

**EINFLUSS EXTRAZELLULÄRER FAKTOREN
AUF STRUKTUR UND FUNKTION
NICHTVIRALER GENVEKTOREN**

SØREN GERSTING

2003

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

**Einfluss extrazellulärer Faktoren auf Struktur und Funktion
nichtviraler Genvektoren**

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

vorgelegt von
Søren Gersting
aus Wittmund
2003

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

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. G. Hartmann Prof. Dr. R. A. W. Rupp
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Josef Rosenecker
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	16.01.2003

Und umzuschaffen das Geschaffne,
Damit sich's nicht zum Starren waffne,
Wirkt ewiges, lebendiges Tun.
Und was nicht war, nun will es werden
Zu reinen Sonnen, farbigen Erden;
In keinem Falle darf es ruhn.

Es soll sich regen, schaffend handeln,
Erst sich gestalten, dann verwandeln;
Nur scheinbar steht's Momente still.
Das Ewige regt sich fort in allen:
Denn alles muß in Nichts zerfallen,
Wenn es im Sein beharren will.

(Johann Wolfgang Goethe)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Einführung	1
1.2. Gentransfersysteme	2
1.3. Extrazelluläre Barrieren des Gentransfers in die Lunge	7
1.4. Magnetofektion	10
1.5. Ziele der Arbeit	11
2. Methoden	12
2.1. Surfactantpräparate und anionische Phospholipide	12
2.2. BALF	12
2.3. N/P 13	
2.4. Grundlagen der Fluoreszenz	14
2.5. Markierung von DNA und Vektoren mit Fluorochromen	15
2.6. Fluoreszenz-Quenching-Assay	16
2.6.1. Theorie zum Fluoreszenz-Quenching	16
2.6.2. Durchführung der Fluoreszenz-Quenching-Assays	18
2.7. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	19
2.7.1. Theorie zum Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	19
2.7.2. Durchführung der FRET-Messungen	21
2.8. Bestimmung des Zetapotezials	22
2.9. Größenbestimmung	22
2.10. Transfektionen von 16 HBE 14o- Zellen	23
2.11. Adhäsionsexperimente	24
2.11.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Adhäsion von Genvektorkomplexen	24
2.11.2. Fluoreszenzspektroskopische Messung der Adhäsion von Genvektorkomplexen	25
2.12. Magnetofektion	25
2.12.1. Herstellung der Magnetofectins und Durchführung der Magnetofektion	25
2.12.2. Standard Transfektion als Kontrolle der Magnetofectionsexperimente	26
2.12.3. Primärzellkultur	26

2.12.4. Magnetofektion von Hela-Zellen	27
2.12.5. Organkultur von Atemwegsepithelien	27
2.12.6. Elektronenmikroskopie	28
2.12.7. Statistik	28
3. Strukturveränderungen nichtviraler Genvektorkomplexe unter Einfluss extrazellulärer Faktoren	30
3.1. Packungsdichte der DNA im Genvektorkomplex mit kationischen Liposomen und Polymeren	30
3.2. Einfluss von Surfactant und dessen Komponenten auf die Struktur kationischer Genvektorkomplexe	32
3.2.1. Messung des Einflusses von Alveofact, Exosurf und POPG auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexe	32
3.2.2. Messung des Einflusses von Alveofact, Exosurf, POPG und DPPG auf die räumliche Anordnung von DNA und Vektor im Genvektorkomplex	34
3.3. Einfluss von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und deren Komponenten auf die Struktur kationischer Genvektorkomplexe	36
3.3.1. Messung des Einflusses von BALF auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexen	36
3.3.2. Messung des Einflusses von Albumin, Mucin und Glykoprotein auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexen	38
3.4. Einfluss von Surfactant auf die Oberflächenladung von kationischen Genvektorkomplexen	40
3.5. Fluoreszenzmikroskopische Größenbestimmung nichtviraler Genvektorkomplexe	42
3.5.1. Problematik des Einsatzes der Fluoreszenzmikroskopie zur Größenbestimmung nichtviraler Genvektorkomplexe	42
3.5.2. Einfluss von Alveofact auf die Größe nichtviraler Genvektorkomplexe	46
3.5.3. Einfluss der Größe auf die Transfektionseffizienz kationischer Genvektorkomplexe	48
4. Adhäsion nichtviraler Genvektorkomplexe an die Zelloberfläche	50
4.1. Verteilungsmuster der Adhäsion von Lipo- und Polyplexen an Atemwegszellen unter Einfluss von Surfactant	52
4.2. Quantitative Messung des Einflusses von Surfactant auf die Adhäsion kationischer Genvektorkomplexe	55
5. Magnetofektion	57
5.1. Anreicherung und Adhäsion von Magnetofectins auf Atemwegszellen	57

5.2. Vergleich der Effizienz der Magnetofektion mit der Gentransfereffizienz von Lipoplexen und Polyplexen	61
5.3. Dosis-Wirkungs-Beziehung der Magnetofektion im Vergleich zur Polyfektion	64
5.4. Zeitaufgelöste Darstellung der Magnetofektion im Vergleich mit Polyfektion	66
5.5. Magnetofektion von Atemwegszellen	67
5.6. Elektronenmikroskopie von Magnetofectins: Anreicherung der Partikel und Aufnahme in die Zelle	69
5.7. Elektronenmikroskopie von Magnetofectins: Nachweis der Aufnahme von DNA in Atemwegszellen	74
6. Diskussion	77
7. Zusammenfassung	84
8. Literaturverzeichnis	85
9. Publikationsliste	93
10. Lebenslauf	94
11. Danksagung	95

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einführung

Seit jeher versucht der Mensch, die Substanz des Seins zu ergründen. Wann immer er glaubt, an die Wurzeln der eigenen Existenz gelangt zu sein, wird er feststellen, dass diese sich weiter verzweigen. Der griechische Philosoph Demokrit prägte den Begriff $\alpha\tau\omicron\mu$ als Sinnbild der kleinsten denkbaren Einheit (Sextus 200-250 n. Chr.). Doch das, was wir heute unter einem Atom verstehen, gilt schon längst nicht mehr als unteilbar. Und noch immer ist man auf der Suche nach der kleinsten Einheit dessen, "was die Welt im Innersten zusammenhält".

Nachdem um die Jahrhundertwende durch Wilson, Sutton und Boveri die Chromosomentheorie der Vererbung postuliert wurde (Boveri 1887; Wilson 1900; Sutton 1903) und 1953 Watson und Crick ein Strukturmodell der DNA als Bauplan des Lebens entwarfen (Watson and Crick 1953), dauerte es bis zum Jahr 2001, um den in der menschlichen DNA enthaltenen genetischen Code vollständig zu entschlüsseln (Lander, Linton et al. 2001). Schon viel früher hatte man jedoch erkannt, dass nicht der genetische Code allein das Geheimnis des Lebens birgt. Auch die Interaktion der Gene untereinander, die räumliche Anordnung der DNA im Zellkern und vieles mehr nehmen Einfluss auf die Merkmalsausprägung (Sadoni, Langer et al. 1999; Sun and Yokota 1999). Und so wird das Modell des genetischen Codes als Grundstein des Lebens immer komplexer, je mehr wir darüber wissen.

Die schrittweise Entschlüsselung des menschlichen Genoms brachte auch die Identifizierung von Genen mit sich, deren Fehlfunktion zur Ausprägung von Erbkrankheiten führt. Es lag der Gedanke nahe, fehlerhafte Gene durch eingeschleuste Wildtyp-Gene zu ersetzen. So kann als Ziel der Gentherapie formuliert werden, angeborene oder erworbene Krankheiten kausal zu therapieren, indem Gene hinzugefügt, verändert oder ersetzt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, muss durch das Einschleusen von DNA oder RNA in den Zellkern eine Korrektur der fehlerhaften Bildung desjenigen Proteins erreicht werden, welches durch den Gendefekt betroffen ist.

Erste Therapieversuche erfolgten 1990 mit Patienten, die im fortgeschrittenen Stadium an einem Melanom erkrankt waren (Rosenberg, Aebersold et al. 1990). Im gleichen Jahr begann der erste klinische Test mit Patienten, die an Adenosindeaminase-Mangel erkrankt waren (Culver, Osborne et al. 1991).

Eine Krankheit, deren zugrunde liegender Gendefekt bereits seit langem entdeckt wurde, ist die Mukoviszidose. Im Jahre 1989 wurde das *CFTR*-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert (Kerem, Rommens et al. 1989; Riordan, Rommens et al. 1989; Rommens, Iannuzzi et al. 1989; Gregory, Cheng et al. 1990) und bis heute wurden über 1.000 Mutationen identifiziert, die zur klinischen Manifestation der Mukoviszidose führen (Bobadilla, Macek et al. 2002). Die

Mukoviszidose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die in Europa mit einer Inzidenz von ca. 1:2.500 Geburten auftritt und deren pulmonologische Manifestation trotz stetig verbesserter Therapiemöglichkeiten zu einer deutlichen Reduktion der Lebenserwartung führt (Tümmler 2000; Assael, Castellani et al. 2002). Bereits 1990 wurde durch viralen Gentransfer *in vitro* die Korrektur des durch das fehlerhafte *CFTR*-Gen entstandenen Transportdefekts für Chlorid-Ionen von Mukoviszidose-Zelllinien nachgewiesen (Drumm, Pope et al. 1990; Rich, Anderson et al. 1990). Der erste klinische Test zur Therapie von Mukoviszidose, den 1994 Zabner und Kollegen mit adenoviralen Vektoren durchführten, erreichte eine Korrektur des Chlorid-Ionen Transportdefekts für längstens 10 Tage (Zabner, Couture et al. 1994). Bald danach wurden auch nichtvirale Vektoren, insbesondere Liposome, in klinischen Tests zur Therapie der Mukoviszidose erprobt (Caplen, Alton et al. 1995; Hyde, Southern et al. 2000).

Die ersten Versuche einer kausalen Therapie genetischer Erkrankungen mit viralen oder nichtviralen Gentransfersystemen ergaben jedoch nicht den erhofften Heilungserfolg (Bellon, Michel-Calemard et al. 1997; Huang and Viroonchatapan 1999; Bigger and Coutelle 2001). Man musste erkennen, dass das Einschleusen von DNA in menschliche Zellen und das dauerhafte Ablesen der eingebrachten Erbinformation zahlreichen Störfaktoren unterworfen ist (Huang and Viroonchatapan 1999). Grundlegende Fragen waren zu beantworten. Wie kann die DNA am geeignetsten verpackt werden, um eine möglichst günstige Größe einzunehmen und um vor Abbau geschützt zu sein? Wie kann zielgerichteter Gentransfer in bestimmte Gewebe erfolgen? Welche Faktoren behindern eine Aufnahme in die Zielzelle? Wie wird der Transport in den Zellkern ermöglicht? Auf welche Weise erreicht man eine dauerhafte Expression des codierten Proteins?

Um eine Anwendung der somatischen Genterapie *in vivo* zu ermöglichen, ist ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen dem Arzneistoff und dem Milieu, in das die Applikation erfolgt, erforderlich. Ein Schwerpunkt der Forschung ist der Versuch, eine somatische Genterapie der Mukoviszidose zu erreichen. Hierfür stehen virale und nichtvirale Gentransfersysteme zur Verfügung. Unter anderen Verfahren wird versucht, mittels topischer Applikation nichtviraler Genvektorkomplexe in die Lunge, die Korrektur des *CFTR*-Gen-Defekts von einer so großen Anzahl von Atemwegszellen zu erzielen, dass der Defekt funktionell korrigiert wird. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der extrazellulären Barrieren bei der topischen Applikation von Genvektorkomplexen in die Atemwege.

1.2. Gentransfersysteme

”Transfektion, d.h. die Infektion einer Zelle mit freier Nukleinsäure, ist eine potente und weit verbreitete Technik, mit der die Expression von Proteinen in Zellen manipuliert werden kann.” (Old and Primrose 1980). Diese Definition des Begriffs der Transfektion aus einem Standardwerk der Gentechnik von Old und Primrose 1980 läßt sich gleichermaßen auf das Feld der Gentherapie anwenden. Erstmals gelang es 1979, ein Gen in menschliche Zellen einzuschleusen – das β -Globin Gen wurde in Knochenmarkszellen transferiert (Cline, Stang et al. 1980; Mercola, Stang et al. 1980).

Es stehen drei methodisch unterschiedliche Ansätze zur Verfügung, um Gene in Zellen einzubringen: das Einschleusen von nackter Plasmid-DNA, der Gentransfer mit viralen Vektoren und der Gentransfer mit nichtviralen Vektoren.

Die Applikation nackter Plasmid-DNA kann auf intravenösem, intratrachealem oder intramuskulärem (Wolff, Malone et al. 1990; Jiao, Williams et al. 1992) Weg erfolgen. Daneben gibt es weitere Methoden, nackte Plasmid-DNA in Zellen einzuschleusen. So wird bei der ”Gene-Gun”-Methode DNA ballistisch beschleunigt und dadurch der Gentransfer in die Zellen des Zielorgans erhöht (Yang, Burkholder et al. 1990; Sun, Burkholder et al. 1995; Rols, Delteil et al. 1998). Auch das Anlegen eines elektrischen Feldes, Elektroporation genannt, erleichtert den Eintritt der DNA in die Zelle (Machy, Lewis et al. 1988; Maxwell and Maxwell 1988; Raptis and Firth 1990; Xie and Tsong 1990).

Beim viralen Gentransfer macht man sich die evolutionär erworbenen Fähigkeiten von Viren zunutze, Erbinformation in Zellen einzubringen. Seit Anfang der 1980er Jahre wurden virale Vektoren entwickelt, denen die Fähigkeit zur Replikation genommen wurde (Wei, Gibson et al. 1981; Tabin, Hoffmann et al. 1982). Von Fischer und Kollegen wurde die erste erfolgreiche Gentherapie einer Erbkrankheit überhaupt durchgeführt. Sie korrigierten mit Hilfe retroviraler Vektoren, über eine Transfektion *ex vivo* den Gendefekt, der einer Variante des schweren kombinierten Immundefizienzsyndroms - dem X-SCID - zugrunde liegt (Fischer, Hacein-Bey et al. 2002). Die *ex vivo* Applikation der viralen Genvektoren führt zu einer wesentlich höheren Effizienz, als dies bei der *in vivo* Applikation der Fall ist, weshalb das *ex vivo* System grundsätzlich von anderen viralen und nichtviralen Gentransfersystemen zu unterscheiden ist.

Je nach verwendetem Virus bestehen jedoch bei der Anwendung viraler Gentransfersysteme, trotz der hohen Effizienz viraler Genvektorsysteme, einige gewichtige Nachteile. So rufen virale Genvektorsysteme im allgemeinen immunologische Reaktionen hervor (Simon, Engelhardt et al. 1993; Worgall, Wolff et al. 1997; Brown and Lillicrap 2002) weshalb nach wiederholter Anwendung der viralen gentherapie eine erhebliche Abnahme der Genexpression beobachtet wurde (Yei, Mittereder et al. 1994; Zabner, Couture et al. 1994; Harvey, Leopold et al. 1999). Grundsätzlich besteht die Gefahr, dass Viren die Fähigkeit zur Replikation wiedererlangen und zu ungewollten Infektionen beim Patienten führen und die remutierten Viren Verbreitung finden. Der eigentliche Vorteil des viralen Gentransfers, dass mit Hilfe bestimmter Viren die Erbinformation in das menschliche Genom stabil eingebaut werden kann, erweist sich

hinsichtlich einer möglichen Mutagenese durch unkontrollierten Einbau als Risiko (Cooke 2001; Mitani and Kubo 2002). Schließlich ist es mit den bis heute etablierten Methoden nur begrenzt möglich, virale Vektoren für einen breiten therapeutischen Einsatz in der erforderlichen Menge herzustellen.

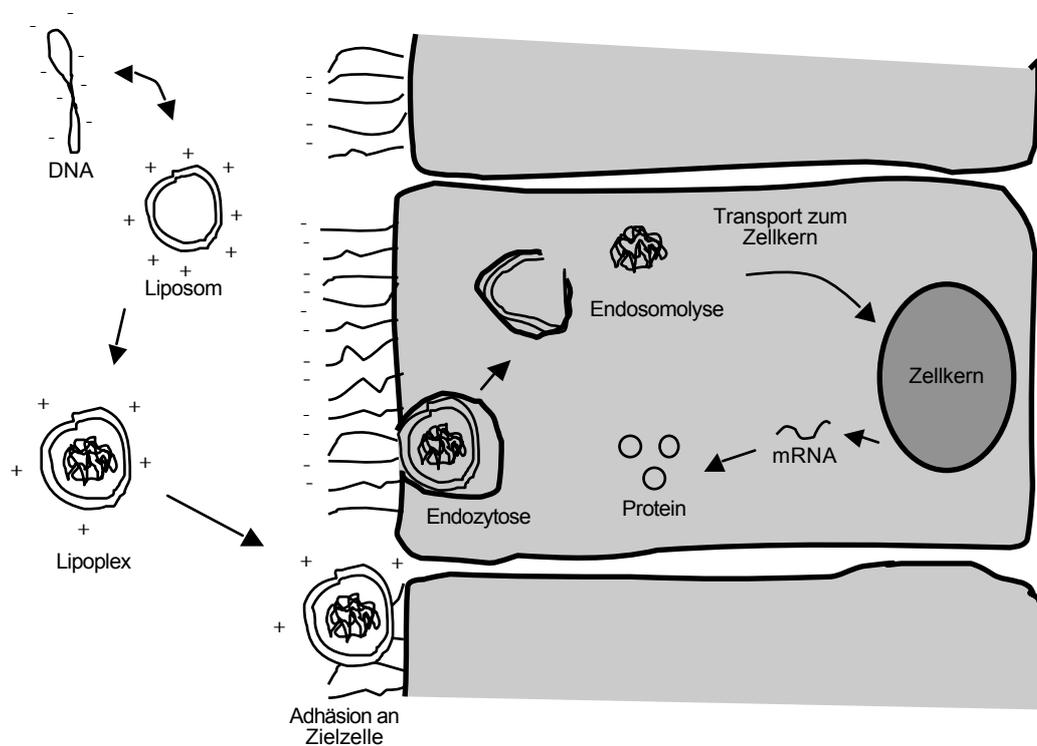
Der Gentransfer mit nichtviralen Vektoren verfolgt das Ziel, die vorteilhaften Eigenschaften des viralen Gentransfers zu imitieren, und gleichzeitig dessen Nachteile zu vermeiden. L. Huang fordert für den nichtviralen Gentransfer: "Ideale Gentransfersysteme sollten biologisch abbaubar und nicht toxisch sein, keine Immunantwort hervorrufen und in der Lage sein, in die Zielzellen zu gelangen und dort effiziente Genexpression erzielen" (Huang 1999). Darüber hinaus sollten die Gentransfersysteme "ein hohes Maß an Stabilität im jeweiligen biologischen Umfeld" des Zielgewebes aufweisen (Kircheis, Wightman et al. 2001).

Kationische Liposomen und kationische Polymere sind die bislang erfolgreichsten nichtviralen Gentransfersysteme. Diese Vektoren weisen unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung auf und können so über elektrostatische Anziehungskräfte die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene DNA binden. Beide Systeme basieren auf dem Prinzip der Formierung eines Genvektorkomplexes über selbständige spontane Aggregation von Vektor und DNA. Dieser Prozess wird als DNA-Kondensation bezeichnet. Dabei spielen verschiedene molekulare Kräfte eine Rolle, insbesondere elektrostatische und hydrophobe Anziehungskräfte, H-Brückenbindungen und Ausschluss des Solvens (Huang 1999). Die Kondensierung der DNA ist ein wesentlicher Schritt bei der Bildung der Genvektorkomplexe, denn erst hierdurch wird die Entstehung kleiner Genvektorkomplexe möglich.

Es wurden zahlreiche kationische Lipide entwickelt (Felgner, Gadek et al. 1987), wovon einige bereits in klinischen Tests therapeutische Anwendung fanden (Caplen, Alton et al. 1995; Gill, Southern et al. 1997; Alton, Stern et al. 1999). Kationische Liposomen bestehen zumeist aus einem positiv geladenen Lipid und einem neutralen "Helferlipid". Durch ihre positive Überschussladung nach der Komplexierung mit DNA und ihre lipophilen Eigenschaften zeigen die entstandenen Genvektorkomplexe (Lipoplexe) eine gute Bindungsaffinität an die Zelloberfläche (Mislick and Baldeschwieler 1996; Mounkes, Zhong et al. 1998) und gelangen dadurch verstärkt zur Aufnahme in die Zelle. Hierfür sind unter anderem Heparan-Sulfat-Proteoglycan-Rezeptoren (HSPG-Rezeptoren) verantwortlich. Werden die Genvektorkomplexe durch Endozytose aufgenommen, so werden sie in Endosomen verpackt. Nach Übergang des Endosoms zum Endolysosom werden die Genvektorkomplexe zerstört und die DNA wird abgebaut (Zhou and Huang 1994; Zabner, Fasbender et al. 1995). Liposomen besitzen je nach Lipidkomponenten die Fähigkeit, einen Austritt der DNA aus dem Endosom zu bewirken, um so einen Transport der DNA zum Zellkern zu ermöglichen (Litzinger and Huang 1992; Farhood, Serbina et al. 1995). Dieser Prozess wird Endosomolyse genannt (siehe hierzu auch Abbildung 1).

Im Rahmen der Entwicklung von Strategien zur nichtviralen Gentherapie wurden bereits etliche kationische Polymere entwickelt. Die am ausführlichsten untersuchten unter ihnen sind Polylysine (Wagner, Zenke et al. 1990), PAMAM Dendrimere (Haensler and Szoka 1993), und Polyethylenimin (PEI) (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). Genvektorkomplexe aus kationischem Polymer und DNA (Polyplexe) bilden bei einem hohem Verhältnis von Polymer zu DNA im allgemeinen kleine und positiv geladene Partikel, während Partikel mit neutralen Ladungsverhältnissen verstärkt aggregieren. Polylysin zeigt gute Eigenschaften, DNA zu kondensieren, jedoch fehlt auf Polylysin basierenden Polyplexen der Mechanismus zur Endosomolyse, weshalb endosomolytische Substanzen, beispielsweise Chloroquin, zugegeben werden müssen, um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen (Cotten, Langle-Rouault et al. 1990; Zauner, Kichler et al. 1996). Im Gegensatz dazu haben Dendrimere und PEI inhärente endosomolytische Eigenschaften aufgrund ihrer hohen Pufferkapazität. Besonders PEI hat die Fähigkeit, aufgrund seines niedrigen pK_b Wertes im Bereich der endosomalen pH-Werte als Puffer zu wirken (Kircheis, Wightman et al. 2001). Aufgrund dieser hohen Pufferkapazität agiert PEI als eine Art "Protonenschwamm" und führt bei pH-Abfall im Endolysosom zum osmotischen Anschwellen und schließlich zum Platzen des Endolysosoms (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995).

Haupthindernis des nichtviralen Gentransfer ist dessen Ineffizienz. In den oben erwähnten klinischen Studien ist der "proof of principle" schon lange erbracht, doch um zu einem breiten therapeutischen Einsatz zu gelangen, müssen Verbesserungen bei nahezu allen Schritten des Gentransfers erreicht werden.

**Abbildung 1**

Stadien des liposomalen Gentransfers in Atemwegszellen: Anionische DNA und kationische Liposomen bilden einen Genvektorkomplex (Lipoplex) mit positiver Nettoladung. Dabei wird die DNA kondensiert. Die Lipoplexe adhären an die negativ geladene Zelloberfläche (über HSPG-Rezeptoren) und werden durch Endozytose aufgenommen. Nach der Endosomolyse gelangt die DNA in den Zellkern, wo die Transkription erfolgt. Schließlich wird im Zytosol das von der DNA codierte Protein gebildet.

1.3. *Extrazelluläre Barrieren des Gentransfers in die Lunge*

Die Lunge eignet sich aufgrund ihrer anatomischen Eigenschaften im Besonderen als Zielorgan der Gentherapie. Einerseits ist die Lunge über das Bronchialsystem einer topischen Applikation direkt zugänglich, wodurch ein organspezifisches targeting erreicht wird. Andererseits werden bei der intraluminalen Gabe von therapeutischen Genen keine Zellen anderer Organe ungewollt genetisch verändert (Densmore, Orson et al. 2000; Rudolph, Lausier et al. 2000). Dieser letztgenannte Aspekt ist speziell im Hinblick auf die Vermeidung ungewollter Eingriffe an der Erbinformation der Keimbahnen von Interesse. Auch bei systemischer (intravenöser) Anwendung der Gentherapie bietet die Lunge ein gut erreichbares Ziel, da die applizierten Genvektorkomplexe im Kapillarfilter der Lungenstrombahn hängen bleiben (Zou, Erbacher et al. 2000). Die hohen Expressionsraten in der Lunge bei systemischer Applikation von kationischen Genvektorkomplexen werden dem Vorhandensein von anionischen Heparinsulfat-Proteoglykanrezeptoren zugeschrieben (Mounkes, Zhong et al. 1998).

Die somatische Gentherapie der pulmonalen Manifestation der Mukoviszidose steht im Fokus der Forschung, und war bereits Gegenstand verschiedener klinischer Studien (siehe Einführung). Hier ist die topische Applikation über Inhalation von Aerosolen oder intratracheale Instillation Gegenstand der Untersuchungen. Weitere angeborene oder erworbene Erkrankungen, die über genetische Korrekturen an der Lunge therapiert werden sollen, sind der α_1 -Antitrypsinmangel, Lungenkarzinome und maligne Mesotheliome, Asthma, das acquired respiratory distress syndrome und der pulmonale Hypertonus (Brigham, Canonico et al. 1994; Curiel, Pilewski et al. 1996; Albelda, Wiewrodt et al. 2002; Engelhardt 2002).

Um einen effizienten Gentransfer in die Lunge über die Atemwege zu erreichen, müssen verschiedene Hürden überwunden werden. Zunächst gilt es, die Zielregion zu erreichen. Es ist Gegenstand der Diskussion, ob zur Therapie der Mukoviszidose eine Korrektur des Defekts im *CFTR*-Gen bei den Epithelzellen der kleinen Atemwege erforderlich ist, oder ob die serösen Zellen der submukösen Drüsen das eigentliche Ziel sind (O'Dea and Harrison 2002). Eine funktionelle Korrektur des *CFTR*-Gendefekts in Zellen der submukösen Drüsen ist beim Menschen im Rahmen der klinischen Studien bislang nicht nachgewiesen worden, gleichwohl gelang die funktionelle Korrektur im Tierversuch (Koehler, Hannam et al. 2001).

Werden Genvektorkomplexe via Aerosolisierung oder Instillation in die Atemwege eingebracht, müssen sie extrazellulären Barrieren durchdringen, welche eine physiologische Schutzfunktion für die Atemwegsepithelien bilden. Dieser Flüssigkeitsfilm wird mit gerichtetem Zilienschlag nach oral transportiert (mukoziliäre Clearance) (Lucas 1934; Kilburn 1968). Die Spitzen der Zilien des Flimmerepithels ragen in eine Gelschicht hinein, und transportieren diese auf einer Solschicht schwimmende Lage durch den Zilienschlag in Richtung oral. Auf der Gelschicht befindet sich ein dünner Lipid-Film, gebildet aus der oberflächenaktiven Substanz Surfactant.

Mit diesem Film treten die Genvektorkomplexe nach topischer Applikation zunächst in Kontakt. Die Gelschicht besteht größtenteils aus ungeladenen Lipiden, die mit Proteinen, negativ geladenen Mucinen und Glykoproteinen durchsetzt ist. Die Solschicht enthält einen Großteil der Komponenten des Blutserums, wie beispielsweise Albumin, Komplementfaktoren und Immunglobuline (Rogers 1997). Das Atemwegsepithel besteht im wesentlichen aus Klarazellen, Becherzellen und zilientragenden Zellen. Die Zilien selbst, die mit einem Zwischenraum von ca. 200 nm eng stehend auf den Zellen angeordnet sind, stellen bereits eine physikalische Barriere dar. Die Zellmembran schließlich ist mit einer Glykokalyx besetzt, deren inhibitorischer Effekt z.B. auf adenoviralen Gentransfer nachgewiesen (Pickles, McCarty et al. 1998). Entscheidend für die Fähigkeit der Genvektorkomplexe auch nach der Passage der extrazellulären Barrieren einen effizienten Gentransfer zu vermitteln, ist das Beibehalten ihrer spezifischen Funktionsweisen, wie der Bindung an die Zelloberfläche, dem Austritt aus dem Endosom oder dem Transport zum Zellkern. Durch die Interaktion extrazellulärer Substanzen mit den Genvektorkomplexen kann ihre Funktion in sämtlichen in Abbildung 1 beschriebenen Schritten des Gentransfers eingeschränkt oder aufgehoben werden.

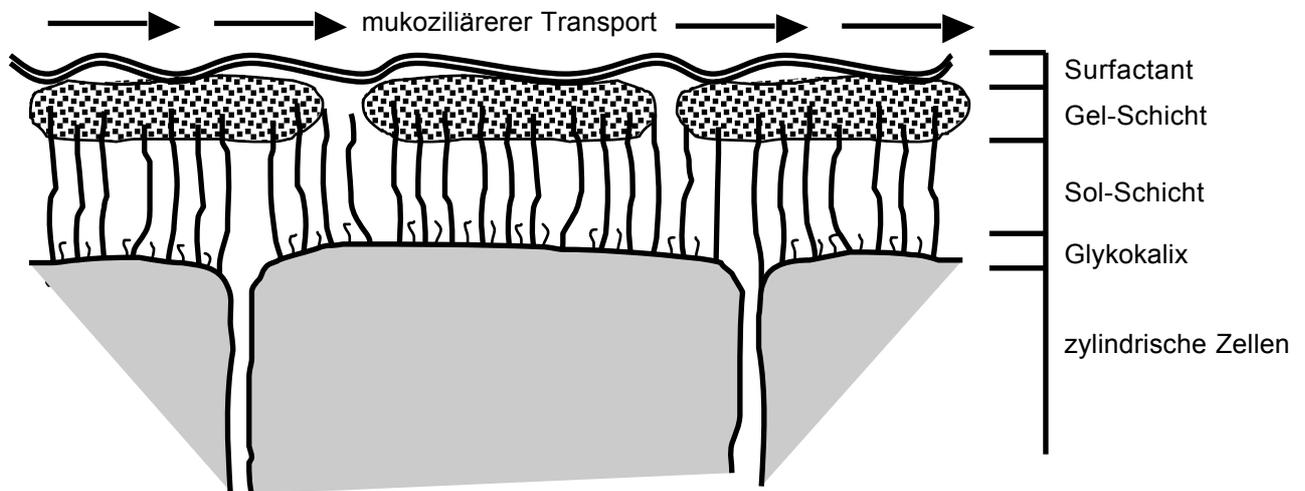


Abbildung 2

Das Flimmerepithel der Atemwege bildet zusammen mit dem Lungenflüssigkeitsfilm eine Barriere, die den Kontakt der Genvektorkomplexe mit der Zelloberfläche behindert.

