untereinander zeigt Folgendes (s. Abb. 32):

Die mit funktionellen siRNA-Magnetobubbles (Anti-Luciferase-siRNA) behandelten Tiere weisen im rechten Lungenflügel ca. gleich große Werte auf, wie diejenigen der unbehandelten Kontrollgruppe (nur Tumorwachstum, rechte Lungenhälfte): 10028 pg Luciferase / g Gewebe (Anti-Luc) gegenüber 10311 pg Luciferase / g Gewebe (unbehandelt). Die mit Kontroll-siRNA-Microbubbles injizierten Mäuse zeigen innerhalb der rechten Lunge im Mittel nur ca. die Hälfte der Luciferasemenge (5561 pg Luciferase / g Gewebe) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe.

Während die Luciferaseaktivität in der nicht angesteuerten, linken Lungenhälfte sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe, als auch in der mit Anti-Luciferase-siRNA behandelten Tiergruppe im Gegensatz zu der jeweiligen rechten Lungenseite niedriger ist, weist die linke Lungenseite der mit Kontroll-siRNA-Magnetobubbles behandelten Versuchsgruppe durchschnittlich 3,4-fach höhere Luciferasewerte auf, im Vergleich zu der physikalisch angesteuerten rechten Lungenhälfte.

Insgesamt ist durch die ex vivo Messmethode eine erwartete Herunterregulierung der Luciferaseexpression in der rechten Lungenhälfte oder in der gesamten Lunge in der mit spezifischer Anti-Luciferase-siRNA behandelten Tiergruppe nicht eingetreten. Andererseits scheint sich hingegen die unspezifische Kontroll-siRNA auf die Genregulation des Reportergens im Sinne einer Niederregulierung auszuwirken.

Bei Vergleich der Biolumineszenzdaten, gemessen 48 Stunden nach siRNA-Microbubble Applikation am lebenden Tier (Tag 14 des Tumorwachstums) und der Luciferasemenge pro Gramm Gesamtlungengewebe nach Homogenisierung (ex vivo) zu dem genannten Zeitpunkt, ist Folgendes festzustellen (s. Tab. 31 und Abb. 34):

Die Durchschnittswerte der Messungen beider Methoden korrelieren in allen drei Behandlungsgruppen miteinander. Bei Betrachtung der Daten einzelner Tiere, fallen insbesondere die Mäuse aus der mit Kontroll-siRNA-Magnetobubble Behandlungsgruppe negativ auf: Maus 7, 8 und 9 zeigen im Imaging ansteigende Signale (Maus 9 ca. das 4-fache von Maus 7), während der ex vivo gemessenen Luciferasewert bei Tier 7 ca. das 2-fache von Tier 9 beträgt (s. Tab. 31). In der Lunge von Maus 8, welche im Imagingsystem ein vergleichbar hohes Biolumineszenzsignal wie Maus 7 zeigt, kann durch luminometrische Messung nur ein 4,4-fach niedrigerer Wert als bei Tier 7 detektiert werden.

Anders verhält es sich mit der individuellen Übereinstimmung beider Messmethoden in der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit spezifischer Anti-Luciferase-siRNA-Microbubbles behandelten Tiergruppe: Hier zeigt sich bis auf eine Ausnahme (Maus 11) eine gute Korrelation beider Messwerte innerhalb der einzelnen Individuen.

Tab. 31: Lumineszenz in der Lunge 48 Stunden nach siRNA-Microbubble Applikation (Tag 14 des Tumorwachstums) gemessen mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo) bzw. im Luminometer (ex vivo)

	Mausnr.	Käfig/Maus	Biolumineszenz (in vivo)	Lumineszenz (ex vivo)
			p / sec / cm ²	pg Luciferase / g Gewebe
unbehandelt	Maus 1	K3M1	106910	15412
	Maus 2	K4M4	135960	17935
	Maus 3	K4M5	87043	2234
	Maus 4	K4M1	468820	46461
	Maus 5	K4M2	312180	20772
	Maus 6	K4M3	106080	12298
n = 6				
MW			202832	19185
SD			154368	14813
contr-siRNA	Maus 7	K3M2	182990	50809
	Maus 8	K2M4	196765	11529
	Maus 9	K2M5	724520	24648
	Maus 10	K2M2	95188	10863
n = 4				
MW			299866	24462
SD			286655	18676
luc-siRNA	Maus 11	K1M2	173920	7178
	Maus 12	K2M1	280000	21479
	Maus 13	K2M3	241530	30788
	Maus 14	K1M4	246054	22298
	Maus 15	K1M5	72230	8603
	Maus 16	K1M1	76240	4298
n = 6				
MW			181662	15774
SD			90056	10560

unbehandelt = nur Tumorwachstum

contr-siRNA = Behandlung mit Kontroll-siRNA

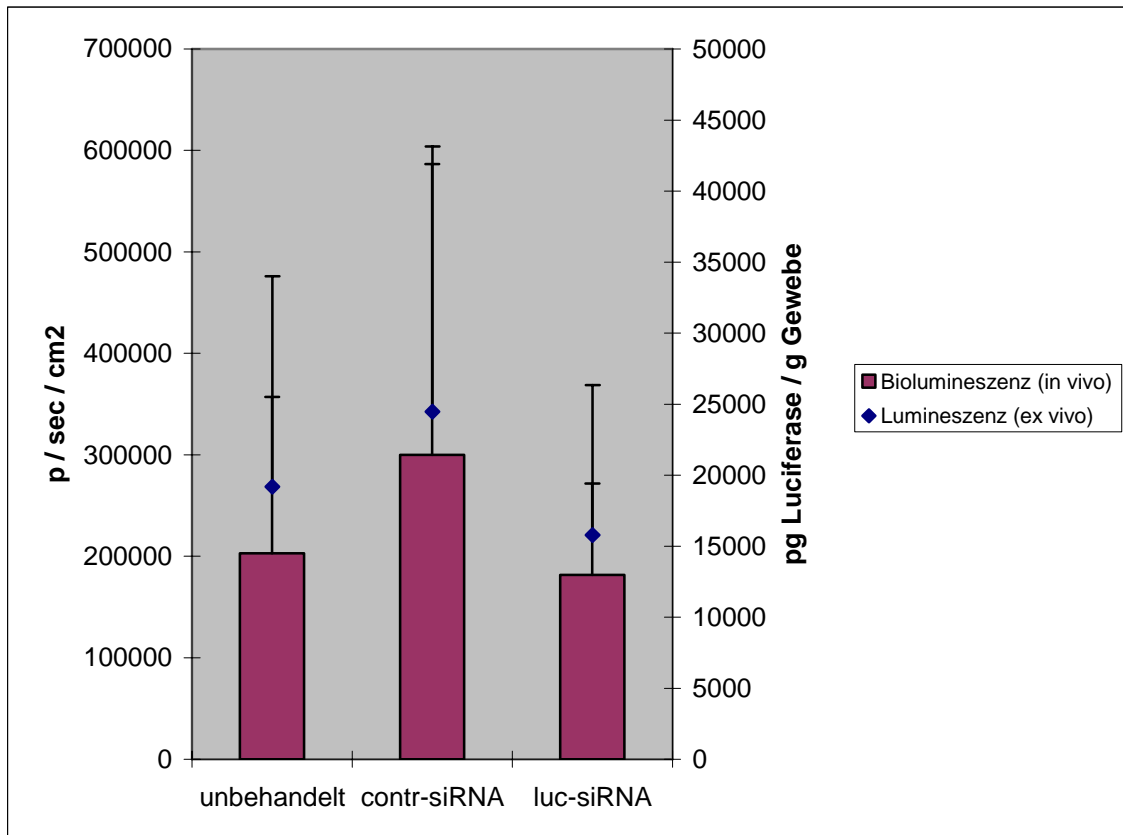
luc-siRNA = Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA

n = Anzahl der Versuchstiere

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

p / sec / cm² = Photonen / Sekunde / Quadratcentimeter

Abb. 34: Vergleichende Darstellung der gemessenen Lumineszenz in der gesamten Lunge mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo) und im Luminometer (ex vivo) am Tag 14 des Tumorwachstums (48 h nach siRNA-Microbubble Applikation)



unbehandelt = nur Tumorwachstum; n=6

contr-siRNA = Behandlung mit Kontroll-siRNA; n=4

luc-siRNA = Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA; n= 6

p / sec / cm² = Photonen / Sekunde / Quadratzentimeter

3.3.6.6 Ergebnisse des in vivo Versuches VI: Intravenöse Applikation von siRNA-Microbubbles in transgene, Luciferase exprimierende Mäuse

Nach wenig eindeutigen und nicht signifikanten vorherigen Versuchsergebnissen am murinen, transduzierten Tumormodell in vivo, soll dieser letzte Ansatz klären, ob Magnetobubbletechnologie grundsätzlich in der Lage ist, siRNA funktionell in der Lunge oder in einem anderen Organ nach systemischer Applikation zu deponieren. In diesem Versuch werden gesunden, transgenen Mäusen (exprimieren in allen Organen stabil Luciferase) unter Magnetfeld und Ultraschallanwendung siRNA-Magnetobubbles, beladen

mit funktioneller Anti-Luciferase-siRNA oder mit unspezifischer Kontroll-siRNA, intravenös appliziert und nach 48 Stunden die Luciferaseaktivität in den einzelnen Organen bestimmt. Aufgrund von hygienerechtlichen Vorschriften der ZVH, Klinikum Innenstadt, muss auf Biolumineszenzaufnahmen in vivo mittels Imagingsystem verzichtet werden.

Tab. 32: Luciferaseexpression in den Organen transgener Mäuse 48 Stunden nach systemischer Applikation von Anti-Luciferase-siRNA- (20 µg) bzw. Kontroll-siRNA-Magnetobubbles (Messung ex vivo)

		pg Luciferase / g Gewebe							
	Mausnr.	Herz	Lunge re (MF+US)	Lunge li	Lunge gesamt	Leber	Milz	Nieren	Injektionsst.
luc-siRNA	1	138,61	152,38	134,91	287,29	31,55	76,43	232,41	256,78
	2	133,58	300,31	279,75	580,06	19,07	44,97	132,64	619,92
	3	51,85	250,28	107,55	357,84	4,40	15,77	63,72	349,76
	4	155,54	226,21	225,15	451,37	8,81	21,25	48,78	387,56
n=4									
MW		119,90	232,29	186,84	419,14	15,96	39,61	119,39	403,51
SD		46,33	61,57	79,76	126,59	12,08	27,63	83,74	154,39
contr-siRNA	5	94,35	273,41	481,45	754,86	5,25	1,84	10,69	559,53
	6	3,50	18,37	137,84	156,21	0,91	1,65	0,71	409,96
	7	12,78	81,87	114,28	196,15	0,54	4,76	3,14	347,61
	8	205,81	284,73	253,34	538,07	10,75	30,06	9,05	84,49
n=4									
MW		79,11	164,59	246,73	411,32	4,36	9,58	5,90	350,40
SD		93,81	134,78	167,87	286,04	4,76	13,73	4,74	198,33

Luc-siRNA = Behandlung mit anti-Luciferase-siRNA

Contr-siRNA = Behandlung mit Kontroll-siRNA

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Lunge re (MF+US) = rechte Lunge, mit Magnetfeld und Ultraschall behandelt

Lunge li = linke Lunge

Lunge gesamt = rechter und linker Lungenflügel

Injektionsst.= Injektionsstelle (am Schwanz)

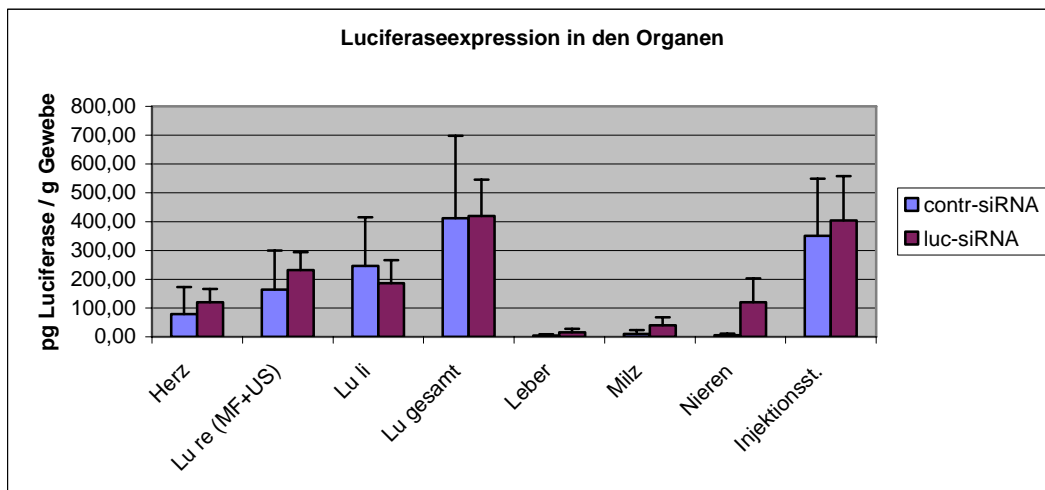
Aus Tab. 32 und Abb. 35 ist ersichtlich, dass in den Organen Herz und Lunge, sowie an der Injektionsstelle selbst, in beiden Behandlungsgruppen Reporterexpression über 100 pg Luciferase pro Gramm Gewebe messbar ist. Im Gegensatz dazu sind in der Leber und Milz beider Behandlungsgruppen deutlich geringere Mengen an Luciferase (zwischen 4 und 40 pg /g) festzustellen. Letzteres trifft auch für die Nieren der mit Kontroll-siRNA-Magnetobubbles

behandelten Tiere zu, während in den Nieren der mit spezifischer Anti-Luciferase-Microbubbles behandelten Mäuse ein deutlich höherer Luciferasegehalt detektiert werden kann.

Die Genexpression in der gesamten Lunge der spezifisch behandelten Tiergruppe und der Kontrollgruppe ist beinahe identisch (419 bzw. 411 pg Luciferase / g). In der mit Magnetfeld und Ultraschall angesteuerten rechten Lungenhälfte ist in der Gruppe, welcher spezifische siRNA appliziert wurde, der detektierte Luciferasegehalt im Durchschnitt und in den einzelnen Tieren höher, verglichen mit der linken, nicht angesteuerten Lungenseite (s. Tab. 32). Eine erwünschte Herunterregulierung der Luciferaseexpression speziell im rechten Lungenflügel ist nicht erkennbar.

Das Gegenteil ist in der mit Kontroll-siRNA-Magnetobubbles behandelten Mausgruppe der Fall: Hier zeigt sich eine durchschnittlich größere Expression des Reportergens in dem physikalisch nicht angesteuerten linken Lungenflügel, im Vergleich zum rechtem. Bis auf eine Ausnahme (Maus 8), bei dem der Unterschied zwischen beiden Lungenflügeln minimal ist, zeigen die restlichen 3 Mäuse eine bis zu 7,6-fach (Maus 6) höhere Luciferasemenge links wie rechts. Große Standardabweichungen bedingen hier erneut keine Signifikanz der Ergebnisse.

