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

Uronsäure-funktionalisierte PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate und artifizielle Chromosomen für den nicht-viralen Gentransfer

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabine Isabella Weiss
aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Josef Rosenecker
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Med. C. Haferlach
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Carsten Rudolph
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	30. November 2006

Meinen Eltern gewidmet

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

- **S.I. Weiss, N. Sieverling, M. Niclasen, C. Mauksch, A.F. Thünemann, H. Möhwald, D. Reinhardt, J. Rosenecker und C. Rudolph (2006):** Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethylenglycol (PEG)-*graft*-copolymers as novel synthetic gene carriers. Biomaterials **27:**2302-2312

- **S. Weiss, C. Rudolph, D. Reinhardt und J. Rosenecker** (2004): Die Verwendung artifizieller Chromosomen in der somatischen Gentherapie. Zeitschrift der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie **7:**16-18

Tagungsbeiträge (Abstracts):

- **S. I. Weiss, N. Sieverling, M. Niclasen, C.Maucksch, A. F. Thünemann, J. Rosenecker and C. Rudolph** (2005): Mannuronic acid-functionalized PEI-PEG-*graft*-copolymers as novel synthetic gene carriers. Abstract book of the 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy (ESGT), p. 75, P 126 (29. Oktober – 1. November, Prag, Tschechische Republik)

- **N. Sieverling, M. Niclasen, S. Weiss, C. Rudolph, A. F. Thünemann und H. Möhwald** (2005): Sugar-Conjugates for the Receptor-mediated Gene Transfer. Makromolecular Rapid Communications, Vol. 26 F 29 (24. – 26. Februar, Freiburg)

- **S. I. Weiss, M. Niclasen, N. Sieverling, J. Rosenecker, D. Reinhardt und C. Rudolph** (2004): Coupling of various uronic acids to PEI as novel synthetic gene carriers. Abstract book of the 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy (ESGT), p. 72, P121. (4. – 7. November, Tampere, Finnland)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotika
ADA	Adenosin-Deaminase
AK	Antikörper
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
B-PEI	Branched PEI
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovines Serum Albumin
CENP-B	Centromer Protein B
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGD	Chronic Granulomatous Disease
DAPI	4', 6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco`s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
δ	chemische Verschiebung
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Foetal Calf Serum
FLUOS	Carboxy-fluorescein-N-succinimidyl-Ester
GFP	Green Fluorescent Protein
GalAc	Galakturonsäure
GalAc-ox	Galakturonsäure aus Methyl-α-D-Galaktopyranosid oxidiert
HAC	Human Artificial Chromosome
HBS	Hepes Buffered Saline
L-PEI	Linear PEI
LacAc	Laktobionsäure
MW	Molekulargewicht
MAC	Mammalian Artificial Chromosome
ManAc	Mannuronsäure
MEM	Minimal Essential Medium

M	Mol
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N/P-Verhältnis	Verhältnis von Stickstoffatomen des kationischen Polymers zu Phosphatatomen der DNS
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
ρ	Dichte der Lösung [g/cm^3]
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
RLU	Relative Light Units
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
Sdp	Siedepunkt
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
Tf	Transferrin
UV/Vis	Ultraviolett/Visible-Spectroscopy

INHALTSVERZEICHNIS

1.	**EINLEITUNG**	**1**
1.1	**Somatische Gentherapie**	**1**
1.1.1	Definition, Methoden, Anwendung	1
1.1.2	Genvektoren	2
1.2	**Erfolge und Niederlagen in der Gentherapie**	**5**
1.3	**Nicht-virale Genvektoren**	**6**
1.4	**Rezeptor-vermittelter Gentransfer**	**9**
1.5	**Artifizielle Chromosomen in der Gentherapie**	**12**
1.6	**Zielsetzung der Dissertation**	**15**
2.	**MATHERIAL UND METHODEN**	**16**
2.1	**Synthese der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate**	**16**
2.1.1	Herstellung des PEI-PEG-Pforpfcopolymers	16
2.1.2	Synthese von Mannuronsäure durch selektive Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid	17
2.1.3	Synthese der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate am Beispiel von (ManAc-PEG)-PEI	18
2.2	**Synthese der Dextran-Konjugate und Fluoreszenzmarkierung mit FLUOS**	**20**
2.3	**Analytische Methoden zur Charakterisierung der Polymere**	**21**
2.4	**Zellkultur**	**23**
2.4.1	Verwendete Zelllinien	23
2.4.2	Anzuchtbedingungen und Subkultivierung	24
2.4.3	Kulturmedien und Supplemente	24
2.5	**Präparation der Genvektorkomplexe**	**25**
2.5.1	Verwendete Plasmide und Vektoren	25
2.5.2	Das N/P-Verhältnis	26
2.5.3	Herstellung der Komplexe	26
2.6	**Transfektion**	**27**
2.7	**Bestimmung der Luziferaseaktivität**	**27**
2.8	**Untersuchungen zur Zellvitalität**	**28**
2.9	**Messung des Zeta-Potentials und der Größe**	**29**
2.10	**Analyse der zellulären Aufnahme verschiedener FLUOS-Dextran-Konjugate**	**29**
2.10.1	Fluoreszenzmikroskopie	29

2.10.2 Durchflußzytometrie 30

2.11 Verneblung der Gen-Vektor-Komplexe und Agarosegel-Elektrophorese 30

2.12 Verneblung von ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugat/DNS-Komplexen in die Mauslunge 31

2.13 Injektion neu formulierter ManAc-funktionalisierter PEI-und PEI-PEG-Konjugat/DNS-Komplexe in die Schwanzvene von Mäusen 31

2.14 Experimente mit Chromosomen bzw. Minichromosomen 32

2.14.1 Extraktion von Chromosomen in der Methaphase 32

2.14.2 „Immunosurfaction“ 33

2.15 Mikroskopie 34

2.15.1 Epifluoreszenzmikroskopie 34

2.15.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 35

2.16 Statistische Auswertungen 35

3. ERGEBNISSE 36

3.1 Physikochemische Charakterisierung der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate 36

3.1.1 Durchschnittliche Anzahl der Uronsäure-Liganden pro PEI- bzw. PEI-PEG-Molekül 36

3.1.2 Hydrodynamischer Durchmesser der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate 38

3.1.3 Molmassencharakterisierung der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate 38

3.2 Gentransfereffizienz der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate 39

3.2.1 Gentransfereffizienz der Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate 39

3.2.2 Gentransfereffizienz der Laktobionsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate 43

3.2.3 Gentransfereffizienz der Mannuronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate 45

3.3 Analyse von Zeta-Potential und Größe der Komplexe 48

3.4 Vergleich der Gentransfereffizienzen methylierter- und nicht-methylierter ManAc-Konjugate 50

3.5 Analyse des Aufnahme-Mechanismus der ManAc-Konjugate in die Zelle 51

3.5.1 Inhibierung der ManAc-Rezeptoren durch freie Mannuronsäure 51

3.5.2 ManAc-vermittelte Aufnahme Fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate 55

3.5.2.1 Analyse der rezeptorvermittelten Aufnahme der ManAc-funktionalisierten Konjugate mittels Fluoreszenzmikroskopie 55