1.4. Magnetofektion

Die effiziente Transfektion von Atemwegsepithelien *in vitro* oder im Tiermodell ist die Voraussetzung für den Erfolg künftiger klinischer Studien zur Gentherapie der Mukoviszidose und anderer Atemwegserkrankungen. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits der nichtvirale Gentransfer in Zellen der Atemwege *in vitro* und *in vivo* untersucht (Crystal, McElvaney et al. 1994; Caplen, Alton et al. 1995; Ernst, Ulrichskotter et al. 1999; Bragonzi, Dina et al. 2000; Rudolph, Lausier et al. 2000; Gautam, Densmore et al. 2001). Die erreichten Transfektionseffizienzen waren jedoch gering. Die Transfektion intakter Atemwegsepithelien erwies sich als am wenigsten erfolgreich (Boucher 1996; Kitson, Angel et al. 1999). Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass extrazelluläre Barrieren wie das Vorhandensein eines Lungenflüssigkeitsfilms oder der mukoziliären Clearance den Kontakt der Genvektorkomplexe mit den Zellen erschweren. Auch weisen geschlossene Atemwegsepithelien eine geringere Endozytoserate auf, als dies bei lockeren Zellverbänden der Fall ist (Matsui, Johnson et al. 1997).

Eine Anreicherung der applizierten Genvektorkomplexe und eine Verlängerung ihrer Kontaktzeit an den Zielzellen sollte eine verstärkte Aufnahme in die Zelle und eine erhöhte Transfektionseffizienz zur Folge haben (Luo and Saltzman 2000; Ogris, Steinlein et al. 2001). Diese Ziele könnten mit Hilfe der Magnetofektion verwirklicht werden. Magnetofektion ist der gerichtete Transfer von Genen in Zellverbände unter Ausnutzung magnetischer Kräfte (Lübbe 1998; Scherer, Anton et al. 2002). Die Methodik, ursprünglich entwickelt zur Anreicherung von Arzneistoffen im Tumorgewebe, wurde bereits erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet, wobei die Akkumulation der Genvektorkomplexe im Einflussbereich des Magnetfeldes mit nachfolgender hoher Transfektionseffizienz nachgewiesen werden konnte. (Scherer, Anton et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit soll die Anwendbarkeit der Magnetofektion auf die Transfektion von Atemwegsepithelien untersucht werden.

Das Prinzip der Magnetofektion beruht auf der elektrostatischen Bindung von DNA an supraparamagnetische Nanopartikel, die durch das Anlegen eines magnetischen Feldes an den Zielzellen angereichert werden. Die supraparamagnetischen Nanopartikel wurden mit einem kationischen Polymer, PEI 25 kDa, beschichtet (transMAG-PEI), so dass sich mit der Zugabe von DNA und freiem PEI über elektrostatische Anziehungskräfte ternäre Genvektorkomplexe, die sogenannten Magnetofectins, bilden können. Das magnetische Feld wurde mit Stabmagneten erzeugt, die in möglichst geringem Abstand zu den zu transfizierenden Zellen plaziert wurden. Da die magnetische Feldstärke mit dem Quadrat des Abstandes abnimmt, ist die Distanz zwischen Magnet und Magnetofectins von großer Bedeutung für die Wirksamkeit der Methodik.

1.5. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Surfactant und anderen Komponenten des Lungenflüssigkeitsfilms auf nichtvirale Genvektorkomplexe zu analysieren. Es wurde untersucht, auf welche Wechselwirkungen mit extrazellulären Faktoren auftreten. Potenzielle strukturelle Änderungen der Genvektorkomplexe wurden mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie über die Messung biophysikalischer Parameter dargestellt. Diese biophysikalischen Parameter umfassten den Grad der Kondensierung der DNA im Komplex mit den Vektoren, des Abstandes der DNA und des Vektors zueinander, die Oberflächenladung und die Größe der Partikel. Die Untersuchung der Parameter erfolgte unter Einfluss von Lipiden wie Surfactant und dessen Komponenten, sowie von Proteinen der Gel- und Solschicht des Lungenflüssigkeitsfilms wie Glykoproteinen, Mucinen und Albumin. Ebenfalls wurde das Adhäsionsverhalten, d.h. die Bindungsaffinität der Genvektorkomplexe an die Oberfläche von Atemwegszellen unter Einfluss der extrazellulären Faktoren untersucht.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung der Magnetofektion am Modell des Atemwegsepithels darzustellen. Es wurde ermittelt, ob die Magnetofektion extrazelluläre Hürden des Gentransfers besser überwinden kann als der nichtvirale Gentransfer mit Lipiden oder Polymeren dies zu tun vermag. Zu diesen Hürden zählt neben den physiologischen Barrieren des Lungenflüssigkeitsfilms und des Flimmerepithels auch der Faktor Zeit, der den Grad der Anreicherung der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche beeinflusst.

2. Methoden

2.1. *Surfactantpräparate und anionische Phospholipide*

Es wurden zwei Surfactantpräparate verwendet, Alveofact und Exosurf.

Alveofact (Boehringer Ingelheim, Ingelheim) wird als natürliches Surfactant durch Auswaschung aus Rinderlungen gewonnen. Es hat einen Lipidbestandteil von 90%, der sich zu 80% aus dem zwitterionischen Phosphatidylcholin und zu 12% aus negativ geladenem Phosphatidylglycerol zusammensetzt. Weitere Bestandteile des Alveofact sind Kohlenhydrate (2%) und Proteine (8%). Aufgrund der Präparation zur Gewinnung des Alveofact werden die lipophilen Surfactantproteine A und D entfernt, so dass nur noch die Surfactantproteine B und C enthalten sind.

Exosurf (GlaxoSmithKline, München) ist ein artifizielles Surfactant, das zu 62% aus Phosphatidylcholin (DPPC, Colfosceril) besteht. Da Exosurf frei von Proteinen ist, und Phosphatidylcholin zwar die Oberflächenspannung herabsetzt, aber keine benetzenden Eigenschaften hat, sind dem Arzneimittel noch Cetylalkohol (7%) und Tyloxapol (5%) beigemischt.

Die gereinigten Phospholipide L- α -phosphatidyl-DL-glycerol-dipalmitoyl (DPPG) und L- α -phosphatidyl-DL-glycerol-b-oleoyl-c-palmitoyl (POPG) wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.2. *BALF*

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wird durch Spülung mit 0,9% Natriumchloridlösung und anschließendem Absaugen aus der Lunge gewonnen. Mit dieser Methodik ist es nicht möglich, definierte Volumina der Spülflüssigkeit zurückzugewinnen, weshalb die einzelnen Proben hinsichtlich ihrer Zusammensetzung heterogen sind. Um einen höheren Konzentrationsgrad zu erhalten, mussten die Proben gepoolt werden. Als Maß der Konzentration galt dabei der Gehalt an Phospholipiden.

2.3. N/P

Das N/P-Verhältnis ist das Verhältnis potenziell protonierbarer Aminogruppen der kationischen Vektoren zum Phosphatanteil der DNA. Die Aminogruppen sind die Träger der positiven Ladungen, während der Phosphatanteil für die negativen Ladungen im Komplex steht.

Die N/P-Verhältnisse wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$m(PEI) = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(DNA)}{7,662}$$

Gleichung 1

Berechnung N/P-Verhältnis für Polyethylenimin 25 kDa.

$$m(Dendrimer) = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(DNA)}{1,122}$$

Gleichung 2

Berechnung N/P-Verhältnis für Polyamidoamine Dendrimere (starburst dendrimers).

$$m(Polylysin) = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(DNA)}{2,557}$$

Gleichung 3

Berechnung N/P-Verhältnis für Poly-L-Lysin (MW 5.000-10.000).

2.4. Grundlagen der Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein molekulares Phänomen bei dem ein Molekül elektromagnetische Strahlung aufnimmt (Absorption) und elektromagnetische Strahlung eines geringeren energetischen Niveaus wieder abgibt (Emission). Die Lebensdauer dieses Phänomens liegt im allgemeinen im Bereich von Nanosekunden (10^{-9} s) (Tipler 1995). Die Anregung (Exzitation) eines Fluoreszenzmoleküls erfolgt idealerweise im Bereich seines Absorptionsmaximums, d.h. mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Ein so angeregtes Fluoreszenzmolekül wird Licht geringerer Energie (Stokes-Shift), also größerer Wellenlänge (λ), abgegeben (siehe Abbildung 3). Der Nachweis von Fluoreszenz kann einerseits genutzt werden als qualitativer Nachweis derjenigen Substanz, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Andererseits kann auch die Intensität (I) der Fluoreszenz zur quantitativen Messung der markierten Substanz herangezogen werden. Fluoreszenzfarbstoffe werden auch als Fluorochrome bezeichnet. Sind sie an Nukleinsäuren oder Proteine gebunden wird der Begriff Fluorophor verwendet.

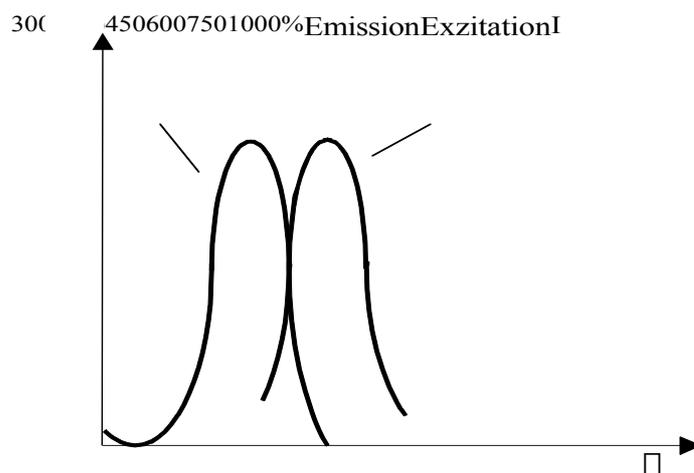


Abbildung 3

Beispielhafte Exzitations- und Emissionsspektren eines Fluoreszenzfarbstoffes. Intensität (I) in Prozent, Wellenlänge (λ) in Nanometern angegeben.

2.5. Markierung von DNA und Vektoren mit Fluorochromen

Plasmid-DNA wurde mit dem bisinterkalierenden Fluorochrom TOTO-1 (Molecular Probes Inc., # T-3600, Eugene, OR, USA) markiert. TOTO-1 hat sein Absorptionsmaximum bei 514 nm und sein Emissionsmaximum bei 533 nm. DNA und TOTO-1 wurden mit einem Basenpaar / Farbstoff Verhältnis von 10/1 in gleichen Volumina gemischt, wobei die DNA-Lösung zum Farbstoff dazugegeben wurde. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 50°C inkubiert, wodurch ein besseres Bisinterkalieren des Farbstoffes ermöglicht werden sollte. Die Markierung der DNA mit TOTO-1 wurde für jedes für sich abgeschlossene Experiment einzeln durchgeführt. Zur Markierung von Lipofectamine mit dem Fluorochrom Texas Red wurde das lipophile Texas Red DHPE verwandt. (Molecular Probes Inc., # T-1395, Eugene, OR, USA). Texas Red hat sein Absorptionsmaximum bei 584 nm und sein Emissionsmaximum bei 603 nm. Zunächst wurde Lipofectamine durch Abdampfen mit N₂ von Wasser befreit und anschließend in Chloroform gelöst. Dann wurden Lipofectamine und Texas-Red in einem Verhältnis von 100:1 gemischt. Die Lösung wurde durch erneutes Abdampfen mit N₂ gereinigt und in aqua bidest resuspendiert. Zur Markierung der Polymere Dendrimere und Polyethylenimin (PEI) mit dem Fluorochrom Texas Red wurde der Texas Red Succinimidy-Ester verwandt. (Molecular Probes Inc., # T-6134, Eugene, OR, USA). Dendrimere wurden in äquimolarem Verhältnis mit Texas Red gemischt und über 12h dialysiert. Zur Dialyse wurde ein Dialyseschlauch mit Porengröße 10-12 kD verwendet. Die Dialyse erfolgte unter 3-maligem Wechseln der Pufferlösung mit HBS bei pH 7,3 unter der Voraussetzung, dass das Volumen im Dialyseschlauch bei Verwendung gleicher Puffer konstant bleibt. PEI wurde mit Texas Red in einem molaren Verhältnis von 2:1 gemischt und ebenso wie bei Dendrimeren beschrieben dialysiert.

2.6. *Fluoreszenz-Quenching-Assay*

2.6.1. **Theorie zum Fluoreszenz-Quenching**

Fluoreszenz unterliegt verschiedenen Störfaktoren, die eine Fluoreszenzlöschung, im nachfolgenden Quenching genannt, zur Folge haben. Konkurrierend zur Fluoreszenz können strahlungslose Prozesse zur Abregung des durch elektromagnetische Strahlung angeregten Fluorochromes führen. So kommt es zur Abnahme der Fluoreszenzintensität beispielsweise bei steigender Temperatur, dem sogenannten dynamic quenching. Auch freie Radikale und Iod-Ionen sind potente Quencher. Auch die strahlungslose innere Konversion führt zu Quenching. Ein weiteres Phänomen, das zu Quenching führt, ist die Interaktion der einzelnen an die markierte Substanz gebundenen Fluorophore untereinander, ein Phänomen des statischen Quenching. Ab Unterschreitung einer kritischen Distanz nimmt die Fluoreszenz um so mehr ab, je geringer der Abstand der Fluorophore zueinander ist. Hierzu kommt es unter anderem durch den Übergang der angeregten Fluorophore vom Singulettzustand in einen Triplettzustand, dessen Abregung über Phosphoreszenz oder innere Konversion stattfindet. In Abbildung 4 wird die Veränderung der Intensität eines Fluoreszenzsignals beim Quenching dargestellt. Dieses Phänomen der Fluoreszenzlöschung bei Veränderung der räumlichen Struktur der fluoreszenzmarkierten Substanz wird beim Quenching Assay ausgenutzt.

Zur Durchführung eines Fluoreszenz-Quenching-Assay wird die zu untersuchende Substanz, in diesem Fall Plasmid-DNA, mit einem Fluorochrom markiert. Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Fluorochrom TOTO-1 in einem Farbstoff zu Basenpaar Verhältnis von 1:10. TOTO-1 bisinterkaliert in den Doppelstrang der DNA und weist durch diese Einlagerung in die DNA eine hohe Fluoreszenzintensität auf (Spielmann, Wemmer et al. 1995). Die Quantenausbeute von freiem nicht bisinterkaliertem TOTO-1 ist mind. um den Faktor 100 geringer und beeinflusst dadurch das Messergebnis nicht (Galneder 2001). Bei Zugabe von Substanzen, welche die räumliche Struktur der DNA verändern, wird sich auch die Intensität des Fluoreszenzsignals ändern. So wird bei Relaxierung der markierten DNA aus der Komplexierung im Genvektorkomplex das Quenching abnehmen, d.h. es wird ein höheres Fluoreszenzsignal gemessen. Umgekehrt wird eine Zunahme des Quenching beobachtet, wenn die markierte DNA stärker komplexiert wird. Setzt man die Fluoreszenzintensität der markierten DNA im Genvektorkomplex ins Verhältnis zur Intensität der Fluoreszenz freier TOTO-1 markierter DNA, so erhält man den Quenchingfaktor. Dieser zeigt an, wie dicht die DNA im Genvektorkomplex gepackt ist.

Nachstehende Formel berechnet den Quenchingfaktor:

$$Q_F = \frac{I_{\text{interkaliert}}}{I_{\text{komplexiert}}}$$

Gleichung 4

Der Quenchingfaktor (Q_F) errechnet sich aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität freier DNA ($I_{\text{interkaliert}}$) und der Fluoreszenzintensität von DNA im Genvektorkomplex ($I_{\text{kondensiert}}$). (Formel nach Rusu, L.: Aggregationsverhalten und Oberflächenaktivität von lipid- und polymerbasierten Genvektorkomplexen, Diplomarbeit, TU-München 1999).

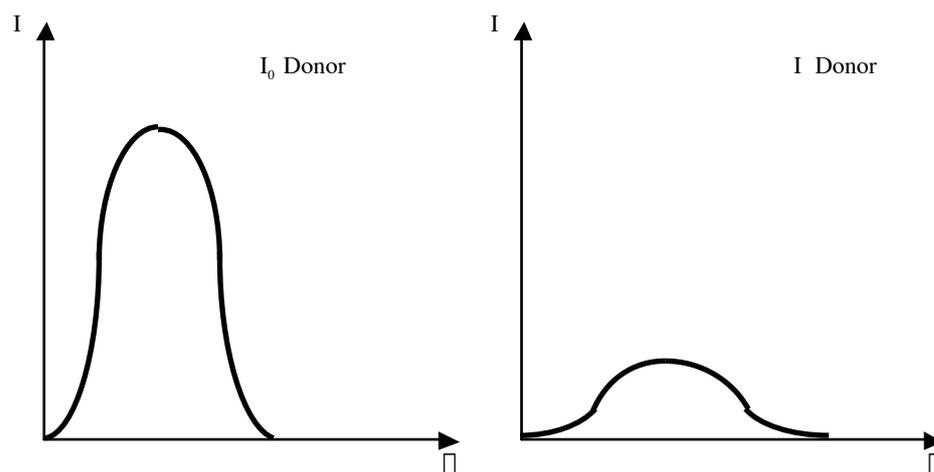


Abbildung 4

Bei räumlicher Annäherung der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle nimmt die Fluoreszenzintensität eines Fluoreszenzfarbstoffes (I_0 Donor) ab – das Signal wird gequench (I Donor).

2.6.2. Durchführung der Fluoreszenz-Quenching-Assays

Bei der Messungen des Fluoreszenz-Quenching sollten ähnliche Verhältnisse gelten wie bei *in vitro* Transfektionen, weshalb die gewählten Versuchsbedingungen hinsichtlich der verwendeten Materialien den Protokollen der zu Grunde liegenden Transfektionsexperimente angeglichen wurden. Es wurden die zu untersuchenden Genvektorkomplexe aus TOTO-1 markierter DNA und Lipofectamine, Dendrimeren, Polyethylenimin (PEI) oder Poly-L-Lysin (pLL) hergestellt. Hierzu wurden 0,15 μg DNA mit 1,5 μg Lipofectamine bzw. 0,3 μg Dendrimeren, 0,11 μg PEI oder 0,05 μg pLL in gleichen Volumina in HBS gemischt. Dabei wurde die DNA zum Vektor gegeben. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Ansätze mit einem Volumen von 25 μl wurden in 96-well Zellkulturplatten zu 25 μl Minimum Essential Medium (MEM) gegeben. Anschließend wurden 50 μl einer Verdünnung der Substanz zugegeben, deren Einfluss auf das Fluoreszenz-Quenching der Genvektorkomplexe getestet werden sollte. Diese Substanzen waren im einzelnen Alveofact (maximale Konzentration 250 $\mu\text{g/ml}$), Exosurf (250 $\mu\text{g/ml}$), POPG (360 μM), Albumin (100 $\mu\text{g/ml}$), Mucin (100 $\mu\text{g/ml}$), Glykoprotein (100 $\mu\text{g/ml}$), BALF (125 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 3 $\mu\text{g/ml}$). Ausgehend von diesen Konzentrationen wurden Verdünnungsreihen in HBS hergestellt, 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und mit einer Mehrkanalpipette zeitgleich den Genvektorkomplexen zugegeben und durch auf und ab pipettieren gemischt. Die Ansätze mit einem Endvolumen von 100 μl wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im direkten Anschluss in einem Fluoreszenzreader (Wallac Victor², Perkin Elmer, Finnland) bei einer Wellenlänge von 485 nm (Exzitation) bzw. 535 nm (Emmission) vermessen. Jede Bedingung wurde in Triplikaten vermessen und es wurden Mittelwerte gebildet. Der Nullwert der Fluoreszenzintensität der TOTO-1 markierten DNA wurde bestimmt als der Mittelwert von fünffach gemessenen Werten. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Genvektorkomplexe wurden auf den Nullwert der DNA bezogen und in Prozent angeben (relative Fluoreszenz).

2.7. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

2.7.1. Theorie zum Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Eine weitere Alternative zu den oben beschriebenen strahlungslosen Abregungen eines Fluoreszenzfarbstoffes stellt der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) dar. Ein Fluorochrom (Donor) überträgt seine Anregungsenergie unter bestimmten Voraussetzungen an ein anderes Fluorochrom (Akzeptor), das schließlich eine Abregung über Fluoreszenz zeigt. Donor und Akzeptor müssen ein spektrales Überlappungsintegral aufweisen, um den Energietransfer zu ermöglichen. Die Rate des FRET hängt entscheidend von der Distanz des Donors zum Akzeptor ab. Bei Abgabe der Energie des Donors an den Akzeptor findet eine Fluoreszenzlöschung, d.h. ein Quenching, der Fluoreszenzintensität des Donors statt. Diese Abnahme kann quantitativ bestimmt werden und steht als Maß für den FRET:

$$E_T = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}$$

Gleichung 5

FRET (E_T) ist umgekehrt proportional zur Fluoreszenzintensität des Donors bei Anwesenheit des Akzeptors (I_{DA}). I_D ist die Fluoreszenzintensität des Donors bei Abwesenheit des Akzeptors.

Zur Bestimmung des Energietransfers wird die Fluoreszenzintensität des Donors also jeweils in Abwesenheit und in Anwesenheit des Akzeptors bestimmt.

Äquivalent dazu kann auch der Quotient aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Abwesenheit des Donors (I_A) und aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit des Donors (I_{DA}) gebildet werden. Dieser in Gleichung 6 dargestellte Quotient verhält sich proportional zum Energietransfer.

$$E_T \propto \frac{I_A}{I_{DA}}$$

Gleichung 6

Der Quotient aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Abwesenheit des Donors (I_A) und aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit des Donors (I_{DA}) ist proportional zum Energietransfer (E_T).

Der Zusammenhang zwischen dem Maß des FRET und dem Abstand des Donor-Akzeptor Paares wird in folgender Gleichung dargestellt:

$$E_T = \frac{R_F^6}{R_F^6 + r^6}$$

Gleichung 7

FRET (E_T) ist umgekehrt proportional zum Abstand des Donor-Akzeptor Paares (r). R_F ist der Försterradius, eine Stoffkonstante des Donor-Akzeptor Paares.

Die Tatsache, dass der Abstand des Donor-Akzeptor Paares in der 6. Potenz in die Gleichung eingeht, zeigt, dass schon eine geringfügige Änderung des Abstandes zu einer starken Änderung des FRET führt. Hieraus ergibt sich eine hohe Meßempfindlichkeit.

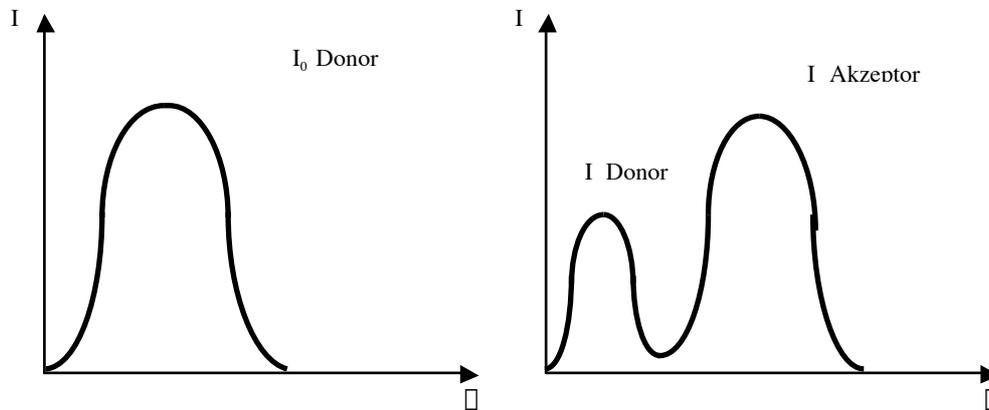


Abbildung 5

Die Energie eines angeregten Farbstoffes (I_0 Donor) wird auf einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff übertragen, der diese Energie wieder in Form von Fluoreszenz abgibt (I Akzeptor). Je mehr Energie übertragen wird (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer), desto geringer ist das Fluoreszenzsignal des Donors (I Donor) und desto höher ist das Fluoreszenzsignal des Akzeptors.

2.7.2. Durchführung der FRET-Messungen

Es wurden die zu untersuchenden Genvektorkomplexe aus TOTO-1 markierter DNA und den mit Texas Red markierten Vektoren Lipofectamine, Dendrimeren oder Polyethylenimin (PEI) hergestellt. Hierzu wurden $0,18 \mu\text{g}$ DNA mit $1,8 \mu\text{g}$ Lipofectamine bzw. $0,36 \mu\text{g}$ Dendrimeren oder $0,11 \mu\text{g}$ PEI in einem Endvolumen von $50 \mu\text{l}$ in Opti-MEM (Optimized Minimal Essential Medium) gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden in eine auf $37,5^\circ\text{C}$ vorgeheizte Küvette mit einem Messvolumen von $70 \mu\text{l}$ gegeben. Es wurde von den Substanzen, deren Einfluss auf den FRET ermittelt werden sollte, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese Substanzen waren im einzelnen Alveofact (maximale Konzentration $375 \mu\text{g/ml}$), Exosurf ($375 \mu\text{g/ml}$), POPG ($540 \mu\text{M}$) und DPPG ($540 \mu\text{M}$). Ein Volumen von $20 \mu\text{l}$ der Verdünnung, zuvor 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wurde in die Küvette gegeben, durch Auf-und-Ab-Pipettieren gemischt und der Ansatz für 3 Minuten bei $37,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit einem Fluoreszenzspektrometer (Hellmanex, Hellma, Mühlheim) vermessen. Die Exzitation erfolgte im Absorptionsbereich von TOTO-1 (Donor) bei 490 nm . Die Emission des Akzeptors Texas Red wurde bei 603 nm gemessen. Zur Bestimmung des FRET wurde der Quotient aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Abwesenheit des Donors (I_A) und aus der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit des Donors (I_{DA}) gebildet (I_A/I_{DA}).

2.8. *Bestimmung des Zetapotenzials*

Das Zetapotential der Genvektorkomplexe wurde über elektrophoretische Lichtstreuung bestimmt (ZetaPals, Brookhavn, Holtsville, USA). Lipofectamine-Lipoplexe wurden in einem Gewichtsverhältnis (Lipofectamine/DNA) von 10/1 und 3/1 hergestellt. Dies entspricht einem Ladungsüberschuss der positiven Ladungen der Aminogruppen der Vektoren gegenüber den negativen Ladungen der Phosphatgruppen der DNA von 8,5 bzw. 2,5. PEI-Polyplexe wurden in einem Gewichtsverhältnis (Polymer/DNA) von 1/1,6 hergestellt, resultierend in einem positiven Ladungsüberschuss von 6,0. Für die Zetapotentialmessungen der Lipoplexe wurden 5 μg DNA in 50 μl HBS mit 50 μg bzw. 15 μg Lipofectamine in 50 μl HBS gemischt. Für die Zetapotentialmessungen der Polyplexe wurden 30 μg DNA in 50 μl HBS mit 22,5 μg PEI in 50 μl HBS gemischt. Die Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ein Messvolumen von 1,25 ml verdünnt und Alveofact wurde während der Messung Schrittweise in ansteigenden Konzentrationen zugegeben.

2.9. *Größenbestimmung*

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zunächst an einem Leitz Orthoplan Fluoreszenzmikroskop mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer CellCam Twain Digitalkamera (Klughammer GmbH, Markt Indersdorf) gemacht und die Daten wurden digital akquiriert (AxioVision, Zeiss, Göttingen).

Zur Messung der Größe fluoreszenzmarkierter Genvektorkomplexe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde der lineare Bereich der Digitalkamera bestimmt. Der lineare Bereich der Kamera ist das Intervall von Belichtungszeiträumen, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen Belichtungszeit der Digitalkamera und ermittelter Fluoreszenzintensität besteht. Hierzu wurden fluoreszierende Kügelchen (fluorescent microspheres, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) mit einem Durchmesser von 1000 nm über ein Belichtungsintervall von 240 Sekunden bis 2000 Sekunden aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen fluorescent microspheres wurde softwaregestützt (ScionImage, Scion Corporation, Frederick, USA) ausgewertet.

Um eine Größenbestimmung von Genvektorkomplexen durchführen zu können, musste eine Kalibrierung der Messapparatur erfolgen. Die fluoreszierenden Kugeln werden über eine Digitalkamera als dimensionslose Fläche abgebildet. Auf dem CCD-Chip der Digitalkamera werden durch das ausgesandte Fluoreszenzsignal eine bestimmte Anzahl von Photorezeptoren angeregt, diese werden nach einem festen Muster zusammengeschaltet und als Bildinformation aufgegliedert in picture elements (Pixel) abgebildet. Der Kalibrierungsstandard sollte festlegen, wie viele Pixel welcher realen Größe entsprechen. Die Experimente wurden mit einem festgelegten

Messungsaufbau hinsichtlich Mikroskop- und Kameraeinstellungen (100xObjektiv, 1000 ms Belichtungszeit, gain 186) durchgeführt. Zur Eichung wurden fluorescent microspheres im Größenbereich von 20 Nanometern bis 2 Mikrometern verwendet (fluorescent microspheres, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Die aufgenommene Fläche der einzelnen fluorescent microspheres wurde softwaregestützt (ScionImage, Scion Corporation, Frederick, Maryland USA) ausgewertet.

Da die Messungen zur Größenbestimmung auflösungsbedingt (siehe Kapitel 3.5.1) nicht mit der oben genannten Messapparatur möglich waren, wurden die Messungen im Weiteren von R. Galneder und L. Rusu von der Abteilung Experimentalphysik und Biophysik der LMU München an einem Zeiss Axiovert 100 TV Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.10. Transfektionen von 16 HBE 14o- Zellen

Die Zellen der Atemwegszelllinie 16 HBE 14 o- wurden in Minimum Essential Medium versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten und alle 3-4 Tage passagiert. Zur Transfektion wurden die Zelle mit Trypsin EDTA aus dem Epithelverband gelöst und in einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro well in 24-well Zellkulturplatten ausgesät. Am folgenden Tag hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 60% erreicht und wurden vor Durchführung der Transfektion mit 1 ml Phosphatpuffer (PBS) gewaschen.