Abb. 35: Luciferaseexpression 48 Stunden nach i.v. Applikation von 20 µg siRNA-Magnetobubbles in den verschiedenen Geweben



Lu re (MF+US) = rechte Lunge, mit Magnetfeld und Ultraschall behandelt

Lu li = linke Lunge

Lunge gesamt = rechter und linker Lungenflügel

Injektionsst. = Injektionsstelle (am Schwanz)

Contr-siRNA = Behandlung mit Kontroll-siRNA

Luc-siRNA = Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA

4 DISKUSSION

Durch die rasche Entwicklung neuartiger Nanomaterialien sowie molekular- und zellbiologischer Techniken, profitiert auch in zunehmenden Maß die therapeutisch ansetzende Gentherapie. Die wichtigste Voraussetzung für einen Therapieerfolg besteht in einem effektiven Einschleusen der Gene in die Zielzellen durch einen Vektor, der gleichzeitig biokompatibel sein muss. Die Idee, durch optimale Konzentration des Wirkstoffes (Nukleinsäure oder Arzneimittel) am Wirkort die Transfektionseffizienz zu steigern, ist ein weiterer Ansatzpunkt der nichtviralen Gentherapie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Kombination von Methoden zum magnetisch gesteuerten Nukleinsäuretransfer in Zellen (Magnetofection™) mit Methoden des Arzneimitteltransportes (Drug targeting) durch gasgefüllte Bläschen (Microbubbles) und ortsspezifischer Arzneimittelaktivierung durch eine zweite physikalische Kraft, dem Ultraschall. Der Nachweis der Funktionalität der magnetfeld- und ultraschallgesteuerten Applikation magnetischer Microbubbles (Magnetobubbles) als Träger aktiver Agenzien sollte in einem relevanten Maustumormodell erbracht werden. Die ausgewählte murine B16F10-Lungenmelanomzelllinie musste zu diesem Zweck zunächst mit Viren aus der Familie der Retroviridae infiziert werden, welche das Reporter-gen Luciferase stabil in das Genom der Zelle einbauen. Es folgten Vorversuche an den transduzierten Lungenmelanomzellen *in vitro*, bezüglich der Zellvitalität bzw. der Expressionsstabilität des Reporter-gens Luciferase. Weitere Versuche in Zellkultur wurden durchgeführt, um die Gentransfereffizienz vorhandener Magnetobubbleformulierungen mit derjenigen der etablierten Magnetofektionsmethode zu vergleichen. Die magnetischen Microbubbles trugen als aktives Agens „small interfering RNAs“ (siRNAs), welche gegen das Reporter-gen gerichtet sind. Ein Verlust an Reporter-gensignal wurde als Maß für die Qualität der Transfektion bewertet.

An die *in vitro* Tests schloss sich die eigentliche Etablierung des murinen Lungenmetastasenmodells *in vivo* an. Nach Verteilungsstudien der siRNA-Microbubbles, wurde dieses Tiermodell genutzt, um ortsspezifische magnetische Deposition und ultraschallinduzierte Freisetzung der siRNA speziell in der Lunge zu untersuchen. Für die Auswertung der Reporter-genexpression wurden zwei verschiedene Messmethoden (*in vivo* und *ex vivo*) angewandt und anschließend miteinander verglichen. Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lunge bzw. anderer relevanter Organe trugen zu zusätzlichem Erkenntnisgewinn bei. Abschließend sollte ein Versuch an transgenen, stabil

Reporter gen exprimierenden Mäusen, Gewissheit über die Funktionalität von Magnetobubbletechnologie nach systemischer Gabe erbringen.

4.1 Diskussion der Nachweisverfahren

Um untersuchen zu können, ob eine Herunterregulierung der Genexpression mittels spezifischer siRNA-tragender Magnetobubbles grundsätzlich gelingt, und wenn ja, in welcher Größenordnung, kam in der vorliegenden Arbeit das Reporter gen Luciferase bzw. die entsprechende (entgegengerichtete) Anti-Luciferase-siRNA zum Einsatz. Die Vorteile des Luciferase-Assays liegen auf der Hand: Verglichen zu Reporter gensystemen wie GFP oder β -Galactosidase, ist zuvor genannter hoch sensitiv, gut standardisiert und erlaubt eine qualitative und quantitative Beurteilung der Genexpression in kurzer Zeit (143). Der entscheidendste Vorteil jedoch, der zur Verwendung dieses Reporter gens in den vorliegenden Versuchen führte, ist die Möglichkeit die durch die Aktivität des exprimierten Enzyms Luciferase umgesetzte Menge an Photonen zusätzlich durch ein hoch sensibles optisches Ganzkörper-Imagingsystem zu erfassen (179). Dessen Vorteil besteht vor allem darin, die Genexpression bzw. mögliche Änderungen in der Genexpression nach regulatorischem Eingreifen auf genetischer Ebene (z. B. siRNA) am lebenden Tier nicht invasiv und wiederholt evaluieren zu können. Die Zahl der Tierversuche kann so deutlich reduziert werden, was aus ethischen Gesichtspunkten sehr wünschenswert ist. Zusammen mit der klassischen Nachweismethode des Luciferasegehaltes durch die Lumineszenzmessung der homogenisierten Organproben am Luminometer, erhält man ein Gesamtbild, von dem aus die Einzelergebnisse interpretiert und verglichen werden können (s. 4.5). Bei letztgenannter, klassischer Lumineszenzmessung der Luciferase in Organproben (in vivo Versuche) ist zu beachten, dass die Mäuse vor Organentnahme gründlich perfundiert werden müssen, da Blut, bzw. v.a. Hämoglobin und ein zu trübes Analysat die Lumineszenzmessung erheblich stören können (186, 26). Dieser Nachteil wurde durch entsprechendes Vorgehen bei der Durchführung der in vivo Versuche (s. 3.2.4.2) umgangen oder zumindest verringert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche I und II

Im in vitro Versuch I wurde der Einfluss der Zelldichte auf die Genexpression der stabil mit Luciferase transduzierten B16F10-Melanomzellen evaluiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen bei einer optischen Konfluenz von ca. 70 %, hohe und gleichzeitig maximale Luciferaseexpression zeigen. Diese ist durch ein konstantes Splitten der Zellen alle zwei Tage im Verhältnis 1:10 gewährleistet. Längere Splittingintervalle und damit höhere Konfluenz der transduzierten Zellen, führen zu einem signifikanten Abfall der Reporterexpression. Dieses Ergebnis lässt sich wohl darauf zurückführen, dass mit zunehmender Zelldichte viele Zellen absterben (schwimmen frei im Medium) und nicht mehr das Reportergen exprimieren und andererseits die verbliebenen Zellen zunehmend unter „Stress“ stehen und nur noch notwendige, überlebenswichtige Zellfunktionen aufrecht erhalten (die Expression eines Enzyms, welches unter Energieverbrauch Lichtphotonen produziert ist dabei vielmehr kontraproduktiv).

Eine wieder messbare Luciferaseexpression nach wiederhergestellter optimaler Populationsdichte, spricht auch für die oben genannte Annahme, dass die Zellen jetzt, ohne vorhandenen Selektionsdruck, nicht überlebensnotwendige Enzyme (wie die Luciferase) wieder exprimieren können.

Die Expressionsstabilität war auch Gegenstand der Untersuchungen der in vitro Versuche II: Hier ließ sich direkt nach der Transduktion eine 3,5-fach höhere Genexpression der retroviral transduzierten Melanomzellen nachweisen, verglichen zu den lentiviral transduzierten Zellen. Ein möglicher Grund hierfür könnte die zellspezifische Reaktion auf die unterschiedlichen Promotoren der verwendeten Viren sein: Während der Retrovirus seine starken Promotorregionen in den LTR-Sequenzen (engl. „long terminal repeats“) schon mitbringt, muss in den Lentivirus, der seinen Promotor bei Einbau seines Genoms selbst inaktiviert, ein interner Promotor (in diesem Fall SF-Promotor) zusätzlich eingebaut werden. Die Expression des folgenden Reportergens kann dadurch, je nach transduzierendem Zelltyp, unterschiedlich stark ausfallen (4). Innerhalb der ersten Woche nach Transduktion kommt es zu einem signifikantem Abfall der Reporterexpression: 4-fach im Fall des Retrovirus bzw. 2-fach bei der lentiviralen Transduktion. Da das Reportergen durch beide Virustypen stabil in das Wirtszellgenom eingebaut wird und bei jeder Zellteilung theoretisch weitergegeben wird, kann der Verlust der Luciferaseexpression evtl. durch die Vermehrung nicht transduzierter B16F10-Zellen und den damit resultierenden Verdünnungseffekt auf die Genexpression

erklärt werden. Eine Selektion der positiven transduzierten Melanomzellen (Klonpicken), wurde anschließend bei den retroviral transduzierten Zellen vorgenommen.

Nach einer Woche, bzw. drei Splittings, bleiben die Luciferasewerte in beiden Fällen für mehrere Wochen auf ca. gleich hohem Niveau, mit geringen Standardabweichungen. Das stabil eingebaute Reportergen scheint nun ohne Verlust exprimiert zu werden. Ähnliche Beobachtungen der Expressionsstabilität machten Shai und Mitarbeiter (191), die murine Speicheldrüsenzellen mithilfe von lentiviralen Vektoren stabil für mindestens 80 Tage mit dem Luciferasegen transduzieren konnten. Allerdings erreichte die Luciferaseexpression dieser Zellen erst 17 bis 21 Tage nach Transduktion ihr Maximum.

Aufgrund des höheren Expressionslevels der **retroviral** transduzierten Melanomzellen wurde diese Zellpopulation weiter expandiert, bei niedriger Passagezahl eingefroren und für siRNA-Transfektions- bzw. in vivo Versuche verwendet.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche III, IV und VII

Die in vitro Versuche III und IV sind, wie die vorher beschriebenen Zellkulturversuche, Vorversuche für die folgenden Hauptversuche mit siRNA-Komplexen bzw. siRNA-Microbubbles. Untersucht wurde in beiden Fällen die Zellmortalität der retroviral transduzierten B16F10-Zellen, einmal nach Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche mit zwei verschiedenen Reagenzien (in vitro Versuch III) bzw. in verschiedenen Zellsuspensionen (in vitro Versuch IV). Die gewonnene Kenntnis war wichtig, insbesondere für spätere Versuche in Mäusen, um eine optimale Zellvitalität beim Transport in den Tierstall zu gewährleisten. Anlass zur Untersuchung der Zellvitalität war ein, in dieser Arbeit nicht aufgeführter in vivo Versuch, der daran scheiterte, dass den betroffenen Tieren nach systemischer Tumorzellapplikation keine oder nur sehr kleine Tumore in der Lunge wuchsen. Die Ergebnisse der in vitro Versuche III zeigen zum einen, dass die abgelösten Melanomzellen, wenn sie direkt auf Eis gekühlt werden, deutlich länger (bis zu drei Stunden) vital sind, als bei Raumtemperatur belassene Tumorzellen. Signifikant größere Zellvitalität ist mit Trypsin als Ablösereagenz zu erzielen, verglichen mit Citric Saline. Die besten Ergebnisse, im Sinne von niedriger Mortalitätsrate, wurden mit trypsinisierten Zellen und anschließender sofortiger Kühlung auf Eis erzielt. Der Zellverlust tritt insgesamt innerhalb der ersten Stunde nach Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche auf und steigert sich nur minimal in den darauffolgenden zwei Stunden.

Trypsin, aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen isoliert, ist im Laborbereich ein vielfach benutztes Enzym, um Zellverbände zu vereinzeln und von der Oberfläche von Zellkulturschalen abzulösen (247). Wie schnell dieser Vorgang stattfindet, ist abhängig von vielen Faktoren wie z. B. Zelltyp, Zelldichte, Splittingintervall und Temperatur. Aufgrund von Beobachtungen, dass Trypsin nach längerem Verbleiben auf bestimmten Zelllinien Schaden anrichten kann, wird in der Literatur auf zellschonendere Alternativen wie Citric Saline- oder EDTA-Puffer verwiesen (121). In vorliegendem Versuch mit retroviral transduzierten murinen Melanomzellen konnte dies für Citric Saline jedoch nicht bestätigt werden. Trypsin scheint hier die schonendere Alternative zu sein.

Bei Durchführung des darauffolgenden *in vitro* Versuches IV wurden die Zellen, nach Aufnahme in die verschiedenen Suspensionslösungen, aufgrund der zuletzt gewonnenen Erkenntnis sofort auf Eis verbracht. Hier stellte sich heraus, dass 5 %-ige Glucoselösung mit nur 4 % Zellmortalität unter den resuspendierten transduzierten Melanomzellen (nach drei Stunden Aufbewahrung auf Eis) die signifikant besten Ergebnisse brachte. Die Unterschiede der Zellmortalität im zeitlichen Verlauf (eine, zwei bzw. drei Stunden Verweildauer der Zellen in der Lösung) sind äußerst gering. Dasselbe Bild zeigte sich auch im letzten Versuch (III), was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen vor allem durch die Zellablösung in „Stress“ geraten (Vereinzelnung, fehlende Bodenhaftung) und teilweise derart irreversibel geschädigt werden, dass sie innerhalb der folgenden 60 Minuten absterben. Doppelt bis 3-fach höhere Zellverluste, verglichen mit 5 %-iger Glucoselösung, traten unter den in 0,9 %-iger Kochsalzlösung resuspendierten Melanomzellen auf. Als die eindeutig ungeeigneteste Suspensionslösung für die stabil exprimierenden Melanomzellen stellte sich, mit bis zu 15,71 % Zellmortalität nach zwei Stunden, die Phosphat gepufferte Lösung (PBS) heraus. Eine mögliche Erklärung für derartig große Zellverluste in Suspensionslösungen wie physiologische Kochsalzlösung und PBS, könnte der fehlende Glucosegehalt sein. In dem verwendeten Zellkulturmedium (DMEM) sind 4,5 Gramm Glucose pro Liter enthalten. Seit langem ist bekannt, dass vor allem in invasiven Tumoren eine erhöhte aerobe Glycolyse stattfindet, Warburg Effekt genannt (103, 125). Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die vermehrte Aufnahme von Glucose in Tumorzellen nicht für deren zelluläre Energieproduktion verwendet wird, sondern vielmehr zur Produktion von Säuren, welche den Tumorzellen den Vorteil verschaffen, sich invasiv auszubreiten (59). Für folgende *in vivo* Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden aus diesen Gründen die transduzierten B16F10-Zellen nach Ablösen mit Trypsin, in 5 %-iger Glucoselösung resuspendiert und während des Transportes, bis zur ausgeführten Injektion in die Tiere, auf Eis gelagert.

Im weiteren Sinne kann auch der in vitro Versuch VII zu den Vorversuchen gezählt werden. Hier wurde die in den folgenden Zellkultur- und Tierversuchen eingesetzte siRNA auf ihre Stabilität (intakte Sequenz) mittels Gelelektrophorese überprüft. Sowohl der Schüttelvorgang bei der Herstellung der siRNA-Microbubbles, als auch die Anwendung von Ultraschall zur ortsspezifischen siRNA-Freisetzung, sind zwei kritische Verfahren, die möglicherweise zu einer Störung der Integrität der Nukleinsäure führen könnten. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Alle aufgetragenen siRNA-Microbubbleproben zeigten ein, mit der nativen siRNA vergleichbares Bandenmuster, was für eine intakte Struktur der Nukleinsäure spricht. Eingesetztes SDS (Natriumdodecylsulfat), das als Detergenz zu zwei Microbubbleproben (bzw. zu nativer siRNA) zugesetzt wurde, um die Bläschenstruktur aufzulösen und die enthaltene siRNA freizusetzen, hatte keinen Einfluss auf das Bandenmuster, störte andererseits auch nicht die Darstellung nativer siRNA. Stärkere Bandenmuster der zuvor mit Ultraschall definierter Frequenz und Intensität behandelte siRNA-Magnetobubbles, sprechen möglicherweise für eine vermehrte Freisetzung der Nukleinsäure aus dem Vektor. Letzteres müsste nicht zwingend mit dem Platzen der Mikrobläschen einhergehen. Gegen das Platzen der Magnetobubbles nach Ultraschallapplikation, sprechen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des *in vivo* Versuches IV, außerdem weitere Beobachtungen *in vitro*, die in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt werden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Regulierung der Genexpression mittels siRNA *in vitro* (Versuch V und VI)

Die siRNA-Transfektion der retroviral transduzierten, stabil Luciferase exprimierenden Zellen durch die **Magnetofektionsmethode** (in vitro Versuch V) zeigt, dass eine Regulierung der Luciferaseexpression mithilfe von magnetischen siRNA-Komplexen im Sinne einer Herunterregulierung der Enzymexpression (im Vergleich zu unbehandelten Zellen) in diesen Zellen prinzipiell gelingt. Dass die noch relativ neue Technologie der Magnetofektion die Gentransfereffektivität erhöhen kann, wurde bereits in verschiedenen Zellkulturstudien von Scherer et al. gezeigt (183). Verbesserte Transfektionsergebnisse mithilfe dieser Methode konnten auch *in vivo* erbracht werden (249, 17).