3.5.2.2 Analyse der rezeptorvermittelten Aufnahme der ManAc-funktionalisierten Konjugate mittels Durchflußzytometrie 60

3.6 Untersuchung der Gentransfereffizienz der ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate *in vivo* 63

3.6.1 Aerosol-Applikation der ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate in die Mauslunge 63

3.6.2 Neue Formulierungen der ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate 66

3.6.2.1 Biophysikalische Charakterisierung und Gentransfereffizienz *in vitro* 66

3.6.2.2 Gentransfereffizienz *in vivo* 70

3.7 „Immunosurfaction" – eine neuartige Methode zur Transfektion von Minichromosomen in Zellen 72

3.7.1 „Immunosurfaction von aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen 72

3.7.1.1 Transfer von GFP-markierten Chromosomen/Minichromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen 75

3.7.1.2 PEI-vermittelter Transfer von GFP-markierten Chromosomen/Mini-chromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen 77

3.7.1.2 (ManAc-PEG)3-PEI-vermittelter Transfer von GFP-markierten Chromo-somen/Minichromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen 78

3.7.2 „Immunosurfaction von aus 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen extrahierten Chromosomenin 16HBE14o$^-$ -Zellen 79

4. DISKUSSION 82

4.1 Verwendung von Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer 82

4.1.1 ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate vermitteln unter den Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate die höchsten Gentransfereffizienzen 82

4.1.2 Die Aufnahme der ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate erfolgt mittels ManAc-spezifische Rezeptoren 85

4.1.3 Verwendung von ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate für *in vivo*-Applikationen 88

4.2 Mittels „Immunosurfaction" können Chromosomen effizient in Zellen transfiziert werden 90

5. ZUSAMMENFASSUNG 94

6. LITERATUR 96

Anhang: Bezugliste der verwendeten Chemikalien

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Methoden des Gentransfers	2
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung des nicht-viralen Rezeptor-vermittelten Gentransfers	10
Abbildung 1.3	Herstellung artifizieller Chromosomen	13
Abbildung 2.1	Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid	17
Abbildung 2.2	Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe	18
Abbildung 2.3	Synthese von (ManAc-PEG)-PEI	19
Abbildung 2.4	Fluoreszenzmarkierung von (ManAc-PEG)-Dextran mit FLUOS	21
Abbildung 2.5	Aufbau des Verneblers und gesammelte Fraktionen	31
Abbildung 2.6	Extraktion von Chromosomen in der Metaphase	33
Abbildung 3.1	Strukturen von Galakturonsäure, Mannuronsäure und Laktobionsäure	36
Abbildung 3.2	Verteilung der Sedimentationskonstanten	39
Abbildung 3.3	Ermittlung der Transfereffizienzen GalAc-funktionalisierter PEI und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen	41
Abbildung 3.4	Ermittlung der Transfereffizienzen oxidierter GalAc-funktionalisierter PEI und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen	42
Abbildung 3.5	Ermittlung der Transfereffizienzen LacAc-funktionalisierter PEI und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen	45
Abbildung 3.6	Ermittlung der Transfereffizienzen ManAc-funktionalisierter PEI und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen	47
Abbildung 3.7	Zeta-Potentiale und Größen der PEI-pDNS-, PEI-PEG-pDNS, ManAc(4)-PEI-pDNS und (ManAc-PEG)3-PEI-pDNS-Komplexe	49
Abbildung 3.8	Vergleich der Gentransfereffizienzen methylierter und nicht-methylierter ManAc-PEI-Konjugate anhand von 16HBE14o$^-$ -Zellen	50
Abbildung 3.9	Toxizität der ManAc	52
Abbildung 3.10	Inhibierung der ManAc-Rezeptoren durch Zugabe freier ManAc vor der Transfektion	54
Abbildung 3.11	Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate Mittels fluoreszenzmarkierter Dextran-Konjugate	56
Abbildung 3.12	Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate Mittels fluoreszenzmarkierter Dextran-Konjugate	57
Abbildung 3.13	Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate Mittels fluoreszenzmarkierter Dextran-Konjugate	58

Abbildung 3.14	Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate Mittels fluoreszenzmarkierter Dextran-Konjugate	59
Abbildung 3.15	Durchflußzytometrische Quantifizierung der erzielten Transfereffizienzen verschiedener fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate	61
Abbildung 3.16	Duchflußzytometrische Analyse der erzielten Transfereffizienzen von FLUOS-PEG-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex mit Zugaben molarer Überschüsse an ManAc und Mannose	62
Abbildung 3.17	Analyse der Intaktheit der DNS nach Verneblung der Genvektorkomplexe	64
Abbildung 3.18	Verneblung der Gen-Vektoren in die Mauslunge	65
Abbildung 3.19	Ermittlung der Transfereffizienzen neu formulierter ManAc-funktionalisierter PEI-Konjugate anhand von 16HBE14o$^-$ -Zellen	69
Abbildung 3.20	Getransfereffizienz neu formulierter ManAc-funktionalisierter PEI-PEG-Konjugate *in vivo*	71
Abbildung 3.21	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HTLAGBG B5-4-Zellen	73
Abbildung 3.22	Darstellung der einzelnen Schritte der „Immunosurfaction“	73
Abbildung 3.23	Visualisierung fixierter Chromosomen/Minichromosomen	74
Abbildung 3.24	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$ -Zellen nach Durchführung der „Immnosurfaction“	76
Abbildung 3.25	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Untersuchung der Aufnahme der Chromosomen/Minichromosomen	77
Abbildung 3.26	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$ -Zellen nach Durchführung der „Immnosurfaction	78
Abbildung 3.27	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$ -Zellen nach Durchführung der „Immnosurfaction	79
Abbildung 3.28	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen	80
Abbildung 3.29	Darstellung der einzelnen Schritte der „Immunosurfaction“	81
Abbildung 3.30	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$ -Zellen nach Durchführung der „Immnosurfaction“	81