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Größe der Genvektorkomplexe wurde die Formierung der Komplexe in salzfreiem Milieu (aqua bidest) und in physiologischer Salzkonzentration (HBS) durchgeführt.

Zur Transfektion von Komplexen, die in salzfreiem Milieu generiert wurden, wurde die Plasmid-DNA pCMVluc kodierend für das Reportergen Luciferase (Ernst Wagner, Pharmazeutisches Institut, LMU, München) in einer Konzentration von 1 µg pro well mit Lipofectamine (10 µg), Dendrimeren (2,0 µg), PEI (0,7 µg) oder pLL (0,35 µg) in aqua bidest gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde eine Salzkonzentration von 100 mM NaCl, 10 mM HEPES und 1 mM Ascorbinsäure im Ansatz eingestellt und Alveofact mit einer Endkonzentration von 125 µg/ml wurde zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden 320 µl der Komplexlösung auf 680 µl auf den Zellen vorgelegtes MEM gegeben.

Zur Transfektion von Komplexen, die in salzhaltigem Milieu generiert wurden, wurde 1 µg pCMV-luc DNA mit Lipofectamine (10 µg), Dendrimeren (2,0 µg), PEI (0,7 µg) oder pLL (0,35 µg) in HBS gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alveofact in einer Endkonzentration von 125 µg/ml wurde zugegeben und die Ansätze für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 150 µl der Komplexlösung wurden auf 850µl vorgelegtes MEM auf den Zellen gegeben.

Anschließend wurden die Transfektionen mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% durchgeführt. Der Überstand wurde abgesaugt, durch 1 ml MEM plus 10% FCS ersetzt und die Zellen wurden für weitere 24h inkubiert.

Die Transfektionen wurden als Quadruplikate für jede Bedingung gemessen. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert (250 mM Tris, 0,1% Triton-X-100, pH 7,8). 10 µl des Lysates wurden in Messröhrchen gegeben und nach Injektion von 100 µl des Substrates Luciferin mit dem Luminometer über 10s vermessen (Lumat LB9507, Berthold, Bad Wilbach). Die Messwerte in relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf den Gesamtproteingehalt im Lysat bezogen, um so die Schwankungen in der Zellmasse mit einzubeziehen (RLU/10s/mg Protein). Der Proteingehalt wurde mit einem Protein Assay (BioRad) nach der Bradford Methode bestimmt.

2.11. Adhäsionsexperimente

2.11.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Adhäsion von Genvektorkomplexen

Das Verteilungsmuster der Adhäsion von Genvektorkomplexen wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. 16 HBE 14o- Zellen wurden am Vortag des Experimentes mit einer Dichte von $1,75 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer auf 4-Kammer Objektträgern ausgesät, so dass sie am Folgetag eine Konfluenz von 50-60% erreichten.

Plasmid-DNA (pEGFP-N1, Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurde wie oben beschrieben mit dem Fluorochrom TOTO-1 markiert. 0,25 µg DNA wurden in 125 µl Opti-MEM (Optimized Minimal Essential Medium) mit 2,5 µg Lipofectamine, mit 0,51 µg Dendrimeren oder mit 0,16 µg in 125 µl Opti-MEM gemischt. Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alveofact oder Exsurf wurden 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und in einem Volumen von 125 µl zu 125 µl der Komplexlösung gegeben, so dass eine Endkonzentration des Surfactant von 125 µg/ml erreicht wurde. Um die Adhäsionseigenschaften der Genvektorkomplexe ohne Einfluss extrazellulärer Faktoren zu ermitteln, wurde 125 µl der Komplexlösung mit 125 µl Opti-MEM gemischt.

Die Zellen wurden zweimalig mit 1 ml serumfreien Mediums (MEM) gespült und 100 µl der Komplexe pro Kammer (Doppelwerte für jede Bedingung) wurden zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden zweimalig mit 0,5 ml MEM für 3 Minuten bei niedriger Geschwindigkeit auf dem Schwenker (Polymax 1040, Heidolph, Nürnberg) gespült. Die Spüllösung wurde abgesaugt und durch 0,2 ml MEM ersetzt. Im direkten Anschluss daran wurde die Auswertung durchgeführt mit einem Zeiss Axiovert 25 Fluoreszenzmikroskop mit einem 40x Long-Distance Objektiv und dem Fluoreszenzfiltersatz 10 der Firma Zeiss (Exzitation 585nm, Emission 535 nm). Über eine Digitalkamera (CellCam Twain, Klughammer, Markt Indersdorf)

wurden von jeder Kammer 9 Bilder bei einer Belichtungszeit von 2000 ms gemacht, indem die Mitte der Kammer und 8 Diagonalen im Abstand von 2 Gesichtsfeldern angefahren wurden.

2.11.2. Fluoreszenzspektroskopische Messung der Adhäsion von Genvektorkomplexen

Für die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Menge der adhärenenten Genvektorkomplexe wurden 16 HBE 14o- Zellen in einer Dichte von $1,0 \cdot 10^5$ pro Kammer auf 8-Kamer Objektträgern ausgesät, so dass am Folgetag eine Konfluenz von 50-60% erreicht wurde.

Plasmid-DNA (pEGFP-N1, Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurde wie oben beschrieben mit dem Fluorochrom TOTO-1 markiert. 0,35 μg DNA wurden mit in 25 μl HBS mit 3,5 μg Lipofectamine, 0,71 μg Dendrimeren oder 0,22 μg PEI in 25 μl HBS gemischt. Dabei wurde die DNA zum Vektor gegeben. Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alveofact, Exsurf oder POPG wurden 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und in einem Volumen von 50 μl zu den 50 μl der Komplexlösung gegeben, so dass eine Endkonzentration der Substanzen von 125 $\mu\text{g/ml}$ (Alveofact / Exsurf) bzw. 180 μM (POPG) erreicht wurde. Um die Adhäsionseigenschaften der Genvektorkomplexe ohne Einfluss extrazellulärer Faktoren zu ermitteln, wurde 50 μl der Komplexlösung mit 50 μl HBS gemischt.

Die Zellen wurden zweimalig mit 1 ml serumfreien Mediums (MEM) gespült und 100 μl der Komplexe pro Kammer (Doppelwerte für jede Bedingung) wurden auf 250 μl vorgelegtes MEM pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden zweimalig mit 0,5 ml MEM für 3 Minuten bei niedriger Geschwindigkeit auf dem Schwenker gespült. Die Spüllösung wurde abgesaugt und durch 0,2 ml MEM ersetzt. Im direkten Anschluss daran wurde die Auswertung durchgeführt mit einem Fluoreszenzreader (Wallac Victor², Perkin Elmer, Finland). Die Flächen der Kammern wurden in 20 Schritten gescannt und der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der einzelnen Scans wurde errechnet. Parallel wurde die Fluoreszenzintensität von DNA-TOTO-1 mit einer Konzentration von 0,35 μg pro Kammer als Nullwert bestimmt und von den Messwerten abgezogen. Die Werte wurden dann auf das Fluoreszenz-Quenching normiert. Die Quenchingfaktoren der einzelnen Komplexe unter Einfluss von Surfactant wurden in den Versuchen aus Kapitel 3.2.1 ermittelt.

2.12. Magnetofektion

2.12.1. Herstellung der Magnetofectins und Durchführung der Magnetofektion

Die Genvektorkomplexe, mit denen die Magnetofektion durchgeführt wurde, den sogenannten Magnetofectins (Scherer, Anton et al. 2002), bestehen als ternäre Komplexe aus drei Komponenten. Supraparamagnetische Nanopartikel, die mit Polyethylenimin (PEI) überzogen

sind (transMAG-PEI 16/1, Chemicell, Berlin), wurden mit DNA und freiem PEI in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen komplexiert. Dazu wurden 1 μg DNA mit 0,26 μg (N/P 2), 0,52 μg (N/P 4), 0,78 μg (N/P 6) oder 1,04 μg (N/P 8) PEI in gleichen Volumina in aqua bidest gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesen präformierten PEI-Polyplexen wurde 1 μg oder 2 μg transMAG-PEI in gleichen Volumina in aqua bidest gegeben und es wurde eine weitere 20 minütige Inkubation vollzogen. Anschließend wurde die Bildung ternärer Komplexe durch Zugabe von Salzlösung mit einer Endkonzentration von 150 mM NaCl vollzogen.

150 μl der Ansätze wurden zu 850 μl vorgelegten Mediums (MEM) pro well in 24-well Zellkulturplatten gegeben. 16 HBE 14o- Zellen wurden nach dem Protokoll zur Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen ausgesät. Zur Magnetofektion wurden Magnete (Neodymium-Boron-Eisen Stabmagnete) in umgekehrte 24-well Zellkulturplatten plaziert. Auf diese Magnetplatte konnten dann die Zellkulturplatten gestellt werden, so dass der Abstand zwischen Magnet und Zellrasen nur ca. 1 mm betrug. Die Komplexe wurden über die bei den einzelnen Versuchen angegebene Zeit mit oder ohne Magnetplatte bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit auf den Zellen inkubiert. Die weiteren Schritte der Magnetofektion und Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgten analog zum Protokoll der Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen.

2.12.2. Standard Transfektion als Kontrolle der Magnetofektionsexperimente

Standard Transfektionen wurden mit Lipofectamine-Lipoplexen, Dendrimer-Polyplexen oder PEI-Polyplexen durchgeführt. 1 μg DNA wurde mit 10 μg Lipofectamine, 4,0 μg Dendrimeren (N/P 4,5) oder 1,3 μg PEI (N/P 10) in HBS in gleichen Volumina gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 150 μl der Ansätze wurden auf 850 μl vorgelegtes Medium gegeben und die Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen wurde nach oben stehendem Protokoll (Kapitel 2.10) durchgeführt.

2.12.3. Primärzellkultur

Primärzellkultur der Trachea vom Schwein („PPAE“) wurden von Schweinen aus dem Münchner Schlachthof gewonnen. Die Tracheen wurden direkt nach Entnahme aus dem Tier zum Transport in eisgekühlte PBS-Puffer gegeben. Mit einem Skalpell wurde das Epithel in kleinen Stücken disseziert und anschließend viermalig in PBS-Puffer gewaschen. Die Epithelstücke wurden in antibiotikahaltigem Medium (4000U/ml Penicillin-Streptomycin, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin und 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B) mit 0,4 mg/ml Protease IX über 24h bei 4°C verdaut. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 2,5% fötalem Kälberserum (FCS) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde zweimalig über eine sterile Mullkompressen filtriert und anschließend bei 1.300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit in 2 ml Medium (DMEM, Dulbeccos modified Eagle Medium plus 5% FCS und den oben angegebenen Konzentrationen an Antibiotika) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in mit Collagen beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert.

Primärzellkulturen von menschlichen Atemwegszellen wurden freundlicherweise von Dr. R. Bals vom Klinikum Grosshadern der LMU München zur Verfügung gestellt.

Die primären Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten ausgesät und Standard Transfektionen wurden nach oben stehendem Protokoll (Kapitel 2.10) durchgeführt.

2.12.4. Magnetofektion von Hela-Zellen

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Anreicherung der Magnetofectins wurden in MEM kultivierte Hela-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Zink, LMU, München) in einer Konfluenz von ca.40% in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät.

Es wurden Magnetofectins nach oben stehendem Protokoll mit 2 μg transMAG-PEI pro 1 μg DNA und einem N/P von 6 hergestellt. Pro Zellkulturschale wurden 1955 μl MEM vorgelegt und 345 μl Komplexlösung mit einer DNA Menge von 1,25 μg zupipettiert. Die Zellen wurden für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten mit und ohne Magnet bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Magnete mit einem Durchmesser von 15 mm wurden mittig unter den Zellkulturschalen plaziert. Einige der Zellkulturschalen, die für 15 Minuten inkubiert wurden, wurden anschließend für weitere 24h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmalig mit Soerensens Puffer (16% 0,1M KH₂PO₄, 84% 0,1M Na₂HPO₄) gespült und anschließend für 1h bei Raumtemperatur mit 2% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd in Soerensens Puffer fixiert.

Zum elektronenmikroskopischen Nachweis der Anreicherung der DNA an den Zellen und Aufnahme der DNA in die Zellen wurde biotinylierte DNA mit Streptavidin-Gold markiert. Die elektronendichten Goldpartikel sind als Markierung zur Elektronenmikroskopie geeignet. Magnetofektion von Hela-Zellen wurde nach oben stehendem Protokoll durchgeführt und die Zelle wurden für die Elektronenmikroskopie aufbereitet.

2.12.5. Organkultur von Atemwegsepithelien

Trachea von frisch geschlachteten Schweinen vom Münchner Schlachthof wurden in eiskalter Ringerlaktatlösung ins Labor transportiert.

Zuvor wurde Medium mit Antibiotika hergestellt: MEM/A = 500ml MEM mit 5ml Gentamycin (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5ml Amphotericin B (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 10 ml Pen/Strep 10.000U/ml. Von einem unberührten intakten Stück Trachea wurde mit einem Skalpell je 3 x 3 cm große Epithelstücke gelöst und für 2h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in MEM/A inkubiert. Zur Gewinnung des Epithels wurde die Trachea längs der knorpelfreien Linie aufgeschnitten, ein ca. 5 cm langes Stück abgeschnitten und dieses mit sterilen Kanülen auf einem Styropor aufgespannt fixiert. Nun wurde mit der Pinzette das Epithel an einer Ecke angehoben und mit dem Skalpell disseziert.

Die Epithelstücke wurden nach 2 h in einer Petrischale mit MEM/A in 0,5 cm² Stücke geschnitten, und auf „membrane inserts“ (BioCoat, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) in 24-well

Zellkulturplatten platziert in denen 350 μl MEM/A für die Versorgung der Organkultur von der basolateralen Membranseite vorgelegt waren. Die membrane inserts erlauben es, das Epithel an einer Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche zu kultivieren und so die physiologischen Bedingungen der Atemwege zu imitieren. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung konnte eine gute Zilienfunktion festgestellt werden, womit die Vitalität des Gewebes bestätigt wurde.

Zur Magnetofektion der Atemwegsepithelien („NAEP“) wurden autoklavierte Stabmagnete direkt unter den membrane inserts platziert. Die Magnetofektion wurde mit Magnetofectins mit einem N/P von 6 und einem Anteil von 1 μg transMAG-PEI pro μg DNA durchgeführt. Die Komplexlösung mit einem Volumen von 10 μl und einer DNA Menge von 2 μg wurden vorsichtig auf die Epithelstücke pipettiert, so dass die Komplexlösung nicht die Epithelstücke von rückwärtiger Seite benetzen konnten.

Nach Inkubationszeiten von 5 Minuten und 15 Minuten mit oder ohne Magneten wurden die Epithelstücke vorsichtig zweimalig in Soerenens Puffer (16% 0,1M KH_2PO_4 , 84% 0,1M Na_2HPO_4) gespült und für die Elektronenmikroskopie für eine Stunde mit 2% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd fixiert.

Einige Epithelstücke wurden direkt nach der Dissektion für die Anfertigung histologischer Schnitte präpariert. Die Epithelstücke wurden in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur 1h fixiert und anschließend über nacht in 30% Sucrose inkubiert. Die Einbettung für die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte in OCT-Compound (Tissue Tek, USA). Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 5 μm mit einem Cryotom angefertigt und auf Objektträgern luftgetrocknet. Anschliessend wurden die Präparate mit einer Hämatoxylin-Eosin Lösung eigener Herstellung gefärbt.

2.12.6. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von Herrn J. Lausier durchgeführt. Die fixierten Zellen oder Organkulturen wurden in 1% Osmiumtetroxid für 1 Stunde postfixiert und mit Soerenens Puffer zweimalig vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für jeweils zweimal 10 Minuten bei 4°C in ansteigenden Ethanolkonzentrationen dehydriert. Die Präparate wurden auf Plastikblöcke polymerisiert indem das Epoxidharz Epon 812 aufgetragen wurde. Nach einer 2-tägigen Inkubation im Ofen bei 50°C wurden die Blöcke mit den aufpolymerisierten Präparaten ausgebrochen und mit dem Ultramicrotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Gitterträgern platziert und es wurde eine Gegenfärbung mit 4% Uranylzitrat und 0,2% Bleizitrat durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate elektronenmikroskopisch dargestellt.

2.12.7. Statistik

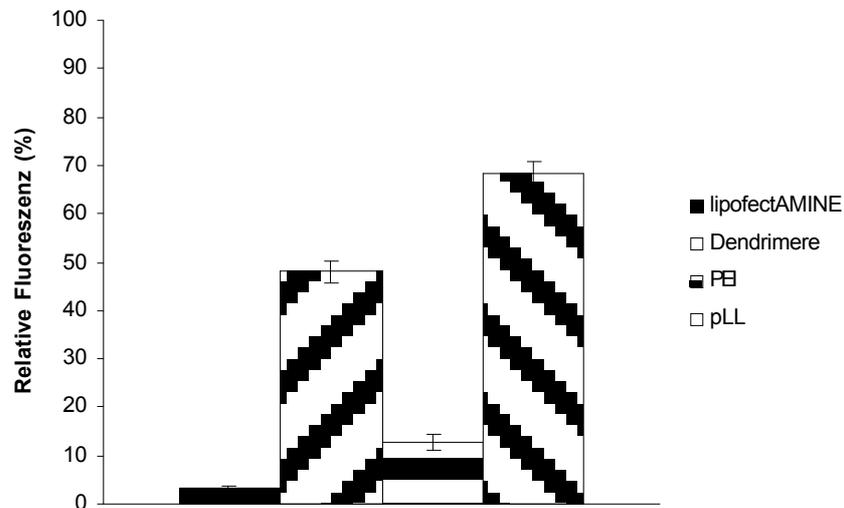
Transfektionsexperimente und Fluoreszenz-Quenching-Assays wurden dreimalig durchgeführt, wobei die einzelnen Bedingungen jeweils als Triplikate oder Quadruplikate gemessen wurden. Messergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn $p < 0,05$. Signifikanzen wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben getestet (StatView, SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Strukturveränderungen nichtviraler Genvektorkomplexe unter Einfluss extrazellulärer Faktoren

3.1. *Packungsdichte der DNA im Genvektorkomplex mit kationischen Liposomen und Polymeren*

Bei der Bildung der Genvektorkomplexe aus DNA und kationischen Liposomen bzw. kationischen Polymeren wird die DNA kondensiert. In Abbildung 6 ist die relative Fluoreszenz von Lipofectamine-Lipoplexen, Dendrimer-Polyplexen, PEI-Polyplexen und pLL-Polyplexen dargestellt, deren DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff TOTO-1 markiert wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die zur Bildung der Genvektorkomplexe benutzten kationischen Lipide und Polymere die DNA zu einem Komplex verdichten. Dabei wurde das stärkste Fluoreszenz-Quenching bei auf Liposomen basierten Genvektorkomplexen erreicht. Das beobachtete Quenching wird als Maß der Verdichtung / Kondensation der DNA betrachtet. DNA komplexiert mit Lipofectamine, resultierte in einem Quenchingfaktor (Q_F) von ca. 0,03. Genvektorkomplexe, die mit dem kationische Polymer PEI gebildet wurden, erreichten eine annähernd starke Verdichtung der DNA mit einem Q_F zwischen 0,11 und 0,15. Deutlich geringer war die Verdichtung der DNA im Genvektorkomplex, wenn dieser mit Dendrimeren oder PLL gebildet wurde. Hier wurden Q_F von ca. 0,5 bei Dendrimeren und ca. 0,7 bei PLL gemessen.

**Abbildung 6**

Relative Fluoreszenz der DNA im Komplex mit Lipofectamine, Dendrimeren, PEI oder pLL. Die relative Fluoreszenz ergibt sich aus der Fluoreszenzintensität der markierten DNA im Genvektorkomplex ins Verhältnis gesetzt zur Fluoreszenzintensität freier markierter DNA. Dieser Quotient wird als Quenchingfaktor (Q_F) bezeichnet. Je stärker das beobachtete Fluoreszenzsignal abnimmt, desto stärker wird die DNA kondensiert.

3.2. Einfluss von Surfactant und dessen Komponenten auf die Struktur kationischer Genvektorkomplexe

3.2.1. Messung des Einflusses von Alveofact, Exosurf und POPG auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexen

In den folgenden Experimenten wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität der TOTO-1 markierten DNA in Genvektorkomplexen und der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer innerhalb der Genvektorkomplexe in Abhängigkeit von der Zugabe von Surfactant (Alveofact, Exosurf) und dessen Komponenten (POPG, DPPG) gemessen.

Abbildung 7 zeigt das in Quenching Assays erhobenen Messungen des Kondensierungsgrades der DNA im Genvektorkomplex. Die Zugabe von ansteigenden Konzentrationen Alveofacts zu Lipofectamine-Lipoplexen führte zu einer drastischen Abnahme des Quenching, d.h. zu einer geringeren Packungsdichte der DNA im Genvektorkomplex. Die maximale Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ Alveofact in der Probe führte zu einer Reduktion des Quenching um den Faktor 35. Es konnte eine signifikante Änderung des Quenching bereits bei einer Konzentration von 31 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Die Zugabe von Alveofact hingegen führte zu keiner signifikanten Änderung des Quenching von PEI-Polyplexen, Dendrimer-Polyplexen und PLL-Polyplexen.

Bei Zugabe des künstlichen Surfactant Ersatzpräparates Exosurf kam es zu keiner Abnahme des Quenching sämtlicher getesteter Genvektorkomplexe.

Ebenfalls wurde die Wirkung des anionischen Phospholipids POPG auf die Genvektorkomplexe getestet. Es wurde eine diskontinuierliche Abnahme des Quenching von Lipofectamine-Lipoplexen gemessen. Der deutlichste Rückgang des Quenching wurde bei einer Konzentration von 22,5 μM ermittelt, also im unteren Konzentrationsbereich der Messreihe. Hier lag die relative Fluoreszenz bei 78%, dies entspricht einem Rückgang um den Faktor 39. Für Polyplexe wurden heterogene Änderungen des Quenching gemessen. pLL-Polyplexe zeigten ebenfalls bei niedrigen Konzentrationen eine Reduktion des Quenching, bei einer Konzentration von 6-11 μM POPG lag die relative Fluoreszenz bei 83%.

Dendrimer-Polyplexe zeigten eine uneinheitliche, statistisch nicht signifikante Änderung ihres Quenching. Einzig die PEI-Polyplexe blieben von der Zugabe von POPG unbeeinflusst.

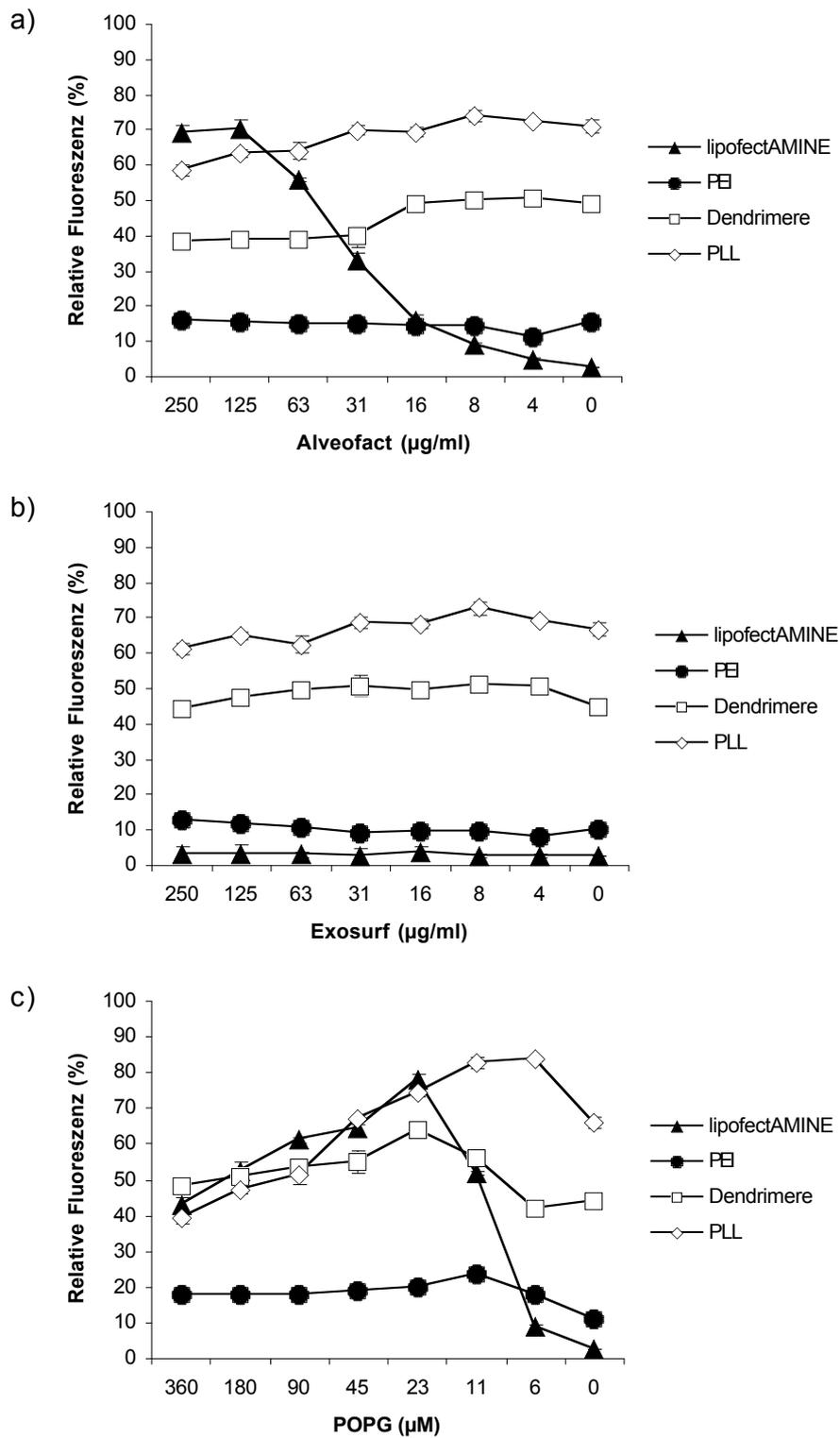


Abbildung 7

Die relative Fluoreszenz TOTO-1 markierter DNA im Genvektorkomplex wurde nach Zugabe von Alveofact (a), Exosurf (b) oder POPG (c) gemessen.

3.2.2. Messung des Einflusses von Alveofact, Exosurf, POPG und DPPG auf die räumliche Anordnung von DNA und Vektor im Genvektorkomplex

Um zu ermitteln, ob neben einer Änderung des Kondensierungsgrades der DNA im Genvektorkomplex (siehe Kapitel 3.2.1) zusätzlich eine Änderung des Abstandes zwischen DNA und Liposom bzw. Polymer stattfindet, wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer innerhalb der Genvektorkomplexe gemessen.

Hierzu wurden die Bestandteile der Genvektorkomplexe, die DNA und die nichtviralen Vektoren, mit Fluorophoren markiert. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist vom Abstand der Fluorophore zueinander abhängig und gibt dadurch Aufschluss über die Änderung der Abstände der fluoreszenzmarkierten Substanzen zueinander. Als Maß für den FRET wurde hier der Quotient I_A/I_{DA} verwendet.

Bei Zugabe ansteigender Konzentrationen Alveofacts nahm der FRET in Lipoplexen drastisch ab und erlosch vollständig bei einer Alveofact Konzentration von 375 $\mu\text{g/ml}$. PEI-Polyplexe und Dendrimer-Polyplexe hingegen wurden durch die Zugabe von Alveofact nicht beeinflusst.

Zu einer drastischen Abnahme des FRET bei Lipoplexen kam es ebenfalls durch den Einfluss der anionischen Phospholipide POPG und DPPG, wenn diese in Konzentrationen $>60 \mu\text{M}$ zugegeben wurden. Auch bei Dendrimer-Polyplexe bewirkte die Zugabe von POPG in diesen Konzentrationen eine starke Abnahme des FRET. Eine moderaten Abschwächung des FRET innerhalb der Dendrimer-Polyplexe war ebenfalls bei hohen Konzentrationen von DPPG zu beobachten. Der FRET von PEI-Polyplexen durch POPG bzw. DPPG blieb hingegen unbeeinflusst.

Bei Zugabe von Exosurf war keine Änderung des FRET innerhalb sämtlicher getesteter Genvektorkomplexe meßbar.

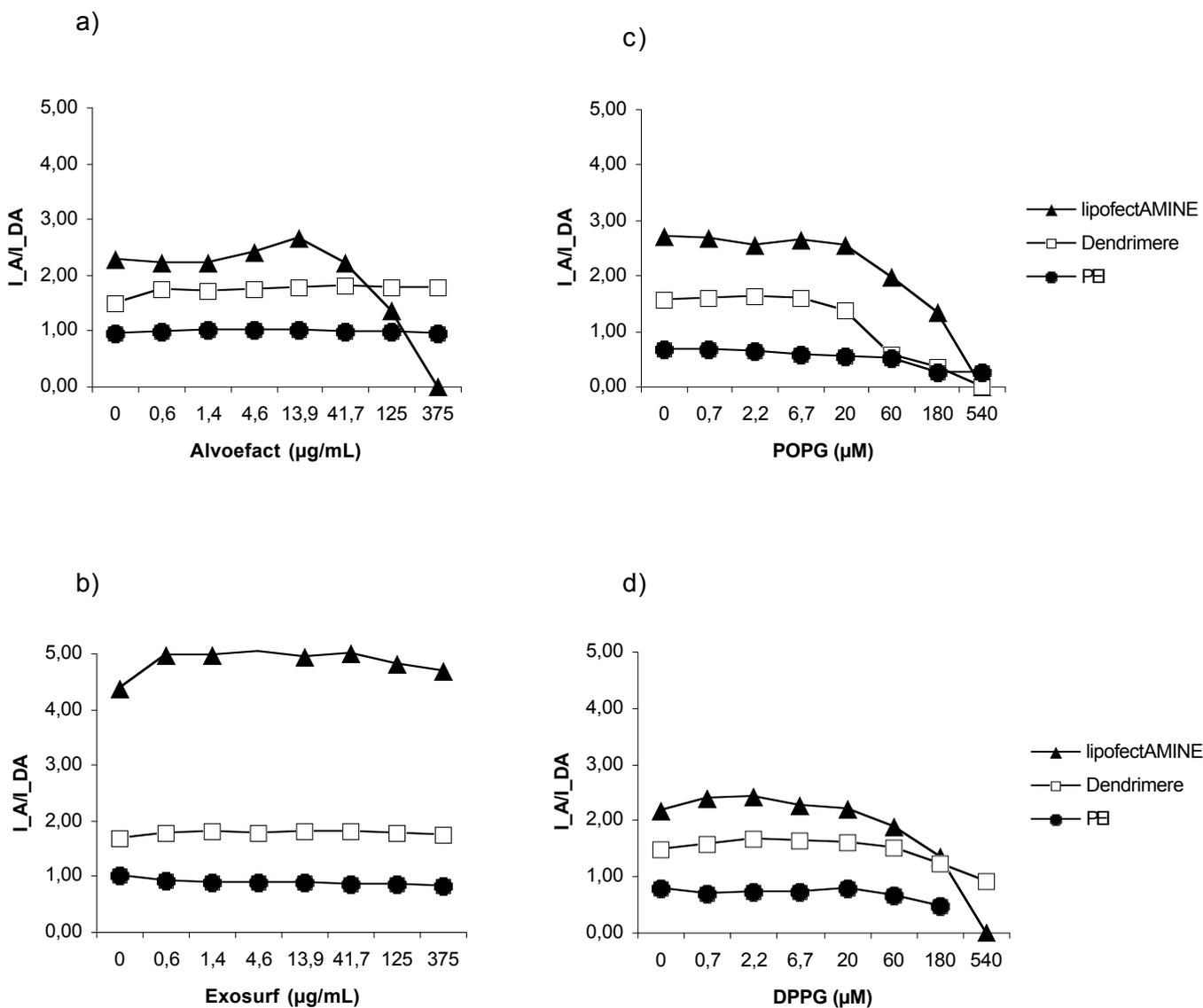


Abbildung 8

Messung der Änderung des Abstandes zwischen DNA und Vektor im Genvektorkomplex als Funktion der Zugabe von Alveofact (a), Exosurf (b), POPG (c) oder DPPG (d). Als Äquivalent zum FRET wird hier der Quotient I_A/I_{DA} verwendet. I_A ist die Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Abwesenheit des Donor, I_{DA} ist die Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit des Donors.