Untersuchungen zur Steigerung der Ergebnisse von **siRNA-Transfektionen** durch Magnetofektion *in vitro* werden in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt und haben ebenfalls zu positiven Ergebnissen geführt (141). Die Regulierung der Genexpression zeigte sich im eigenen Versuch (*in vitro* Versuch V) einerseits zeitabhängig, als auch abhängig von

der eingesetzten siRNA-Konzentration pro well. Dosisabhängige Regulierung der Genexpression stellten auch Mykhaylyk und Mitarbeiter (141) und Toub et al. fest (219).

24 Stunden nach Transfektion konnte im eigenen Versuch die größtmögliche Herunterregulierung der Luciferaseexpression festgestellt werden, wobei nach 48 und 72 Stunden die Genexpression wieder anstieg, jedoch nicht den Wert der unbehandelten Kontrollzellen erreichte. Letzteres spricht für einen reversiblen Wirkmechanismus der siRNA, wie er in der Literatur beschrieben ist (25, 34). Da die Zellen ab einer siRNA-Dosis von 25 nM pro well sichtlich morphologische Schäden zeigten, ist die niedrige Reporterexpression ab dieser Konzentration wohl auf die Toxizität der Nukleinsäure zurückzuführen. Höhere Konzentrationen der Kontroll-siRNA-Komplexe (ab 12,5 nM siRNA/well) erniedrigten ebenfalls die Genexpression in den Melanomzellen. Diese Beobachtung konnte z.T. auch in späteren in vivo Versuchen gemacht werden.

Zusammenfassend konnte mit den besten Nanopartikeln (S9) und spezifischer Anti-Luciferase-siRNA in einem relativ engen Konzentrationsfenster (3 nM bis 10 nM siRNA/well) durch Magnetofektion bis zu 80 % Herunterregulation der Reporterexpression erreicht werden, ohne dass die Kontroll-siRNA-Magnetpartikel-Komplexe in diesem Konzentrationsbereich zu einer signifikante Erniedrigung führten. Mit vergleichbar niedrigen siRNA-Konzentrationen (8 nM bis 16 nM Anti-GFP-siRNA) erzielten auch Mykhaylyk et al. die größte Erniedrigung des GFP-Proteins in HeLa-Zellen (86 % bis 90 %) 24 Stunden nach Magnetofektion mit verschiedenen Magnetpartikel-siRNA-Komplexen (141).

Die siRNA-Transfektion der stabil transduzierten Melanomzellen durch **Magnetobubbles** (in vitro Versuch VI) wurde 48 Stunden nach Behandlung der Zellen ausgewertet. Zu diesem Zeitpunkt konnte durch frühere Versuche der größtmögliche Einfluss der siRNA-Magnetobubbles auf die Luciferaseexpression der Melanomzellen ermittelt werden. In der Literatur finden sich ähnliche Zeitangaben (165, 25). Grundsätzlich gelingt eine Reduzierung der Luciferaseexpression in den behandelten Zellen mit Anti-Luciferase-beladenen Magnetobubbles in Abhängigkeit von der eingesetzten siRNA-Konzentration. Ähnlich wie bei der Transfektion durch Magnetofektion, ist auch hier das siRNA-Konzentrationsfenster, in welchem eine Erniedrigung der Genexpression gelingt und diese gleichzeitig nicht auf die Toxizität von siRNA oder Magnetpartikel zurückzuführen ist, sehr eng (4 nM bis 8 nM siRNA/well). Ein direkter Vergleich der in vitro Versuche V und VI ist aufgrund der

Tatsache, dass die Versuche zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet wurden, kaum möglich.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die verwendeten Magnetobubbles weniger effektiv die stabil Luciferase exprimierenden Melanomzellen mit siRNA transfizieren können, als Magnetpartikel-siRNA-Komplexe unter Magnetfeldeinfluss (Magnetofektion): Interpretiert man das im Luminometer gemessene, verringerte Signal (im Vergleich zu unbehandelten Zellen) als eine Wirkung der siRNA auf das Reportergen, so gelingt mittels Magnetobubble-Technologie eine 40 %-ige (Versuch 1) bzw. 50 %-ige (Versuch 2) Herunterregulierung der Luciferaseexpression (48-Stunden-Wert) im Vergleich zu 80 %-iger Erniedrigung der Genexpression durch Magnetofektion (24-Stunden-Wert). Ein Grund hierfür könnte die kleine Größe der Komplexe im Magnetofektionsversuch sein, die zu einer effektiveren intrazellulären Aufnahme führen, im Vergleich zu den relativ großen Magnetobubbles (Standardpräparation: 5 μm -10 μm), deren transportierte siRNA in der Nähe der Plasmamembran erst freigesetzt werden muss. Dies wurde in den beschriebenen Magnetobubble-Versuchen versucht, über Ultraschallapplikation zu erreichen. Gezeigt hat sich, dass nur in einem zweiten Versuchsansatz und nur im Konzentrationsbereich der siRNA von 4 nM, die Luciferaseexpressionswerte mit Ultraschall niedriger waren, als die Expression unbeschallter Zellen. Die verwendeten Ultraschallparameter (2 Watt / cm^2 , 1 MHz, 50 % duty cycle, 30 sec), die in dieser Form üblicherweise in Zellkultur zum Einsatz kommen (22, 35, 80), führten in vorliegendem Fall nicht zu einer kompletten Zerstörung der Mikrobubbles. Die Frage, ob durch Ultraschall eine erwünschte Permeabilitätsänderung in der Plasmamembran der Zellen gelang, wie sie in der Literatur beschrieben wird (135, 187, 99), kann nicht mit Sicherheit geklärt werden: Der Großteil der Genexpressionswerte der beschallten Zellen zeigen nicht signifikante Unterschiede zu denen der nicht beschallten Zellen und lassen daher letztere Hypothese nicht vermuten. Eine Optimierung der Ultraschallparameter bzw. ultraschallsensitiverer Microbubbles ist zwingend notwendig. Andererseits zeigt der MTT-Test wünschenswerter Weise in beiden Versuchsansätzen keine Toxizität des angewendeten Ultraschalls (mit den genannten Parametern) auf die Zellen.

4.5 Diskussion der systemischen Anwendung des siRNA-Microbubble-Systems in vivo

Wahl der Maus als Tiermodell

Der geringe finanzielle Aufwand, die Verfügbarkeit der Tiere und Räume, das einfache Handling und die relativ problemlose Durchführung der intravenösen Applikation machen die Maus zu einem geeigneten Versuchstier um Genexpressionsstudien in vivo durchzuführen. Die meisten publizierten Daten hinsichtlich der Vektoroptimierung im Gentransfer wurden an dieser Spezies gewonnen (139, 260, 215, 115). Um vorliegende Ergebnisse mit denen der Literatur vergleichen zu können, wurde auch hier das Mausmodell gewählt. Die anschließende Wahl des Tumormodells bedingte den Einsatz von Mäusen des Inzuchtstammes C57 BL/6.

Wahl des Tumormodells

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch die Kombination zweier physikalischer Kräfte (Magnetfeld und Ultraschall) einen verbesserten lokoregionären Gentransfer in topographisch schwer zu erreichendes Gewebe zu erzielen, unter Zuhilfenahme eines innovativen Genvektors, der systemisch appliziert wurde. Da nicht publizierte Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe darauf hinwiesen, dass Mikrobubbles nach intravenöser Applikation sich vorzugsweise in der Lunge anreichern, bot sich ein pulmonales Tumormodell an. Durch **intranasale Instillation** von spezifischen siRNAs (als Chitosan-Komplex bzw. nackte siRNA) in Mäuse, ist es anderen Arbeitsgruppen (255, 256) gelungen, vorübergehend Gene (z. B. NS1, virales Gen des respiratorischen Syncytial-Virus, welches die Interferon-Immunantwort des Wirtes antagonisieren zu scheint bzw. HO-1, kodierend für das Enzym Hämoxygenase-1, welches eine wichtige Rolle innerhalb des zytoprotektiven Enzymsystems bei diversen Krankheitsmodellen spielt) bis zu einem gewissen Grad auszuschalten und somit die Entzündungserscheinungen einer Virusinfektion abzumildern (255) bzw. eine vermehrte Apoptoserate der Endothelzellen in einem Lungenischämie-Reperfusion-Modell zu erzielen (256). Zur Überprüfung des Potenzials der eigenen, neuen Gentransfermethode, speziell der lokalen Anreicherung nach **systemischer Applikationsroute**, erschien das B16F10-Melanom-Tumormodell als eine geeignete Herausforderung. Es handelt sich um ein relativ aggressives Modell, welches durch das schnelle Wachstum von zahlreichen Mikrometastasen gekennzeichnet ist (173, 101) und der Aggressivität von natürlich auftretenden humanen Tumoren sehr nahe kommt. Der wenig immunogene Tumor (kaum Expression von MHC I

Molekülen) wurde erstmals 1975 von Fidler (48) beschrieben und wird heutzutage vielfach in wissenschaftlichen Studien verwendet.

Wahl der Messzeitpunkte

Aufgrund von Studienergebnissen, die zeigen, dass eine Genabschaltung in der Regel 36 bis 48 Stunden nach siRNA-Anwendung seinen Höhepunkt erreicht, nach 96 Stunden jedoch wieder abnimmt (165, 34) und den eigenen gewonnen Erkenntnissen aus den Zellkulturversuchen, wurde bei den Versuchen, in denen das siRNA-Microbubble-System zur Anwendung kam (Versuch V und VI), 48 Stunden nach siRNA-Applikation als Zeitpunkt für die Bestimmung der Genexpression gewählt. Die Behandlung mit siRNA erfolgte im Versuch V am Tag 12 des Tumorwachstums, da zwischen dem Tag 12 und 14 die Luciferaseexpression im optischen Imagingsystem ein deutliches Signal ergab, andererseits die Lungenmetastasen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu zahlreich in der Lunge auftraten.

Die Messintervalle im Tumorwachstumsversuch (Versuch I) wurden so gelegt, dass man einen guten Überblick über die Wachstumszeit der Tumore in der Lunge erwarten konnte (40, 101, 173) und gleichzeitig den Tieren ausreichend Regenerationszeit nach der notwendigen Anästhesie für die Imagingmessungen gewährt wurde.

Weiter galt es die Frage zu klären, was kurz nach intravenöser Applikation im Blutkreislauf mit der transportierten siRNA bzw. ihrem Vektor geschieht. Aus diesem Grund wurden die Verteilungsstudien (Versuch II) und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Versuch VI) jeweils schon 15 Minuten nach siRNA-Microbubble Applikation ausgewertet. Nach einem ähnlich kurzen Zeitraum (60 Minuten nach Applikation) wurden auch die Lungen und restlichen Organe der Tiere für die histologischen Untersuchungen entnommen.

Diskussion der in vivo Versuche

Die Evaluierung des Tumorwachstums war Gegenstand der Untersuchungen im Versuch I. Dieses wurde versucht durch drei verschiedene Messmethoden zu ermitteln: durch die Lumineszenzmessung mittels optischen Imagingsystems am lebenden Tier, die makroskopische Beurteilung der Anzahl und Größe der Tumore nach Entnahme der Lungen und die Lumineszenzmessung der Luciferase in den homogenisierten Lungengewebeproben. Ersteres gelang erst relativ spät im Tumorverlauf (Tag 14 bzw. Tag 21 nach Rasur), da das schwarze Fell der Tiere das Lumineszenzsignal erheblich absorbierte. In diesem Versuch

konnten deshalb die in vivo gewonnen Biolumineszenzdaten nicht mit den ex vivo gemessen Luciferasewerten verglichen werden.

Die Messung des Luciferasegehaltes im Gewebehomogenisat mittels Luminometer gelingt schon am Tag 6 des Tumorwachstums, an welchem makroskopisch in beiden Dosisgruppen keine Tumore erfasst werden können und ist deshalb als ein sehr sensitives Verfahren einzustufen. Ab Tag 14 nach B16F10-Melanomzellinokulation (stabil mit Luciferase transduziert) unterscheiden sich die Lungen beider Dosisgruppen auch makroskopisch voneinander. Insgesamt entwickelt sich die Expression des Reportergens Luciferase in der Lunge bei der höheren Dosisgruppe (200 000 Zellen i.v.) von Tag 6 an annähernd exponentiell ansteigend mit geringer Standardabweichung, im Gegensatz zu dem mehr inhomogenen Tumorwachstum in der Niedrig-Dosisgruppe (100 000 Zellen i.v.), was schließlich ausschlaggebend für die Wahl der höheren Dosis in folgenden in vivo Versuchen war. In der Literatur finden sich Angaben zwischen $0,5 \times 10^5$ und $7,5 \times 10^5$ systemisch zu verabreichenden B16F10-Zellen, welche innerhalb von 21 Tagen Lungentumore hervorrufen und die Tiere meist zu diesem Zeitpunkt auch geopfert werden (173, 101, 40).

In anderen Organen (Herz, Leber, Milz und Niere) konnten im Vergleich zur Lunge innerhalb des beobachteten Zeitraumes nur sehr geringe oder keine Reporterexpression gemessen werden, ausgenommen an der Injektionsstelle. Da letztgenanntes Gewebe stets gute Genexpressionsdaten aufweist (255, 186), aber geringere Werte als in der Lunge zeigte und nicht Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, lassen vorliegende Ergebnisse den Schluss zu, dass sich die intravenös injizierten Melanomzellen fast ausnahmslos in der Lunge ansiedeln.

Es konnte gezeigt werden, dass das Reporterexpressionssignal (im Gewebehomogenisat) ausgehend von den stabil mit Luciferase transduzierten Melanomzellen in der Lunge mit der Metastasenanzahl und dem Tumorwachstum korreliert. Zusammen mit den Ergebnissen des in vivo Versuches V, in dem eine Korrelation zwischen den Biolumineszenzmessungen in vivo und ex vivo festgestellt wurde, ist mit vorliegendem stabil Luciferase exprimierendem Lungentumormodell eine Grundlage geschaffen worden, regulatorische Eingriffe in die Genexpression des Tumors (z. B. im Sinne von siRNA-Applikation in der vorliegenden Arbeit) und deren Einflüsse auf das Tumorwachstum am lebenden Tier beurteilen zu können. Als Maß der Beeinflussung diente hier die Quantität des Luciferasesignals vor und nach der Behandlung, welche auch von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen murinen Tumormodellen (u.a. Fibrosarkom und Adenokarzinom der Lunge) zur Evaluierung ihrer Therapie herangezogen wurde (206, 190, 213, 179).

Da das verwendete Enzym des Reportergens (firefly Luciferase) eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 2 Stunden besitzt, finden Änderungen im Enzymlevel zeitnah mit Änderungen des mRNA-Levels statt (77, 211). Aus diesem Grund ermöglicht das Biolumineszenzverfahren durch Messung der Luciferaseaktivität einen Rückschluss auf den mRNA-Abbau durch applizierte siRNA-Moleküle. Andere, häufig eingesetzte Analysemethoden sind die Real-Time-PCR (mRNA-Quantifizierung) oder die Western-Blot Analyse (Protein-Quantifizierung), um eine Wirkung der siRNA auf Transkriptions- bzw. Proteinebene nachzuweisen (255,127). Allerdings erfordern diese Nachweisverfahren die Tötung der Tiere, sodass nur eine Aussage über den aktuellen Stand, aber nicht über den Verlauf getroffen werden kann.