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Verwendete Zelllinien	23
Tabelle 2.2	Verwendete Vektoren	25
Tabelle 3.1	Charakterisierung der Uronsäure-Konjugate	37
Tabelle 3.2	Zetapotential und Größe der neu formulierten ManAc-funktionalisierten PEI-PEG-Konjugate	67
Tabelle 3.3	Vergleich der Größen der ursprünglich generierten Komplexe mit den Größen neu formulierter Komplexe	68

1. Einleitung

1.1 Somatische Gentherapie

1.1.1 Definition, Methoden, Anwendung

Seit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2003, bei der auch Gene identifiziert wurden, deren Fehlfunktion zur Ausprägung von Erbkrankheiten führt, stellt die Gentherapie einen zunehmend wichtigeren Forschungsschwerpunkt der Naturwissenschaften dar. Mit Hilfe der somatischen Gentherapie könnten angeborene oder erworbene Erkrankungen kausal therapiert werden, indem eine intakte Kopie (therapeutisches Gen) des für die entsprechende Krankheit verantwortlichen defekten Gens in die erkrankten Körperzellen eingeschleust wird. Als therapeutisches Gen kann genetisches Material, das aus cDNS, mRNS oder artifiziellen Chromosomen besteht, dienen (Rosenecker *et al*., 2001). Nach dem gezielten Einschleusen des intakten Gens soll die Funktion des defekten Gens komplementiert werden.

Im Gegensatz zu der somatischen Gentherapie, bei der die Veränderung des Erbgutes nur auf den behandelten Patienten beschränkt bleibt, werden bei der Keimbahntherapie Keimzellen gentherapeutisch verändert. Statt Gendefekte in den Körperzellen bereits Erkrankter oder von einer Krankheit Bedrohter zu behandeln, setzt die gezielte Reparatur defekter Gene schon in den Keimzellen an. Da die genetischen Eingriffe auch an die nächste Generation vererbt werden, ist die Keimbahntherapie nach dem Embryonenschutzgesetz von 1991 in Deutschland verboten.

Bei der somatischen Gentherapie kann das genetische Material durch verschiedene Methoden in den Patienten eingebracht werden (Abb. 1.1). Für die *ex vivo*-Gentherapie werden aus dem Patienten körpereigene Zellen (z.B. hämatopoetische Stammzellen) isoliert und außerhalb des Körpers gentherapeutisch verändert, d. h mit dem gewünschten Gen transfiziert. Anschließend werden die korrigierten Zellen, die jetzt die vorher fehlenden Funktionen erfüllen, *in vitro* vermehrt und in den Patienten reimplantiert. Dagegen basiert die *in vivo*-Gentherapie auf einer direkten Injektion von Vektoren, die das therapeutische Gen tragen (Rosenecker, 2004).

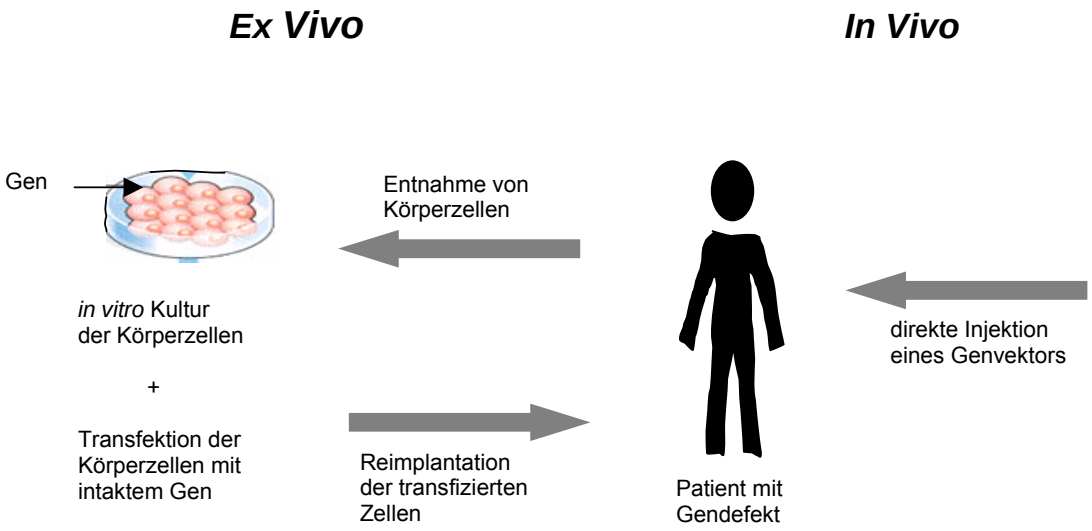


Abbildung 1.1: Methoden des Gentransfers. In der somatischen Gentherapie unterscheidet man zwischen der *ex vivo*- und der *in vivo*-Gentherapie. Das *ex vivo*-Verfahren basiert auf einer Entnahme von Körperzellen aus dem Patienten, die anschließend vermehrt, gentechnisch verändert und dem Patienten reimplantiert werden. Bei dem *in vivo*-Verfahren werden die fehlenden Erbinformationen dem Körper des Patienten direkt zugeführt. Vektoren, die das Gen enthalten, werden injiziert oder inhaliert und gelangen so an ihren Funktionsort.

Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie ergeben sich nicht nur für die Korrektur klassischer Erbkrankheiten mit isoliertem Einzeldefekt wie zum Beispiel der Mukoviszidose oder der Bluterkrankheit, sondern auch für die Behandlung anderer schwerer Erkrankungen. So erhofft man sich ebenso erworbene Erkrankungen (z.B. AIDS) und multifaktorielle genetische Erkrankungen (Tumore, Herz-Kreislaufkrankheiten) therapieren zu können (Edelstein *et al*., 2004).

Die große Bedeutung der somatischen Gentherapie ergibt sich daraus, dass diese Therapie eine echte Kausaltherapie darstellen könnte. Eine Hürde stellen derzeit die noch nicht vollständig ausgereiften „Genfähren“, die so genannten Genvektoren dar.

1.1.2 Genvektoren

Für den Transfer genetischen Materials in Körperzellen stehen drei methodisch unterschiedliche Ansätze zur Verfügung: das Einschleusen von „nackter DNS“, der Gentransfer mit viralen Vektoren und der Gentransfer mit nicht-viralen Vektoren.