3.3. Einfluss von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und deren Komponenten auf die Struktur kationischer Genvektorkomplexe

3.3.1. Messung des Einflusses von BALF auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexen

Zur Messung des Einflusses von BALF auf den Kondensierungsgrad der DNA, d.h. die Packungsdichte innerhalb des Genvektorkomplexes, wurden Quenching Assays als Funktion der BALF Konzentration durchgeführt (Abbildung 9).

Bei niedrigen Konzentrationen konnte kein Einfluss der BALF auf den Kondensierungsgrad der DNA im Genvektorkomplex festgestellt werden. Dies gilt für alle drei getestete Genvektorkomplexe: Lipofectamine-Lipoplexe, Dendrimer-Polyplexe und PEI-Polyplexe.

Erst bei höherer Anreicherung der BALF wurde eine Änderung des Quenching beobachtet. Ab einer Konzentration von 62,5 $\mu\text{g/ml}$ Phospholipid zeigten alle drei Genvektorkomplexe eine Zunahme der relativen Fluoreszenz. Eine signifikante Änderung des Quenching wurde für Lipoplexe bei 125 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. PEI-Polyplexe zeigten eine signifikante Abnahme des Quenching bei Zugabe von BALF >63 $\mu\text{g/ml}$. Eine Abnahme des Quenching der Fluoreszenz der DNA im Komplex mit Dendrimeren war zu beobachten. Diese Änderung blieb jedoch statistisch nicht signifikant.

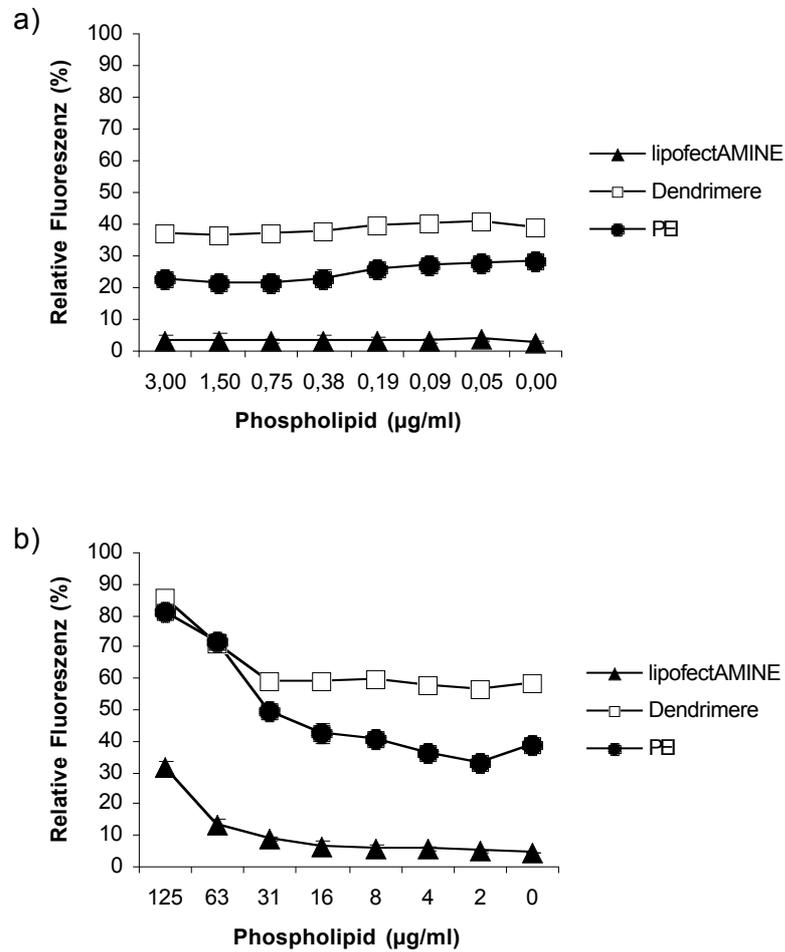


Abbildung 9

Die relative Fluoreszenz von TOTO-1 markierter DNA im Genvektorkomplex wurde nach Zugabe von BALF in niedriger (a) und in hoher Konzentration (b) gemessen. Mehrere BALF wurden gepoolt und aufkonzentriert. Der Gehalt an Phospholipid wurde als Maß der Konzentration genommen.

3.3.2. Messung des Einflusses von Albumin, Mucin und Glykoprotein auf den Kondensierungsgrad der DNA in kationischen Genvektorkomplexen

Als Vertreter einzelner Proteinkomponenten der BALF wurden Albumin, Mucin und Glykoprotein hinsichtlich ihres Einflusses auf die Struktur der Genvektorkomplexe untersucht (Abbildung 10).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Albumin, Mucin oder Glykoprotein in einer maximalen Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ zu keiner signifikanten Änderung des Quenching von Lipoplexen oder Polyplexen führte.

Die in Abbildung 10 dargestellten Quenching Assays zeigen im Vergleich zu Abbildung 9 reduzierte Ausgangswerte des Quenching der Genvektorkomplexe (0-Werte). Diese interexperimentellen Veränderung werden häufig beobachtet und lassen sich unter anderem durch die unterschiedlichen Temperaturen in der Messkammer bei den an verschiedenen Tagen durchgeführten Experimenten erklären.

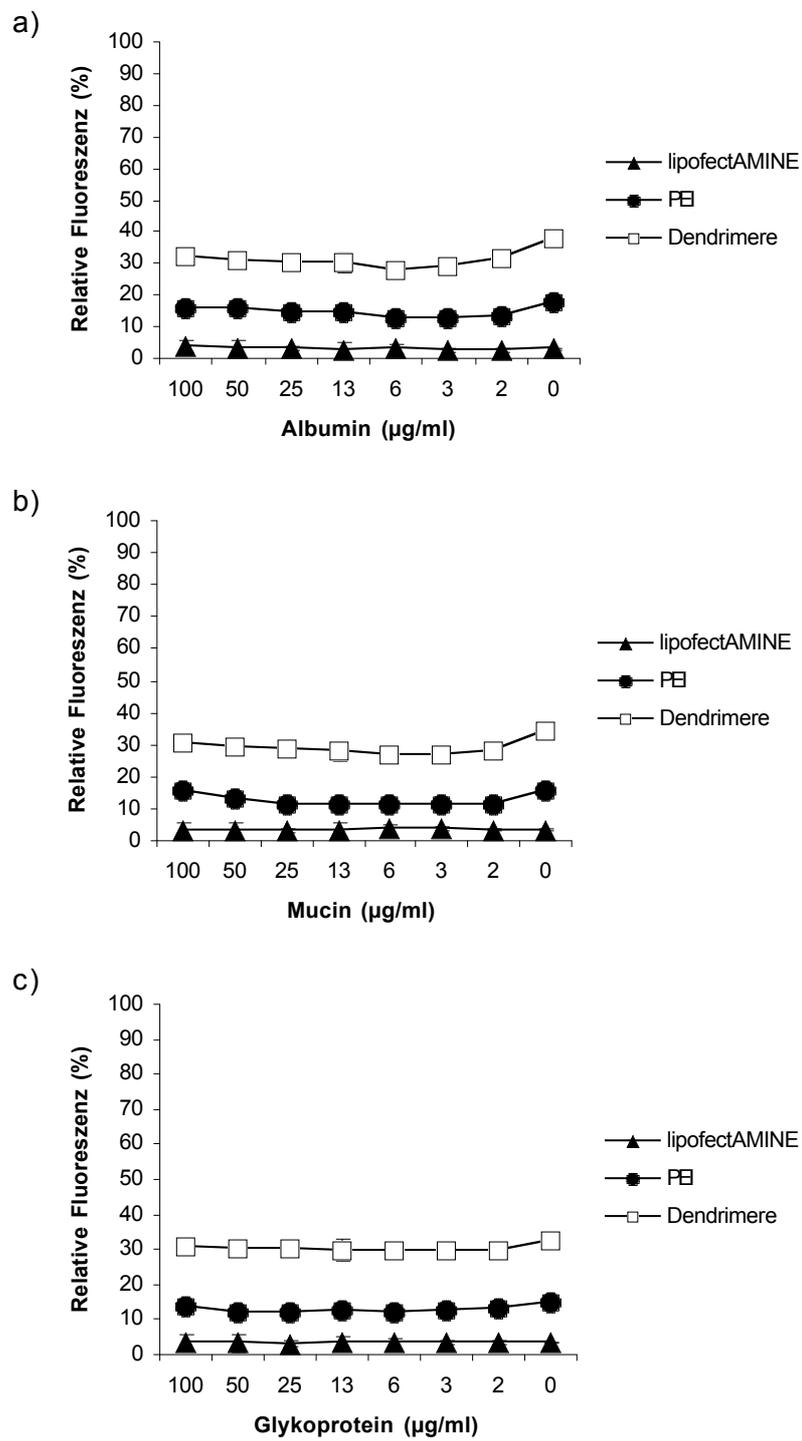


Abbildung 10

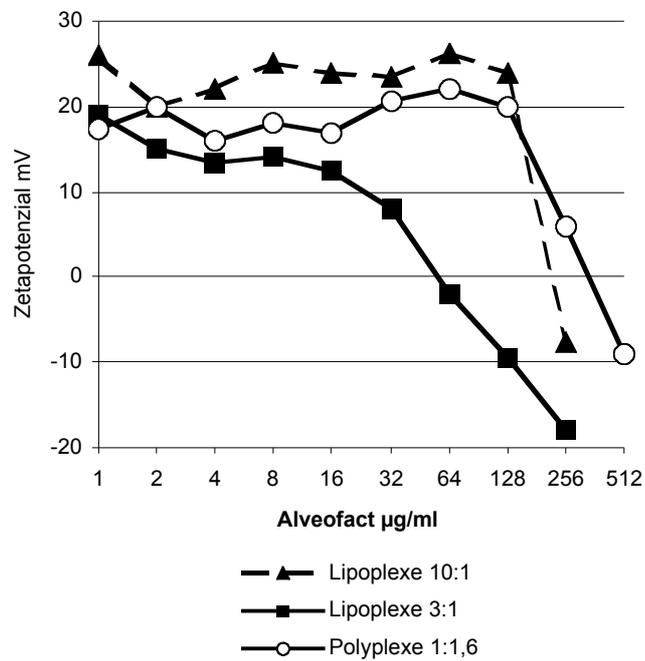
Die relative Fluoreszenz von TOTO-1 markierter DNA im Genvektorkomplex wurde nach Zugabe von Albumin (a), Mucin (b) oder Glykoprotein (c) gemessen.

3.4. Einfluss von Surfactant auf die Oberflächenladung von kationischen Genvektorkomplexen

Die Oberflächenladung von Partikeln kann über die Messung des Zetapotenzials ermittelt werden. Das Zetapotenzial ist ein Maß für die Nettoladung von Partikeln, so zum Beispiel eines Komplexes, der aus positiv geladenen Vektoren und negativ geladener DNA besteht.

Es wurde untersucht, welchen Einfluss Surfactant auf die Oberflächenladung der Genvektorkomplexe hat. Lipoplexe wurden in einem Gewichtsverhältnis (Lipid/DNA) von 10/1 und 3/1 hergestellt. Aus diesem Mischungsverhältnissen resultierte ein positiver Ladungsüberschuss von 8,5 bzw. 2,5. PEI-Polyplexe wurden in einem Gewichtsverhältnis (Polymer/DNA) von 1/1,6 hergestellt. Dies ergibt ein Stickstoff/Phosphat-Verhältnis (N/P) von 5,7 (positiver Ladungsüberschuss).

Nach Zugabe von ansteigenden Konzentrationen an Alveofact zeigte sich eine Verschiebung des Zetapotenzials in Richtung negativer Werte (Abbildung 11). Lipoplexe mit einem höheren Gehalt an kationischem Lipid gelangten erst nach Zugabe höherer Konzentrationen an Alveofact zu einem Ladungsausgleich. Lipoplexe mit einem positiven Ladungsüberschuss von 8,5 wurden nach Zugabe von 128 $\mu\text{g/ml}$ Alveofact zu einem Ladungsausgleich gebracht, während Lipoplexe mit einem positiven Ladungsüberschuss von 2,5 bereits nach Zugabe von $>32 \mu\text{g/ml}$ Alveofact einen Ladungsausgleich erreichten. PEI-Polyplexe mit einem positiven Ladungsüberschuss von 6,0 erreichten erst nach Zugabe von $>256 \mu\text{g/ml}$ Alveofact einen Ladungsausgleich.

**Abbildung 11**

Lipoplexe mit einem Lipofetcamine/DNA-Verhältnis von 10/1 oder 3/1 und PEI-Polyplexe mit einem Polymer/DNA-Verhältnis von 1/1,6 wurden mit ansteigenden Konzentrationen Alveofact versetzt und das Zetapotenzial wurde gemessen.

3.5. *Fluoreszenzmikroskopische Größenbestimmung nichtviraler Genvektorkomplexe*

3.5.1. Problematik des Einsatzes der Fluoreszenzmikroskopie zur Größenbestimmung nichtviraler Genvektorkomplexe

Um Fluoreszenzmikroskopie für die Bestimmung quantitativer Parameter einzusetzen, wird neben dem Fluoreszenzmikroskop eine Digitalkamera mit Anschluß an einen Rechner zur Gewinnung der optischen Information benötigt. Des weiteren bedarf es einer Software, um die erhaltenen Daten auszuwerten. Schließlich muß die Methodik ausreichend validiert werden.

Zunächst mußte ermittelt werden, ob im erwarteten Meßbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Belichtungszeit der Digitalkamera und ermittelter Fluoreszenzintensität besteht. Für diejenigen Belichtungszeiten, die diesen linearen Zusammenhang aufweisen, verwendet man den Begriff des linearen Bereiches der Kamera. Bei Messung von Fluoreszenzsignalen deren Intensitäten stark von einander abweichen, kann es erforderlich sein, verschiedene Belichtungszeiten zu wählen. Soweit die gewählte Belichtungszeit im linearen Bereich der Kamera liegt, ist ein Extrapolieren zulässig und ein Vergleich der gemessenen Intensitäten wird möglich. In Abbildung 12 ist ein linearer Zusammenhang mit dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9768$ für Belichtungszeiträume zwischen 240 msec. und 2000 msec. dargestellt. Als Quelle des Fluoreszenzsignals wurden Kügelchen von 1000 nm Durchmesser mit konstanter Fluoreszenz eingesetzt.

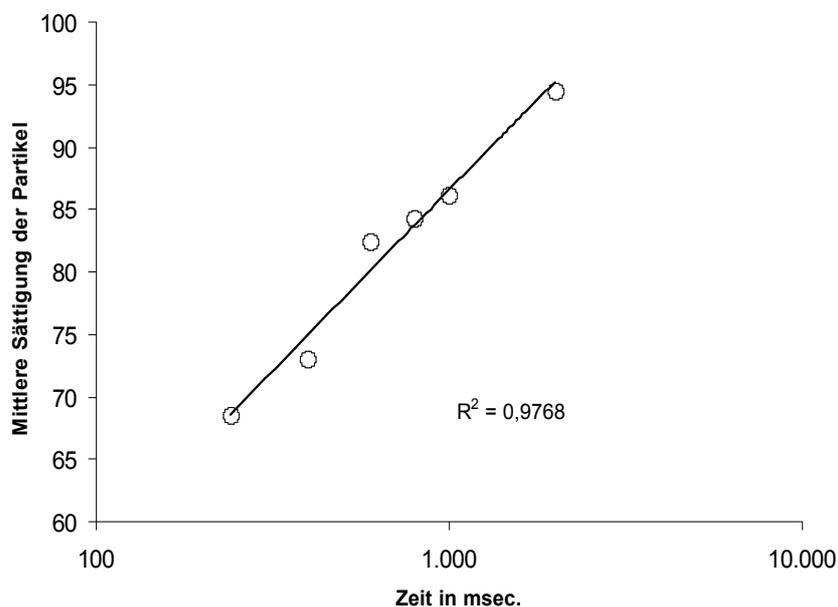


Abbildung 12

Anhand von fluoreszierenden Partikeln mit stabilem Signal (fluorescent microspheres) wurden Messungen mit Belichtungszeiten zwischen 240 msec. und 2.000 msec. durchgeführt. Es wurde ein Zusammenhang der Messpunkte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,98$ ermittelt

Bei der Abbildung von dreidimensionalen Strukturen, so zum Beispiel von fluoreszierenden Kügelchen (fluorescent microspheres) durch die Digitalkamera am Fluoreszenzmikroskop werden diese als eine Fläche von Pixeln dargestellt (relative Größe). Es musste ein Kalibrierungsstandard geschaffen werden, um die relativen Messgrößen der Kamera auf tatsächliche Größen beziehen zu können.

Abbildung 13 zeigt die Vermessung der fluorescent microspheres mit Durchmessern zwischen $0,5 \mu\text{m}$ und $2 \mu\text{m}$. Da die Durchmesser der Kugeln jeweils verdoppelt werden, müßte nach der Flächenformel für Kreise ($A = \pi \cdot r^2$) die gemessene Fläche um den Faktor 4 zunehmen. Die Messwerte (A_{Messung}) nehmen jedoch für Kugeln von $0,5$ bzw. $1 \mu\text{m}$ Durchmesser die Werte 10,5 bzw. 30,7 an; sie zeigen also eine Zunahme um den Faktor 2,9. Bei Kugeln von 1 bzw. $2 \mu\text{m}$ Durchmesser liegt eine Zunahme um den Faktor 2,3 vor. In Abbildung 13 ist außerdem der errechnete Verlauf der Messung dargestellt ($A_{\text{err.}}$), ausgehend von dem höchsten Messwert. Es ist ersichtlich, dass die Messwerte für die Kugeln mit kleinstem Durchmesser relativ die größte Abweichung in Richtung zu großer Werte bieten. Dies ist in einem optischen Phänomen begründet, das mit der Punktverbreiterungsfunktion (engl. point-spread-function, abgekürzt PSF) beschrieben wird. Dieses Phänomen tritt in nicht optimalen optischen Systemen auf, wie es das

Linsensystem eines Fluoreszenzmikroskops oder auch die Linse des menschlichen Auges sind. Im Randbereich des Auflösungsvermögens des Systems werden um einen Punkt Beugungsringe geringerer Intensität gebildet, die den Punkt verbreitert darstellen (siehe Abbildung 14).

Um die Problematik im Falle der vorliegenden Experimente zu demonstrieren, wurde angenommen, dass Kugeln mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ unverfälscht abgebildet werden. Die für diese Kugeln gemessene Fläche in Pixeln wurde jeweils um den Faktor 4, entsprechend dem halbierten Durchmesser, verringert aufgetragen. Kommt in den Messbereichen für Kugeln von 1 bzw. $0,5 \mu\text{m}$ Durchmesser nun die PSF zum tragen, müssten die abgebildeten Flächen zunehmend zu groß vermessen werden. Dies ist im vorliegenden Experiment der Fall.

Untersuchungsgegenstand sollten in der vorliegenden Arbeit Genvektorkomplexe sein, die Größen oberhalb von $500 \mu\text{m}$ Durchmesser haben können. Für Partikel dieser Größe ist eine Verfälschung der Messergebnisse aufgrund der PSF wahrscheinlich, weshalb eine Größenbestimmung als nicht valide angesehen werden musste.

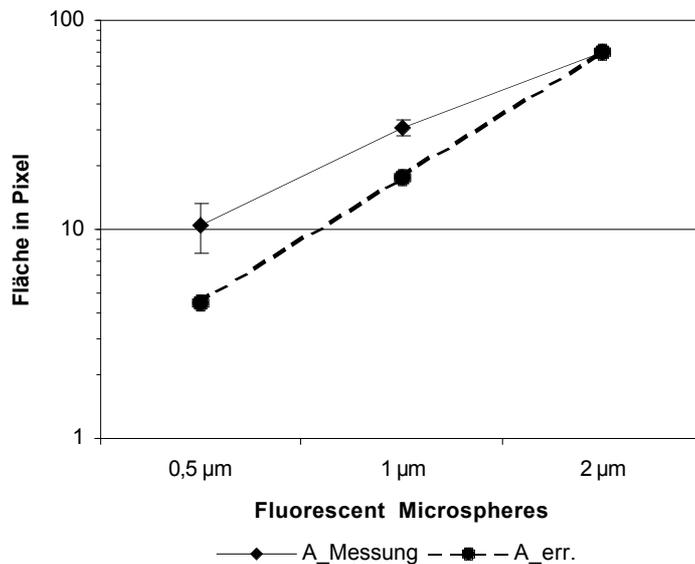


Abbildung 13

Fluoreszenzmikroskopische Messung der Abbildungsfläche von Kugeln: Fluorescent Microspheres von 0,5 μm , 1 μm und 2 μm Größe wurden fluoreszenzmikroskopisch abgebildet. Die gemessene Fläche in Pixel (A_{Messung}) lag für kleinere Objekte höher, als rechnerisch erwartet ($A_{\text{err.}}$). Hierbei wurde die Prämisse gesetzt, dass der Messwert für Objekte von 2 μm Größe unverfälscht ist.

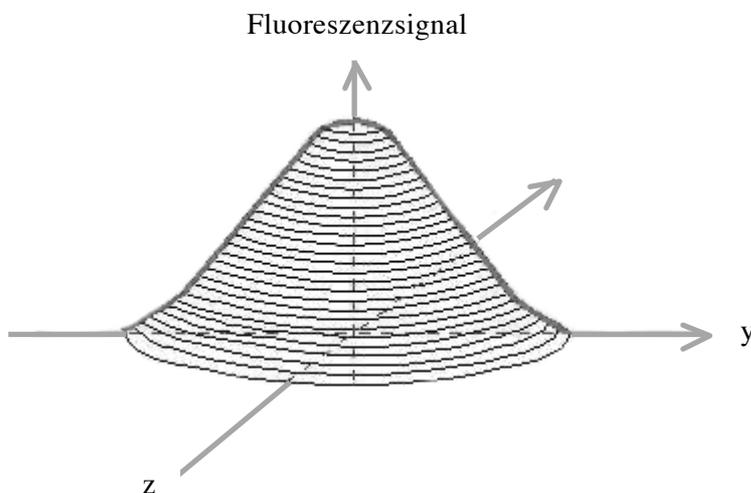


Abbildung 14

Anhand der point-spread-function (Punktverbreiterungsfunktion) erklärt sich, dass ein leuchtender punktförmiger Gegenstand von sogenannten nicht-optimalen optischen Systemen als falsch zu groß dargestellt wird. Nicht-optimale optische Systeme sind z. B. die Optik eines Fluoreszenzmikroskops oder das Linsensystem des menschlichen Auges.

3.5.2. Einfluss von Alveofact auf die Größe nichtviraler Genvektorkomplexe

Eine Lösung der im vorangehenden Kapitel geschilderten Problematik wurde in Zusammenarbeit mit R. Galneder und L. Rusu von der Abteilung Experimentalphysik und Biophysik der LMU München unter der Leitung von Prof. J.O. Rädler gefunden. Die Partikel konnten mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und quantitativer Fluoreszenzmikroskopie vermessen werden. Es konnten außerdem genauere Spezifizierungen der Partikel durchgeführt werden hinsichtlich der Bestimmung der Anzahl der Plasmide pro Genvektorkomplex und der Aggregationskinetik der Genvektorkomplexe. (Für eine detaillierte Darstellung der Methodik siehe (Galneder 2001).

Es ist bekannt, dass bei der Herstellung von Genvektorkomplexen aus kationischen Liposomen und kationischen Polymeren das Solvens die Aggregation der Komplexe und damit ihre Größe beeinflusst (Rudolph, Muller et al. 2002). Im Allgemeinen bleibt die Größe der Komplexe in salzfreier Umgebung stabil, während nach der Zugabe von Salz in physiologischen Konzentrationen eine Aggregation stattfindet. Um den Einfluss von Alveofact auf die Größe der Genvektorkomplexe zu untersuchen, wurde vor der Einstellung des physiologischen Salzgehaltes im Transfektionsansatz Alveofact mit einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben.

In Anwesenheit von Alveofact zeigte sich ein starke Beeinflussung des Aggregationsverhaltens der Genvektorkomplexe. Dabei zeigten kationische Liposome und kationische Polymere ein konträres Verhalten (Abbildung 15). Während Dendrimer-Polyplexe und PEI-Polyplexe bei Zugabe von Alveofact eine deutlich geringere Größe aufwiesen, wurde das Wachstum durch Aggregation von Lipoplexen durch die Zugabe Alveofact verstärkt. Wurde Alveofact erst nach der Einstellung des Salzgehaltes zugegeben, also erst nachdem die Komplexe bereits aggregiert waren, so hatte dies keinen Einfluss mehr auf die Größe der Komplexe (ohne Abbildung). Da sich die gemessenen Größen für PEI-Polyplexe im Randbereich der Auflösung des System befanden, können hier nur Aussagen über relative Änderungen der Größe getroffen werden.

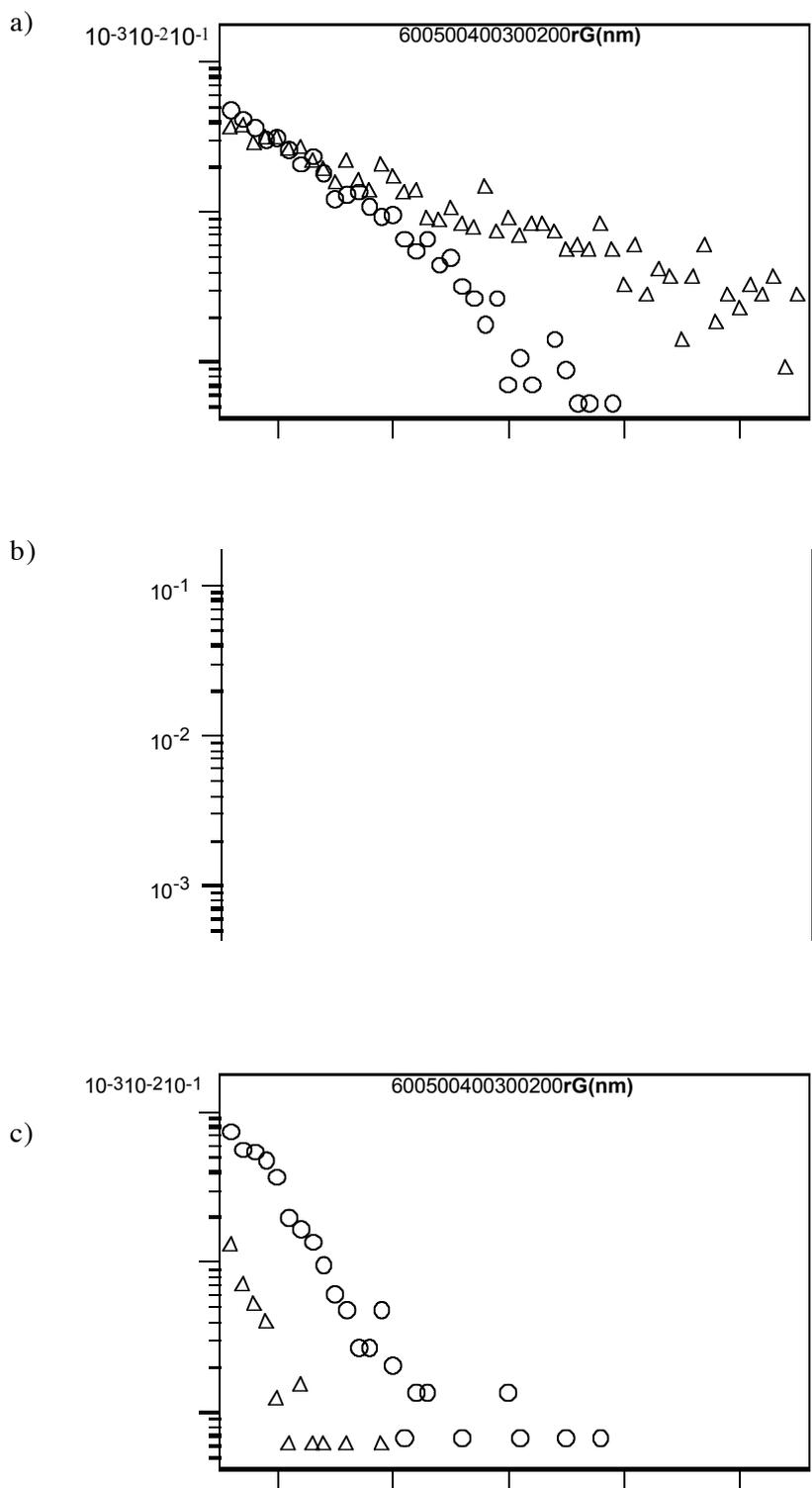


Abbildung 15

Größenverteilung von Lipofectamine-Lipoplexen (a), Dendrimer-Polyplexen (b) und PEI-Polyplexen (c). Komplexe wurden in salzfreiem Milieu generiert, anschließend wurde der Salzgehalt mit Zugabe von Alveofact (\square) und ohne Zugabe von Alveofact (\circ) auf 15 mM NaCl eingestellt. Angegeben ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Größen (r_G).