Nogawa und Mitarbeiter stellten nach intravenöser Injektion von stabil Luciferase exprimierenden HT1080-Zellen (Fibrosarkom) fest, dass trotz Applikation und Besiedelung von relativ gleicher Zellanzahl in der Lunge, die Anzahl und Größe der Metastasen zwischen den Tieren erheblich variierte (150). Dies traf im eigenen Versuch vor allem in der Niedrig-Dosisgruppe ebenfalls zu.

Die Kurzzeitbiodistributionsstudien mit radioaktiv markierten siRNA-Microbubbles (zwei verschiedene Präparationen) belegen in beiden Fällen eine erhöhte Deposition der siRNA in der Lunge 15 Minuten nach systemischer Applikation des Genvektors. Im Vergleich zur Deposition der siRNA aus Magnetobubbles der Standardpräparation (1. Biodistribution), ist die Ansammlung der siRNA, transferiert mittels den kleineren (1 μm bis 5 μm) Microbubbles (2. Biodistribution), in der Lunge geringer. Diese Tatsache und die Bilder aus den histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass der Genvektor zwar sein Zielgebiet (die Lunge) erreicht, dann aber aufgrund seiner Größe innerhalb der Kapillaren stecken bleibt. Es wurden z. T. erheblich an Größe zugenommene (10 μm bis 20 μm) Aggregate an eisenhaltigen Strukturen in den pulmonalen Kapillaren gefunden. Festsitzende Magnetobubbles können anschließend im schlimmsten Fall zur Embolie und zum Tod des Tieres führen, was z.T. auch in der vorliegenden Arbeit vorkam (s. in vivo Versuch V). Je kleiner der Genvektor (2. Bubblepräparation), desto geringer war der Anteil an deponierter siRNA in der Lunge, bzw. desto größer die Deposition in Leber und Milz, was letztere Beobachtungen bekräftigt.

Eine geringgradig höhere Anreicherung der markierten siRNA in der mit Magnetfeld behandelten rechten Lungenhälfte erwies sich aufgrund der großen Varianz zwischen den

einzelnen Tieren als nicht signifikant. Bereits hier zeichnen sich die Probleme ab, die sich auch durch die folgenden in vivo Versuche hindurchzogen: Die Varianz v.a. der Expressionsergebnisse (Versuch V und VI) war hoch und somit war die Reproduzierbarkeit der Effektivität des Magnetobubblesystems innerhalb einer Gruppe als auch im Inter-Gruppen-spezifischen Vergleich schwierig.

Der Ultraschall alleine bzw. der Einsatz von Ultraschall kombiniert mit Magnetfeld zeigte im Sinne einer größeren Deposition der siRNA in der angesteuerten Lungenhälfte in beiden Gruppen der Biodistributionsstudien keine Wirkung. Spätere elektronenmikroskopische Aufnahmen von der Lunge eines tumorfreien Tieres bestätigen, dass durch den applizierten Ultraschall in den pulmonalen Kapillaren vorhandene Magnetobubbles nicht zerstört werden. Es sind Microbubbles mit intakter Bläschenstruktur und einem Magnetpartikelsaum erkennbar, vergleichbar mit denen auf der unbeschallten Lungenseite. Ein Grund für das Intaktsein der Mikrobläschen trotz appliziertem Ultraschall, könnten die luftgefüllten Alveolen in der Lunge sein: Luft führt wie unter 2.4.2.3 erwähnt, frequenzabhängig zu einer starken Dämpfung der Wellen bis hin zur Schallauslöschung (117). Andererseits scheint die verwendete Intensität und Frequenz der Ultraschallwellen, obwohl sie in dieser Form in der Literatur als effektiv beschrieben wird (22, 35, 80, 180, 254), in vorliegendem Fall (bei dieser speziellen Zusammensetzung des Mikrobläschens) wohl nicht zu einer ausreichender Kavitationsenergie zu führen, die das Platzen des Vektors und gleichzeitige Freisetzung der siRNA zur Folge hätte (135, 226). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaft von Ultraschall, die Permeabilität von Zellen zu erhöhen (187, 124, 99) bzw. den Gentransfer in verschiedenen Zelllinien in vivo zu steigern (226) wurde jedoch auch in den folgenden in vivo Versuchen (Versuch V und VI) nicht auf seinen Einsatz verzichtet.

Der relativ große Anteil an deponierter siRNA in der Leber und Milz in den Biodistributionsstudien (v.a. bei den kleineren Microbubbles mit nur 1 % Sojabohnenöl in der Formulierung), kann mit dem First-Pass-Effekt dieser Organe erklärt werden: Durch das sinusoidale Endothel des RES konnten die Microbubbles leichter ins Gewebe austreten und somit aus dem Blutstrom entfernt werden (62, 161). Weiter kann durch die Verteilungsstudien gefolgert werden, dass der jetzige Genvektor „Microbubble“ hinsichtlich seiner Rezirkulationszeit noch optimiert werden könnte, um bessere Voraussetzungen für einen gesteuerten Gentransfer (magnetische Attraktion) zu schaffen: Nach 15 Minuten befinden sich derzeit noch 9 % bis 13 % der markierten siRNA-Magnetobubbles im Blutkreislauf. Eine Oberflächenmodifikation des Vektors, beispielsweise mit Polyethylenglycol (PEG), wie sie bereits in kommerziell erhältlichen Liposomenprodukten existiert (149, 201, 171), könnte zu

einer längeren Zirkulation im Blutkreislauf beitragen und so den Verlust der Nukleinsäure an das RES minimieren. Die Folge wäre eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit den Genvektor und die transportierte siRNA in größeren Maß im Zielgebiet magnetisch zu akkumulieren.

Die Ergebnisse der systemischen Behandlungsstudie mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles am Tag 12 des Tumorwachstums, in vivo Versuch V, zeigen eine positive Tendenz der Wirksamkeit des neuartigen Genvektorsystems, wenngleich eine Signifikanz aufgrund großer Varianzen innerhalb der Behandlungsgruppen nicht auftritt: Die Zunahme des Biolumineszenzsignals innerhalb von 48 Stunden nach siRNA-Magnetobubble Applikation (in vivo Messung) ist mit durchschnittlich 3,5-fach in der mit spezifischer Anti-Luciferase-siRNA behandelten Tiergruppe am geringsten (unbehandelte Tiergruppe: 7,3-fache Signalerhöhung). Dasselbe Bild zeigt sich in der ex vivo Messung der Lungenhomogenisate, bei der die quantitative Reporterexpression in der gesamten Lunge in der mit Anti-Luciferase-Magnetobubbles behandelten Mausgruppe (Mittelwert) den niedrigsten Wert zeigt. Dies kann als ein Hinweis auf die Regulation der Reporterexpression durch die applizierte siRNA gedeutet werden, wenn auch keine tatsächliche Herunterregulierung der Luciferaseexpression im Sinne einer Signalabnahme zu erkennen ist.

Erklärbar wären die Ergebnisse durch das rasche Wachstum des aggressiven Tumors, dessen stabil Luciferase produzierenden Zellen innerhalb kürzester Zeit das Signal verdoppeln, im Gegensatz zu der nur einmalig applizierten und im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen (255, 256, 34) relativ geringen Menge an eingesetzter siRNA (20 µg / Maus). Zusätzlich muss der Verlust an intrazellulär vorliegender siRNA, v.a. bei sich schnell teilenden Zellen zu denen die verwendeten Melanomzellen zu rechnen sind, bedacht werden (großer Verdünnungseffekt) (34, 36).

Übliche siRNA-Dosierungen anderer Forschergruppen bewegen sich zwischen 40 µg und 50 µg siRNA pro Maus (2 - 2,5 mg/kg) (256, 34) bzw. bis zu 10 g (!! spezifische siRNA pro Tier (500 g/kg) (255). Andererseits wird von Erfolgen berichtet, nachdem den Versuchstieren entsprechende siRNA-Dosen mehrmalig appliziert wurden: Bartlett und Mitarbeiter beispielsweise konnten nach dreimaliger spezifischer siRNA-Injektion (Anti-Luciferase-siRNA) an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Abnahme des Signals in einem murinen subkutanen Tumormodell (Neuro-2A-Luc Zellen) feststellen (34).

Fumitaka et al. gelang allerdings mit nur 25 µg Anti-Luciferase-siRNA pro Tier gekoppelt an 0,05 % Atelocollagen 24 Stunden nach einmaliger i.v. Applikation eine Erniedrigung des

Biolumineszenzsignals bis zu 90 % in fast allen Knochenmetastasen eines Luciferase exprimierenden Prostatakarzinom-Tumormodells (213). Dies verdeutlicht, wie wichtig ein effektives Genvektorsystem ist, sodass auch mit geringeren Mengen an eingeschleuster Nukleinsäure eine Wirkung erzielt werden kann. In vorliegender Arbeit wurde versucht mit ähnlich geringer Dosierung (20 µg / Maus) durch den Einsatz von physikalischen „Enhancern“ (Magnetfeld und Ultraschall) funktionellen Gentransfer zu erreichen.

Die beabsichtigte erhöhte magnetische Anreicherung der siRNA-Magnetobubbles in der rechten Lunge der Tiere bzw. siRNA-Freisetzung mittels Ultraschall und damit eine verbesserte Wirkung der siRNA im eigenen Versuch (Versuch V) konnte nicht nachgewiesen werden: In der mit spezifischer, gegen Luciferase gerichteten siRNA Behandlungsgruppe waren die quantitativen Luciferasegehalte im Homogenisat der rechten, physikalisch angesteuerten Lungenhälfte im Mittel größer, als die der linken, nicht anvisierten Lungenseite. Die unbehandelte Kontrollgruppe (nur Tumorwachstum) wies in der rechten Lungenhälfte vergleichbar große Luciferasegehalte auf. Gründe hierfür könnten einerseits der schon erwähnte Effekt der Schallauslöschung durch Luft in den Alveolen bzw. noch nicht optimierte Ultraschallparameter sein. Andererseits reicht evtl. die Magnetfeldstärke nicht aus, um im Blutstrom zirkulierende magnetische Mikrobläschen vermehrt in der Lunge festzuhalten. Auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich trotz Sättigung der Microbubbles mit den ferromagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln keine vermehrte Anreicherung in der magnetisierten Lungenhälfte im Vergleich zu der nicht mit Magnetfeld behandelten Seite.

Bei Betrachtung der Ergebnisse (ex vivo) der Versuchsgruppe, die mit Kontroll-siRNA-Microbubbles behandelt wurde, und damit eigentlich eine unspezifischen Sequenz der Nukleinsäure (Negativkontrolle) erhalten hat, fällt dessen ca. 3,4-fach niedrigerer Luciferasewert in der physikalisch angesteuerten rechten Lungenhälfte, verglichen mit der linken Seite auf, der aber aufgrund großer Standardabweichungen nicht signifikant ist. Im ersten Augenblick scheint die unspezifische siRNA einen Einfluss auf die Reporterexpression der Lungenmelanomzellen im Sinne einer Herunterregulierung auszuüben. Dagegen sprechen aber die gemessenen Enzymaktivitäten in der gesamten Lunge (in der Kontroll-siRNA-Gruppe am höchsten) bzw. die 6,4-fache Zunahme des Biolumineszenzsignals innerhalb von 48 Stunden nach der Behandlung, die nur wenig unter der Signalzunahme der unbehandelten Kontrollgruppe (7,3-fach) liegt.

Ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch durch den in vivo Versuch VI, bei dem spezifische bzw. unspezifische siRNA-Magnetobubbles intravenös in transgene, in allen Organen Luciferase exprimierende Mäuse ohne Tumor injiziert wurden. Aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden transgenen Tiere konnte keine echte Kontrollgruppe (ohne siRNA-Magnetobubbleinjektion) gebildet werden, was die Interpretation dieser Ergebnisse erheblich erschwert.

Die Tiere, die mit spezifischer siRNA-Sequenz behandelt wurden, weisen in fast allen Organen (mit Ausnahme des linken Lungenflügels) höhere Reporterexpression (Messung *ex vivo*) auf, verglichen mit der Genexpression der Kontrollgruppe (unspezifische Kontroll-siRNA). Während eine Herunterregulierung der Luciferaseexpression in der angesteuerten Lunge mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles nicht gelingt, scheint es in dieser Behandlungsgruppe in den anderen Organen (Herz, Leber, Milz, Niere) zu einer Überexpression des Reportergens zu kommen, verglichen zur Kontrollgruppe, womöglich durch Anschalten des Luciferasegens. Li et al. veröffentlichten 2006 umstrittene Ergebnisse in denen von einer positiven Interferenz, sprich einer Aktivierung von Genen durch siRNAs die Rede ist (113): 21 Basenpaar lange, chemisch synthetisierte doppelsträngige siRNA-Moleküle, deren Sequenz auf unterschiedliche Promotorregionen von humanen Genen zielten (E-Cadherin, p21 und VEGF), führten nach Transfektion von humanen Zelllinien zu lang anhaltender und sequenzspezifischer Induktion der Zielgene, anstatt zu deren Stilllegung. Der dazugehörige molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Das involvierte Enzym ist noch dasselbe wie bei der RNA-Interferenz, danach scheint die RNA-Aktivierung aber auf die molekulare Verpackung der Gene (wichtig für deren Abschaltung) einen Effekt auszuüben im Sinne einer Zerstörung jener kleinen RNA-Moleküle, die zusammen mit Proteinen die Gensequenzen als Packmaterial umgeben (113). Kritiker dieser Theorie vertreten die Meinung, dass die Aktivierung von Genen nur ein indirekter Effekt einer typischen RNA-Interferenz sei: Die siRNA könnte auch zufällig die Produktion eines Proteins RNA-Interferenz-mäßig unterbinden, das die untersuchten Gene normalerweise ausschaltet (Hemmung eines Hemmstoffes = Aktivierung).

Eine andere Auslegung der Ergebnisse des *in vivo* Versuches VI wäre anstatt einer Genaktivierung durch die spezifische siRNA, eine Regulierung des Reportergens durch die unspezifische Kontroll-siRNA (s. Versuch V) und folglich eine erniedrigte Expressionsrate der Luciferase in dieser Behandlungsgruppe (v.a. in der angesteuerten rechten Lungenhälfte). Wie im Versuch V sind die Luciferasegehalte beider Gruppen in der gesamten Lunge jedoch

auch hier fast identisch und von großen Varianzen geprägt. Ohne echte Kontrollgruppe sind letztere Aussagen vielmehr spekulativ und nicht beweisbar.

Bei Vergleich der Biolumineszenzdaten, gemessen 48 Stunden nach siRNA-Microbubble Applikation, und der Luciferasegehalte in der gesamten Lunge nach Homogenisierung (ex vivo) im in vivo Versuch V lässt sich eine positive Korrelation beider Messmethoden feststellen. Lediglich einzelne Tiere aus der mit Kontroll-siRNA-Microbubbles behandelten Gruppe zeigen Diskrepanzen beider Messmethoden. Die Durchschnittswerte der Messungen beider Methoden jedoch korrelieren in allen drei Behandlungsgruppen miteinander. Dies macht die in vivo Biolumineszenzmessung, neben der präzisen aber invasiven Messung der Gewebhomogenisate im Luminometer, zu einem leistungsstarken und ebenso genauen Verfahren bei der Analyse der Effizienz von Genvektorsystemen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Konzept eines Magnetobubble vermittelten Gentransfers konnte in vitro als erfolgreich bewertet werden, obwohl die Magnetofektionsmethode der erstgenannten Technologie überlegen war. Eine Verbesserung der Gentransfer-Effektivität in vivo könnte durch Optimierung der Ultraschallparameter bzw. durch die Erhöhung der eingesetzten Menge an siRNA und / oder Erhöhung der Frequenz der Nukleinsäureapplikation erzielt werden. Desweiteren wäre es denkbar, durch Modifikation der Hauptkomponenten der Microbubbles (evt. auch der Oberfläche/Hülle durch beispielsweise PEG oder Rezeptorliganden) die Ultraschallsensitivität, Biokompatibilität (Größe) und Effektivität des Genvektors zu verbessern.