Die Applikation nackter Plasmid-DNS kann beispielsweise durch Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektroporation) erfolgen. Durch elektrische Pulse bildet die Zellmembran Mikroporen aus, durch die die DNS aufgenommen werden kann (Zimmermann *et al.*, 1973). Des Weiteren kann die Applikation nackter Plasmid-DNS auf intramuskulärem, intravenösem oder intratrachealem Weg erfolgen (Wolff *et al*., 1990; Jiao *et al*., 1992). Da nackte Plasmid-DNS durch endogene Nukleasen abgebaut wird, muss die DNS während des Transfers vom Ort der Applikation bis zur Genexpression im Zellkern geschützt werden (Wolff *et al.,* 1991). Nur so kann gewährleistet werden, dass Transkription, Translation und Proteinbiosynthese stattfinden können. Aus diesem Grund werden für den Transport der DNS in die Zielzellen meist Transportvehikel, d.h. Genvektoren verwendet.

Viren erscheinen auf den ersten Blick als optimale Genvektoren. Sie sind von Natur aus darauf ausgerichtet, ihre Gene in fremde Zellen einzuschleusen. In der viralen Gentherapie werden Viren durch rekombinante Techniken so verändert, dass sie ihre Replikationseigenschaften und Pathogenität verloren haben (Rosenfeld *et al*., 1992). Die für den Menschen schädlichen viralen Gene werden ausgeschaltet und stattdessen wird das sogenannte „therapeutische Gen“eingesetzt. Alle für die Bindung an die Wirtszelle und die Einschleusung der DNS benötigten Bestandteile des Virus bleiben dabei intakt.

Lange Zeit galten Adenoviren als ideale Vektoren für den viralen Gentransfer. Diese icosaedrischen, doppelsträngigen DNS-Viren beinhalten lange Genome und können somit auch größere therapeutische DNS-Fragmente als andere Viren beherbergen (ca. 20 kb). Außerdem lassen sich diese hoch infektiösen Erreger (grippale Infekte; Atemwegserkrankungen) relativ leicht in bereits völlig ausdifferenzierte Zellen, beispielsweise der Leber, der Blutgefäße, des Gehirns oder auch der Atemwege einschleusen (Volpers *et al*., 2004). Ein Nachteil der Adenoviren besteht jedoch darin, dass die Viren das von ihnen eingeschleuste Genmaterial nicht in das Erbgut der Wirtszelle (Chromosomen) integrieren, und es somit episomal verbleibt. Dies setzt zwar das Risiko herab durch falschen Einbau in das zelleigene Wirtsgenom möglicherweise Fehlfunktionen auszulösen, jedoch ist somit die Wirkung einer Gentherapie mit Adenoviren in der Regel nicht von Dauer. Viel gravierender ist jedoch die Tatsache, dass Adenoviren eine hohe Immunogenität besitzen also beim Patienten heftige Immunantworten auslösen können und bereits in mindestens einem Fall zum Tod eines Gentherapiepatienten geführt haben (siehe 1.2 Erfolge und Niederlagen in der Gentherapie) (Edelstein *et al*., 2004).

Retrovirale Vektoren (z.B. Abkömmlinge von murinen Retroviren) sind die am häufigsten verwendeten Vektoren in der viralen Gentherapie. Das Genom der Retroviren, zu denen

auch das HI-Virus gehört, besteht im Gegensatz zum Erbgut der oben genannten Adenoviren nicht aus DNS, sondern aus RNS und wird nach Umschreibung der RNS in DNS mittels der Reversen Transkriptase fest in das Erbgut der Wirtszelle eingebaut. Der daraus resultierende Vorteil ist die Gewährleistung einer dauerhaften Expression der übertragenen Gene (Panno J., 2005). Ist ein therapeutisches Gen also einmal auf diese Weise integriert, hält die Wirkung dauerhaft an, die Therapie braucht also daher im Idealfall nicht wiederholt zu werden. Allerdings birgt genau dieser Einbau auch erhebliche Risiken. Retroviren integrieren oftmals verstreut mehrere Kopien des eingeschleusten Gens im Genom des Wirtes. Eine Integration der Gene an falscher Stelle kann Folgeschäden hervorrufen. So kann die Funktion wichtiger Steuerungsgene zerstört werden und beispielsweise ungeregeltes Zellwachstum und letztendlich die Ausbildung von Tumoren zur Folge haben. (siehe 1.2 Erfolge und Niederlagen in der Gentherapie). Des Weiteren können meist nur Zellen infiziert werden die sich im Stadium der Teilung befinden (Anderson W.F., 1992).

Eine weitere Gruppe viraler Vektoren die in der letzten Zeit mehr in den Fokus der Wissenschaftler gerückt ist, ist die Gruppe der Adeno-Assoziierten-Viren (AAV). Hierbei handelt es sich um kleine nicht-pathogene Viren, die ein einzelsträngiges Genom besitzen und zur Familie der Parvoviridae gehören (Zabner *et al*., 2000). Für die Replikation und den Einbau des Genmaterials in das menschliche Genom benötigen AAV die Hilfe anderer Viren. Als Helferviren können Adenoviren oder Herpesviren dienen. AAV können eine ebenso breite Palette von Zellen infizieren wie Adenoviren, rufen dabei aber seltener eine Immunantwort des Organismus hervor. Außerdem sind sie durch eine mögliche Integration des therapeutischen Gens in das Genom des Wirtes besonders gut geeignet für Langzeitexpressionen (Grimm *et al*., 1999). AAV besitzen jedoch nur eine begrenzte Packungsgröße und es treten Probleme aufgrund von Kontaminationen mit Helferviren und deren hohe Immunogenität auf.

Die Effizienz und die Anwendbarkeit viraler aber auch nicht-viraler (siehe 1.3 Nicht-virale Genektoren) Genvektoren wurden weltweit in mehr als 900 klinischen Gentherapie-Studien in 24 verschiedenen Ländern an über 3400 Patienten getestet (Edelstein *et al*., 2004). Dabei konnte die Hoffnung, die in die Anwendung der somatischen Gentherapie gesteckt wurde, lediglich bei SCID-Patienten und eventuell bei CGD-Patienten erfüllt werden.