3.5.3. Einfluss der Größe auf die Transfektionseffizienz kationischer Genvektorkomplexe

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Salz und von Alveofact einen Einfluss auf die Größe der kationischen Genvektorkomplexe hat. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Herstellung der Genvektorkomplexe unter den unterschiedlichen Bedingungen, also in Anwesenheit oder Abwesenheit von Salz bzw. Alveofact, ihre Transfektionseffizienz verändert.

Die Komplexe wurden in salzfreiem Milieu (aqua bidest) bzw. in Puffer mit physiologischem Salzgehalt (HBS, 150 mM) generiert. Anschließend wurde Alveofact mit einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ dem Transfektionsansatz zugegeben und die Transfektion von Atemwegszellen (16 HBE 14o-) wurde durchgeführt.

Abbildung 16 stellt den Einfluss von Alveofact auf die Transfektionseffizienz von Genvektorkomplexen, die unter Zugabe von Salz hergestellt wurden, dar. Alveofact zeigte einen starken inhibitorischen Effekt auf den Lipofectamine vermittelten Gentransfer. Die Effizienz der Polyfektion wurde jedoch nicht reduziert. Transfektionsraten von Dendrimer und pLL vermitteltem Gentransfer waren erhöht, wenn auch kein statistisch signifikanten Anstieg gemessen wurde.

Wurden die Komplexe unter salzfreien Bedingungen generiert, kam jedoch es zu einer Abnahme der Transfektionsraten aller getesteter Genvektorsysteme (Abbildung 17). Hierbei ist zu beachten, dass bei PEI-Polplexen im Vergleich zu Dendrimer-Polplexen durch Zugabe von Alveofact eine wesentlich stärkere Abnahme der Transfektionseffizienz zu verzeichnen war.

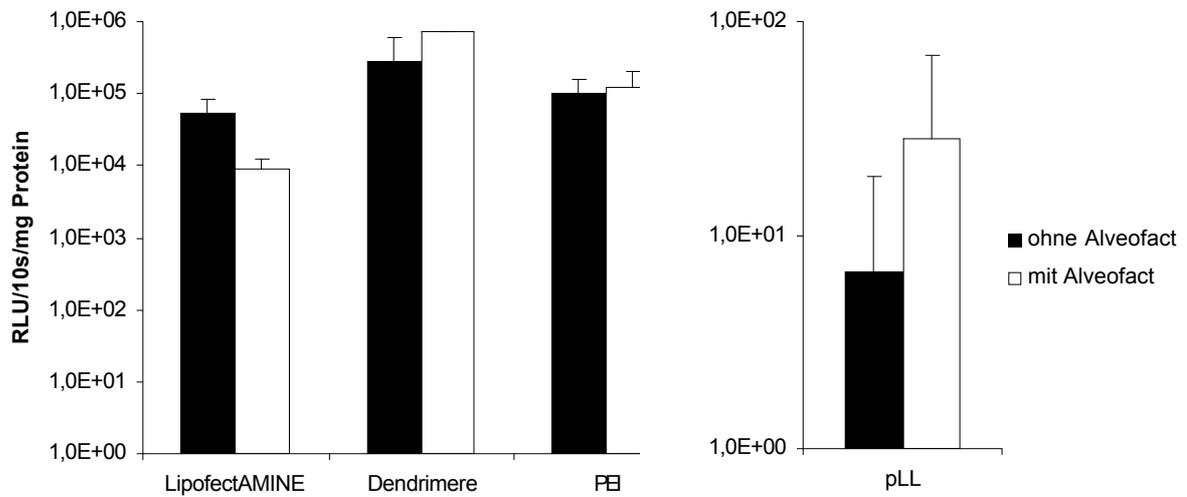


Abbildung 16

Transfektionseffizienz von Lipoplexen und Polyplexen unter Einfluss von Alveofact ($c_{125} \mu\text{g/ml}$). Komplexe wurden in HBS generiert (Salzgehalt 150 mM).

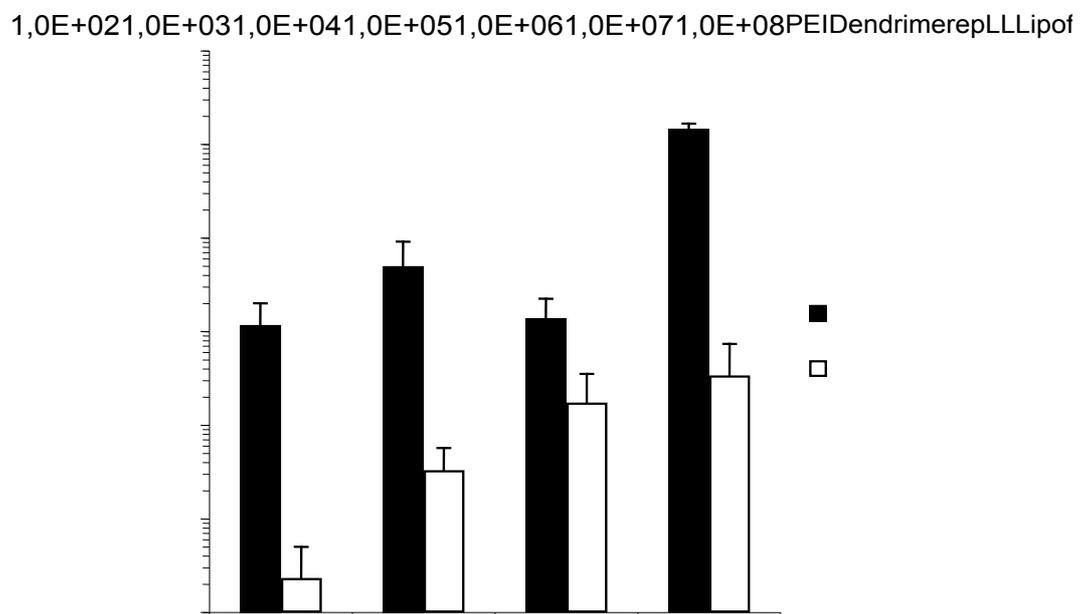


Abbildung 17

Transfektionseffizienz von Lipoplexen und Polyplexen unter Einfluss von Alveofact ($c_{125} \mu\text{g/ml}$). Komplexe wurden in aqua bidest generiert.

4. Adhäsion nichtviraler Genvektorkomplexe an die Zelloberfläche

Die Anhaftung des genetischen Materials an die Zelloberfläche (Adhäsion) ist die Voraussetzung für die Aufnahme in die Zielzelle. Die Aufnahme erfolgt zumeist über Endozytose (Zabner, Fasbender et al. 1995; Tseng, Haselton et al. 1997). Da die Oberfläche menschlicher Zellen mit negativ geladener Sialinsäure und HSPG-Rezeptoren bedeckt ist, kann eine unspezifische, aber effiziente Bindung von Genvektorkomplexen mit positiver Überschussladung erreicht werden (Felgner and Ringold 1989; Mounkes, Zhong et al. 1998). In den vorstehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass Surfactant bei hohen Konzentrationen die Struktur und auch die Oberflächenladung von Lipoplexen verändert. Polyplexe werden durch Surfactant nur in einem sehr geringen Maße in ihrer inneren Struktur verändert. PEI-Polyplexe zeigten aber hinsichtlich der Veränderung ihrer Oberflächenladung ein analoges Verhalten zu den Lipoplexen. Es war Gegenstand der folgenden Experimente zu ermitteln, eine Korrelation besteht zwischen dem Einfluss von Surfactant auf die biophysikalischen Parameter und dem Adhäsionsverhalten der Genvektorkomplexe. Das Adhäsionsverhalten ist ein Parameter für die Funktion der Genvektorkomplexe.

Zunächst wurde ein Modell etabliert, das die Adhäsion der Genvektorkomplexe an die Zelloberfläche testet. Fluoreszenzmarkierte Lipoplexe und Polyplexe wurden unter Zugabe von Surfactant auf eine immortalisierte Atemwegszelllinie (16HBE14o-) gegeben. Um das Modell zu vereinfachen wurde nur die DNA fluoreszenzmarkiert und fluoreszenzmikroskopisch oder fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen. Nach 15 Minuten wurden die Zellen gespült, um nicht adhärenente Komplexe zu entfernen.

Die Adhäsion der Komplexe nahm über die Zeit zu, sei es durch Sedimentierung oder durch Diffusion im Medium, je nach Größe der Partikel. Abbildung 18 zeigt exemplarisch anhand von Lipoplexen die Zunahme der Adhäsion über die Zeit, wobei bereits nach 5 Minuten messbare Mengen an DNA auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren. Bei Ausdehnung der Inkubationszeit auf 25 bzw. 45 Minuten nahm die Menge adhärenenten Materials um jeweils etwa den Faktor 2 zu.

In weiteren Vorexperimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Surfactantzugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu einem gleichsinnig beeinflussten Adhäsionsverhalten führte. Das Adhäsionsverhalten war unabhängig davon, ob Surfactant direkt nach dem Mischen der Genvektorkomplexe zugegeben wurde, nach der Aggregation der Komplexe oder vor bzw. nach dem Aufbringen auf die Zellen.

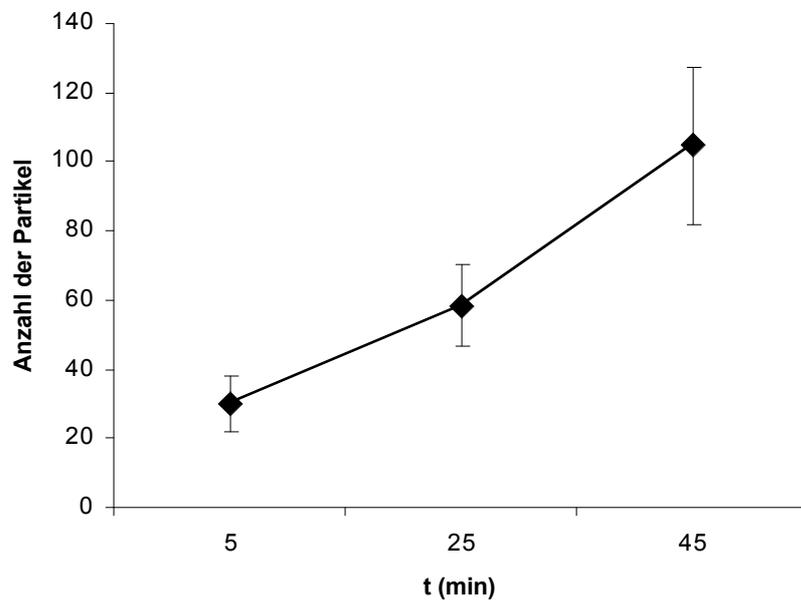


Abbildung 18

Zeitaufgelöste Adhäsion von Lipoplexen: Die Menge der adhärenen Partikel (Lipoplexen) auf den Atemwegszellen (16 HBE 14o-) nimmt bei Verlängerung der Inkubationszeit zu. Es wurden jeweils 9 Gesichtsfelder ausgezählt und die Mittelwerte mit Standardabweichung sind dargestellt.

4.1. Verteilungsmuster der Adhäsion von Lipo- und Polyplexen an Atemwegszellen unter Einfluss von Surfactant

Um einen Einblick in das Muster der Verteilung von Genvektorkomplexen, die an die Oberfläche von Atemwegszellen (16HBE14o-) adhären, zu erhalten, wurden die Komplexe fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Komplexe wurden auf den Überstand des Nährmediums in Kulturschalen von Zellen mit >60% Konfluenz gegeben. Nach 10 Minuten wurden durch zweimaliges vorsichtiges Spülen mit Pufferlösung nicht adhärenente Komplexe entfernt. Abbildung 19 zeigt das Verteilungsmuster von Lipoplexen und Polyplexen nativ und unter Einfluss der Surfactantpräparate Alveofact und Exosurf mit einer Konzentration von jeweils 125 µg/ml. Es ist zu beachten, dass die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Genvektorkomplexe im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie nicht direkt verglichen werden kann. Das Fluoreszenzsignal der TOTO-1 markierten DNA unterliegt, wie in Kapitel 3 dargestellt, einem komplexspezifischen Quenching. Deshalb lässt eine gleich starke Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Vektoren nicht auf gleiche Mengen adhärenenten Materials rückschließen.

Augenfällig war die einheitliche Verteilung der Polyplexe auf der Zelloberfläche. Dieses Verteilungsmuster bestand unter allen getesteten Bedingungen und wurde durch die Zugabe von Alveofact oder Exosurf nicht beeinflusst. Die Polyplexe zeigten sowohl eine einheitliche Verteilung hinsichtlich der Lage auf dem Zellrasen, als auch hinsichtlich ihrer Größe und der Fluoreszenzintensität.

Für Lipoplexe war eine deutliche Änderung im Verteilungsmuster der Adhäsion zu beobachten. Lipoplexe nahmen in Anzahl und Größe nach Zugabe von Alveofact deutlich zu. Die Zugabe von Exosurf führte hingegen zu keiner Veränderung des Verteilungsmusters von adhärenenten Lipoplexen an der Zelloberfläche.

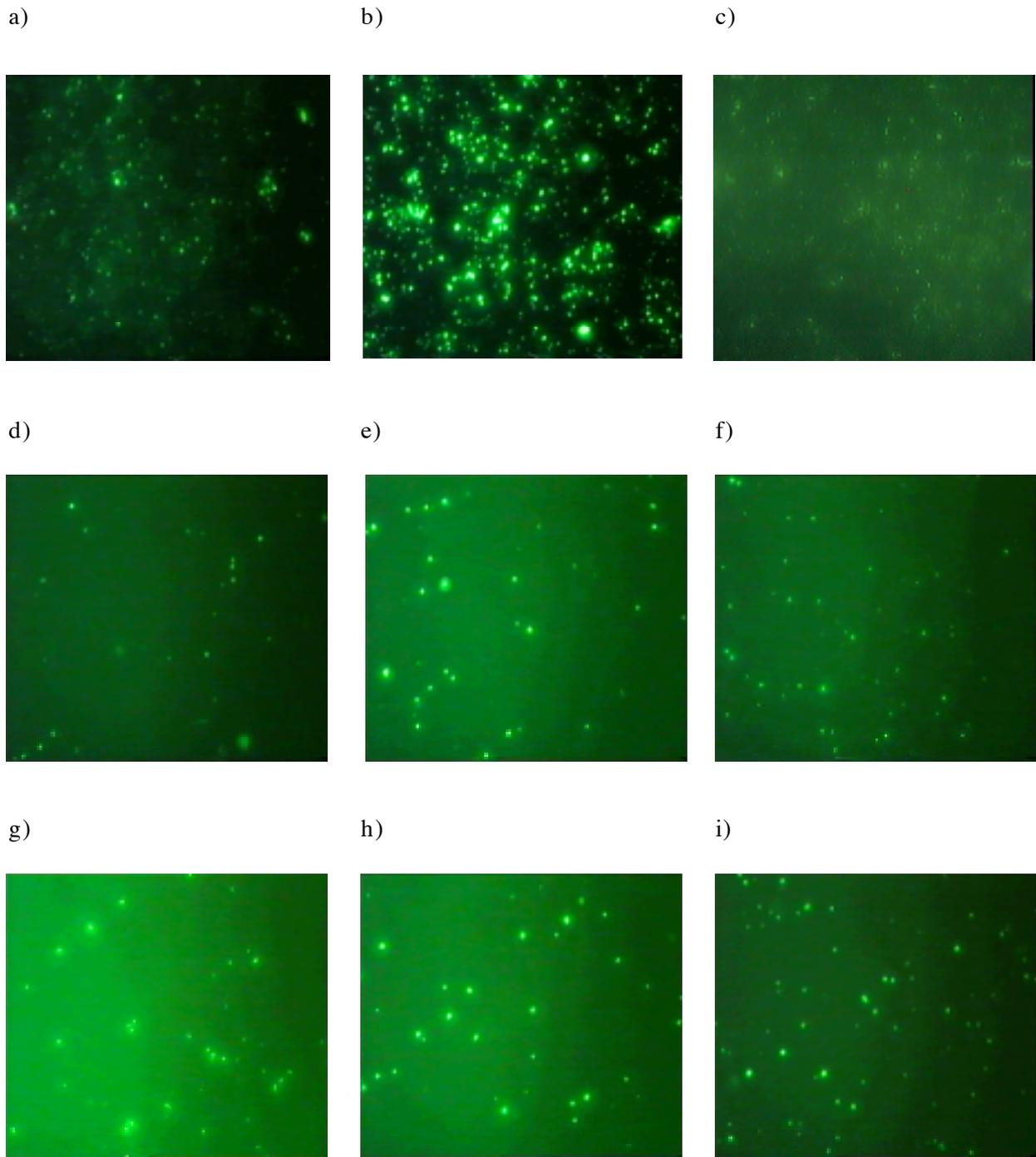


Abbildung 19

Verteilungsmuster der Adhäsion von Lipoplexen und Polyplexen auf Atemwegszellen (16 HBE 140-). Lipofectamine-Lipoplexe unbeeinflusst (a) und unter Einfluss von Alveofact (b) oder Exosurf (c). PEI-Polyplexe unbeeinflusst (d) und unter Einfluss von Alveofact (e) oder Exosurf (f). Dendrimer-Polyplexe unbeeinflusst (g) und unter Einfluss von Alveofact (h) oder Exosurf (i). Vergrößerung: 63x Objektiv.

Abbildung 20 zeigt die Adhäsion von Lipoplexen auf Atemwegszellen. Dem Fluoreszenzbild wurde das lichtmikroskopische Bild unterlegt, um die Größenverhältnisse und das Verteilungsmuster detailliert darzustellen. Die Lipoplexe waren über das gesamte mit Zellen bedeckte Areal verteilt.

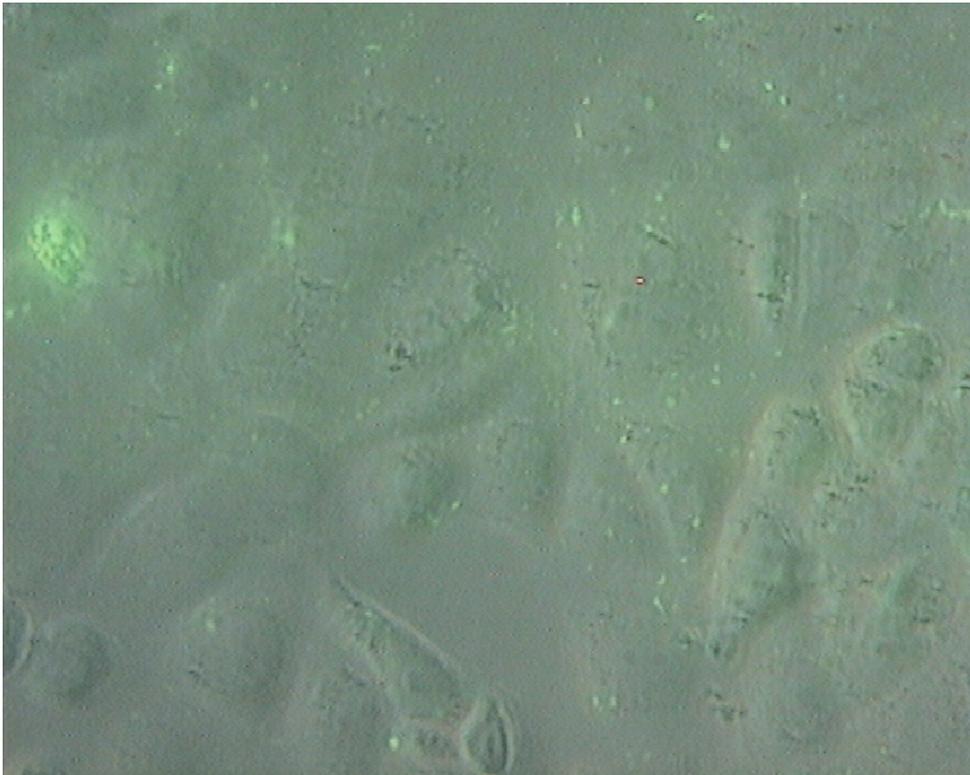


Abbildung 20

Verteilungsmuster der Adhäsion von Lipoplexen auf Atemwegszellen (16 HBE 14o-). Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lipoplexe ist der lichtmikroskopischen Abbildung der Zellen überlagert. Vergrößerung: 40x Objektiv.

4.2. Quantitative Messung des Einflusses von Surfactant auf die Adhäsion kationischer Genvektorkomplexe

Neben der Art der Verteilung der Genvektorkomplexe auf den Zielzellen ist die Menge des adhärenen Materials von Interesse. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter DNA wurde eine quantitative Analyse der Adhäsion von Lipoplexen und Polyplexen auf Atemwegszellen durchgeführt. Weiterhin wurde ermittelt, welchen Einfluss Surfactant auf die Adhäsion der Genvektorkomplexe hat. Genvektorkomplexe, zuvor mit Alveofact, Exosurf, POPG oder HBS inkubiert, wurden auf Atemwegszellen (16HBE14o-) gegeben. Nach 15 min. wurde durch Spülen nicht adhärenes Material entfernt (vergl. Kap. 4.1). Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Fluoreszenzmultifunktionsreader vermessen. Das zu vermessende Areal wurde gescannt und die mittlere Intensität der Fluoreszenz errechnet. Um die Intensitäten vergleichen zu können, wurden die Messwerte bezüglich des Quenching normiert.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, wurde der Einfluss von Surfactant auf die Adhäsion von Lipoplexen und Polyplexen bestimmt. Als Kontrollgruppe diente die Bestimmung der Adhäsion der Genvektorkomplexe die mit HBS inkubiert wurden. Zudem spiegeln diese Experimente das unbeeinflusste Adhäsionsverhalten der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche wieder.

Die stärkste Adhäsion wurde unter den Versuchsbedingungen für PEI-Polyplexe beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass PEI-Polyplexe im Kontrollexperiment mit HBS um den Faktor 2,7 stärker an die Zelloberfläche adhäreren als Lipoplexe. Im Vergleich zu Dendrimer-Polyplexen ist die Adhäsion sogar um den Faktor 4,1 höher.

Zu signifikanten Änderungen der Fluoreszenz des adhärenen Materials kam es nach Zugabe von Alveofact (125 $\mu\text{g/ml}$) bzw. POPG (180 μM). Die Adhäsion von Lipoplexen nahm nach Zugabe von Alveofact im Vergleich zum Kontrollexperiment mit HBS um den Faktor 8,4 ab. Ebenfalls stark reduziert wurde die Menge adhärenter Lipoplexe durch Zugabe von POPG, hier jedoch nur um den Faktor 5,6. Polyplexe wurden durch die Zugabe von Alveofact bzw. POPG ebenfalls beeinflusst, jedoch in einer geringeren Masse. PEI-Polyplexe zeigten einen Rückgang der Adhäsion durch Alveofact um weniger als die Hälfte (Faktor 1,6), POPG reduzierte die Adhäsion um den Faktor 3,2. Die Reduktion der Adhäsion von Dendrimer-Polyplexen durch Alveofact bzw. POPG lag bei Faktor 2,5 bzw. 2,3.

Bei Zugabe von Exosurf in einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ erreichten alle getesteten Genvektorkomplexe gleiche Intensitäten wie unter Bedingungen mit HBS.

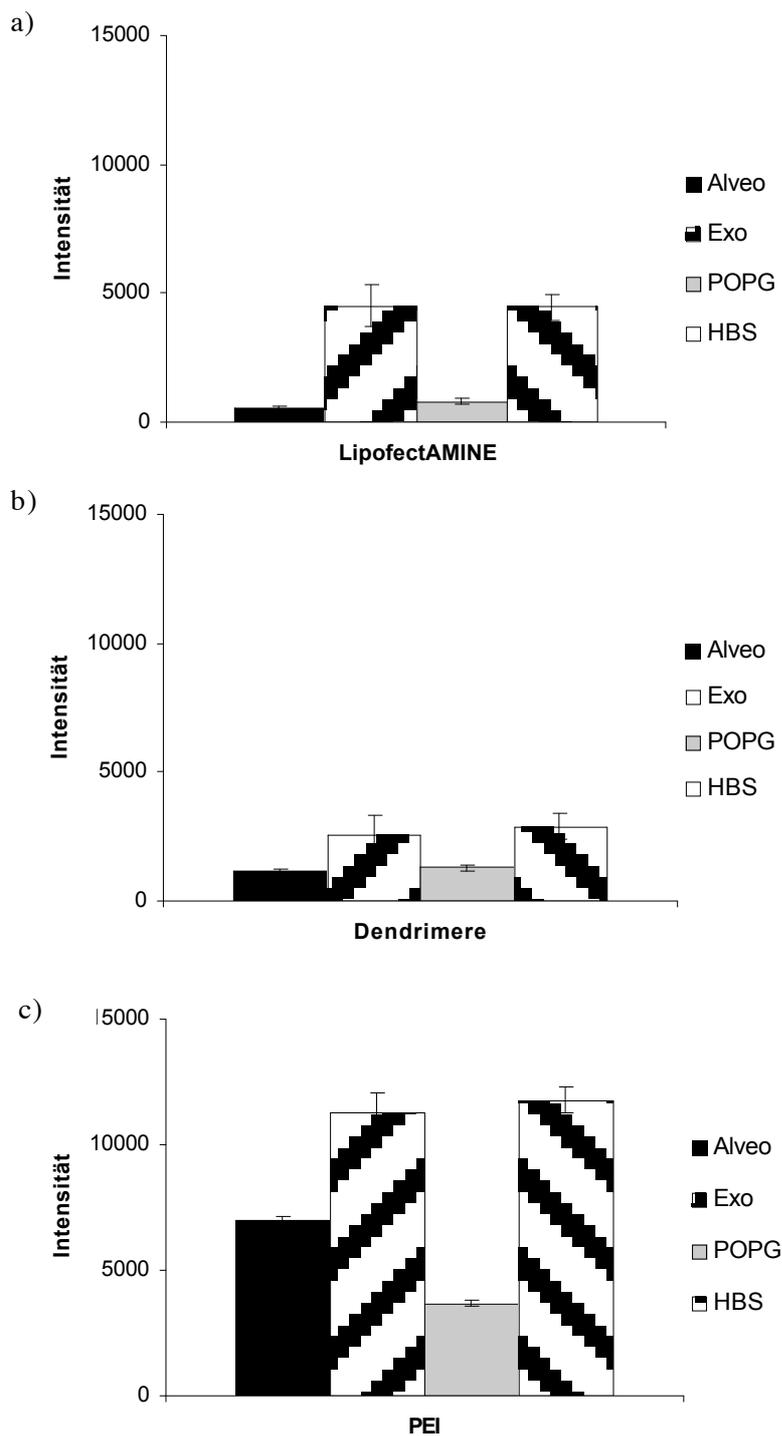


Abbildung 21

Adhäsion von Lipofectamine-Lipoplexen (a), Dendrimer-Polyplexen (b) und PEI-Polyplexen (c). Nativ (HBS) und nach Zugabe von Alveofact, Exosurf oder POPG. Dargestellt ist der Vergleich der Fluoreszenzintensität, auf Quenching normiert.

5. Magnetofektion

5.1. *Anreicherung und Adhäsion von Magnetofectins auf Atemwegszellen*

Die Sedimentierungseigenschaften der Magnetofectins und ihre Fähigkeit zur Adhäsion an Atemwegszellen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Als Vergleich dienten die bereits untersuchten Polyplexe, deren Sedimentierungs- und Adhäsionseigenschaften bereits in den vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit dargestellt wurden. Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurde die DNA mit TOTO-1 markiert. Transfektionsansätze mit Magnetofectins wurden für 15 min. Ansätze mit Polyplexen für 15 min. bzw. 4 Stunden auf den Atemwegszellen (16 HBE 14o-) inkubiert und anschließend zweimalig vorsichtig gespült um nicht adhärenente Komplexe zu entfernen.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde der Anteil adhärenter PEI-Polyplexe nach Inkubationszeiten von 15 Minuten und 4 Stunden dem Anteil adhärenter Magnetofectins mit und ohne Einfluss des Magnetfeldes nach 15 Minuten gegenübergestellt (Abbildung 22). Nach 4 Stunden Inkubationszeit zeigen PEI-Polyplexe ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal verglichen mit einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten. Wurden die Magnetofectins für einen Zeitraum von 15 Minuten auf den Zellen inkubiert, ohne dass ein Magnetfeld angelegt wurde, war eine ein Fluoreszenzsignal in vergleichbarer Höhe zu beobachten, wie bei PEI-Polyplexen nach 15 minütiger Inkubationszeit. Dagegen konnte ein sehr starkes Fluoreszenzsignal gemessen werden, wenn Magnetofectins für 15 Minuten unter Einfluss eines Magnetfeldes auf den Zellen inkubiert wurden.

Um die Wertigkeit dieser Ergebnisse weiter zu festigen, wurden die Experimente in gleicher Weise mit einem weiteren kationischen Polymer, den Dendrimer-Polyplexen, durchgeführt. Hier wurde durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 15 Minuten auf 4 Stunden ein Anstieg der Adhäsion der Polyplexe um den Faktor 5 beobachtet.