Das etablierte, stabil Reporter gen exprimierende Tumormodell bietet aufgrund der Tatsache, die Entwicklung der Genexpression „online“ am lebenden Tier in selbst gewählten Zeitabständen verfolgen zu können, eine gute Grundlage für gentherapeutische Zielsetzungen bzw. Fragestellungen. In vorliegendem Fall erwies sich dieses Lungentumormodell allerdings als wenig geeignet für die Überprüfung des Potenzials des neuartigen Konzepts der spezifischen Nukleinsäureaktivierung des Genvektors mittels Ultraschall, da die vorhandene Luft innerhalb der Alveolen wahrscheinlich zu einer Schallauslöschung führte. Alternative Tumor- oder Erkrankungsmodelle wären vonnöten, um die Effektivität dieses vielversprechenden Ansatzes weiter zu evaluieren. Die Blutgefäßneubildung mittels transferierter Gefäßwachstumsfaktoren in Ischämiegebieten oder die Unterdrückung dieser

mit spezifischen siRNAs im Tumorareal sind beispielsweise durch ihre gute Zugänglichkeit denkbare Einsatzgebiete der Magnetobubbletechnologie in der Zukunft.

Wenn es gelingt, den innovativen Vektor aktiv physikalisch in einem Zielgewebe anzureichern und damit die Mindestdosis des aktiven Agens zu minimieren und so mögliche Nebenwirkungen zu reduzieren, ergeben sich weitere potenzielle Anwendungsmöglichkeiten der Microbubbles, die jetzt schon erfolgreich (aber ohne aktive Steuerbarkeit von außen) als Kontrastmittel auf dem Markt bestehen: Anstatt der transportierten Nukleinsäure (Plasmide oder siRNAs) könnten beispielsweise Arzneimittel wie Antibiotika oder Zytostatika zielgerichtet in infektiöse bzw. tumoröse Areale geschleust und dort mit Ultraschall aktiviert werden. Ein Bedarf an derartigen Pharmaprodukten besteht zur Zeit nicht nur durch die wachsende Anzahl an Krebspatienten, deren Tumore zum Teil nur schwer oder überhaupt nicht chirurgisch zugänglich sind, sondern z. B. auch durch an Mukoviszidose erkrankten Patienten, deren Leiden erheblich durch immer wiederkehrende bronchopulmonale Infektionen vergrößert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl für den nicht-viralen Gentransfer *in vitro* inzwischen effektive Vektoren entwickelt wurden, bleibt die Etablierung biokompatibler, zielgerichteter und effizienter Genvektoren für systemische *in vivo* Anwendungen weiter eine Herausforderung mit erheblichen Hürden. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Nutzung eines murinen Lungentumormodells zur Untersuchung von ortsspezifischer magnetischer Deposition und ultraschallinduzierter Freisetzung von siRNA in der Lunge. Als Genvektoren dienten magnetische Microbubbles, gasgefüllte Mikrobäschen mit superparamagnetischen Eisenpartikeln in ihrer Lipidhülle, die so durch ein Magnetfeld von außen lenkbar sind. Durch Kombination mit einer zweiten physikalischen Kraft, dem Ultraschall, sollte eine lokale Nukleinsäureaktivierung durch das Platzen des Genvektors und Freisetzung der siRNA im rechten Lungenflügel der Maus erfolgen. Alle Versuche wurden mit dem Reportergen, kodierend für das Enzym Luciferase, durchgeführt. Die Evaluierung einer erfolgreichen siRNA-Transfektion nach systemischer Magnetobubbleapplikation erfolgte anhand des Expressionslevels des eingesetzten Reportergens *in vivo* (Biolumineszenz) und *ex vivo* (Lumineszenz in der entnommenen Lunge).

Nach viraler (retroviraler bzw. lentiviraler) Transduktion von B16F10-Melanomzellen mit dem Reportergen wurden diese Zellen zunächst auf ihre Expressionsstabilität und ihrem Verhalten unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (Ablösereagenz, Transportmedium) untersucht und schließlich *in vitro* mit siRNA transfiziert: Dies erfolgte vergleichend mit zwei verschiedene Methoden, der Magnetofektion bzw. der Magnetobubbletechnologie. Für die eigentliche Etablierung des murinen Tumormodells wurde das Tumorstadium nach Applikation zweier verschiedener Zellzahlen (stabil Luciferase exprimierende B16F10-Zellen) evaluiert und die Genexpression mittels optischen Imagingsystems verfolgt. Auf diese Weise wurde ein therapeutisches Zeitfenster für die intervenierende siRNA-Applikation gefunden. Anschließend Verteilungsstudien sollten Aufschluss geben über die bevorzugte Deposition des innovativen Genvektors und dessen physikalische Beeinflussung durch ein externes Magnetfeld bzw. Ultraschall. Schließlich galt es zu zeigen, ob ein derartiges Genvektorsystem nach systemischer Verabreichung in der Lage ist, spezifische siRNA funktionell in Luciferase exprimierende Lungenmetastasen einzuschleusen, d.h. eine Erniedrigung der Reportergenexpression *in vivo* zu erzielen. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

Stabil Reporter-gen exprimierende Melanomzellen konnten in vitro durch Magnetobubble-technologie funktionell, dosisabhängig und reversibel mit siRNA transfiziert werden. Eine erhoffte Verbesserung der Effektivität dieses Genvektors verglichen mit der Magnetofektionsmethode zeigte sich nicht. Es wurde ein stabil exprimierendes Tumormodell in der Maus geschaffen, das es erlaubt therapeutische oder regulatorische Eingriffe auf genetischer Ebene „online“ am lebenden Tier zu verfolgen. Der neuartige Genvektor deponierte in vivo zu einem erheblichen Anteil in den Kapillaren der Lunge, nicht zuletzt bedingt durch seine Größe. Allerdings gelang ein funktioneller Gentransfer in die Lunge im Sinne einer Herunterregulierung der Genexpression nach systemischer Magnetobubbleapplikation nicht. Eine möglicherweise stattgefundenen Interferenz der siRNA mit der zellulären mRNA war in dem gewählten Tumormodell nicht ausgeprägt genug, um eine signifikante Erniedrigung der Reporter-genexpression zu bewirken. Die eingesetzten Ultraschallparameter führten in vivo nicht zu einer lokalen Aktivierung des Genvektors (Platzen der Mikrobläschen). Eine gute magnetische Anreicherung durch ein äußeres Magnetfeld des voll mit Nanopartikeln beladenen Genvektors gelang in vitro, war jedoch in vivo nicht eindeutig möglich, wahrscheinlich bedingt durch die hier vorherrschende hohe Blutflussgeschwindigkeit.

6 SUMMARY

Establishment of a murine lung tumor model for evaluation of local magnetic deposition and ultrasound-mediated release of siRNA

Effective non viral gene vectors for in vitro gene transfer have been developed recently. Nevertheless, the establishment of biocompatible, specific and efficient gene vectors for systemic in vivo administration still remains a formidable challenge. The intention of this study was establish a murine lung cancer model and to examine the locally specific magnetic deposition and ultrasound-mediated release of siRNA into the lung. The gene vectors used were magnetic microbubbles, i.e. gas filled bubbles with superparamagnetic iron nanoparticles in their shell, which respond to an external magnetic field. Combining this method with a second physical force (ultrasound), a local activation of nucleic acid by bursting the micro- bubbles and a subsequent release of siRNA into the right lung lobe of the mice was attempted. All experiments were carried out using a reporter gene coding the enzyme Luciferase. The confirmation of a successful siRNA transfection after systemic application of the magnetobubbles was achieved by assessing the in vivo (by bioluminescence) and ex vivo (luminescent signal in the removed lungs) level of expression of the reporter gene.

After viral (retroviral or lentiviral) transduction of B16F10-melanoma cells with the reporter gene, all cells were tested for stability of the gene expression. In addition, their behaviour under different conditions in cell culture (cell detachment, suitable transport medium) was examined. Afterwards, the cells were transfected in vitro with siRNA. The transfection was performed using two different methods, magnetofection and magnetobubble technology. The tumor model was established by investigation of tumor growth after application of two different cell doses (stable expressing B16F10-cells) and observation of the gene expression using an optical imaging system. Through this approach a therapeutic time-window for future siRNA-application could be found. Subsequent biodistribution studies provided insight into the preferred deposition mechanisms of the innovative gene vector and into its physical manipulation by external magnetic fields and ultrasound, respectively. Finally it was necessary to show whether such a gene vector system can introduce specific siRNA functionally in lung metastases expressing Luciferase through systemic application and therefore decrease in vivo expression of the reporter gene. The following results were obtained:

Melanoma cells stably expressing the reporter gene could be successfully transfected with siRNA in vitro in a dose dependent and reversible manner via magnetobubbles. An improvement of the efficiency of this gene vector in comparison to magnetofection was not found. Nevertheless, a stably expressing mouse tumor model was created which allows the online observation of therapeutic or genetic regulatory interventions in living animals. The novel gene vector in vivo deposited a considerable fraction into the lung capillaries, which is mainly due to its big size. However, a functional gene transfer into the lung (i.e. a down regulation of gene expression after systemic magnetobubble application) could not be demonstrated. A possible interference of siRNA with cellular mRNA, which would cause a significant down regulation in reporter gene expression, could not be clearly identified. The parameters of the application of ultrasound used here did not lead to an activation of the gene vector (bursting of bubbles) although there were positive signs of this in vitro. A substantial enrichment of the gene vectors fully loaded with nanoparticles by the external magnetic force could be demonstrated in vitro. It could not be demonstrated clearly in vivo, probably due to the high blood flow rate present in this case.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 AHLQUIST P (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses and RNA silencing. *Science*; 296:1270-1273
- 2 AMBROS V (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature*; 431:350-355
- 3 ANDERSON WF (1992): Human gene therapy. *Science*; 256(5058):808-13.
- 4 ANTON M (2008): Persönliche Mitteilung.
- 5 ANTON M, WAGNER B, HAUBNER R, BODENSTEIN C, ESSIEN BE, BÖNISCH H, SCHWAIGER M, GÄNSBACHER B, WEBER WA (2004): Use of the norepinephrine transporter as a reporter gene for non-invasive imaging of genetically modified cells. *J Gene Med*; 6:119-126
- 6 ANWER K, KAO G, PROCTOR B (2000): Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther*; 7:1833-1839
- 7 ANWER K, KAO G, PROCTOR B, SULLIVAN SM (2000): Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther*; 7:1833-1839
- 8 ARGYLE DJ (1999): Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec*; 144: 369-376
- 9 AUDOUY S, MOLEMA G, DE LEIJ L, HOEKSTRA D (2000): Serum as a modulator of lipoplex-mediated gene transfection: dependence of amphiphile, cell type and complex stability. *J Gene Med*; 2:465-476
- 10 BEERMANN F, RUPPERT S, HUMMLER E, BOSCH FX, MULLER G, RUTHER U, SCHUTZ G (1990): Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *EMBO J*; 9:2819-2826
- 11 BEHR JP (1996): The proton sponge, a means to enter cell viruses never thought of. *Med Sci*; 12:56-58
- 12 BEKEREDIJAN R, CHEN S, FRENKEL PA, GRAYBURN PA, SHOHET RV (2003): Ultrasound targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*; 108(8):1022-1026
- 13 BERTRAND JR, POTTIER M, VEKRIS A, OPOLON P, MAKSIMENKO A, MALVY C (2002): Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Commun*; 296:1000-1004
- 14 BOOMER JA, THOMPSON DH (1999): Synthesis of acid-labile displasmenyl lipids for drug and gene delivery applications. *Chem Phys Lipids*; 99:145-153

- 15 BRAASCH DA, JENSEN S, LIU Y (2003): RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Nucleic Acids Res*; 42:7967-7975
- 16 BRACHA N (2003): Chitosan based vector/DNA nanoparticles for gene therapy. Lecture
- 17 BRASIER AR, TATE JE, HABENER JF (1989): Optimized use of firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell line. *Bio Tech*; 7:1116-1122
- 18 BRIDGE AJ, PEBERNARD S, DUCRAUX A, NICOULAZ AL, IGGO R (2003): Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*; 34:263-264
- 19 BRUMMELKAMP TR, BERNARDS R, AGAMI R (2002): Stable suppression of tumorigenicity by virus mediated RNA interference. *Cancer Cell*; 2:243-247
- 20 CALLAHAN MK, WILLIAMSON P, SCHLEGEL RA (2000): Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ*; 645-653
- 21 CARRINGTON JC, AMBROS V (2003): Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*; 301:336-338
- 22 CHEN S, SHOHET RV, BEKEREDIJAN R, FRENKEL P (2005): Pluronic block copolymers: novel functions in ultrasound-mediated gene transfer and against cell damage. *Ultrasound Med Biol*; 32(1):131-137
- 23 CHEN S, SHOHET RV, BEKEREDIJAN R, FRENKEL P, GRAYBURN PA (2003): Optimazation of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol*; 42(2):301-308
- 24 CHERNG JY, VAN DE WETERUNG P, TALSMA H, CROMMELIN DJA, HENNINK WE (1996): Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*;13(7):1038-42
- 25 CLYTON J (2004): The silent treatment. *Nature*; 431:599-605
- 26 COLIN M, MORITZ S, SCHNEIDER H, CAPEAU J, COUTELLE C, BRAHIMI-HORN MC (2000): Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo. *Gene Ther*; 7:1333-1336
- 27 COLOSIMO A, GONCZ KK, HOLMES AR, KUNZELMANN K, NOVELLI G, MALONE RW, BENNETT MJ, GRUENERT DC, (2000): Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTech*; 29:314-331

- 28 COMPOCHIARO PA (2006): Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther*; 13:559-562
- 29 CONNER SD, SCHMID SL (2003): Regulated portals of entry into the cell. *Nature*; 422:37-44
- 30 DANIALOU G, COMPTOIS AS, DUDLEY RW, GILBERT R, PETROF BJ (2002): Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol Ther*; 6(5):687-693
- 31 DASH PR, READ ML, BARETT LB, WOLFERT MA, SEYMOUR LW (1999): Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther*; 6:643-650
- 32 DASS CR (2003): Vehicles for oligonucleotide delivery: therapeutic applicability against tumors. *J Pharm Pharmacol*; 54:3-27
- 33 DELENDIA C (2004): Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med*; 6(1):125-38
- 34 DEREK W, DAVIS B (2006): Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucl Acids Res*; 34: 322-330
- 35 DUVSHANI-ESHET M (2006): The effects of albumin-coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound. *J Contr Release*; 112(2):156-166
- 36 DYKXHOORN DM, LIEBERMANN J (2006): Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs. *Annu Rev Biomed Eng*; 8:15.1-15.26
- 37 ELBASHIR SM, HARBOTH J, LENDECKEL W, WEBER K, TUSCHL T (2001): Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*; 20:6877-6888
- 38 ELBASHIR SM, HARBOTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*; 411:494-498
- 39 ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*; 15:188-200
- 40 ELZAOUK L, MOELLING K, PAVLOVIC J (2006): Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol*; 15(11):865-74
- 41 ERBACHER P, REMY JS, BEHR JP (1999): Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther*; 6(1):138-45