1.2 Erfolge und Niederlagen in der Gentherapie

Im Jahr 1989 fand in den USA der erste Gentherapie-Versuch an fünf an malignem Melanom erkrankten Patienten statt. Diesen Patienten wurden Lymphozyten entnommen die in den Tumor infiltrierten. Diese Lymphozyten wurden *ex vivo* mittels viralen Gentransfer (Retroviren) mit einem bakteriellen Gen, das für eine Neomycinresistenz kodiert, transfiziert und anschließend in die Patienten reinfundiert. Bei zwei der behandelten Patienten verringerte sich im Anschluss an die Therapie das Tumorwachstum (Rosenberg *et al*., 1990). Dieser Pionier-Versuch schaffte das nötige Wissen und bereitete den Weg für nachfolgende Gentherapie-Studien.

Die erste klinische und eine der bekanntesten Gentherapie-Studien folgte im Jahr 1990 und fand an zwei Mädchen statt, die an einer schweren kombinierbaren Immundefekterkrankung, dem Adenosindeaminase (ADA)-Mangel litten (Blaese *et al*., 1995). Eines der beiden Mädchen war die vierjährige Ashanti DeSilva, die als eine der ersten Patienten der somatischen Gentherapie in die Geschichte der Medizin einging. Das bei ihrer Erkrankung fehlende Enzym ADA ist verantwortlich für den Abbau toxischer Metabolite des Purinstoffwechsels. Liegt ein Mangel an ADA vor, so führt dies zu einer Akkumulation von Adenosin, Deoxyadenosin und Deoxyadenosin-triphosphat. Diese Stoffwechselmetabolite induzieren bei Vorläuferzellen der Lymphozyten Zelltod durch Apoptose. Dies führt zu einem nahezu vollständigen Fehlen von T-Lymphozyten, NK(Natürliche Killer-)-Zellen und B-Lymphozyten. In der von Blaese und Anderson durchgeführten Studie wurden den beiden Patientinnen T-Lymphozyten, die die cDNS für das fehlende Enzym enthielten, mittels retroviraler Genvektoren *ex vivo* transfiziert und reinfundiert. Bei beiden Patientinnen kam es zu einer körpereigenen Expression von ADA, jedoch konnte auf eine begleitende medikamentöse Substitution des Enzyms nicht verzichtet werden (Bordignon *et al*., 1995).

Im September des Jahres 1999 erlitt die somatische Gentherapie nach der Durchführung einer Gentherapie an dem 18-jährigen Patienten Jesse Gelsinger, der an einem OTC (Ornithin-Transcarbamylase)-Mangel, einer schweren erblichen Stoffwechselerkrankung, litt einen schweren Rückschlag. Das Enzym OTC spielt bei der Harnstoffsynthese in der Leber eine Rolle. Ein Mangel an diesem Enzym führt zu einem erhöhten NH_4^+-Spiegel im Blut (Hyperammonämie) und kann dabei zum Koma und zu irreversiblen Hirnschäden führen (Stryer). Dem Patienten wurden abgeschwächte Adenoviren, die die cDNS für OTC trugen, in die rechte hepatische Arterie infundiert, woraufhin dieser infolge einer unerwartet starken inflammatorischen Reaktion gegen den viralen Vektor starb (Raper *et al*., 2003).

Eine erfolgreiche Gentherapie wurde erstmalig im Jahr 2000 von Alain Fischer in Paris an zehn Kindern durchgeführt, die unter dem angeborenen schweren x-chromosomalen kombinierten Immundefekt SCID-X1 litten. Diese bei einem von 150.000 neugeborenen Jungen auftretende Immunschwäche ist durch das Fehlen von ausdifferenzierten T- und NK -Lymphozyten gekennzeichnet. Das Fehlen dieser Lymphozyten wird durch Mutationen auf dem Gen das für die γc-Kette kodiert, die eine Untereinheit der Zytokin-Rezeptoren IL(Interleukin)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 darstellt (Cavazzano-Calvo *et al*., 2000) ausgelöst. Den Patienten wurden Zellen aus dem Knochenmark entnommen und anschließend konnte das defekte Gen mittels retroviralen Gentransfer komplementiert werden. Die genetisch korrigierten Zellen wurden anschließend retransplantiert. Im April 2002 berichtete Fischers Team, dass die Mehrheit der Patienten geheilt seien, über ein funktionierendes Immunsystem verfügten und sogar gegen einige Krankheiten geimpft werden konnten. Zu einem großen Rückschlag für diese Gentherapie-Studie kam es Ende des Jahres 2002. Zwei der zehn behandelten Kinder erkrankten an Leukämie (Hacein-Bey-Abina *et al*., 2003a) aufgrund einer Integration der für die Gentherapie verwendeten Retroviren in der Nähe des LMO2 Protoonkogen Promotors, was zu einer Transkription und Expression von LMO2 führte (Hacein-Bey-Abina *et al*., 2003b). Mittlerweile bekam ein drittes Kind, das innerhalb dieser Studie gentherapeutisch behandelt wurde, ebenfalls Leukämie (Check, 2005).

In 70% der weltweit durchgeführten Gentherapie-Studien werden zurzeit noch virale Genvektoren verwendet (Edelstein *et al.,* 2004). Aufgrund der erhöhten Risiken und der extrem hohen Kosten die bei der Verwendung viraler Vektoren auftreten, sowie deren geringe Kapazität therapeutische DNS zu tragen, geht man dazu über, vermehrt nicht-virale Vektoren in der Gentherapie einzusetzen. Der Einsatz nicht-viraler Vektoren in der Gentherapie verfolgt das Ziel, die vorteilhaften Eigenschaften des viralen Gentransfers zu imitieren, und gleichzeitig dessen Nachteile zu vermeiden.

1.3 Nicht-virale Genvektoren

Dem Gentransfer nackter Plasmid-DNS und dem viralen Gentransfer (siehe 1.1.2 Genvektoren) steht der von nicht-viralen Genvektoren vermittelte Gentransfer gegenüber. Nicht-virale Systeme sind, was Transfektion und Genexpression anbelangt, im Moment zwar weniger effektiv als virale Systeme, sie bieten jedoch Vorteile in der Herstellung, im sicheren Umgang, ihrer Fähigkeit Transgene einzukapseln (El-Aneed, 2004) und ihrer

niedrigen Immunogenität. Des Weiteren schirmen die Trägermaterialen die DNS effektiv gegen äußere Einflüsse ab. Zu diesen Einflüssen zählt u. a. die natürliche DNase-Aktivität im Serum, die die Erbsubstanz zerstört.