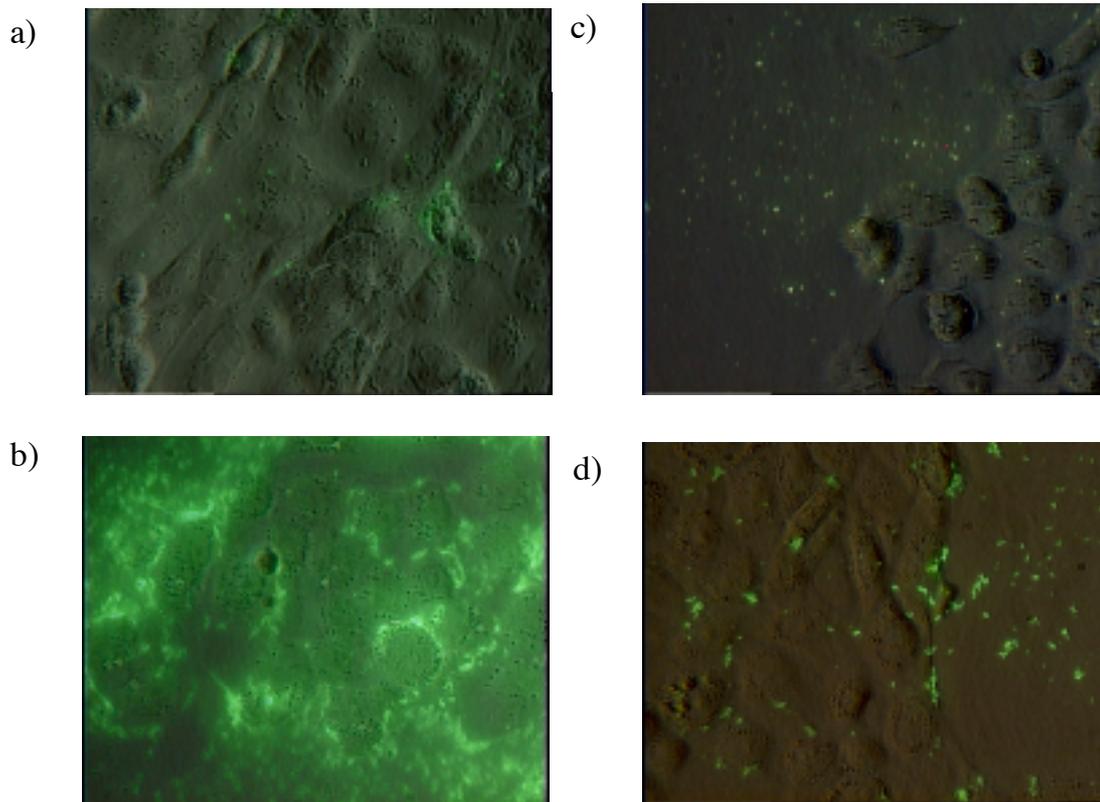
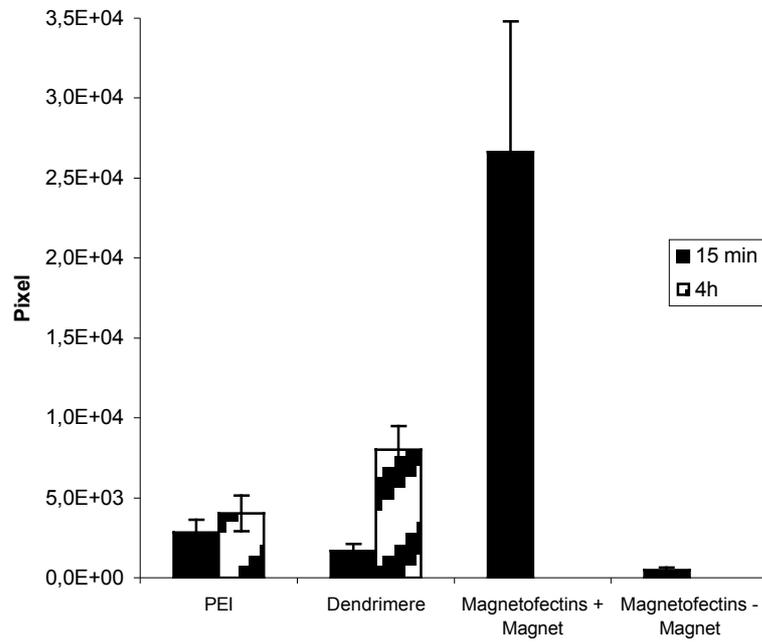


Abbildung 22

Verteilungsmuster der Adhäsion von Magnetofectins ohne (a) und mit Einfluss eines Magnetfeldes (b) nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten. Im Vergleich Adhäsion von PEI-Polyplexen nach 15 Minuten (c) und 4 Stunden (d).

Um die Gültigkeit dieser Beobachtungen zu überprüfen, wurde eine Analyse der oben dargestellten Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware durchgeführt (Abbildung 23). Die mit fluoreszierenden Partikeln bedeckte Fläche wurde gemessen und die Messwerte in Pixel aufgetragen. Die Adhäsion von PEI-Polyplexen nahm um den Faktor 1,5 zu, wenn die Inkubationszeit von 15 Minuten auf 4 Stunden verlängert wurde. Die Adhäsion von Magnetofectins unter Einfluss des Magnetfeldes war um den Faktor 50 höher verglichen mit der Adhäsion von Magnetofectins ohne Magnetfeld ($p < 0,05$). Die Anreicherung von Genvektorkomplexen mit Hilfe der Methodik der Magnetofektion nach einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten war deutlich höher als sie mit PEI-Polyplexe nach 4 Stunden erreicht wurde.

**Abbildung 23**

Quantitative Auswertung der Adhäsion von PEI-Polyplexen im Vergleich zu Magnetofectins mit und ohne Magnet (siehe Abb. 21). Dargestellt ist die von fluoreszierenden Partikeln bedeckte Fläche in Pixel.

Um den Nachweis zu führen, dass die Magnetofectins ebenso wie freies PEI selbst die Fähigkeit besitzen, DNA zu kondensieren, wurde ein Quenching Assay. Abbildung 24 zeigt die relative Fluoreszenz von Magnetofectins mit unterschiedlichen N/P-Verhältnissen (Stickstoff/Phosphat-Verhältnissen). Die relative Fluoreszenz der Magnetofectins beträgt, unabhängig vom N/P-Verhältnis, 5-6, d.h. die Fluoreszenzintensität wurde um 95% gequenchet. Im Vergleich zu den zuvor untersuchten nichtviralen Genvektorkomplexen (siehe Kapitel 3.1) wurde die DNA in den Magnetofectins ebenso stark kondensiert, wie dies für Lipoplexe und Polyplexe der Fall ist.

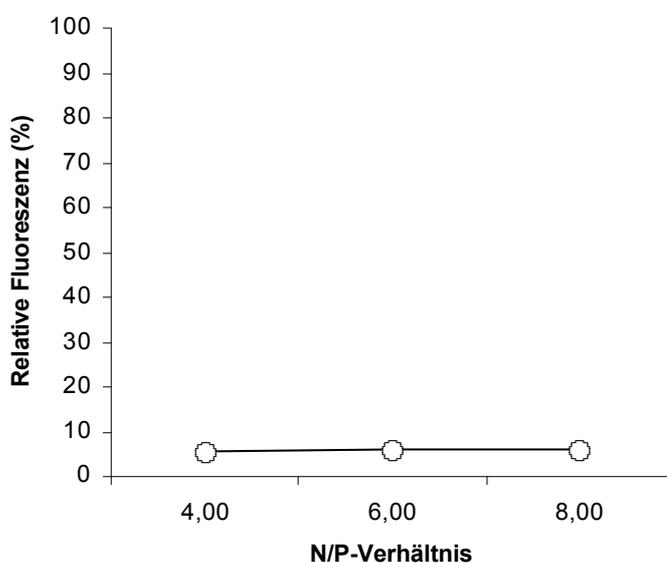


Abbildung 24

Relative Fluoreszenz (%) der DNA-TOTO markierten DNA im Komplex mit transMAG-PEI und freiem PEI (Magnetofectins). Der Messwert ist auf die Fluoreszenz freier TOTO-1 markierter DNA normiert.

5.2. Vergleich der Effizienz der Magnetofektion mit der Gentransfereffizienz von Lipoplexen und Polyplexen

Im Vorstehenden wurde das Adhäsionsverhalten der Magnetofectins dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die DNA mit Hilfe der Magnetofektion an der Zelloberfläche effizient anreichern läßt. Im Folgenden wurde ermittelt, ob die Methodik der Magnetofektion auch eine Erhöhung des Gentransfers im Vergleich zum Gentransfer mit anderen nichtviralen Genvektoren ermöglicht.

Zunächst wurde evaluiert, welche Mischungsverhältnisse in Bezug auf die Zusammensetzung der Magnetofectins die besten Transfektionsraten zur Folge haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektionsraten für Magnetofectins mit einem Anteil von 2 μg transMAG-PEI pro 1 μg DNA etwas höher lagen als für einen Anteil von 1 μg transMAG-PEI. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 25). Für ein N/P-Verhältnis von 6 wurden maximale Transfektionsraten gemessen (Abbildung 26). Für die weiteren Versuche wurde deshalb die Verwendung von Magnetofectins mit 2 μg transMAG-PEI pro 1 μg DNA und einem N/P-Verhältnis von 6 als Standard festgelegt.

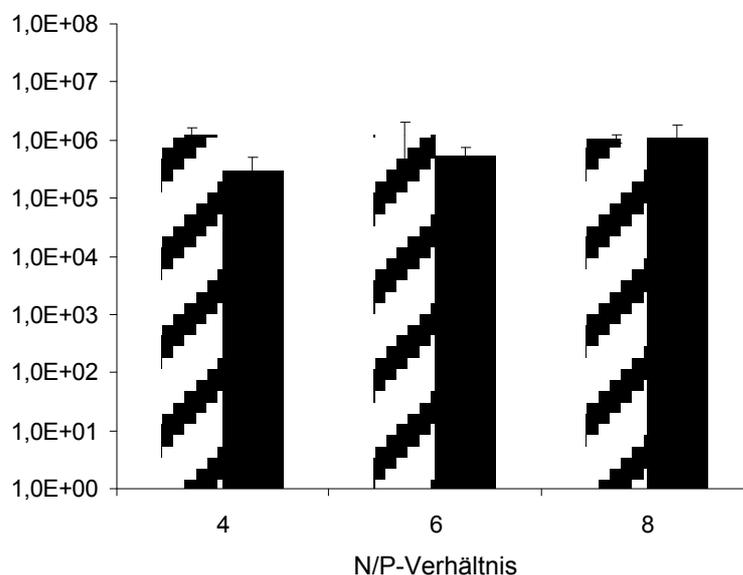


Abbildung 25

Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen mit 1 μg und 2 μg transMAG-PEI pro μg DNA in Abhängigkeit des N/P-Verhältnis. Inkubationszeit 15 min. unter Einfluss eines Magnetfeldes.

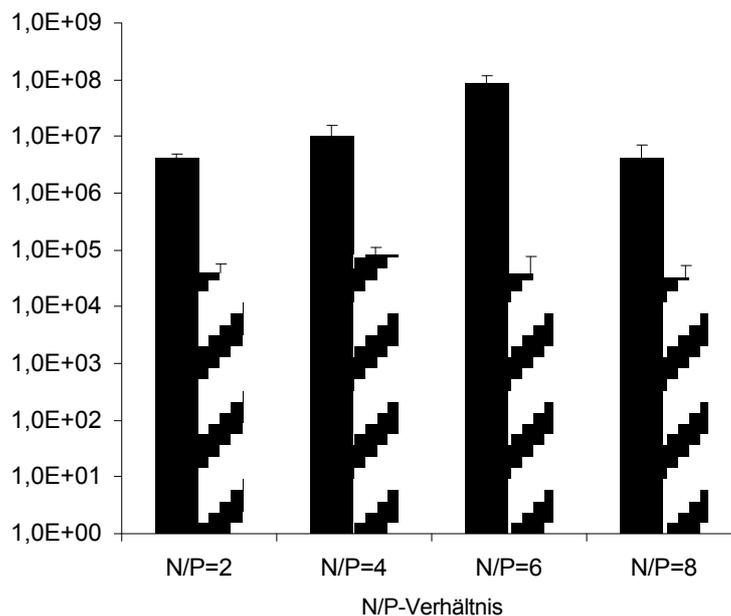


Abbildung 26

Transfektion von 16 HBE 14 o- Zellen mit 2 μg transMAG-PEI in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis. Inkubationszeit 15 min. mit oder ohne Einfluss eines Magnetfeldes.

Die Magnetofektion unter Einfluss eines Magnetfeldes wurde der Transfektion mit anderen nichtviralen Genvektorsystemen, bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten für alle Genvektorsysteme, gegenübergestellt (Abbildung 27). Die Magnetofektion zeigte eine 400fach höhere Transfektionsrate als dies bei Polyplexen der Fall war. Die Transfektionseffizienz von Lipoplex vermitteltem Gentransfer war sogar um den Faktor 2500 geringer als die der Magnetofektion.

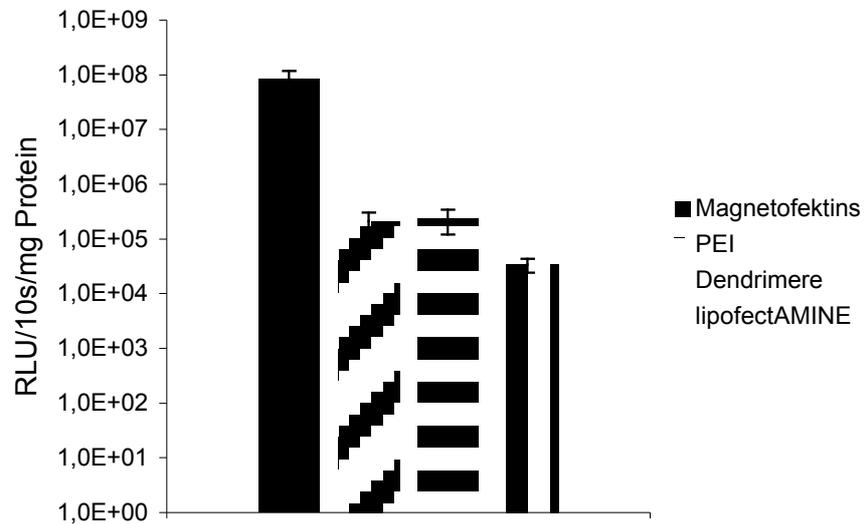


Abbildung 27

Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen mit Magnetofektins (1 μ g transMAG pro 1 μ g DNA) mit Magnet im Vergleich zu Lipofectamine, Dendrimer oder PEI vermitteltem Gentransfer. Inkubationszeit 15 Minuten.

5.3. Dosis-Wirkungs-Beziehung der Magnetofektion im Vergleich zur Polyfektion

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Magnetofektion verglichen mit Polyfektion bei definierter Menge an DNA eine höhere Effizienz aufweist. Folglich wurde eine ebenfalls bessere Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Magnetofektion erwartet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellen mit abnehmenden Mengen an Genvektorkomplexen, d.h. abnehmenden Mengen an DNA, inkubiert. Magnetofektion wurde unter Anlegen eines Magnetfeldes über 15 Minuten durchgeführt, während die Transfektion mit PEI-Polyplexen zu den standardisierten Bedingungen über 4 Stunden durchgeführt wurden. Die Messergebnisse wurden auf gleiche Bedingungen mit 1 μg DNA normiert. Die Transfektion mit maximaler Menge an DNA führte auch zu den höchsten Transfektionsraten (Abbildung 28). Bei abnehmendem Gehalt an DNA im Transfektionsansatz nimmt die Transfektionsrate für Polyplexe schnell ab, während der Abfall der Transfektionsrate bei der Magnetofektion weniger stark ausgeprägt ist.

Um den Einfluss des Magnetfeldes bei der Magnetofektion zu ermitteln, wurde die Magnetofektion mit und ohne der Anlage eines Magnetfeldes durchgeführt. In Abbildung 28 sind dazu die Transfektionsraten der Magnetofektion mit und ohne Magnetfeld bei abnehmenden Mengen an Magnetofectins dargestellt. Die Anlage eines Magnetfeldes führte zu einer drastischen Zunahme der Transfektion. Dieser Effekt war um so ausgeprägter, je höher die Menge an eingesetzten Magnetofectins war. Bei Transfektion mit einer Dosis an Magnetofectins die 1 μg DNA entspricht liegt die Magnetofektion mit Magnetfeld um 2 Größenordnungen über derjenigen ohne Magnetfeld.

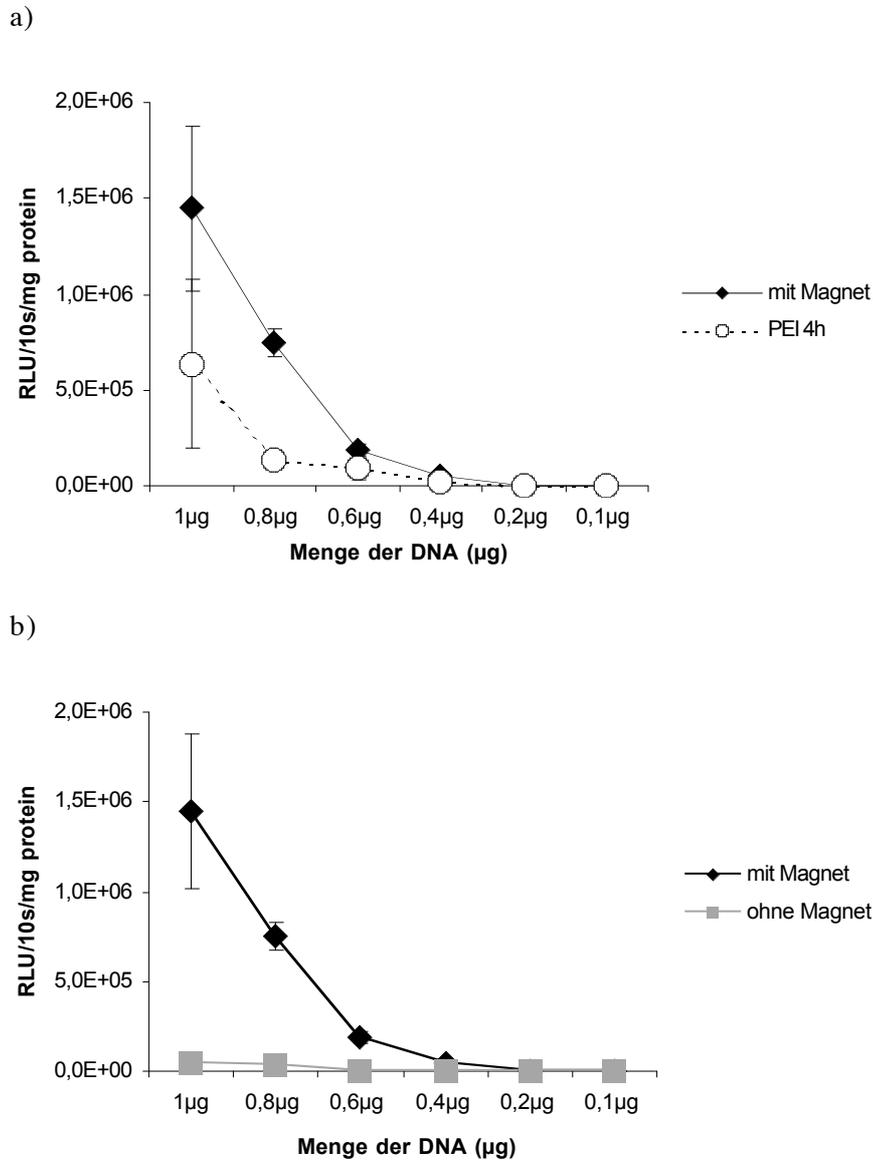


Abbildung 28

Dosis-Wirkungs-Beziehung der Magnetofektion bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Vergleich zur Polyfektion (PEI) bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden (a). Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Magnetofektion bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit und ohne Magnet. (b).

5.4. Zeitaufgelöste Darstellung der Magnetofektion im Vergleich mit Polyfektion

Mit Hilfe einer zeitaufgelösten Darstellung der Magnetofektion im Vergleich zur Polyfektion wurde die Korrelation zwischen Inkubationszeit und Transfektionseffizienz ermittelt.

Nach bereits 5 Minuten wurde bei der Magnetofektion effizienter Gentransfer beobachtet (Abbildung 29). Hohe Transfektionsraten konnten nach 15 Minuten Inkubationszeit für die Magnetofektion gemessen werden. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 4 Stunden konnten keine signifikante Steigerung der Transfektionsraten für Magnetofektion erreicht werden. PEI-Polyplex vermittelter Gentransfer zeigt bei Inkubationszeiten bis zu 15 Minuten hingegen keine ausreichenden Transfektionsraten. Bei der Durchführung der Polyfektion mit der standardmäßigen Inkubationszeit von 4 Stunden zeigte sich jedoch ein starker Anstieg der Transfektionsrate.

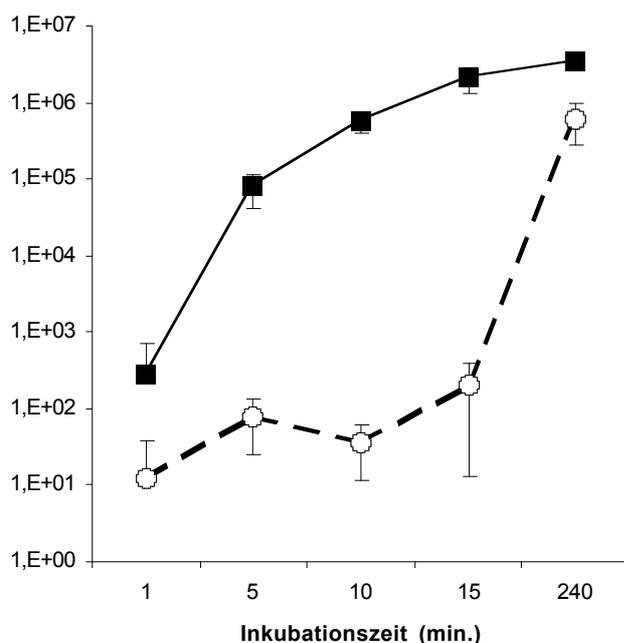


Abbildung 29

Zeitaufgelöste Darstellung der Transfektionseffizienz von Magnetofectins ($2 \mu\text{g}$ transMAG-PEI pro $1 \mu\text{g}$ DNA) unter Einfluss eines Magnetfeldes im Vergleich zur PEI-Polyfektion.

5.5. *Magnetofektion von Atemwegszellen*

Die Wirksamkeit der Methodik der Magnetofektion sollte nun unter Bedingungen untersucht werden, die dem Gentransfer *in vivo* näher kommen. Hierzu wurde die Magnetofektion an immortalisierten und primären Atemwegszellen durchgeführt. Die Primärzellkulturen wurden aus der Trachea frisch getöteter Schweine (PPAE-Zellen) und aus menschlichem Lungengewebe, das von therapeutischer Resektionen stammt, gewonnen.

Die Darstellung in Abbildung 30 vergleicht die Magnetofektion, mit und ohne Applikation eines Magnetfeldes durchgeführt, mit der Polyfektion mit PEI-Polyplexen. Bei der Transfektion von immortalisierten Atemwegszellen (16 HBE 14o-) und von PPAE-Zellen waren die Transfektionsraten jeweils gleich hoch für Magnetofektion mit Magnet und Polyfektion. Die absolute Höhe des Gentransfers war für PPAE-Zellen um den Bereich einer Größenordnung geringer verglichen mit der Transfektion von 16 HBE 14o- Zellen. Noch weiter reduziert war die absolute Höhe des Gentransfers an primären menschlichen Atemwegszellen. Hier lag die Transfektionseffizienz der Magnetofektion höher als die der Polyfektion. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Überlegenheit der Magnetofektion mit Magnet gegenüber der Magnetofektion ohne Magnet bei stärker differenzierten Zelllinien zunahm. Magnetofektion ohne Magnet zeigte für alle getesteten Zelllinien signifikant geringere Transfektionsraten ($p < 0,05$).

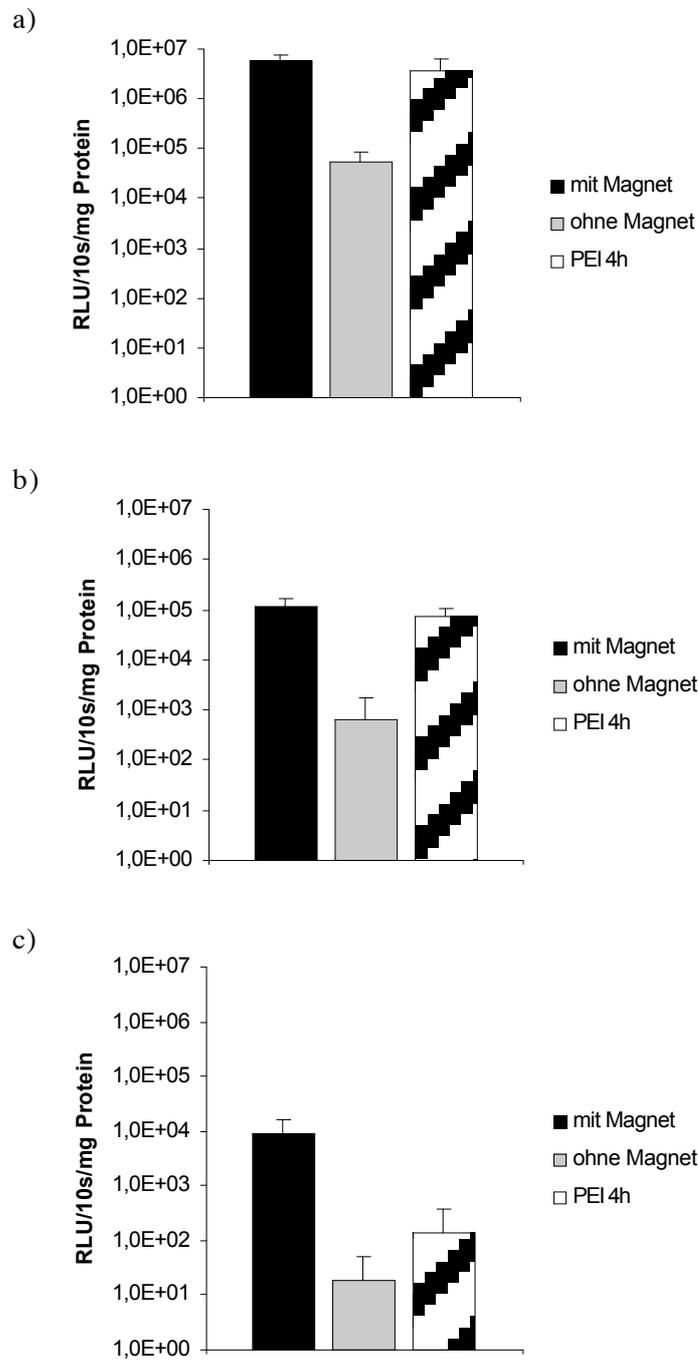


Abbildung 30

Transfektion von Atemwegesepithelzellen: Immortalisierte Zellen (16 HBE 14o-; a), Primärzellkultur aus Schweinetrachea (PPAE; b) und Primärzellkultur aus menschlichen Atemwegesepithelien (c). Vergleich der Magnetofektion mit und ohne Magnet (15 min. Inkubation) mit PEI-Polyplex vermitteltem Gentransfer (4 Stunden Inkubation).

5.6. Elektronenmikroskopie von Magnetofectins: Anreicherung der Partikel und Aufnahme in die Zelle

Magnetofektion führte zu einer schnelleren Anreicherung der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche und erzielte nach einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten vergleichbare Transfektionsraten wie bei der Polyfektion nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten wurde nun die Anreicherung und Aufnahme der Magnetofectins in Zellen genauer untersucht. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde am Beispiel einzelner Zellen – an einer immortalisierten Zelllinie (Hela-Zellen) und am intakten Atemwegsepithel (vom Schwein) – die Prozesse der Anreicherung und Aufnahme verfolgt. Da die Magnetofectins supraparamagnetische Nanopartikel aus elektronendichtem Eisenoxid enthalten, war keine weitere Markierung der Partikel für die Elektronenmikroskopie nötig. Es sind jedoch nur die supraparamagnetischen Nanopartikel selbst nachweisbar. Eine Aussage über den Verbleib der DNA kann auf diese Weise nicht getroffen werden.

Hela-Zellen wurden in einer geringen Dichte ausgesät, um die Untersuchungen an einzeln liegenden Zellen durchführen zu können. Die Zellen wurden für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten mit Magnetofectins unter Einfluss eines Magnetfeldes inkubiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie fixiert (Abbildung 31). Nach 1 Minute werden nur vereinzelt Magnetofectins beobachtet, nach 5 Minuten Inkubation kam es jedoch bereits zur Anreicherung der Genvektorkomplexe an der Zelle. Diese Anreicherung konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 15 Minuten deutlich verstärkt werden. Hela-Zellen, die nach 15 Minuten Inkubation mit Magnetofectins für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden, hatten eine Vielzahl an Magnetpartikeln aufgenommen. Diese Partikel waren im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Bedingungen zu großen Konglomeraten aggregiert.

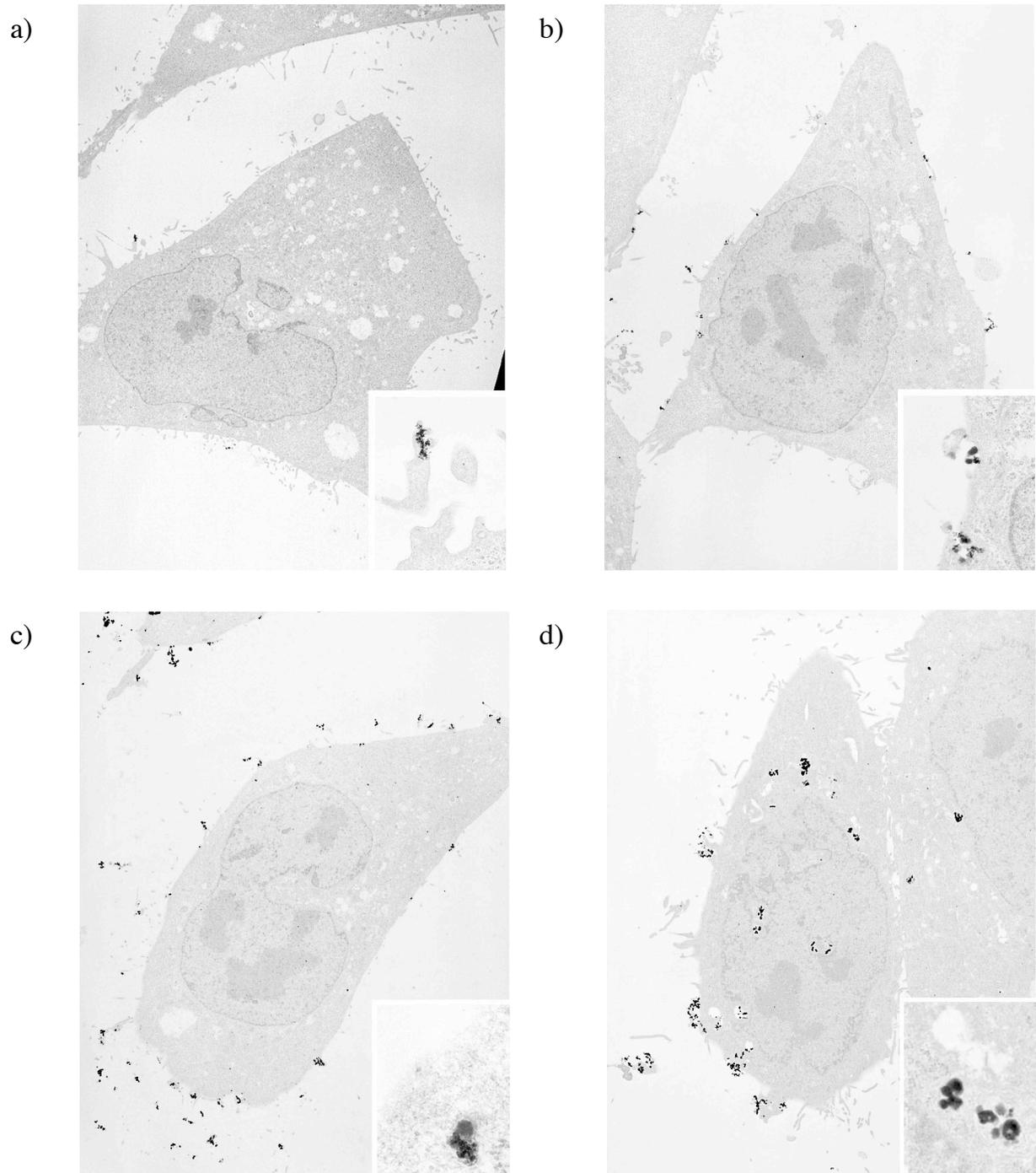


Abbildung 31

Anreicherung der Magnetofectins an HeLa-Zellen unter Einfluss eines Magnetfeldes nach Inkubationszeiten von 1 Minute (a), 5 Minuten (b) und 15 Minuten (c). Aufnahme der Magnetofectins in HeLa-Zellen nach Inkubationszeit von 15 Minuten und anschließend 24 Stunden Inkubation bei 37° C (d).