-
- 42 ERBACHER P, ZOU S, BETTINGER T, STEFFAN AM, REMY JS (1998): Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res*; 15:1332-1339
- 43 FADOK VA, CATHELIN A, DALEKE DL, HENSON PM, BRATTON DL (2001): Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*; 1071-1077
- 44 FAJAC I, BRIAND P, MONSIGNY M, MIDOUX P (1999): Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*; 10(3):395-406
- 45 FELGNER PL, (1997): Nonviral strategies for gene therapy. *Scientific American*; 276:86-90
- 46 FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci*; 84:7413-7417
- 47 FERRARI S, MORO E, PETTENAZO A, BEHR JP, ZACCHELLO F, SCARPA M (1997): Exgen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*; 4:1100-1106
- 48 FIDLER IJ (1975): Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*; 35(1):218-24
- 49 FINSINGER D, REMY JS, ERBACHER P, KOCH C, PLANK C (2000): Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther*; 7:1183-1192
- 50 FIRE A, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391 (6669): 806-11
- 51 FISCHER D, BIEBER T, LI Y, ELSASSER HP, KISSEL T (1999): A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*; 16:1273-1279
- 52 FRENKEL PA, CHEN S, THAI T (2002): DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound mediated transfection in vitro: *Ultrasound Med Biol*; 28:817-822
- 53 FREY HH (2002): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Frey HH, Löscher W (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, S.16
- 54 FRIEDMANN T (1997): Overcoming the obstacles to gene therapy. *Scientific American*; 276 (6):79-85
- 55 FRIEDMANN T, ROBLIN R (1972): Gene therapy for human genetic disease? *Science*; 175(25):949-55

- 56 GEBHART CL, KABANOV AV (2001): Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Controlled Release*; 73:401-416
- 57 GERSTING SW, 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
- 58 GIL J, ESTEBAN M (2000): Induction of apoptosis by the dsRNA dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action. *Apoptosis*; 5:107-114
- 59 GILLIES RJ, GATENBY RA (2007): Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr*; 39(3):251-7
- 60 GORMAN CM, MOFFAT LF, HOWARD BH (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol*; 2:1044
- 61 GOTTSCHALK S, CHRISTIANO RS, SMITH LC, WOO SLC (1994): Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression. *Gene Ther*; 1(3):185-191
- 62 GOULA D, BENOIST C, MANTERO S, MERLO G, LEVI G, DEMENEIX BA (1998): Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*; 5:1291-1295
- 63 GROSKREUTZ D, SCHENBORN ET (1997): Reporter systems. *Methods Mol Biol*; 63:11-30
- 64 GUAN H, ZHOU Z, WANG H, JIA SF, LIU W, KLEINERMAN ES (2005): A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res*; 11:2662-26629
- 65 HASHIDA M, MAHATO RI, KAWABATA K (1996): Pharmacokinetics and targeted delivery of proteins and genes. *J Control Release*; 41:91-97
- 66 HEALTH DEPARTMENT OF THE UNITED KINGDOM GENE THERAPY ADVISORY COMMITTEE (2001): Guidance on making proposals to conduct gene therapy research on human subjects. *Hum Gene Ther*; 12:711-720
- 67 HOFFMANN G (2006): Moleküle mit Nebenwirkungen. *Trillium-Report*; 4 (4): 90-92
- 68 HOFFMANN H, BÜLZEBRUCK H, DIENEMANN H (2002): Chirurgische Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC). *Der Onkologe*; 8:425-433
- 69 HONGTAO LV, ZHANG S, WANG B, CUI S, YAN J (2006): Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Controlled Release*; 114:100-109
- 70 HORNUNG V, GUENTHNER-BILLER M, BOURQUIN C, ABLASSER A, SCHLEE M (2005): Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*; 11:263-270

-
- 71 HOSSEINKHANI H, AOYAMA T, TABATA Y (2003): Ultrasound enhances the transfection of plasmid DNA by non-viral vectors. *Curr Pharm Biotech*; 4:109-122
- 72 HSU WL, CHEN HL, LIOU W, LIN HK, LIU WL (2005): Mesomorphic complexes of DNA with the mixtures of a cationic surfactant and a neutral lipid. *Langmuir*; 21:9426-9431
- 73 HUGHES C, GALEA-LAURI J, FARZANEH F, DARLING D (2001): Streptavidin paramagnetic particles provide a choice of three affinity-based capture and magnetic concentration strategies for retroviral vectors. *Mol Ther*; 3:623-630
- 74 HÜTTINGER C, HIRSCHBERGER J, JAHNKE A, KÖSTLIN R, BRILL T, PLANK C, KÜCHENHOFF H, KRIEGER S, SCHILLINGER U (2008): Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcoma: a phase I trial. *J Gene Med*; 10(6):655-67
- 75 HUTVAGNER G, ZAMORE PD (2002): Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*; 12:225-232
- 76 HYNYNEN K, MCDANNOLD, VYKHODTSEVA N, JOLESZ F (2001): Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiol*; 220:640-646
- 77 IGNOWSKI JM, SCHAFFER DV (2004): Kinetic analysis and modelling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*; 86:827-834
- 78 ILIES MA, JOHNSON BH, MAKORI F, MILLER A, WILLIAM AS, SEITZ E, THOMPSON B, BALABAN AT (2005): Pyridinium cationic lipids in gene delivery: an in vitro and in vivo comparison of transfection efficiency versus a tetraalkylammonium congener. *Arch Biochem Biophys*; 435:217-226
- 79 ILIES MA, SEITZ WA, CAPROIU MT, WENTZ M, GARFIELD RE, BALABAN AT (2003): Pyridinium-based cationic lipids as gene-transfer agents. *Eur J Org Chem*; 14:2645-2655
- 80 INAGAKI H (2006): Ultrasound-microbubble mediated NF-kb decoy transfection attenuates a neo-intimal formation after arterial injury to mice. *J Vasc Res*; 43:12-18
- 81 JAQUE JM, TRIQUES K, STEVENSON M (2002): Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*; 418:435-438
- 82 JUDGE AD, SOOD V, SHAW JR, FANG D, MCCLINTOCK K, MACLACHLAN (2005): Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*; 23:457-462
- 83 KABANOV AV, KABANOV VA (1995): DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem*; 6(1):7-20

- 84 KAMATH RS (2003): Systemic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*; 421:231-237
- 85 KAO SC, KRICHEVSKY A, KOSIK K, TSAI LH (2003): BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem*; 279:1942-1949
- 86 KAPADIA S, BRIDEAU-ANDERSON A, CHISARI F (2003): Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:2014-2018
- 87 KARBERG S (2007): Positive Interferenz. *Süddeutsche Zeitung*; 257, S.18
- 88 KAWAKAMI S, YAMASHITA F, NISHIKAWA M, TAKAKURA Y, HASHIDA M (1998): Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*; 252:78-83
- 89 KENNERDELL JR, CARTHEW RW (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol*; 18:896-898
- 90 KHVOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA SD (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*; 115:209-216
- 91 KICHLER A, LEBORGNE C, COETAUX E, DANOS O, (2001): Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med*; 3: 135-144
- 92 KIM TW, CHUNG H, KWON IC, SUNG HC, JEONG SY (2000): In vivo gene transfer to the mouse nasal cavity mucosa using stable cationic lipid emulsion. *Mol Cells*; 10(2):142-147
- 93 KINGSTON RE (1997): Introduction of DNA into mammalian cells. Ausubel FM (Hrsg.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., USA: 9.6.5-9.6.11
- 94 KIRCHEIS R, KICHLER A, WALLNER G, KURSA M, OGRIS M, FELZMANN T, BUCHBERGER M, WAGNER E (1997): Coupling of cell binding ligands to polythyleneimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*;4:409-418
- 95 KIRCHEIS R, SCHULLER S, BRUNNER S, OGRIS M, HEIDER KH, ZAUNER W, WAGNER E (1999): Polycation-based DNA complexes for tumor targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med*; 1:111-120
- 96 KIRCHEIS R, WAGNER E (2000): Polycation/DNA complexes for in vivo gene delivery. *Gene Ther and Reg*;1:95-114
- 97 KIRKHAM M, PARTON RG (2005): Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*; 1745:273-286
- 98 KLEIN R (2000): Experimentelle Untersuchungen zur Anreicherung von zytostatikagekoppelten Ferrofluide in VX2-Plattenepithelkarzinomen des Kaninchens unter Einwirkung eines magnetischen Feldes. *Vet Med Diss*, München

- 99 KODAMA T, TOMITA Y, KOSHIYAMA K-I, BLOMLEY MJK (2006): Transfection effect of microbubbles on cells in superposed ultrasound waves and behavior of cavitation bubble. *Ultrasound Med Biol*; 32(6):905-914
- 100 KOIKE H, TOMITA N, AZUMA H, OGIHARA T, MORISHITA R (2005): An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. *J Gene Med*; 7:108-116
- 101 KOLBER DL, KNISELY TL, MAIONE TE (1995): Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J Nat Cancer Inst*; 87(4):304-309
- 102 KOLLEN WJ, MIDOUX P, ERBACHER P, YIP A, ROCHE AC, MONSIGNY M, GLICK MC, SCANLIN TF (1996): Gluconoylated and glycosylated polylysines as vectors for gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*; 7(13):1577-86
- 103 KONDOH H (2008): Cellular life span and the Warburg effect. *Exp Cell Res*; 314(9):1923-8
- 104 KOPING-HOGGARD M, TUBULEKAS I, GUAN H, EDWARDS K, NILSSON M, VARUM KM, ARTURSSON P (2001): Chitosan as a non-viral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther*; 8:1108-1121
- 105 KRIEG AM, YI AK, MATSON S, WALDSCHMIDT TJ, BISHOP GA, TEASDALE R, KORETZKY GA, KLINMAN DM (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*; 374:546-549
- 106 KRÖTZ F, SOHN H-Y, GLOE T, PLANK C, POHL U (2002): Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res*; 40:425-434
- 107 LAWRIE A, BRISKEN AF, FRANCIS SE, TAYLER DI, NEWMAN CM (1999): Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation*; 99:2617-2620
- 108 LAYZER JM, MCCAFFREY AP, TANNER AK, HUANG Z, SULLENGER BA (2004): In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*; 10:766-771
- 109 LEAMON CP, WEIGL D, HENDREN RW (1999): Folate copolymer-mediated transfection of cultured cells. *Bioconjug Chem*; 10(6):947-57
- 110 LEE RJ, LOW PS (1995): Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim Biophys Acta*; 1233(2):134-144
- 111 LEWIS RN, MC ELHANEY RN (2000): Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic and zwitterionic lipids. *Biophys J*; 79:1455-1464

- 112 LI BJ, TANG Q, CHENG D, XIE FY (2005): Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimes against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med*; 11:944-951
- 113 LI LC, OKINO ST, ZHAO H, POOKOT D, PLACE RF, URAKAMI S, ENOKIDA H, DAHIYA R (2006): Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *PNAS*; 103(46):17337-17342
- 114 LI S, HUANG L (2000): Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*; 7:31-34
- 115 LI T, TACHIBANA K, KUROKI M (2003): Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison and Levovist in mice-initial results. *Radiology*; 229:423-428
- 116 LI W, NICOL F, SZOKA FC (2004): GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipatic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 56:967-985
- 117 LIANG H-D, BLOMLEY MJK (2003): The role of ultrasound in molecular imaging. *J Radiol*; 76:140-150
- 118 LIDNER JR, SONG J, XU F (2000): Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated leukocytes. *Circulation*; 102:2745-2750
- 119 LIEBERMANN J, SONG E, LEE SK, SHANKAR P (2003): Interfering with disease: Opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. *Trends Mol Med*; 9:397-403
- 120 LIM DW, YEAM JI, PARK TG (2000): Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes. *Bioconj Chem*; 11(5):688-95
- 121 LINDL T (2002): Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- 122 LINDNER JR (2002): Evolving applications for contrast ultrasound. *Am J Cardiol*; 90:72J-80J
- 123 LIU DL, HU JJ, QIAO WH, LI ZS, ZHANG SB, CHENG LB (2005): Synthesis of carbamate-linked lipids for gene delivery. *Bioorg Med Chem Lett*; 15:3147-3150
- 124 LIU Y, MIYOSHI H, NAKAMURA M (2006): Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. *J Controlled Release*; 114:89-99
- 125 LOPEZ-LAZARO M (2008): The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem*; 8(3):305-12
- 126 LOWY DR, RANDS E, SCOLNICK EM (1978): Helper-independent transformation by unintegrated Harvey sarcoma virus DNA. *J Virology*; 26:291-298

- 127 LU DD (2007): AKR1C2 small interfering RNA (siRNA) inhibited beta-catenin expression and transcriptional activation in human liver cancer cell line QGY7701. *Hepatogastroenterology*; 54(79):2088-91
- 128 LUBBE AS, BERGEMANN C, RISS H, SCHRIEVER F, REICHARDT P, POSSINGER K, HERRMANN F, GURTNER R, LEMKE AJ, HUHNS D (1996): Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res*; 56:4686-4693
- 129 MARIN A, SUN H, HUSSEINI GA (2002): Drug delivery in pluronic micelles: effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J Contr Release*; 84:39-47
- 130 MARQUES JT, WILLIAMS BR (2005): Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol*; 23:1399-10405
- 131 MARTINEZ LA, NAGUIBNEVA I, LEHRMANN H (2002): Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99:14849-14854
- 132 MASSOUD TF, PAULMURUGAN R, DE A, RAY P, GAMBHIR SS (2007): Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects. *Curr Opin Biotechnol*; 18:31-37
- 133 MERDAN T, KOPECEK J, KISSEL T (2002): Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*; 54:715-758
- 134 MERDAN T, KUNATH K, FISCHER D, KOPECEK J, KISSEL T (2002): Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res*; 19:140-146
- 135 MILLER DL, PISLARU SV, GREENLEAF JE (2002): Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet*; 27:115-134
- 136 MIYAGISHI M, TAIRA K (2002): U6-promotor-driven siRNAs with four uridine 3'overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*; 20:497-500
- 137 MORIMOTO K, NISHIKAWA M, KAWAKAMI S, NAGANO T, HATTORI Y, FUMOTO S, YAMASHITA F, HASHIDA M (2003): Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther*; 7(2):254-61
- 138 MORRISEY DV, LOCKRIDGE JA, SHAW L, BLANCHARD K, JENSEN K (2005): Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*; 23:1002-1007

- 139 MORRISSEY DV, BLANCHARD K , SHAW L, JENSEN K (2005): Activity of stabilized short interfering RNA in mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology*;41:1349-1356
- 140 MYKHAYLYK O, SANCHEZ ANTEQUERA Y, VLASKOU D, PLANK C (2007): Generation of magnetic nonviral gene transfer agents. *Nature Protocols*; 2(10):2391-2411
- 141 MYKHAYLYK O, VLASKOU D, TRESILWISED N, PITHAYANUKUL P, MÖLLER W, PLANK C (2006): Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. *J Magn Mater*; 6:1016-1023
- 142 NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R (1990): Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*; 2:279-289
- 143 NAYLOR LH (1999): Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*; 58:749-757
- 144 NELSON RW, COUTO CG (2003): Small animal internal medicine. 3rd Edition, Mosby (Verlag), S.35-47
- 145 NEUWALT EA (2004): Imaging of iron oxide nanoparticles with MR and light microscopy in patients with malignant brain tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 5:456-471
- 146 NEWMAN CM, LAWRIE A, BRISKEN AF, CUMBERLAND DC (2001): Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography*; 18:339-347
- 147 NICHOLS B (2003): Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci*;116:4707-4714
- 148 NIIDOME T, HUANG L (2002): Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*; 9:1647-1652
- 149 NISHIYAMA N, KATAOKA K (2006): Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharm Ther*;112:630-648
- 150 NOGAWA M, YUASA T, KIMURA S, KURODA J, SATO K, SEGAWA H, YOKOTA A, MAEKAWA T (2004): Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett*; 217:243-253
- 151 NOVINA CD, MURRAY MF, DYKXHOORN DM (2002): siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*; 8:681-686
- 152 NOVINA CD, SHARP PA (2004): The RNAi revolution. *Nature*; 430:161-164