Als nicht-virale Genvektoren stehen unter anderem kationische Lipide (Felgner *et al*., 1987) bzw. kationische Polymere (Wu and Wu, 1987) zur Verfügung. Diese Vektoren weisen unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung auf. Dadurch können sie über elektrostatische Anziehungskräfte die negativ geladene DNS komplexieren. Dieser Prozess, der als DNS-Kondensation bezeichnet wird ist nötig, da die negative Ladung die DNS am Eintritt in die Zelle hindert.

Auf Polymeren basierende Genvektorkomplexe bezeichnet man auch als Polyplexe. Als erste synthetische Substanzen zur Komplexierung der DNS wurden kationische Polymere wie Poly-L-Lysin (PLL), Chitosan oder Polyethylenimin (PEI) hergestellt und in vesikulärer Form verwendet (Wagner *et al*., 1990). Die überaus kompakten Polyplexe sind kleiner als 200 nm und zeichnen sich durch gute Transfektionsraten aus. Durch Variation der Nettoladung am Polymer (siehe 2.5.2 Das N/P-Verhältnis), der Länge des Polymers und dessen Verzweigungsgrad kann man die Bindungsstärke zur DNS und die relative Größe der entstehenden Komplexe steuern.

Auf Lipiden basierende Genvektorkomplexe bezeichnet man als Lipoplexe. Kationische Liposomen bestehen zumeist aus einem positiv geladenen Lipid und einem neutralen „Helferlipid“. In Anlehnung an häufig verwendete Liposomentransportsysteme wurde eine Vielzahl positiv geladener Lipide synthetisiert. Beispiele hierfür sind das kationische Lipid n-[1(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA), das als Ausgangsmolekül für die heute verwendeten Lipide in der Gentherapie diente, und n-[1(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumpropan (DOTAP) (Leventis *et al*., 1990). Durch Mischung mit natürlichen Lipiden sind leicht herstellbare, in Form, Gestalt und Bindungsstärke stark variierende DNS/Lipid-Komplexe realisierbar (Felgner *et al*., 1991). Die Größe der Lipoplexe variiert zwischen 50 und 800 nm. Im Allgemeinen sind sie weniger stabil als Polyplexe, aber oft sehr effektiv bei der DNS-Übertragung, da sie durch ihre lipophilen Eigenschaften eine gute Bindungsaffinität an die Zelloberfläche zeigen (Mislick and Baldeschwieler, 1996).

Darüber hinaus gibt es seit einiger Zeit Untersuchungen zu Nanopartikeln oder Nanosphären die sich ebenfalls zur Komplexierung von DNS eignen (Fattal *et al*., 1989). Die wichtigsten Vertreter sind Solid Lipid Nanoparticles (SLN) (Olbrich *et al*., 2001, Rudolph *et*

al., 2004), Nanopartikel aus PLGA/Chitosan-Mischungen (Kumar *et al.,* 2002), aber auch oberflächenmodifizierte Silika-Nanopartikel (Kneuer *et al*., 2000). Bei einer Komplexierung der DNS mit diesen Nanopartikeln entstehen so genannte Nanoplexe. Die Größe dieser Nanoplexe schwankt zwischen 100 und 600 nm. Durch die ergänzende sterische Abschirmung der DNS sind solche Trägersysteme oft sehr stabil gegenüber äußeren Einflüssen. Des Weiteren zeichnen sie sich durch ihre geringe Toxizität aus.

Veröffentlicht wurden auch Studien in denen schon existierende nicht-virale Genvektoren, u. a. oben genannte, modifiziert, und anschließend für den Gentransfer verwendet wurden. So wurden Kernlokalisierungssignale (NLS) an einen „Carrier" wie beispielsweise kationische Polymere oder direkt an die DNS gekoppelt um einen aktiven Transport in den Zellkern zu erreichen (Tachibana *et al*., 2001; Bremner *et al*., 2001). Der Transport genetischen Materials in den Zellkern findet über Zellkernporen statt. Kleinere Moleküle gelangen durch passive Diffusion in den Zellkern. Größere Moleküle werden durch einen aktiven und selektiven Mechanismus aufgenommen, der mittels Bindung einer Kernlokalisierungssequenz an den Kerntransporter induziert wird (Stryer). Bei den Kernlokalisierungssequenzen handelt es sich zumeist um basische Peptidsequenzen. So besteht das Arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Proteins aus der basischen Peptidsequenz (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) und repräsentiert einerseits eine Proteintransduktionsdomäne (PTD) und andererseits eine Kernlokalisierungssequenz. Es konnte beobachtet werden, dass eine Kombination aus nicht-viralen Transfektionsreagenzien und der TAT-Sequenz zu einer Steigerung der Gentransfereffizienzen führte (Rudolph *et al*., 2003).

Bei dem in vorliegender Arbeit verwendeten nicht-viralen Genvektor handelt es sich um das kationische Polymer PEI. Es zeigt viel versprechende Gentransfereffizienzen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dabei verhalten sich die verschiedenen Formen von PEI, das verzweigte (B-PEI) und das lineare PEI (L-PEI) *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich. Während B-PEI hohe Gentransfereffizienzen *in vitro* aufweist, konnte hohe Genexpression nach systemischer Applikation vor allem von auf L-PEI basierenden Genvektorkomplxen *in vivo* gezeigt werden. (Wightman *et al*., 2001).

Der Vorteil des kationischen Polymers PEI liegt an seinen chemischen Eigenschaften. Aufgrund der Tatsache dass jedes dritte, bzw. bei einem physiologischen pH-Wert ungefähr jedes fünfte Atom im Molekül ein potentiell protonierbares Stickstoffatom ist, ist die kationische Ladungsdichte sehr hoch. Außerdem ist es aufgrund der sich wiederholenden Ethylamin-Einheiten sehr gut wasserlöslich (Kircheis *et al*., 2001). Eine Bindung zwischen

PEI und der DNS, und somit die Bildung der oben genannten Polyplexe, erfolgt mittels elektrostatischer Anziehung.