Intakte Atemwegsepithelien weisen weit mehr extrazelluläre Barrieren für den Gentransfer auf, als dies bei lockeren Zellverbänden wie den Hela-Zellen der Fall ist (siehe Kapitel 1.3). Aus diesem Grund war es von Interesse, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen auch an Atemwegsepithelien durchzuführen. Das Epithel der Trachea von Schweinen wurde disseziert und in 5x5 mm großen Stücken auf Einsätze für Gewebekulturplatten gesetzt. Diese Einsätze ermöglichen es, das Epithel an einer Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche zu kultivieren. Durch diese weitgehend physiologischen Bedingungen behielt das Flimmerepithel seine Funktion bei und ein Zilienschlag konnte bis zu 36 Stunden nach der Präparation beobachtet werden. Abbildung zeigt ein natives Präparat des Atemwegsepithels vom Schwein.

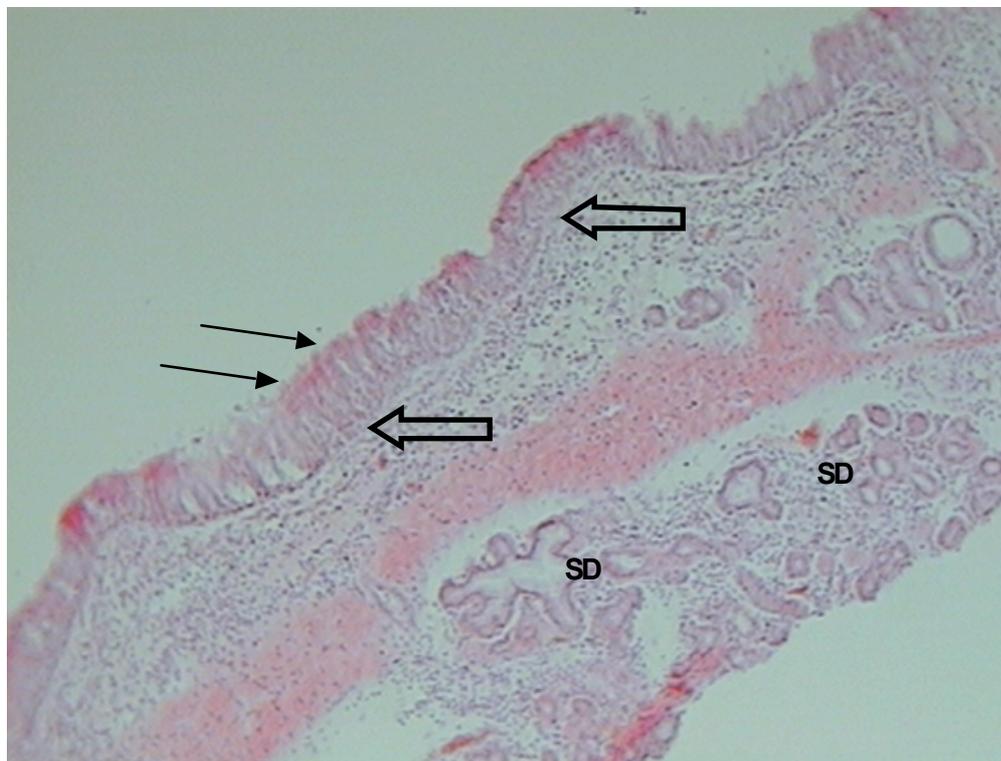
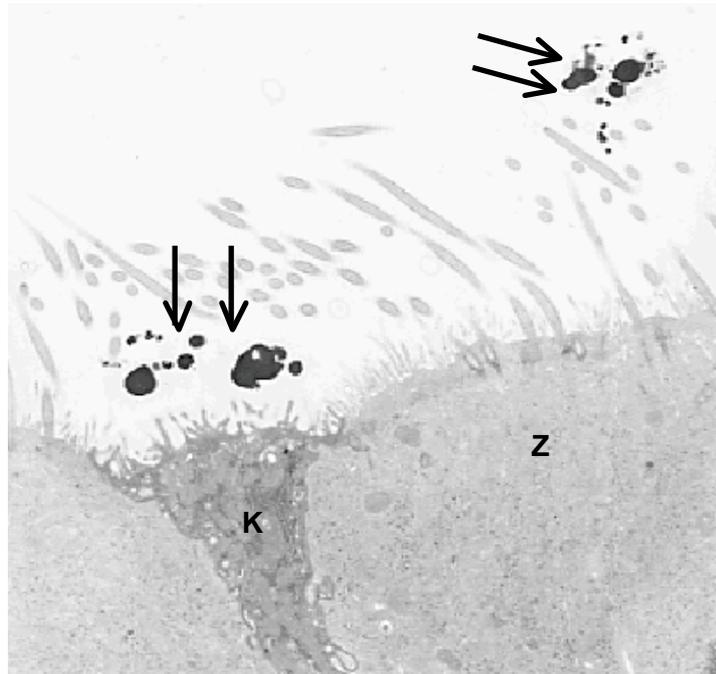


Abbildung 32

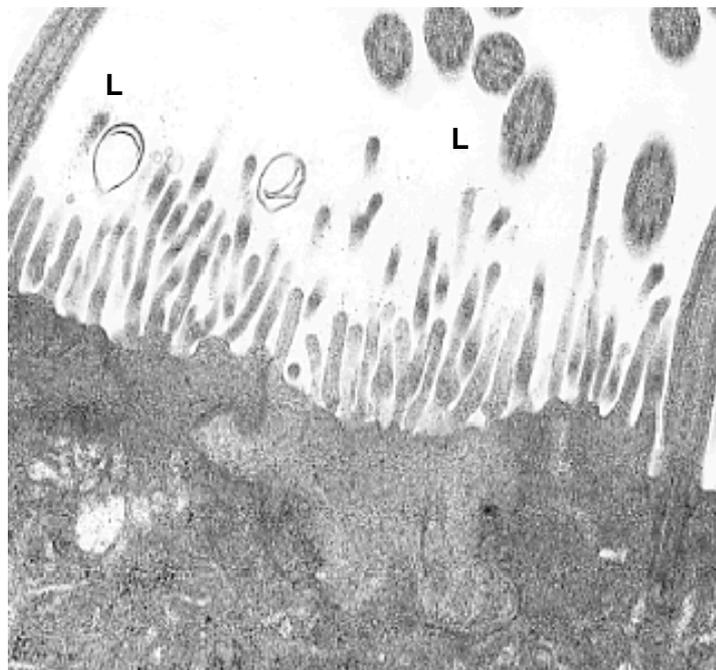
Atemwegsepithel der Trachea vom Schwein. Zylindrisches Epithel (□) mit Zilien (□). In der Submukosa liegen submukösen Drüsen (SD). HE-Färbung, 10x Objektiv.

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der Anreicherung der Magnetofectins am Atemwegsepithel wurden die Gewebestücke für 15 Minuten unter Anlegen eines Magnetfeldes mit Magnetofectins inkubiert. Nahe der luminalen Zelloberfläche waren Konglomerate von Magnetofectins zu beobachten, die im Bereich der Zilien gefangen zu sein schienen (Abbildung 33). Während über Zilien tragenden Zellen der direkte Kontakt mit der Zelloberfläche nicht beobachtet werden konnte, durchdringen die Magnetofectins die Lücke im dichten Zilienrasen über Klarazellen. Ebenfalls dargestellt ist die Kontrollgruppe ohne Magnetofectins. Hier sind in einer größeren Auflösung die dicht stehenden Zilien, im Längsschnitt und Querschnitt getroffen, zu sehen.

a)



b)

**Abbildung 33**

Elektronenmikroskopische Darstellung der Anreicherung der Magnetofectins an intaktem Atemwegsepithel vom Schwein (a). Kontakt der Magnetofectins (□) zur Zelloberfläche nur bei Zilienlücke über Klarazellen (K), keine Kontakt zur Zelloberfläche über den zilentragenden Zellen (Z). Vergrößerung 4.250fach. Kontrollgruppe ohne Magnetofectins, Zilien (L) in Längsschnitt und Querschnitt getroffen (b). Vergrößerung 16.750fach.

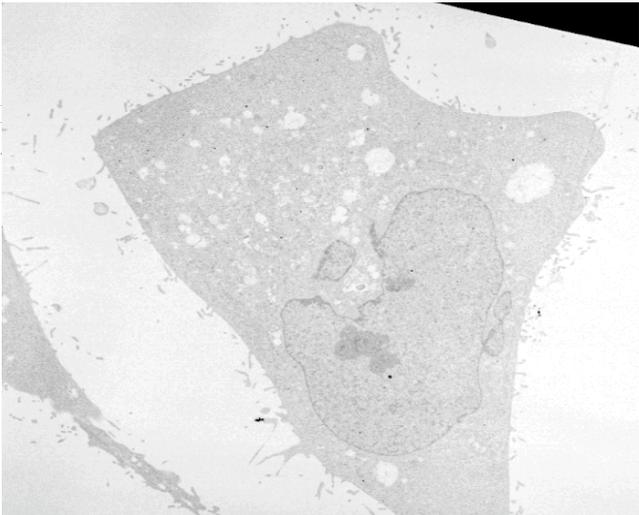
5.7. Elektronenmikroskopie von Magnetofectins: Nachweis der Aufnahme von DNA in Atemwegszellen

Die zuvor dargestellten Experimente zum elektronenmikroskopischen Nachweis der Aufnahme von Magnetofectins in die Zelle erlaubten lediglich die Beobachtung der supraparamagnetischen Nanopartikel. Von Interesse war jedoch auch das Schicksal der DNA als zu transportierendes Agens selbst. Um dies zu untersuchen, wurde die DNA mit elektronendichten Goldpartikeln markiert. Analog zum Experiment aus Abbildung 31 wurde die Magnetofektion von HeLa-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten mit Magnetofectins unter Einfluss eines Magnetfeldes inkubiert und für die Elektronenmikroskopie fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten waren bereits eine Vielzahl von elektronendichten Partikeln zu beobachten, die sich an der Zelloberfläche anreicherten (Abbildung 34). Unter diesen Partikeln waren sowohl die elektronendichten Eisenoxidanteile der Magnetofectins zu identifizieren, als auch die mit Gold markierte DNA. Wurde die Inkubationszeit auf 15 Minuten ausgedehnt, so war die Anreicherung der DNA an der Zelloberfläche deutlich erhöht. Wurde nach der Inkubationszeit von 15 Minuten mit Magnet noch eine 24 stündige Inkubation bei 37°C durchgeführt, konnte eine Aufnahme von DNA im Komplex mit dem Vektor in die Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 35). Im Zytosol der HeLa-Zellen befanden sich zahlreiche Komplexe, die teilweise zu großen Konglomeraten aggregiert waren. Eine Aufnahme der DNA in den Zellkern konnte unter keiner der getesteten Bedingungen nachgewiesen werden.

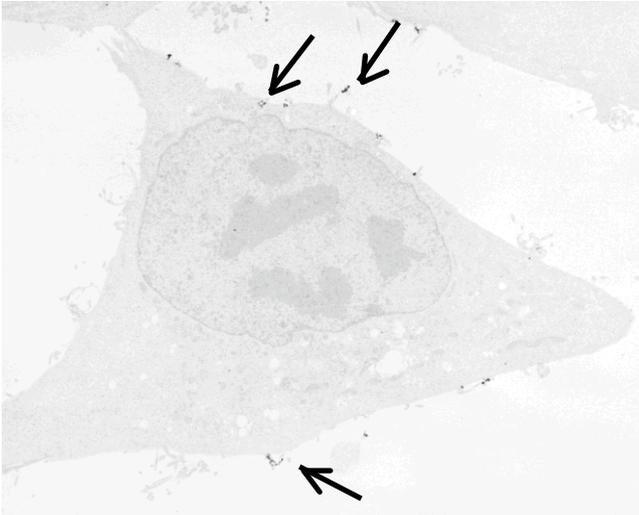
Abbildung 34 a)

Anreicherung der
Minuten (b) und 1

llen nach 1 Minute (a), 5



b)



c)



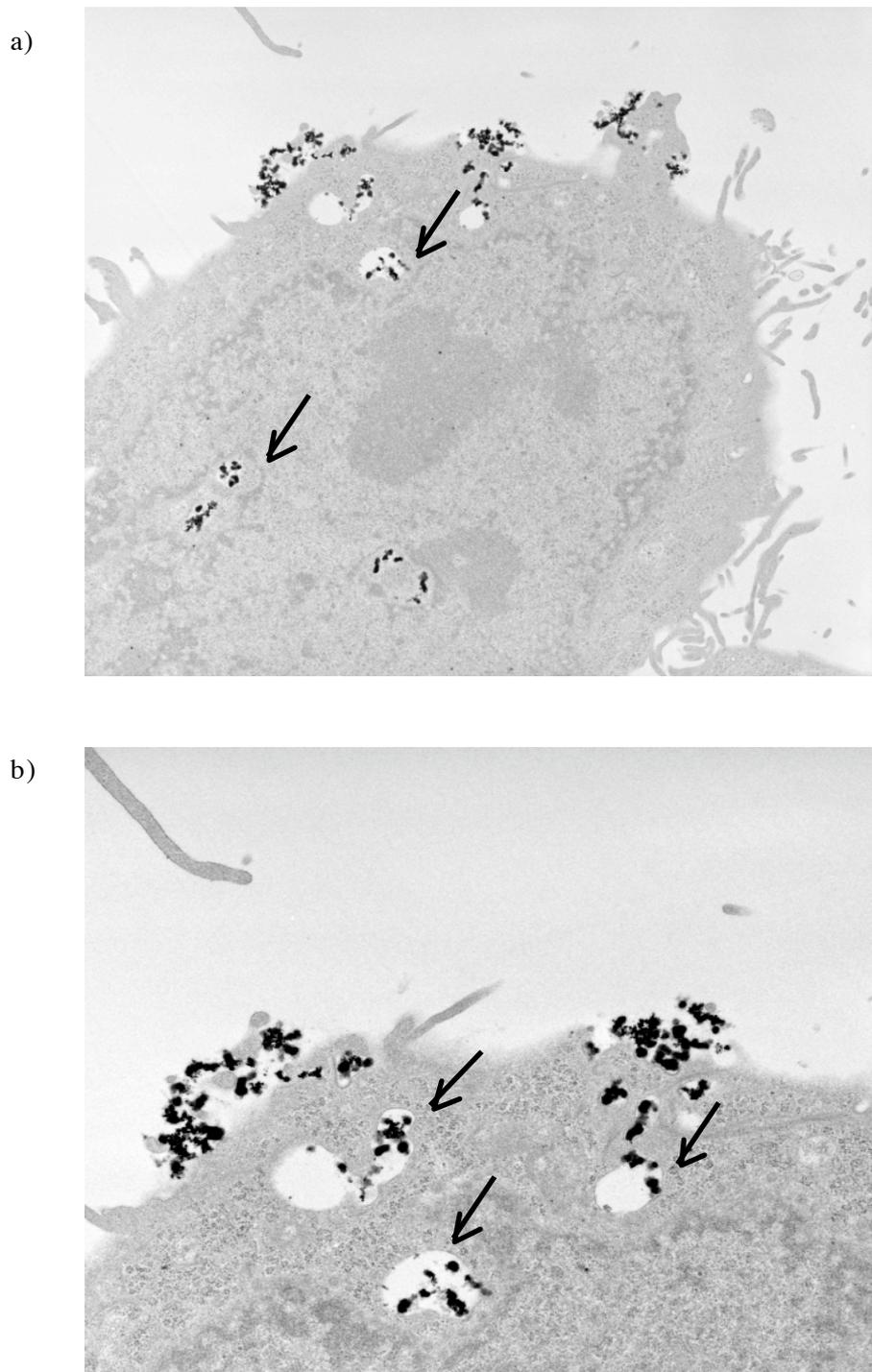


Abbildung 35

Elektronenmikroskopie der Aufnahme goldmarkierter DNA (□) der Magnetofectins in Hela-Zellen. Zellen wurden 15 Minuten mit Magnet inkubiert und anschließend weitere 24h bei 37°C inkubiert (a). Vergrößerung 6.200x (a). (b): Detail aus (a) digital um Faktor 3 vergrößert.

6. Diskussion

Duncan und Kollegen haben gezeigt, dass die Transfektionseffizienz von Lipoplexen in Anwesenheit von Surfactantlipiden und Surfactantproteinen stark abnimmt (Duncan, Whitsett et al. 1997). Eine genauere Aufschlüsselung des Einflusses von Surfactant auf den nicht-viralen Gentransfer wurde von Ernst et al. vorgenommen, die zeigen konnten, dass für die Reduktion der Transfektionseffizienz vor allem die anionischen Phospholipide des Surfactantpräparates verantwortlich sind. Transfektion mit ungeladenen oder neutral geladenen Phospholipiden führten hingegen zu keiner Reduktion des Gentransfers. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit extrazellulärer Faktoren untersucht, die auf die Genvektorkomplexe bei einer topischen Applikation in die Atemwege einwirken könnten. Es wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die biophysikalischen Eigenschaften der Genvektorkomplexe mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen untersucht. Aufbauend darauf wurde die Auswirkung dieser Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften auf die resultierende Gentransfereffizienz ermittelt.

Zunächst konnte in Fluoreszenz-Quenching-Assays gezeigt werden, dass die DNA in Lipoplexen und PEI-Polyplexen stark kondensiert wurde, während die Kondensierung der DNA in Dendrimer-Polyplexen und pLL-Polyplexen deutlich geringer ausgeprägt war. Hierbei wurde das Fluoreszenz-Quenching als Gradmesser der Kondensierung herangezogen.

Die Zugabe von Alveofact in einer maximalen Konzentration von $250\mu\text{g/ml}$ im Messansatz führte zu einer Reduktion des Fluoreszenz-Quenching von Lipoplexen auf annähernd den Ausgangswert. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Struktur der Lipoplexe durch Surfactant in stärkerem Maße beeinflusst wurde. Die Zugabe von Exosurf zu Lipoplexen führte hingegen zu keiner messbaren Strukturveränderung.

Diese bemerkenswerten Unterschiede in der Änderung des Quenching bei Zugabe der verschiedenen Surfactantpräparate sind möglicherweise auf den Gehalt von anionischen Phospholipiden im Alveofact (ca. 10%) zurückzuführen. Diese anionischen Phospholipide sind in Exosurf nicht enthalten. Alveofact ist ein Surfactant-Ersatzpräparat, das durch Auswaschung von Rinderlungen gewonnen wird. Es besteht aus zwitterionischen und anionischen Phospholipiden und den Surfactantproteinen B und C. Von humanem Surfactant unterscheidet es sich im wesentlichen durch das Fehlen der hydrophoben Surfactantproteine A und D. Exosurf ist ein synthetisch hergestelltes Präparat, das aus ungeladenen Phospholipiden (DPPC) besteht. Neben dem Fehlen der Surfactantproteine weist Exosurf im Vergleich zu Alveofact also auch keine anionischen Phospholipide auf. Dies legte den Schluss nahe, der inhibitorische Effekt von Alveofact beruhe auf der Anwesenheit der anionischen Phospholipide. Diese Theorie wurde gestützt durch das folgende Experiment: In Anwesenheit des anionischen Phospholipids POPG, ab einer Konzentration von $60\mu\text{M}$, nahm das Quenching der Lipoplexe stark ab. Der von

Ernst et al. ebenfalls beschriebene Einfluss von POPG auf die Transfektionseffizienz von Polyplexen findet im Fluoreszenz-Quenching-Assay keine Entsprechung (Ernst, Ulrichskotter, et al. 1999). Einzig bei Dendrimer-Polyplexen zeigte sich eine uneinheitliche, jedoch statistisch nicht signifikante Änderung des Kondensierungsgrades der DNA.

Um einen tieferen Einblick in die strukturellen Veränderungen der Komplexe unter Einfluss von Surfactant zu gewinnen, wurde die räumliche Nähe von DNA zu Vektormolekül im Komplex mit Hilfe des FRET untersucht. Die Abnahme des gemessenen FRET kann als Gradmesser der Zunahme des Abstandes zwischen DNA und Vektormolekül herangezogen werden. Es zeigte sich, dass die beobachtete Änderung des Kondensierungsgrades der DNA im Lipoplex unter Einfluss von Alveofact oder anionischem Phospholipid einher geht mit einer Abnahme des FRET und folglich mit einer Zunahme des Abstandes zwischen DNA und Vektor. Lipoplexe werden also in ihrem Strukturverband durch Alveofact und anionische Phospholipide stark aufgelockert, wenn nicht gar zerstört.

Dendrimer-Polyplexe zeigten im Fluoreszenz-Quenching-Assay in Anwesenheit von Surfactant oder anionischem Phospholipid keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität. Dies zeigt, dass sich durch Zugabe von Alveofact, Exosurf oder POPG der Kondensationsgrad der DNA im Komplex mit Dendrimeren nicht ändert. Interessanterweise zeigte sich jedoch in Anwesenheit höherer Konzentrationen an anionischem Phospholipid eine Abnahme des FRET. Dies zeigt eine Änderung der inneren Struktur der Dendrimer-Polyplexe unter diesen Bedingungen. Der Strukturverband der Dendrimer-Polyplexe wurde also aufgelockert, ohne dass dadurch der Kondensierungsgrad der DNA beeinflusst wurde. PEI-Polyplexe hingegen erwiesen sich als unempfindlich gegenüber allen getesteten Surfactantpräparaten bzw. anionischen Phospholipiden, sowohl im Fluoreszenz-Quenching-Assay als auch beim FRET.

Die untersuchten Komplexe weisen sämtlich positive Ladungsverhältnisse auf (Lipofectamine 10; Dendrimer 2,3 und PEI 5,4). Die Tatsache, daß Interaktionen zwischen Komplexen und Surfactant nur bei Anwesenheit von negativ geladenem Lipid nachgewiesen wurden, läßt vermuten, daß es sich bei diesen Interaktionen vor allem um ladungsbedingte Effekte handelt. Für Lipoplexe läßt die Zunahme des Abstandes zwischen DNA und Liposom bei Zugabe von Surfactant eine Fusion der Surfactantlipide mit den kationischen Lipiden vermuten. Dies stünde im Einklang mit der beobachteten Größenzunahme von Lipoplexen bei Zugabe von Surfactant.

In Transfektionsexperimenten von Rosenecker und Kollegen (Rosenecker, Naundorf et al. 2002) zeigte sich eine Reduktion der Gentransfereffizienz für Lipoplexe und Polyplexe durch Zugabe von BALF. Bei genauerer Analyse des Einflusses der einzelnen Komponenten der BALF wie Mucin, Glykoprotein und Albumin, wurde ein deutlicher Effekt von Glykoprotein und Mucin auf Polyplex vermittelten Gentransfer gezeigt. Lipoplex vermittelter Gentransfer wurde durch Zugabe von Mucin und Albumin inhibiert.

Um zu klären wodurch die Beeinflussung zustande kam, wurde zunächst bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit in ihrer Wechselwirkung mit den Genvektorkomplexen getestet.

Es zeigte sich keine Veränderung des Kondensierungsgrades der DNA in den Genvektorkomplexen in Anwesenheit von BALF in dem von Rosenecker und Kollegen verwendeten Konzentrationsbereich. Erst bei Zugabe hoher Konzentrationen der BALF, im Bereich über $63 \mu\text{g/ml}$ Phospholipid nahm das Fluoreszenz-Quenching von Lipoplexen und Polyplexen ab. Erst in diesem Konzentrationsbereich kommt es folglich zu einer Änderung des Kondensierungsgrades der DNA und indiziert somit eine Interaktion von BALF und Genvektorkomplex. Anschließend wurden verschiedene Proteine, die zu den Hauptbestandteilen des Lungenflüssigkeitsfilms zählen, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Struktur der Genvektorkomplexe untersucht. Die untersuchten Proteine Albumin, Mucin und Glykoprotein führten IN DEM gewählten Konzentrationsbereich zu keinerlei Veränderung des Kondensierungsgrades der DNA in den getesteten Genvektorkomplexen.

Ein Zusammenhang zwischen den von Rosenecker und Kollegen gezeigten Einflüssen der BALF sowie ihrer Komponenten auf den nicht-viralen Gentransfer mit Veränderungen der Komplexstruktur konnte also nicht nachgewiesen werden.

Es ist bemerkenswert, dass der Einfluss von Surfactant und anderer extrazellulärer Faktoren auf die Struktur der Genvektorkomplexe nicht davon abhängig war, in welchem Grad die DNA im Genvektorkomplex kondensiert ist. Obwohl Liposomen und PEI zu einer gleich starken Kondensierung der DNA im Komplex führten, zeigten sie bei Zugabe der getesteten Substanzen zumeist ein konträres Verhalten. Lipoplexe wurden besonders stark verändert, während PEI-Polyplexe nur minimalen Beeinflussungen unterworfen waren. Dendrimer führte zu einer deutlich geringeren Kondensierung der DNA im Genvektorkomplex als Liposomen. Sie zeigten allerdings keine Beeinflussung des Kondensierungsgrades der DNA in Anwesenheit von Surfactant und anderen extrazellulären Faktoren. Dies läßt darauf schließen, dass der Grad der Kondensierung der DNA a priori kein Gradmesser für die zu erwartenden Interaktionen mit extrazellulären Bestandteilen des Lungenflüssigkeitsfilm ist.

Vielmehr scheint die Klasse des Vektors, ob kationisches Lipid oder kationisches Polymer, verantwortlich zu sein für die Affinität zu einer Interaktion mit extrazellulären Faktoren.

Die Oberflächenladung von Genvektorkomplexen ist ein entscheidender Faktor, der die Interaktion mit der Zielzelle bestimmt. Elektrostatische Wechselwirkungen und die Interaktion mit HSPG-Rezeptoren führen zu einer Anlagerung der positiv geladenen Genvektorkomplexe an die negativ geladene Zelloberfläche. In Studien wurde gezeigt, dass eine positive Oberflächenladung höhere Gentransfereffizienz zum Ergebnis haben kann (Felgner, Gadek et al. 1987; Fasbender, Zabner et al. 1995; Matsui, Johnson et al. 1997; Kircheis, Schuller et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die negativen Ladungen der anionischen Phospholipide im Alveofact zu einer Änderung der Oberflächenladung der Lipoplexe und Polyplexe von positiven Werten zu negativen Werten führten. Diese Änderung war stärker ausgeprägt bei Lipoplexen mit einem geringeren Anteil positiv geladener Lipide. Es ist daher von

Vorteil stärker geladene Genvektorkomplexe zu verwenden, um den Einfluss auf die Oberflächenladung zu minimieren.

Als weiterer biophysikalischer Parameter wurde die Größe der Genvektorkomplexe bestimmt. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Größe der Genvektorkomplexe deren Transfektionseffizienz entscheidend beeinflusst (Ogris, Steinlein et al. 1998).

In aller Regel erfolgt die Größenbestimmung von Konstrukten, die für den nicht-viralen Gentransfer eingesetzt werden, mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Mit dieser Methode können die Partikel jedoch nicht unter genau denjenigen Bedingungen vermessen werden, die auch während der Transfektion vorherrschen. Außerdem ist die Größenbestimmung der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche oder im Zytoplasma mit PCS nicht durchführbar. Folglich war eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Größenbestimmungen von nicht-viralen Genvektorkomplexen in Transfektionslösung und sogar an der Zellkultur durchzuführen. Für diesen Einsatzbereich schien die quantitative Fluoreszenzmikroskopie als Methode zur Größenbestimmung besonders geeignet.

Die zunächst durchgeführten Experimente zeigten im Fluoreszenzmikroskop starke Änderungen der Größe der Lipoplexe und Polyplexe, abhängig von der Substanz, die zu den Genvektorkomplexen zugegeben wurde. Bei der Kalibrierung von Mikroskop und Digitalkamera zur Größenbestimmung der fluoreszierenden Partikel stellte sich jedoch heraus, dass die Partikel im zu untersuchenden Größenbereich als falsch zu groß dargestellt wurden. Eine Methodik, mit Hilfe quantitativer Fluoreszenzmikroskopie die Größe von nicht-viralen Genvektorkomplexen zu bestimmen, wurde von R. Galneder und L. Rusu von der Abteilung für Experimentalphysik und Biophysik der LMU München erarbeitet. Hier wurde über die Bestimmung der Gyrationradien der Partikel mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop höherer Auflösung der Einfluss von Alveofact auf Lipoplexe und Polyplexe untersucht. In salzfreiem Milieu formulierte Partikel wurden mit Alveofact in salzhaltigem Puffer versetzt. Interessanterweise zeigte sich, dass Polyplexe durch die Zugabe von Alveofact in ihrer Aggregation gehemmt wurden und daraus kleinere Partikelgrößen resultierten. Die Größenverteilung von Lipoplexen hingegen nahm durch die Zugabe von Alveofact deutlich höhere Werte an. Diese Ergebnisse stehen im Einklang damit, dass eine Auflösung des Strukturverbandes der Lipoplexe unter Einfluss von Alveofact nachgewiesen werden konnten (Fluoreszenz-Quenching-Assay, FRET).