- 153 OGRIS M, BRUNNER S, SCHULLER S, KIRCHEIS R, WAGNER E (1999): PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*; 6:595-605
- 154 PALLISER D, CHOWDHURY D, WANG QY, LEE SJ, BRONSON RT (2006): An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*; 439:89-94
- 155 PANDORI MW, HOBSON DA, SANO T (2002): Adenovirus-microbead conjugates possess enhanced infectivity: a new strategy to localized gene delivery. *Virology*; 299:204-212
- 156 PERSENGIEV SP, ZHU X, GREEN MR (2004): Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*; 10:12-18
- 157 PLANK C, MECHTLER K, SZOKA FC, WAGNER E (1996): Activation of the Complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*; 7:1437-1446
- 158 PLANK C, OBERHAUSER B, MECHTLER K, KOCH C, WAGNER E (1994): The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*; 269:12918-12924
- 159 PLANK C, SCHILLINGER U, SCHERER F, BERGEMANN C, REMY J-S, KRÖTZ F, ANTON M, LAUSIER J, ROSENECKER J (2003): The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem*; 384:737-747
- 160 PLANK C, ZATLOUKAL K, COTTEN M, MECHTLER K, WAGNER E (1992): Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconj Chem*; 3:533-539
- 161 POUTON CW, SEYMOUR LW (1998): Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 34:3-19
- 162 POUTON CW (1998): Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes. *Adv Drug Deliv Rev*; 34:51-64
- 163 POUTON CW, LUCAS P, THOMAS BJ, UDUEHI AN, MILROY DH, MOSS SH (1998): Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Controlled Release*; 53:289-299
- 164 PRICE RJ, SKYBA DM, KAUL S, SKALAK TC (1998): Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation*; 98(13):1264-1267

- 165 PUSHPARAJ PN, MELENDEZ AJ (2006): Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic. *Clinical and Exp Pharm and Physiol*; 33: 504-510
- 166 RALPH GS, RADCLIFFE PA, DAY DM (2005): Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med*; 429-433
- 167 RAOUL C, ABBAS-TERKI T, BENSADOUN JC (2005): Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med*; 11:423-428
- 168 REICH SJ, FOSNOT J, KUROKI A (2003): Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*; 9:210-216
- 169 REJMAN J, BRAGONZI A, CONESE M (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther*;12:468-474
- 170 REJMAN J, OBERLE V, ZUHORN IS, HOEKSTRA D (2004): Size-dependent internalization of particles via the pathway of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*; 377:159-169
- 171 REJMAN J, WAGENAR A, ENGBERTS JB, HOEKSTRA D (2004): Characterization and transfection properties of lipoplexes stabilized with novel exchangeable polyethylene glycol-lipid conjugates. *Biochim Biophys Acta*;1660:41-52
- 172 REMY JS, ABDALLAH B, ZANTA MA, BOUSSIF O, BEHR JP, DEMENEIX B (1998): Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*; 30:85-95
- 173 ROJO J, DIAZ V, SEGURA I, BARRIENTOS AG, RIESE HH, BERNAD A, PENADES S (2004): Gold glyconanoparticles as new tools in antiadhesive therapy. *Chem Bio Chem*; 5:291-297
- 174 ROLLE M, MAYR A (2002): Medizinische Mikrobiologie. Mayr A (Hrsg.), Enke Verlag Stuttgart, S.331
- 175 ROSENTHAL N (1987): Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Meth Enzymol*;152:704-720
- 176 RUDOLPH C, PLANK C, FINSINGER D, GESSNER A, NICKLAUS P, MÜLLER RH, ROSENECKER J (2001): Nonviral gene delivery to the lung with copolymer protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Gene Ther*;
- 177 RUPONEN M, YLA-HERTTUALA S, URTTI A (1999): Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*; 1415:331-341

- 178 RUSS V, WAGNER E (2007): Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm Res*; 24(6): 1047-1057
- 179 SADIKOT RT, BLACKWELL TS (2005): Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc*; 2(6):537-40, 511-2
- 180 SAKAKIMA Y (2005): Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents. *Cancer Gene Ther*; 12(11):884-889
- 181 SAMAKOGLU S, LISOWSKI L, BUDAK-ALPDOGAN T, ACUTO S (2006): A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference. *Nat Biotechnol*; 24:89-94
- 182 SATO A, TAKAGI M, SHIMAMOTO A, KAWAKAMI S, HASHIDA M (2007): Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomater*; 28:1434-1442
- 183 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 Ther*; 9(2):102-9
- 184 SCHERR M, BATTMER K, WINKLER T, HEIDENREICH O, GANSER A, EDER M (2003): Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*; 101:1566-1569
- 185 SCHIFFELERS RM, ANSARI A, XU J (2004): Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*; 32:e149
- 186 SCHILLINGER U (2002): Verschiedene Applikationsformen nicht-viraler Genvektoren im Tiermodell unter besonderer Berücksichtigung des lokalen Gentransfers. *Vet Diss*, München
- 187 SCHLICHER RK, RADHAKRISHNA H, TOLENTINO TP, APKARIAN RP, ZARNITSYN V, PRAUSNITZ MR (2006): Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*; 32:915-924
- 188 SCHWARZ DS, HUTVAGNER G, DU T, XU Z, ARONIN N, ZAMORE PD (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*; 115:199-208
- 189 SEN A, STEELE R, GHOSH AK, BASU A, RAY R, RAY RB (2003): Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res*; 96:27-35
- 190 SHAH K, TUNG CH, BREAKFIELD XO, WEISSLEDER R (2005): In vivo imaging of S-trail-mediated tumor regression and apoptosis. *Mol Ther*; 11(6):926-931
- 191 SHAI B, PALMON A, PANETT A, MARMARY Y, SHERMAN Y, CURRAN MA, GALUN E, CONDIOTTI R (2005): Prolonged transgene expression in murine salivary glands following non-primate lentiviral vector transduction. *Mol Ther*; 2005 Jul;12(1):137-43

- 192 SHOHET RV, CHEN S, ZHOU YT, UNGER RH, GRAYBURN PA (2000): Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*; 101(22):2554-2556
- 193 SIOUD M (2005): Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol*; 348:1079-1090
- 194 SKYBA DM, PRICE RJ, LINKA AZ, SKALAK TC, KAUL S (1998): Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation*; 98(4):290-293
- 195 SLEDZ CA, HOLKO M, DE VEER MJ, SILVERMAN RH, WILLIAMS BR (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*; 5:834-839
- 196 SMITH NB, LEE S, MAIONE E (2003): Ultrasound mediated transdermal transport of insulin in vitro through human skin using novel transducer designs. *Ultrasound Med Biol*; 29:311-317
- 197 SMITH NB, LEE S, SHUNG KK (2003): Ultrasound mediated transdermal in vivo transport of insulin with low-profile cymbal arrays. *Ultrasound Med Biol*; 29:1205-1210
- 198 SONG E, LEE SK, DYKXHOORN DM, NOVINA C, ZHANG D (2003): Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol*; 77:7174-7181
- 199 SONG E, LEE SK, WANG J, INCE N, OUYANG N (2003): RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*; 9:347-351
- 200 SONG E, ZHU P, LEE SK, CHOWDHURRY D, KUSSMAN S (2005): Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*; 23:709-717
- 201 SONG LY, AHKONG QF, RONG Q, WANG Z, ANSELL S, HOPE MJ, MUI B (2002): Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*; 1558:1-13
- 202 SONODA S, TACHIBANA K, UCHINO E, IZUMI Y, SAKAMOTO T (2006): Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(2):558-564
- 203 SOUTSCHEK J, AKINC A, BAMLAGE B, CHATISSE K, COUSTIEN R (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*; 432:173-178
- 204 SOUTSCHEK J, ELBASHIR S, VORNLOCHER HP (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*; 432:173-178

- 205 STARK GR, KERR IM, WILLIAMS BR, SILVERMAN RH, SCHREIBER RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*; 67:227-264
- 206 STELL A, BISERNI A, DELLA TORRE S, RANDO G, RAMACHANDRAN B, OTTOBRINI L, LUCIGNANI G, MAGGI A, CIANA P (2007): Cancer modeling: Modern imaging applications in the generation of novel animal model systems to study cancer progression and therapy. *IJBCB*; 39:1288-1296
- 207 STREHLER BL, TOTTER JR (1952): Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. *Arch Biochem Biophys*; 40:28-41
- 208 STRIDE E, SAFFARI N (2003): On the destruction of microbubble ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol*; 29:563-573
- 209 STRYER L (1996): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- 210 SUH W, HAN SO, YU L, KIM SW (2002): An angiogenic, endothelial-cell-targeted polymeric gene carrier. *Mol Ther*; 6(5):664-72
- 211 SWEENEY TJ, MAILANDER V, TUCKER AA, ZHANG w, NEGRIN RS, CONTAG CH (1999): Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:12044-12049
- 212 TAKAKURA Y, MAHATO RI, HASHIDA M (1998): Extravasation of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*; 34:93-108
- 213 TAKESHITA F, OCHIYA T (2006): Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*; 97(8):689-696
- 214 TANDIA BM, LONEZ C, VANDENBRANDEN M, RUYSSCAERT JM, ELOUAHABI A (2005): Lipid mixing between lipoplexes and plasma lipoproteins is a major barrier for intravenous transfection mediated by cationic lipids. *J Biol Chem*; 280:12255-12261
- 215 TANIYAMA Y, TACHIBANA K, HIRAOKA K, MATSUMOTO K, KANEDA Y, MORISHITA R (2002): Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*; 9:372-380
- 216 TATUM EL (1966): Molecular biology, nucleic acids and the future of medicine. *Perspect Biol Med*; 10:19-32
- 217 TILCOCK C (1999): Delivery of contrast agents for magnetic resonance imaging, computed tomography, nuclear medicine and ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev*; 37:33-51
- 218 TOKUNAGA M, HAZEMOTO N, YOTSUYANAGI T (2004): Effect of oligopeptides on gene expression: comparison of DNA/peptide and DNA/peptide/liposome complexes. *Int J Pharm*; 269:71-80

- 219 TOUB N, BERTRAND JR, TAMADDON A, ELHAMESS H, HILLAIREAU H, MAKSIMENKO A, MACCARIO J, MALVY C, FATTAL E, COUVREUR P (2006): Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma. *Pharm. Res*; 23:892-900
- 220 TSUTSUI JM, XIE F, PORTER RT (2004): The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovasc Ultrasound*; 2(1):23
- 221 ULMER JB, DONNEEY JJ, PARKER SE, RHODES GH, FELGNER PL, DWARKI VJ, GROMKOWSKI SH, DECK RR, DEWITT CM, FRIEDMAN A (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*; 259:1745-1749
- 222 UMEMURA S, KAWABATTA K, SASAKI K (1996): Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy. *Ultrasonics Sonochemistry*; 3:187-191
- 223 UNGER EC, HERSH E, VANNAN M, MATSUNAGA TO, MCCREERY T (2001): Local drug and gene delivery through microbubbles. *Proc Cardiovasc Dis*; 44(1):45-54
- 224 UNGER EC, HERSH E, VANNAN M, MCCREERY T (2001): Gene delivery using ultrasound and contrast agents. *Echocardiography*; 18:355-361
- 225 UNGER EC, MCCREERY T, SWEITZER R, VIELHAUER G, WU G, SHEN D, YELLOWHAIR D (1998): MRX 501: a novel ultrasound contrast agents with therapeutic properties. *Acad Radiol*; 5(1):247-249
- 226 UNGER EC, PORTER T, CULP W, LABELL R, MATSUNAGA T, ZUTSHI R (2004): Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev*; 56:1291-1314
- 227 URBAN-KLEIN B, WERTH S, ABUHARBEID S, CZUBAYKO F, AIGNER A (2005): RNAi-mediated gene targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther*; 12:461-466
- 228 VAN DE KROL AR (1990): Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*; 2:291-299
- 229 VANNAN M, MCCREERY T, LI P, HAN Z, UNGER E, KUERSTEN B, RAJAGOPALAN S (2002): Ultrasound-mediated transfection of canine myocardium by intravenous administration of cationic microbubble-linked plasmid DNA. *J Am Soc Echocardiogr*; 15(3):214-218
- 230 WAGNER E, COTTEN M, FOISNER R, BIRNSTIEL ML (1991): Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4255-4259
- 231 WAGNER E, PLANK C, ZATLOUKAL K, COTTEM M, BIRNSTIEL ML (1992): Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89:7934-7938

-
- 232 WANG X, LIANG H-D, DONG B, BLOMLEY MJK (2005): Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiol*; 237:224-229
- 233 WASUNGU L, HOEKSTRA D (2006): Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Controlled Release*; 116:255-264
- 234 WATSON JD, CRICK FHC (1953): Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid. *Nature*; 171:964-969
- 235 WEIS K (1998): Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci*; 23:185-189
- 236 WEISSLEDER R, MOORE A, MAHMOOD U, BHORADE R, BENVENISTE H, CHIOCCA EA, BASILION JP (2000): In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nature Med*; 6:351-354
- 237 WELLS PNT (2001): Physics and engineering: milestones in medicine. *Med Eng Phys*; 23:147-153
- 238 WELTGESUNDHEITSORGANISATION REGIONALBÜRO FÜR EUROPA (2005): Der Europäische Gesundheitsbericht 2005. ISBN 92-890-3376-2
- 239 WIETHOFF CM, MIDDAUGH CR (2003): Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci*; 92 (2):203-217
- 240 WOLF H, JASSEM E, CYNOWSKA B, DAMPS I, MIERZEJEWSKI E, STOMINSKY JM (2002): Chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer with the combination of gemcitabine and cisplatin. *Pneumonol Alergol Pol*; 70 (1-2):44-51
- 241 WOLFERT MA, SEYMOUR LW (1996): Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther*; 3(3):269-73
- 242 WOOD KV (1995): Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol*; 6:50-58
- 243 WROBEL I, COLLINS D (1995): Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta*; 1235:296-304
- 244 WU GY, WU CH (1987): Receptor-mediated in vitro gene transformation by soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*; 262:4429-4432
- 245 www.caliperls.com/products/optical-imaging/ivis-imaging-system-100-series.htm
- 246 www.dharmacon.de
- 247 www.nature.com/nprot/journal/v2/n9/full/nprot.2007.319.html
- 248 www.qiagen.com

- 249 XENARIOU S, GRIESENBACH U, FERRARI S, DEAN P, SCHEULE RK, CHENG SH, GEDDES DM, PLANK C, ALTON EW (2006): Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium in vivo. *Gene Ther*; 13:1545Y1552
- 250 YEW NS, WANG KX, PRZYBYLASKA M, BAGLEY RG, STEDMAN M, MARSHALL J, SCHEULE RK, CHENG SH (1999): Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid-pDNA complexes. *Hum Gene Ther*; 10:223-234
- 251 ZABNER J, FASBENDER AJ, MONINGER T, POELLINGER KA, WELSH MJ (1995): Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipid. *J Biol Chem*; 270:18997-19007
- 252 ZAMORE PD, TUSCHL T, SHARP PA, BARTEL DP (2000): Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals. *Cell*; 101:25-33
- 253 ZDERIC V, VAEZY S, MARTIN RW (2002): Ocular drug delivery using 20-kHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol*; 28:823-829
- 254 ZHANG Q (2006): Enhanced gene delivery into skeletal muscles with ultrasound and microbubble techniques. *Acad Radiol*; 3:363-367
- 255 ZHANG W, YANG H, KONG X, MOHAPATRA S, JUAN-VERGARA H, HELLERMANN G, LOCKEY RF, MOHAPATRA SS (2005): Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med*; 11(1):56-62
- 256 ZHANG X, SHAN P, JIANG D, NOBLE PW, ABRAHAM NG (2004): Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem*; 279:10677-10684
- 257 ZHANG Y, ZHANG YF, BRYANT J, CHARLES A, BOADO RJ, PARDRIGE WM (2004): Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res*; 10:3667-3677
- 258 ZHOU X, HUANG L (1994): DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta*; 1189:195-203
- 259 ZHU X, GREEN MR (2004): Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*; 10:12-18
- 260 ZIMMERMANN TS, LEE AC, AKINC A, BRAMLAGE B, BUMCROT D, FEDORUK MN (2006): RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*; 441(7089):111-114