Wird PEI für Transfektionen, dem Einschleusen der Genvektorkomplexe in Zellen, verwendet, werden die Polyplexe endozytotisch aufgenommen. Hierbei spielen Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren bzw. Syndekane eine Rolle (Mislick and Baldeschwieler, 1996). Anschließend an die Bindung der Polyplexe an die Rezeptoren erfolgt die Internalisierung in die Zelle mittels Ausbildung von endozytotischen Vesikeln (Durrbach *et al*., 1996). Die Polyplexe werden von den Endosomen in die Lysosomen transportiert aus denen sie freigesetzt werden müssen, damit die DNS in den Zellkern transportiert werden kann. In diesem Schritt kommt seine Eigenschaft Protonen binden zu können, zugute. Dabei wirkt PEI aufgrund seiner hohen Pufferkapazität regelrecht als „Protonenschwamm“ und führt bei einem pH-Abfall im Endolysosom zum osmotischen Anschwellen und schließlich zum Platzen des Endolysosoms und damit zu einer Freisetzung der Genvektorkomplexe in das Zytoplasma. (Boussif *et al*., 1995). Dies ist die Voraussetzung dafür, dass die DNS in den Zellkern gelangen kann, um dort transkribiert werden zu können.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Transfereffizienz von PEI stark von dem Ladungsverhältnis (N/P-Verhältnis) des Polyplexes abhängig ist (Kabanov *et al*., 1991). Dieses N/P-Verhältnis beeinflusst ebenso die Größe und Löslichkeit des Komplexes (Cherng *et al*., 1996) und darf nicht zu niedrig gewählt werden, da die entstehenden Komplexe sonst neutral sind und aggregieren (Kircheis *et al*., 2001).

PEI zählt zu den meist untersuchten kationischen Polymeren und aufgrund der oben genannten Vorteile eignet es sich hervorragend für den Transfer genetischen Materials in zu therapierende Zellen. Allerdings findet die Aufnahme von PEI unspezifisch statt. Durch Modifikationen von PEI mit Liganden, kann erreicht werden, dass nach Komplexierung von PEI mit der zu transferrierenden DNS, die Aufnahme dieser Genvektor-Komplexe spezifisch erfolgt.

1.4 Rezeptor-vermittelter Gentransfer

Die Methode des Rezeptor-vermittelten Gentransfers wurde entwickelt, um die Aufnahme der Genvektorkomplexe zu steigern und zu spezifizieren. Der Aufnahme-Mechanismus in die Zelle ist dem des nicht-Rezeptor-vermittelten ähnlich. Der einzige Unterschied ist der,

dass Rezeptoren die spezifische Aufnahme der DNS in die Zelle über Liganden vermitteln (Wu and Wu, 1987). Zum Komplexieren der DNS werden z. B kationische Polymere (PEI), an die ein Ligand gekoppelt wurde, verwendet. Die Aufnahme der Polyplexe erfolgt über Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Dabei binden die Liganden in einem ersten Schritt an den Rezeptor. Anschließend erfolgt, wie bei der nicht-Rezeptor-vermittelten Endozytose die Internalisierung mit Hilfe von Aktinfilamenten durch Ausbildung endozytotischer Vesikeln (Durrbach *et al*., 1996). Danach werden die Polyplexe dem Weg der Endozytose folgend von den Endosomen in die Lysosomen transportiert. Im Anschluß daran müssen sie aus den Lysosomen freigesetzt werden. Nur so kann der Transport der DNS in den Zellkern erfolgen. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung des Prinzips der Rezeptor-vermittelten Endozytose.

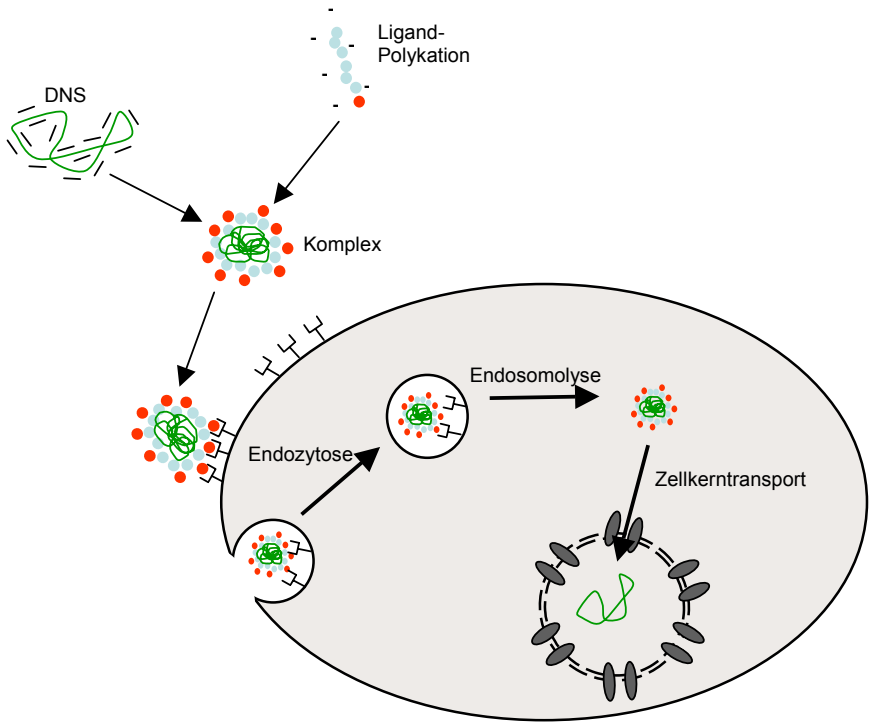


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des nicht-viralen, Rezeptor-vermittelten Gentransfers. Aus DNS und Ligand-Polykation bestehende Komplexe werden über Rezeptoren gebunden, die sich auf der Oberfläche der Zelle befinden. Die anschließende Internalisierung findet mittels Endosomen statt. Durch Endosomolyse werden die Komplexe in das Zytosol der Zelle freigegeben und können in den Zellkern transportiert werden.
DNS: grün; Polykation: blau; Ligand: rot.

Die Liganden, die die Aufnahme über einen spezifischen Rezeptor vermitteln, können an verschiedene Substanzen gekoppelt werden. Bei einer Kopplung der Liganden an das kationische Polymer PLL müssen zusätzlich endosomolytische Substanzen wie Chloroquin

und Glycerol zu den Genvektorkomplexe zugegeben werden, damit eine Freisetzung dieser Komplexe aus den Endo- bzw. Lysosomen erfolgen kann (Kircheis *et al*., 2001). PEI hingegen besitzt eine intrinsische endosomolytische Aktivität und vermag aufgrund seiner hohen Pufferkapazität die endosomale Membran zu destabilisieren und somit selbst Endosomolyse zu induzieren (siehe 1.3 nicht-virale Genvektoren).