Surfactant hat somit nicht nur einen Einfluss auf die innere Struktur nicht-viraler Genvektorkomplexe, sondern auch auf ihr äußeres Erscheinungsbild in Größe und Oberflächenladung.

Darauf aufbauend sollte ermittelt werden, ob eine Änderung der Struktur, also der biophysikalischen Parameter, auch eine Änderung der Funktion, also der biologischen Aktivität, der Genvektorkomplexe nach sich zieht. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob

die Änderung der biophysikalischen Parameter einen Einfluss auf die Adhäsion und auf die Transfektionseffizienz der Genvektorkomplexe haben. Da Surfactant Einfluss auf die Oberflächenladung der Genvektorkomplexe nimmt, und elektrostatische Wechselwirkungen entscheidend für die Bindung der Genvektorkomplexe an die Zelloberfläche sind, können die Interaktion der Genvektorkomplexe mit Alveofact zu einem veränderten Adhäsionsverhalten führen.

Nach dem Stokes-Gesetz nimmt die Sedimentation mit dem Quadrat des Partikeldurchmessers zu. Deshalb könnten große Genvektorkomplexe durch eine erhöhte Sedimentation eine schnellere Adhäsion zeigen, als kleinere Genvektorkomplexe. Um die Untersuchungen zur Adhäsion an *in vivo* Bedingungen anzugleichen, wurden die Komplexe nur kurzzeitig auf den Zellen belassen und nicht adhärenente Komplexe wurden durch vorsichtiges Spülen entfernt. Bereits nach 5 Minuten Inkubation von Lipoplexen auf 16 HABE 140- Zellen konnten adhärenente Lipoplexe nachgewiesen werden. Eine Verlängerung der Kontaktzeit führte den Nachweis einer erhöhten Menge an adhärenentem Material nach sich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Scott und Kollegen, die bereits nach 1 Minute messbare Mengen adhärenenter Lipoplexe an Atemwegsepithelien nachweisen konnten und die ebenfalls eine Zunahme des adhärenenten Materials bei verlängerter Kontaktzeit feststellen konnten (Scott, Goddard et al. 2000). Zabner und Kollegen haben für Lipoplexe gezeigt, dass nach 30 Minuten erst 5% der Komplexe in die Zelle aufgenommen waren (Zabner, Fasbender et al. 1995). Die Zeitspanne von 10 Minuten zwischen Applikation und Spülen wurde gewählt, weil die Messung der Menge der adhärenenten Komplexe einerseits nicht durch Endozytose beeinflusst werden sollte. Andererseits sollte bereits eine ausreichende Menge an Komplexen zur Zelloberfläche gelangt sein. Adhäsion ist nicht nur abhängig von der Zeit, sondern auch vom Differenzierungsgrad der Zellen im Zellverband. Matsui et al. Zitat (Matsui, Johnson et al. 1997) haben gezeigt, dass die Zellen am Rand von einzelnen Zellinseln in der Kulturschale stärker negativ geladen sind und mehr Komplexe binden: Um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe zu erzielen, wurde eine möglichst hohe Konfluenz der Zellen angestrebt.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Verteilungsmusters der adhärenenten Komplexe auf den Atemwegszellen fiel auf, dass die Lipoplexe unter Einfluss von Alveofact eine Zunahme ihrer Adhäsion erfahren hatten. Polyplexe hingegen zeigten keine deutlich sichtbare Veränderung ihrer Adhäsion. Bei dieser Beobachtung ist allerdings der Einfluss des Quenchingfaktors auf die Fluoreszenz zu berücksichtigen. Unter Einbeziehung dieses Faktors drehen sich die Verhältnisse jedoch um. Anhand der quantitativen Messung des Einflusses von Surfactant auf die Genvektorkomplexe konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Alveofact, als auch das anionische POPG die Adhäsion von Lipoplexen und Polyplexen reduziert. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt für Lipoplexe als für Polyplexe. Exosurf nahm wie erwartet keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Genvektorkomplexe.

Die bereits beschriebenen Strukturveränderungen von Polyplexen unter Einfluss von Alveofact und POPG waren, sofern vorhanden, zumeist gering. Dennoch war mit Hilfe der Adhäsionstests eine Veränderung der Adhäsion der Polyplexe nachzuweisen. Diese Funktionsänderung war jedoch zu gering, um sich im Ergebnis der Transfektionsstudien niederzuschlagen.

Transfektionsstudien mit Komplexen, die schon bei ihrer Herstellung in ein salzhaltiges Milieu gebracht wurden, bestätigten im wesentlichen die Ergebnisse aus der Arbeit von Ernst und Kollegen: Alveofact inhibiert den Liposomen vermittelten Gentransfer, während Polymer vermittelter Gentransfer nicht inhibiert wird. Darüber hinaus konnte sogar festgestellt werden, dass die Transfektionseffizienz von Dendrimer-Polyplexen und pLL-Polyplexen in Anwesenheit von Alveofact zunahm. Gegensätzliches wurde jedoch gezeigt für die Transfektionseffizienz von Genvektorkomplexen, die in salzfreiem Milieu hergestellt und erst bei Zugabe von Alveofact in salzhaltiges Milieu gebracht wurden. Hier nahm die Transfektionseffizienz aller getesteter Genvektorkomplexe deutlich ab, sowohl bei Lipoplexen, als auch bei Polyplexen. Es ist also von Bedeutung sowohl für die biophysikalischen Eigenschaften als auch für die Funktion der Genvektorkomplexe, in welchem Milieu sie formuliert werden.

Im Rahmen der dargestellten Experimente konnten Veränderungen von nicht-viralen Genvektorkomplexen in Struktur und Funktion auf unterschiedliche Weise gezeigt werden. Es ist festzustellen, dass die einzelnen Veränderungen für sich genommen nicht direkt in Zusammenhang gebracht werden können mit der Transfektionseffizienz. Um die Auswirkung des Einflusses extrazellulärer Substanzen auf die Funktionsfähigkeit der Genvektorkomplexe zu beurteilen, muss daher die Gesamtheit ihrer biophysikalischen Parameter betrachtet werden.

Angesichts der Hürden, die den Genvektorkomplexen bei der topischen Applikation in die Atemwege entgegenstehen, ergibt sich die Notwendigkeit, Wege zur Überwindung dieser Barrieren zu finden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Methodik der Magnetofektion im Hinblick auf die speziellen Anforderungen der Genterapie der Atemwege zu untersuchen. Eine grundlegende Voraussetzung für effizienten Gentransfer im Allgemeinen ist die Anreicherung der DNA am Zielgewebe, um dadurch eine verstärkte Aufnahme in die Zellen zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Magnetofektion, im Vergleich zur Lipofektion und Polyfektion, die DNA schneller zur Zelloberfläche transportiert wird und hohe Konzentrationen der Genvektorkomplexe an der Zielzelle erreicht werden. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die Anreicherung der Magnetofectins auch an der Zelloberfläche intakter Atemwegsepithelien gezeigt. Ebenso konnte die Aufnahme der applizierten DNA in die Atemwegsepithelien elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

In Transfektionsstudien an immortalisierten Atemwegszellen konnte gezeigt werden, dass Magnetofektion mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten vergleichbar hohe Transfektionsraten erzielt wie Polyfektion mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Bei der Transfektion primärer menschlicher Atemwegszellen zeigte die Magnetofektion jedoch gegenüber der Polyfektion höhere Transfektionsraten. Die Verkürzung der Inkubationszeiten ist für einen effizienten

Genstransfer in vivo besonders wichtig, weil die Kontaktzeit der Genvektorkomplexe mit dem Zielgewebe unter diesen Bedingungen im Allgemeinen nur kurz ist. Bei intravenöser Applikation liegt sie im Bereich von Sekunden, bei der intraluminalen Applikation in die Lunge im Bereich weniger Minuten. Daher ist unter in vivo Bedingungen eine kurze Inkubationszeit erforderlich. Zeitaufgelöste Transfektionsexperimente haben ergeben, dass PEI-Polyfektion nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten keinen ausreichenden Genstransfer in immortalisierte Atemwegszellen erzielen konnte. Magnetofektion hingegen zeigte nach 15 Minuten ebenso hohe Transfektionsraten wie nach einer 4 stündigen Inkubation von PEI Polyplexen. Ein ausreichender Genstransfer wurde sogar nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten erzielt.

Ein weiterer positiver Effekt der beschleunigten und verstärkten Anreicherung der DNA an der Zelloberfläche ist die verbesserte Dosis-Wirkungs-Beziehung der Magnetofektion im Vergleich zum nicht-viralen Genstransfer mit Lipoplexen und Polyplexen. Dies hat zur Folge, dass weniger DNA appliziert werden muss, um einen ausreichenden Genstransfer zu erzielen. Bei der topischen Applikation von Genvektorkomplexen in die Atemwege könnte dies für Patienten von Vorteil sein, bei denen aufgrund ihrer Vorerkrankung, wie zum Beispiel der Mukoviszidose, bereits eine erhöhte Viskosität ihrer Atemwegssekrete besteht. Es ist bekannt, dass ein hoher Gehalt an DNA die Viskosität der Atemwegssekrete erhöht (Griese, App et al. 1997), als Folge dessen sollte eine erhöhte DNA Dosis meist zu einer potentiellen Viskositäerhöhung des Mucus führen.

Die beobachteten Effekte der Magnetofektion waren auf den Einfluss des Magnetfeldes zurückzuführen. Zum einen zeigte die Magnetofektion unter Einfluss des Magnetfeldes eine deutlich bessere Dosis-Wirkungs-Beziehung. Zum anderen waren auch die Transfektionsraten mit Magnet signifikant höher als ohne einen Einfluss des Magnetfeldes. Ein entscheidender Vorteil der Magnetofektion ist also die Ersparnis langer Inkubationszeiten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Methodik der Magnetofektion einen effizienten Genstransfer in die Atemwege ermöglicht. Zieht man die Ergebnisse der Arbeit von Scherer et al. hinzu, so scheint auch der zielgerichtete Transfer von genetischem Material in die Atemwege mit Hilfe der Magnetofektion möglich (Scherer, Anton et al. 2002). Weitere Forschung auf diesem Gebiet wird ergeben, ob es möglich sein wird, mit Hilfe gerichteter Magnetfelder aerosolisierte Genvektorkomplexe in den Atemwegen einzufangen und anzureichern und dadurch die Genvektoreffizienz zu verbessern.

7. Zusammenfassung

In den vergangenen zehn Jahren wurden große Fortschritte hinsichtlich einer möglichen Gentherapie angeborener Lungenerkrankungen wie Mukoviszidose oder α_1 -Antitrypsinmangel erzielt. Dabei spielt die Gentherapie mittels nichtviraler Genvektoren zunehmend eine größere Rolle. Doch trotz ermutigender Ergebnisse aus einer Reihe von klinischen Studien ist die Effizienz des nichtviralen Gentransfers über eine topische Applikation in die Atemwege bis heute zu gering. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Wechselwirkungen nichtvirale Genvektorkomplexe im Milieu der Atemwege unterliegen.

Dabei konnten Veränderungen der inneren Struktur nichtviraler Genvektorkomplexe unter Einfluss von Surfactant bzw. bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit mit Hilfe von Fluoreszenz-Quenching-Assays und Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) nachgewiesen werden. Auch die Oberflächenladung der kationischen Genvektorkomplexe wurde beeinflusst, wobei in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Surfactant eine Ladungsumkehr hin zu negativen Werten gemessen wurde. In Bezug auf die äußere Struktur der kationischen Genvektorkomplexe konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Surfactant bei Lipoplexen eine starke Zunahme der Größe beobachtet wurde, während die Größe von Polyplexen sogar leicht abnahm. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die An- oder Abwesenheit von Salz in physiologischen Konzentrationen bei der Herstellung der Genvektorkomplexe einen Einfluss hat auf die Interaktion von Surfactant mit den Genvektorkomplexen. Um zu ermitteln, inwieweit die Veränderung biophysikalischer Parameter die Funktion der Genvektorkomplexe beeinflusst, wurden das Adhäsionsverhalten der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche und ihre Transfektionseffizienz untersucht. Auch hier waren die Folgen der Interaktion mit Surfactant sehr unterschiedlich ausgeprägt, je nach dem, ob kationische Liposomen oder kationische Polymere als Genvektorsystem verwendet wurden.

Um die Effizienz des nichtviralen Gentransfers in die Lunge zu erhöhen, gibt es eine Reihe unterschiedlicher Ansätze. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit der Magnetofektion auf die Transfektion von Atemwegsepithelien untersucht. Die Magnetofektion beruht auf dem Prinzip der Anreicherung von Genvektorkomplexen am Zielgewebe mit Hilfe magnetischer Anziehungskräfte. Es konnte eine deutlich bessere Dosis-Wirkungs-Beziehung der über kationische Polymere vermittelten Magnetofektion verglichen mit dem konventionellen über kationische Polymere vermittelten Gentransfer nachgewiesen werden. Hierfür waren sowohl eine stärkere als auch eine schnellere Anreicherung der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche verantwortlich. Die Effizienz der Magnetofektion war bei gegebener Inkubationszeit der Transfektionseffizienz konventioneller nichtviraler Gentransfersysteme deutlich überlegen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine Aufnahme der Genvektorkomplexe in Zellen intakter Atemwegsepithelien mit Hilfe der Magnetofektion nachgewiesen werden.

8. Literaturverzeichnis

Albelda, S. M., Wiewrodt, R. et al. (2002). "Gene therapy for lung neoplasms." Clin Chest Med **23**(1): 265-77.

Alton, E. W., Stern, M. et al. (1999). "Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial." Lancet **353**(9157): 947-54.

Assael, B. M., Castellani, C. et al. (2002). "Epidemiology and survival analysis of cystic fibrosis in an area of intense neonatal screening over 30 years." Am J Epidemiol **156**(5): 397-401.

Bellon, G., Michel-Calemard, L. et al. (1997). "Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial." Hum Gene Ther **8**(1): 15-25.

Bigger, B. and Coutelle, C. (2001). "Perspectives on gene therapy for cystic fibrosis airway disease." BioDrugs **15**(9): 615-34.

Bobadilla, J. L., Macek, Jr., M. et al. (2002). "Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening." Hum Mutat **19**(6): 575-606.

Boucher, R. C. (1996). "Current status of CF gene therapy." Trends Genet **12**(3): 81-4.

Boussif, O., Lezoualc'h, F. et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.

Boveri, T. H. (1887). "Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eis von *Ascaris megaloccephala*." Anat Anz: 668-693.

Bragonzi, A., Dina, G. et al. (2000). "Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs." Gene Ther **7**(20): 1753-60.

Brigham, K. L., Canonico, A. E. et al. (1994). "Gene therapy for inflammatory diseases." Prog Clin Biol Res **388**: 361-5.

Brown, B. D. and Lillicrap, D. (2002). "Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy." Blood **100**(4): 1133-40.

Caplen, N. J., Alton, E. W. et al. (1995). "Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Nat Med **1**(1): 39-46.

- Cline, M. J., Stang, H. et al. (1980). "Gene transfer in intact animals." Nature **284**(5755): 422-5.
- Cooke, H. (2001). "Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects." Cloning Stem Cells **3**(4): 243-9.
- Cotten, M., Langle-Rouault, F. et al. (1990). "Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4033-7.
- Crystal, R. G., McElvaney, N. G. et al. (1994). "Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis." Nat Genet **8**(1): 42-51.
- Culver, K. W., Osborne, W. R. et al. (1991). "Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer." Transplant Proc **23**(1 Pt 1): 170-1.
- Curiel, D. T., Pilewski, J. M. et al. (1996). "Gene therapy approaches for inherited and acquired lung diseases." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(1): 1-18.
- Densmore, C. L., Orson, F. M. et al. (2000). "Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization." Mol Ther **1**(2): 180-8.
- Drumm, M. L., Pope, H. A. et al. (1990). "Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer." Cell **62**(6): 1227-33.
- Duncan, J. E., Whitsett, J. A. et al. (1997). "Pulmonary surfactant inhibits cationic liposome-mediated gene delivery to respiratory epithelial cells in vitro." Hum Gene Ther **8**(4): 431-8.
- Engelhardt, J. F. (2002). "The lung as a metabolic factory for gene therapy." J Clin Invest **110**(4): 429-32.
- Ernst, N., Ulrichskotter, S. et al. (1999). "Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant." J Gene Med **1**(5): 331-40.
- Farhood, H., Serbina, N. et al. (1995). "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 289-95.
- Fasbender, A. J., Zabner, J. et al. (1995). "Optimization of cationic lipid-mediated gene transfer to airway epithelia." Am J Physiol **269**(1 Pt 1): L45-51.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R. et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.

Felgner, P. L. and Ringold, G. M. (1989). "Cationic liposome-mediated transfection." Nature **337**(6205): 387-8.

Fischer, A., Hacein-Bey, S. et al. (2002). "Gene therapy of severe combined immunodeficiencies." Nat Rev Immunol **2**(8): 615-21.

Galneder, R. J. (2001). Enzymkinetik von Phospholipase C und Aggregationsverhalten von Gentransfer-Komplexen. Physikdepartment / Biophysik. München, Technische Universität München.

Gautam, A., Densmore, C. L. et al. (2001). "Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes." Mol Ther **3**(4): 551-6.

Gill, D. R., Southern, K. W. et al. (1997). "A placebo controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **4**: 33-51.

Gregory, R. J., Cheng, S. H. et al. (1990). "Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Nature **347**(6291): 382-6.

Griese, M., App, E. M. et al. (1997). "Recombinant human DNase (rhDNase) influences phospholipid composition, surface activity, rheology and consecutively clearance indices of cystic fibrosis sputum." Pulm Pharmacol Ther **10**(1): 21-7.

Haensler, J. and Szoka, F. C. Jr. (1993). "Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture." Bioconjug Chem **4**(5): 372-9.

Harvey, B. G., Leopold, P. L. et al. (1999). "Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus." J Clin Invest **104**(9): 1245-55.

Huang, L. (1999). „Characteristics of a Nonviral Vector. Interactions with DNA“ in: Nonviral Vectors for Gene Therapy. L. Huang, M. Hung and E. Wagner. San Diego, CA, Academic Press: 9.

Huang, L. and E. Viroonchatapan (1999). „Introduction“ in: Nonviral Vectors for Gene Therapy. L. Huang, M. Hung and E. Wagner. San Diego, Academic Press: 3-4.

Hyde, S. C., Southern, K. W. et al. (2000). "Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **7**(13): 1156-65.

Jiao, S., Williams, P. et al. (1992). "Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo." Hum Gene Ther **3**(1): 21-33.

- Kerem, B., Rommens, J. M. et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." Science **245**(4922): 1073-80.
- Kilburn, K. H. (1968). "A hypothesis for pulmonary clearance and its implications." Am Rev Respir Dis **98**: 449-463.
- Kircheis, R., Schuller, S. et al. (1999). "Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo." J Gene Med **1**(2): 111-20.
- Kircheis, R., Wightman, L. et al. (2001). "Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines." Adv Drug Deliv Rev **53**(3): 341-58.
- Kitson, C., Angel, B. et al. (1999). "The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium." Gene Ther **6**(4): 534-46.
- Koehler, D. R., Hannam, V. et al. (2001). "Targeting transgene expression for cystic fibrosis gene therapy." Mol Ther **4**(1): 58-65.
- Lander, E. S., Linton, L. M. et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Litzinger, D. C. and Huang, L. (1992). "Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications." Biochim Biophys Acta **1113**(2): 201-27.
- Lübbe (1998). "Magnetically controlled drug targeting." Cancer J **11**: 104.
- Lucas (1934). "Principles of ciliary activity in respiratory tract." Arch. Otolaryngol **285**(21).
- Luo, D. and Saltzman, W. M. (2000). "Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface." Nat Biotechnol **18**(8): 893-5.
- Machy, P., Lewis, F. et al. (1988). "Gene transfer from targeted liposomes to specific lymphoid cells by electroporation." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8027-31.
- Matsui, H., Johnson, L. G. et al. (1997). "Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells." J Biol Chem **272**(2): 1117-26.
- Maxwell, I. H. and Maxwell, F. (1988). "Electroporation of mammalian cells with a firefly luciferase expression plasmid: kinetics of transient expression differ markedly among cell types." Dna **7**(8): 557-62.

Mercola, K. E., Stang, H. D. et al. (1980). "Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice." Science **208**(4447): 1033-5.

Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12349-54.

Mitani, K. and Kubo, S. (2002). "Adenovirus as an integrating vector." Curr Gene Ther **2**(2): 135-44.

Mounkes, L. C., Zhong, W. et al. (1998). "Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo." J Biol Chem **273**(40): 26164-70.

O'Dea, S. and Harrison, D. J. (2002). "CFTR gene transfer to lung epithelium--on the trail of a target cell." Curr Gene Ther **2**(2): 173-81.

Ogris, M., Steinlein, P. et al. (2001). "DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression." AAPS PharmSci **3**(3).

Ogris, M., Steinlein, P. et al. (1998). "The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells." Gene Ther **5**(10): 1425-33.

Old, R. W. and Primrose, S. B. (1980). Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, University of California Press.

Pickles, R. J., McCarty, D. et al. (1998). "Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer." J Virol **72**(7): 6014-23.

Raptis, L. and Firth, K. L. (1990). "Electroporation of adherent cells in situ." DNA Cell Biol **9**(8): 615-21.

Rich, D. P., Anderson, M. P. et al. (1990). "Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells." Nature **347**(6291): 358-63.

Riordan, J. R., Rommens, J. M. et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-73.

Rogers, D. F. (1997). Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. Basel, Birkhäuser Verlag.

- Rols, M. P., Delteil, C. et al. (1998). "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma." Nat Biotechnol **16**(2): 168-71.
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C. et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." Science **245**(4922): 1059-65.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P. et al. (1990). "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." N Engl J Med **323**(9): 570-8.
- Rosenecker, J., Naundorf, S. et al. (2002). "Interaction of Bronchoalveolar Lavagefluid with Polyplexes and Lipoplexes: Analysing the Role of Proteins and Glycoproteins." J Gene Med **5**(1): 49-60.
- Rudolph, C., Lausier, J. et al. (2000). "In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers." J Gene Med **2**(4): 269-78.
- Rudolph, C., Muller, R. H. et al. (2002). "Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency." J Gene Med **4**(1): 66-74.
- Sadoni, N., Langer, S. et al. (1999). "Nuclear Organization of Mammalian Genomes: Polar Chromosome Territories Build Up Functionally Distinct Higher Order Compartments." Journal of Cell Biology **146**: 1211-1226.
- Scherer, F., Anton, M. et al. (2002). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo." Gene Ther **9**(2): 102-9.
- Scott, E. S., Goddard, C. A. et al. (2000). "A murine tracheal culture system to investigate parameters affecting gene therapy for cystic fibrosis." Gene Ther **7**(7): 612-8.
- Sextus, E. (200-250 n. Chr.). *Adversus mathematicos libri*. **VII**: §135.
- Simon, R. H., Engelhardt, J. F. et al. (1993). "Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study." Hum Gene Ther **4**(6): 771-80.
- Spielmann, H. P., Wemmer, D. E. et al. (1995). "Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy." Biochemistry **34**(27): 8542-53.
- Sun, H. B. and Yokota, H. (1999). "Correlated positioning of homologous chromosomes in daughter fibroblast cells." Chromosome Research **7**: 603-610.

Sun, W. H., Burkholder, J. K. et al. (1995). "In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2889-93.

Sutton, W. S. (1903). "The chromosome in heredity." Biological Bulletin Wood's Hole **4**: 231-251.

Tabin, C. J., Hoffmann, J. W. et al. (1982). "Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Mol Cell Biol **2**(4): 426-36.

Tipler, P. A. (1995). Optik. Physik, Spektrum Akademischer Verlag: 1293.

Tseng, W. C., Haselton, F. R. et al. (1997). "Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression." J Biol Chem **272**(41): 25641-7.

Tümmler, B. (2000). "Genetik, Pathogenese und Getherapie der Mukoviszidose." Atemw.-Lungenkrkh. **10**: 537-538.

Wagner, E., Zenke, M. et al. (1990). "Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3410-4.

Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). "Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid." Nature **171**: 737-738.

Wei, C. M., Gibson, M. et al. (1981). "Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1." J Virol **39**(3): 935-44.

Wilson, E. B. (1900). The cell in development and inheritance. New York, Macmillan.

Wolff, J. A., Malone, R. W. et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.

Worgall, S., Wolff, G. et al. (1997). "Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration." Hum Gene Ther **8**(1): 37-44.

Xie, T. D. and Tsong, T. Y. (1990). "Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. II. Transfection by low-amplitude, low-frequency alternating electric fields." Biophys J **58**(4): 897-903.

Yang, N. S., Burkholder, J. et al. (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9568-72.

Yei, S., Mittereder, N. et al. (1994). "Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung." Gene Ther **1**(3): 192-200.

Zabner, J., Couture, L. A. et al. (1994). "Correction of cAMP-stimulated fluid secretion in cystic fibrosis airway epithelia: efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in vitro." Hum Gene Ther **5**(5): 585-93.

Zabner, J., Fasbender, A. J. et al. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem **270**(32): 18997-9007.

Zauner, W., Kichler, A. et al. (1996). "Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection." Biotechniques **20**(5): 905-13.

Zhou, X. and Huang, L. (1994). "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action." Biochim Biophys Acta **1189**(2): 195-203.

Zou, S. M., Erbacher, P. et al. (2000). "Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse." J Gene Med **2**(2): 128-34.

2. Publikationsliste

1. Ernst, N., Ulrichskötter, S., Schmalix, W., Rädler, J.O., Galneder, R., Mayer, E., Gersting, S. W., Plank, C., Reinhardt, D., Rosenecker, J.
Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant.
J Gene Med, 1999. **1**(5): 331-40.
2. Rosenecker, J., Naundorf, S., Gersting, S. W., Hauck, P., Gessner, A., Müller, R. H., Rudolph, C.
Interaction of Bronchoalveolar Lavagefluid with Polyplexes and Lipoplexes: Analysing the Role of Proteins and Glycoproteins.
J Gene Med, 2003. **5**(1) 49-60.
3. Galneder, R., Rusu, L., Gersting, S. W., Rudolph, C. Rosenecker, J., Radler, J.O.
Number of plasmids per gene delivery complex measured by fluorescence microscopy and fluorescence correlation spectroscopy.
Mol Ther, 2003, (zur Publikation eingereicht)
4. Gersting, S. W., Nicklaus, P., Schillinger, U., Scherer, F., Rudolph, C. Plank, C., Reinhardt, D., Rosenecker, J. *Use of magnetofection for the enhancement of gene delivery by non viral vectors to the respiratory epithelium.*
In Vorbereitung.

10. Lebenslauf

NAME: Søren Gersting

GEBOREN: 06.12.1971 in Wittmund / Ostfriesland.

SCHULBILDUNG: 1978-1982 Janusz-Korczack-Grundschule in Göttingen.
1982-1984 Orientierungsstufe in Göttingen.
1984-1991 Theodor-Heuss-Gymnasium in Göttingen.

STUDIUM: 1991-1992 Studium der Ökonomie in Augsburg.
1992 Studium der Philosophie in München.
1993 SoSe - Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen.
1993-2000 WiSe - Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
1999-2000 Praktisches Jahr im Krankenhaus Harlaching (Innere Medizin und Chirurgie) und am Dr. von Haunerschen Kinderspital (Kinderheilkunde und Kinderchirurgie).
2000 Ärztliche Prüfung.

BERUFSTÄTIGKEIT: 2000-2002 Arzt im Praktikum in der Kinderpoliklinik der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals. Wissenschaftliche Tätigkeit in der AG Molekulare Pneumologie.
09/2002 Assistenzarzt im Dr. von Haunerschen Kinderspital. Wissenschaftliche Tätigkeit in der AG Biochemische Genetik und Molekularbiologie.

11. Danksagung

Im April 1998 hat Josef Rosenecker mich als ersten medizinischen Doktoranden in die von ihm geführte AG Molekulare Pneumologie am Dr. von Haunerschen Kinderspital aufgenommen. Er gab mir die Möglichkeit, in einem faszinierenden Forschungsgebiet, dass im Jahre 1998 von Aufbruchstimmung geprägt war und in den zurückliegenden vier Jahren eine rasante Entwicklung genommen hat, wissenschaftlich zu arbeiten. Er hat mir bei der wissenschaftlichen Arbeit stets alle Freiheiten gelassen.

Ebenfalls danken möchte ich Reinhard Galneder, mit dem ich am Institut für Biophysik an der TU München einen Teil der Untersuchungen zu den biophysikalischen Eigenschaften der Genvektorkomplexe durchgeführt habe. Er hat mich zu Beginn der Arbeit mit dem wissenschaftlichen Arbeiten vertraut gemacht und mir geduldig grundlegende physikalische Methoden nahegebracht. Ihm habe ich die Begeisterung für biophysikalische Aspekte im Allgemeinen und die Fluoreszenzmikroskopie im Besonderen zu verdanken. Gleichmaßen gilt mein Dank Laura Rusu vom Lehrstuhl für Experimentalphysik und Biophysik der LMU München, mit der ich mit großem Spaß die Arbeiten fortführen konnte.

Die Durchführung der Experimente zur Magnetofektion geschah in Zusammenarbeit mit Petra Nicklaus, die wesentlich zur Fertigstellung des experimentellen Teiles in so kurzer Zeit beigetragen hat. Zudem hatten wir dabei trotz Schlachthof und Grosshadern-Exkursionen eine lustige Zeit. Dafür danke ich ihr.

Sehr viel profitiert habe ich auch von Jim Lausiers Gastspiel in unserem Labor. Neben der Vermittlung vieler histologischer Fertigkeiten und der Anfertigung der Elektronenmikroskopie war er stetig dabei, mein Englisch zu verbessern. Aus „Rache“ habe ich seine Deutschkenntnisse vertieft und ihn mit Süßigkeiten versorgt.

In der Anfangszeit war Sonja Naundorf für ein reibungsloses Arbeiten unverzichtbar. Neben der perfekten Organisation des Labors konnte sie mir häufig genug moralisch beistehen – was im Übrigen auf Gegenseitigkeit beruhte.

Danken möchte ich auch Carsten Rudolph, der durch sein aufgeschlossenes Interesse und seine wissenschaftlichen Impulse viel zur Qualität nicht nur dieser Arbeit, sondern im Besonderen Maße der gesamten Arbeitsgruppe beigetragen hat.

Einen unschätzbaren Anteil an dieser Arbeit hat meine Frau, die jeden Abschnitt mit mir durchlebt und mir dabei sehr beigestanden hat; die aber auch beim Verfassen der Dissertation um jede Formulierung mit mir gerungen hat.