-
- 261 ZUHORN IS, BAKOWSKY U, POLUSHKIN E, VISSER WH, STUART MCA ENGBERTS JB, HOEKSTRA D (2005): Nonbilayer phase of lipoplexe-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol Ther*;11:801-810
- 262 ZUHORN IS, BAKOWSKY U, VISSER WH, ENGBERTS JB, HOEKSTRA D (2002): Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochem Biophys Acta*; 1560:25-36
- 263 ZUIDAM NJ, BAREBHOLZ Y (1998): Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochim Biophys Acta*; 1368:115-128

8 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN MEDIEN UND PUFFER

Citric Saline 10 %: für die Zellkultur

50 g Kaliumchlorid

22 g Trisodium-Citrat

ad 500 ml H₂O

Dulbecco's MEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium): für die Zellkultur

Fa. Biochrom KG, Berlin

3,7 g/l NaHCO₃

4,5 g/l D-Glucose

1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine-Na-Pyruvat

Fötales Kälberserum: für die Zellkultur

Fetal Bovine Serum , Fa. Biochrom KG, Berlin

Luciferase Substrat Puffer: für die Zellkultur

9,2 g/l DTT

1M MgSO₄

50mM ATP

35 µM Luciferin

Lyse-Puffer: für die Probenaufbereitung

0,5 % Triton X-100

20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 7,4

137 mM NaCl

2mM EDTA

auf 10 ml 1 Tablette Combi Aprotinin und PMSF

(Complete® , Mini EDTA-free, Boehringer Mannheim, Mannheim)

Microbubble - Puffer: zur Herstellung der Microbubbles

8 ml 0,9% NaCl

1 ml Glycerin

1 ml Propylenglycol

PBS (1x) - Dulbecco: für die Zellkultur

Phosphate buffered saline

Fa. Biochrom KG, Berlin

Penicillin/Streptomycin: für die Zellkultur

Fa. Biochrom KG, Berlin

10000 U Penicillin

10000 µg/ml Streptomycin

Qiagen Puffer: zur Herstellung einer 20µM siRNA Lösung

Qiagen GmbH, Hilden

Trypsin/EDTA-Solution: für die Zellkultur

Fa. Biochrom KG, Berlin

0,25 % Trypsin

0,02 % EDTA

in PBS w/o

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Ultraschall-Kontrastmittel	21
Tabelle 2: Zusammensetzung der Anti-luc-siRNA-Microbubbles	51
Tabelle 3: Zusammensetzung der Kontroll-siRNA-Microbubbles	51
Tabelle 4: Zusammensetzung der Kontroll-siRNA-Magnetobubbles	55
Tabelle 5: Zusammensetzung der Elektrophorese-Proben	55
Tabelle 6: Behandlungsprotokoll der Biodistributionsstudie	60
Tabelle 7: Zusammensetzung der ¹²⁵ Iod markierten siRNA Microbubbles	61
Tabelle 8: Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten siRNA-Microbubbles	62
Tabelle 9: Versuchsplan des in vivo Versuchs V	63
Tabelle 10: Versuchsplan des in vivo Versuchs V	65
Tabelle 11: Quantitative Genexpression der retroviral transduzierten Zellen zu unterschiedlichen Passagezeiten	67
Tabelle 12: Genexpression der retroviral transduzierten Melanomzellen zu den verschiedenen Passagezeiten	69
Tabelle 13: Genexpression der lentiviral transduzierten Melanomzellen zu den verschiedenen Passagezeiten	69
Tabelle 14: Ergebnisse der Ablöseversuche durch Trypsin bzw. Citric Saline mit Bestimmung der Zellmortalität in PBS; Zellen auf Eis	71
Tabelle 15: Darstellung der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. 1% Citric Saline im zeitlichen Verlauf (Zellen bei Raumtemperatur)	72
Tabelle 16: Ergebnisse der Mortalitätsstudien von retroviral transduzierten Melanomzellen in verschiedenen Suspensionslösungen und im zeitlichen Verlauf	72
Tabelle 17: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % 24 h nach siRNA-Magnetofektion	75
Tabelle 18: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % 48h nach siRNA-Magnetofektion	76
Tabelle 19: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in %, 72h nach siRNA-Magnetofektion	77

Tabelle 20: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 24 h nach Magnetofektion mit Anti-Luciferase- bzw. Kontroll-siRNA.....	79
Tabelle 21: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P6+5) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 48 h nach Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall (Versuch 1).....	81
Tabelle 22: Luciferase Expression der B16F10 RV Luc-Zellen (P6+7) in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) 48 h nach Behandlung mit Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall (Versuch 2).....	82
Tabelle 23: Zellvitalität in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) der transfizierten B16F10 RV Luc-Zellen (P 6+5) 48 h nach Transfektion (Versuch 1).....	83
Tabelle 24: Zellvitalität in % (bezogen auf unbehandelte Zellen) der transfizierten B16F10 RV Luc-Zellen (P 6+7) 48 h nach Transfektion (Versuch 2).....	84
Tabelle 25: Gelelektrophorese nativer siRNA im Vergleich zu siRNA aus Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall.....	87
Tabelle 26: Luciferaseexpression in verschiedenen Organen 6 Tage nach Tumorzell-Inokulation.....	89
Tabelle 27: Tumorwachstum und Genexpression in der Lunge in Abhängigkeit von der injizierten Menge an B16F10 RV Luc-Zellen.....	90
Tabelle 28: Relative Verteilung der radioaktiv (¹²⁵ J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten post injectionem (5 % Sojabohnenöl; Angaben der Mittelwerte in % CPM / g Gewebe und ohne Injektionsstelle); n = 4.....	92
Tabelle 29: Relative Verteilung der radioaktiv (¹²⁵ J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten post injectionem (1 % Sojabohnenöl; Angaben der Mittelwerte in % CPM / g Gewebe und ohne Injektionsstelle); n = 4.....	94
Tabelle 30: Biolumineszenz in der Lunge als Maß für die Luciferase Aktivität vor und 48 h nach siRNA-Microbubble Applikation; Messung mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo).....	100
Tabelle 31: Lumineszenz in der Lunge 48 Stunden nach siRNA-Microbubble Applikation (Tag 14 des Tumorwachstums) gemessen mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo) bzw. im Luminometer (ex vivo).....	104
Tabelle 32: Luciferaseexpression in den Organen transgener Mäuse 48 Stunden nach systemischer Applikation von Anti-Luciferase-siRNA- (20 µg) bzw. Kontroll-siRNA-Magnetobubbles (Messung ex vivo).....	106

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DNA und Polylysin-DNA-Komplexen vor und nach der Kondensation	12
Abbildung 2: Oft benutzte kationische Polymere für den Gentransfer	13
Abbildung 3: Aufbau eines Perfluorocarbon-Gencarriers (Microbubble)	20
Abbildung 4: Verschiedene Möglichkeiten des Medikamententransports durch Microbubbles	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gentherapie am Herzen mithilfe von Ultraschall und Microbubbles	24
Abbildung 6: Permanentmagnet-Anordnung für den in vivo Versuch V	64
Abbildung 7: Darstellung der Genexpression des Reportergens Luciferase in retroviral transduzierten Melanomzellen in Abhängigkeit vom Splittingintervall	67
Abbildung 8: Darstellung der Genexpression der retroviral transduzierten Melanomzellen im zeitlichen Verlauf	68
Abbildung 9: Darstellung der Genexpression der lentiviral transduzierten Melanomzellen im zeitlichen Verlauf	69
Abbildung 10: Darstellung der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. 1% Citric Saline im zeitlichen Verlauf (Zellen auf Eis)	70
Abbildung 11: Darstellung der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in PBS nach Ablösung durch Trypsin bzw. 1% Citric Saline im zeitlichen Verlauf (Zellen bei Raumtemperatur)	71
Abbildung 12: Vergleich der Mortalität von retroviral transduzierten Melanomzellen in verschiedenen Suspensionslösungen und im zeitlichen Verlauf	73
Abbildung 13: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc Zellen (P22+5) 24 h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression stabil Reportergen exprimierender Zellen („unbehandelt“) und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration	74
Abbildung 14: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 48 h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression unbehandelter Zellen und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration	75
Abbildung 15: Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 72h nach siRNA-Magnetofektion bezogen auf die Expression unbehandelter Zellen und in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration	77

Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P22+5) 24 h nach Magnetofektion mit Anti-Luciferase- bzw. Kontroll-siRNA und verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln, bezogen auf die Genexpression unbehandelter Zellen.....	78
Abbildung 17: Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P6+5) 48 h nach Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubble Anwendung (Versuch 1).....	80
Abbildung 18: Luciferaseexpression in B16F10 RV Luc-Zellen (P6+7) 48 h nach Anti-Luciferase-siRNA-Magnetobubble Anwendung (Versuch 2).....	81
Abbildung 19: Zellvitalität der transfizierten B16F10 RV Luc Zellen (P 6+5) gemessen mittels MTT-Test 48 h nach Transfektion (Versuch 1) (Angaben in % der Referenz).....	83
Abbildung 20: Zellvitalität der transfizierten B16F10 RV Luc Zellen (P 6+7) gemessen mittels MTT-Test 48 h nach Transfektion (Versuch 2) (Angaben in % der Referenz).....	84
Abbildung 21: Gelelektrophorese nativer siRNA im Vergleich zu siRNA aus Magnetobubbles mit und ohne Ultraschall.....	85
Abbildung 22: Beispiele von entnommenen Lungen mit makroskopisch sichtbaren Melanomen zu verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums.....	88
Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der Genexpression des Reportergens Luciferase in der Lunge nach Applikation von 1×10^5 bzw. 2×10^5 B16F10 RV Luc-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	90
Abbildung 24: Relative Verteilung der radioaktiv (125 J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten nach Injektion (i.v.) der siRNA-Microbubbles mit 5 % Sojabohnenöl (Angaben der Mittelwerte in % CPM ohne Injektionsstelle / g Gewebe); n = 4; Magnetfeld bzw. Ultraschall Anwendung über der rechten Lunge.....	91
Abbildung 25: Relative Verteilung der radioaktiv (125 J) markierten siRNA in vivo 15 Minuten nach Injektion (i.v.) der siRNA-Microbubbles mit 1 % Sojabohnenöl (Angaben der Mittelwerte in % CPM ohne Injektionsstelle / g Gewebe); n = 4; Magnetfeld bzw. Ultraschall Anwendung über der rechten Lunge.....	93
Abbildung 26: Histologische Untersuchung der Lungen 60 Minuten nach fluoreszenzmarkierter siRNA-Magnetobubble Injektion.....	95
Abbildung 27: Histologische Untersuchung der Leber und Milz 60 Minuten nach siRNA-Magnetobubble Injektion.....	96
Abbildung 28: Semidünnschnitte der Lunge einer mit siRNA-Magnetobubbles behandelten Maus (15 Minuten nach i.v. Injektion).....	97
Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Lunge.....	98

Abbildung 30: Biolumineszenz in der Lunge (Luciferase exprimierendes Melanom) am Beispiel zweier Mäuse vor (a) und 48 h nach (b) der Behandlung mit Anti-Luciferase siRNA-Magnetobubbles (i.v.); Aufnahme mit dem Ivis™ 100 Imaging System.....	99
Abbildung 31: Biolumineszenzzunahme in der Lunge (in %) bzw. im Verlauf 48 h nach siRNA-Microbubble Applikation; Messung mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo).....	101
Abbildung 32: Luciferase Aktivität in den Lungenflügeln und im Herzen (ex vivo) 48 h nach siRNA-Microbubble Injektion (20 µg si-RNA / Maus, i.v.).....	102
Abbildung 33: Luciferase Aktivität in der gesamten Lunge 48 h nach siRNA-Microbubble Injektion (20µg si-RNA / Maus, i.v.); Messung des Gewebehomogenisates am Luminometer (ex vivo): Mittelwerte.....	102
Abbildung 34: Vergleichende Darstellung der gemessenen Lumineszenz in der gesamten Lunge mit dem Ivis Imagingsystem (in vivo) und im Luminometer (ex vivo) am Tag 14 des Tumorwachstums (48 h nach siRNA-Microbubble Applikation).....	105
Abbildung 35: Luciferaseexpression 48 Stunden nach i.v. Applikation von 20 µg siRNA-Magnetobubbles in den verschiedenen Geweben.....	107

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Chol	Cholesterin
CMV-Promotor	Cytomegalovirus-Promotor
d. h.	das heißt
DC-Chol	3 β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]Cholesterin
DMEM-Medium	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DOPE	1,2-Dioleoylglycero-3-phosphoethanolamin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-Trimethylammonioopropan
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
engl.	Englisch
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
evt.	eventuell
Fa.	Firma
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	humane Immundefizienzviren
HWZ	Halbwertszeit
i. d. R.	in der Regel
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Inj.	Injektion
LDS	low density protein
LTR	long terminal repeats
Luc	Luciferase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N : P	Stickstoff-zu-Phosphat-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-Pufferlösung)
pDNA	Plasmid DNA
PEI	Polyethylenimin
PKC	Proteinkinase C
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonukleinas
s.	siehe

S.	Seite
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sodium	Natrium
Tab.	Tabelle
US	Ultraschall
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
VEGF	vascular-endothelial growth factor

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CPM	counts per minute
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
kg	Kilogramm
M	Molar
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mT	Milliteslar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
pg	Pikogramm
sec	Sekunde
V	Volt
W	Watt
%	Prozent

12 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. C. Plank für die interessante Themastellung, für die fachliche Betreuung des Projektes und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Kollegin und Freundin Frau Dr. med. vet. U. Schillinger für ihre stetige psychische und physische Unterstützung, ihrer Hilfsbereitschaft während des gesamten Projekts, außerdem für ihre geleistete Motivationsarbeit bei so manchen Durststrecken und für die Verbesserungsvorschläge des Manuskriptes.

Dem gesamten Labor 1.39, insbesondere Frau U. Putz, Frau Dr. D. Vlaskou und Herrn C. Koch möchte ich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Frau Dr. med. vet. B. Schmeller danke ich für ihre Hilfe bei der histologischen Bearbeitung der Proben. Ein herzliches Dankeschön auch an Frau L. Jennen für ihre geleistete Aufbereitungs- und Mikroskopier-Arbeit am Elektronenmikroskop.

Bedanken möchte ich mich auch bei den OP-Schwestern und den Mitarbeitern des Tierbereiches für ihr freundliches Entgegenkommen.

Meinem Freund M. Pustotnik danke ich recht herzlich für seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei etlichen Kämpfen mit dem PC und für seine liebevolle Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen lieben Eltern, die mich während der Ausbildung und der vorliegenden Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben und immer für mich da sind.

13 LEBENS LAUF

Name: Riitta Susanna Renner

Geburtsdatum: 19.04.1981

Geburtsort: München

Eltern: Maximilian Renner
Pirjo Renner (geb. Korhonen)

Schulausbildung: 1987 - 1991 Besuch der Grundschulen in Gröbenzell und Holzkirchen
1991 - 2000 Besuch des Gymnasium in Miesbach

Abitur: 2000

Universität: 2000 - 2006 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: Februar 2006

Approbation: März 2006

Promotionsstudium: seit April 2006 an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mai 2006: Beginn der Doktorarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und
Therapieforschung, Klinikums Rechts der Isar der Technischen
Universität München

Seit Sept. 2006: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle
Onkologie und Therapieforschung, Klinikums Rechts der Isar der
Technischen Universität München

Seit Juni 2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Campus Innenstadt
Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik, Molekulare
Pneumologie II, Klinikum der Universität München