Bei ersten Modellexperimenten zum Rezeptor-vermittelten Gentransfer wurde PLL als DNS-Bindungsmolekül und Asialoorosomucoid als Ligand verwendet. Mit diesen Konjugaten gelang ein effizienter Transfer in Leberzellen über den so genannten Asialoglykoprotein-Rezeptor (Wu and Wu, 1988). Mittlerweile wurden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer an Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und Glycoproteine verschiedenste Liganden gekoppelt (Kircheis *et al*., 2001). Um Tumorzellen anzusteuern wurde beispielsweise Transferrin (Tf) als Ligand verwendet. Dabei wurden TF-Liganden an PLL gekoppelt und mittels des Transferin-Rezeptors, der auf Tumorzellen überexprimiert wird, in die Zellen aufgenommen. In der Zellkultur erreichten diese TF-PLL-Konjugate hohe Transfereffizienzen (Wagner *et al*., 1990; Wagner *et al*., 1991). Leider konnten diese erfolgversprechenden Ergebnisse nicht auf *in vivo* Studien übertragen werden, da die kationischen Komplexe sofort eine Wechselwirkung mit den Bestandteilen des Blutplasmas eingingen. Daraufhin gaben Wagner *et al*. nach Komplexierung von Tf-PEI-DNS-Partikeln hydrophiles PEG (Poly(ethylenglykol)) vor der Transfektion zu den Komplexen (post-PEGylierung) hinzu. Durch die Zugabe von PEG findet eine Abschirmung der positiven Ladung statt und die Komplexe sind vor der Wechselwirkung mit Bestandteilen des Blutplasmas geschützt (Ogris *et al*., 1999). Dadurch erhöhte sich die Transfereffizienz gegenüber nicht-PEGylierten Komplexen signifikant.

Viel versprechende Ergebnisse erzielten in letzter Zeit Untersuchungen bei denen Zucker-Liganden wie Galaktose, Mannose oder Laktose, verwendet wurden. Für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer in Hepatozyten eignen sich hervorragend galaktosylierte PEI/pDNS Komplexe (Zenta *et al*., 1997; Bettinger *et al*., 1999). Hohe Gentransfereffizienzen wurden ebenso durch laktosylierte PEI/pDNS Komplexe in Lungenepithelzellen (Grosse *et al*., 2004) und durch mannosylierte PEI/pDNS Komplexe in Makrophagen und Dentritische Zellen erzielt (Diebold *et al*., 1999).

In vorliegender Arbeit wurden Uronsäure-modifizierte-PEI-PEG-Konjugate angewendet und analysiert. Als Liganden wurden Galakturonsäure, Laktobionsäure und Mannuronsäure verwendet. Diese wurden entweder direkt an PEI oder über PEG an PEI gekoppelt. Der Vorteil dieser Konjugate besteht darin, dass, durch die Liganden, die Konjugate Rezeptor-

vermittelt aufgenommen werden. Des Weiteren wird, durch die Kopplung von PEG an PEI, die positive Ladung der Komplexe abgeschirmt. Die Konjugate stellen also mögliche Kandidaten für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* dar.

1.5 Artifizielle Chromosomen in der Gentherapie

Artifizielle Chromosomen, bzw. Minichromosomen stellen aufgrund ihrer Eigenschaften ebenso hervorragende Vektoren für die Gentherapie dar. Sie sind nicht immunogen, können stabil in die Wirtszelle integriert werden, replizieren sich autonom und können große Fragmente exogener DNS beherbergen. Das bedeutet dass Gene oder ganze Gendomänen mitsamt regulatorischen Bereichen, die für eine zelltypspezifische Expression des Transgens unerlässlich sind, inseriert werden können. Sie stellen daher ein Konzept dar, das gleichzeitig Sicherheit, regulierte Expression und Langzeitwirkung erreichen kann. Die Entwicklung künstlicher menschlicher Chromosomen (HACs, „Human Artificial Chromosomes“) hat sich seit der Beschreibung der ersten Generation der HACs (Harrington *et al*., 1997) rasant fortgesetzt. Es stehen heute eine Vielzahl künstlicher Chromosomenvektoren, wie z.B. MAC („Mammalian Artificial Chromosomes“)-, BAC („Bacterial Artificial Chromosomes)- oder YAC („Yeast Artificial Chromosomes“)-basierende Konstrukte und Mini-Chromosomen zur Verfügung (Lipps *et al*., 2003), und im Laufe ihrer Konstruktion konnte breites Wissen über die funktionellen Elemente eukaryotischer Chromosomen, wie z.B. Zentromere, Telomere oder Replikationsursprünge, gewonnen werden (Huxley *et al*., 1994; Ascenzioni *et al*., 1997).

Die Erzeugung künstlicher Chromosomen erfolgt prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen (Abb. 1.2). Eine der beiden Methoden, die als „top down“-Methode bezeichnet wird, basiert auf Fragmentierung natürlicher Chromosomen mit dem Ziel, ihren DNS-Gehalt auf ein Minimum zu reduzieren. Dies kann entweder mittels Bestrahlung (Auriche *et al*., 2001) oder Integration telomerischer Sequenzen (Farr *et al*., 1992) erreicht werden. Das Endprodukt ist also aus einem endogenen Chromosom entstanden und wurde innerhalb der lebenden Zelle modifiziert. Die andere der beiden Methoden wird als *de novo*-Synthese oder „bottom up“-Methode bezeichnet. Hierbei können funktionelle chromosomale Sequenzelemente, wie telomerische, zentromerische und genomische Sequenzen aus BAC-, PAC- oder YAC-Banken isoliert werden und durch biochemische Reaktionen kloniert und modifiziert werden. Dabei können Markergene oder therapeutische Gene in die Chromosomen eingebracht werden. Dieser Weg wurde bei der Konstruktion der ersten HACs verwendet (Harrington *et*

al., 1997). Die aus beiden Ansätzen resultierenden artifiziellen Chromosomen besitzen etwa ein Fünftel bis ein Zehntel der Größe natürlicher Chromosomen und weisen alle Strukturen, die bei der Zellteilung für die Verteilung auf die Tochterzellen nötig sind, auf. Dazu gehören Zentromere, die sicherstellen, dass bei der Zellteilung die verdoppelten Chromosomen regulär in die Tochterzellen gelangen, sowie Telomere, die wichtig für die korrekte Verdopplung der Chromosomen sind und zudem die Chromosomen-Enden vor enzymatischem Abbau schützen. Die künstlichen Chromsomen tragen zunächst keinerlei Erbinformation. Gene, die in Zellen eingeschleust werden sollen, können – wie in einem Sandwich – zwischen der Zentromer-Region und den Telomeren in den Minichromosomen integriert werden.

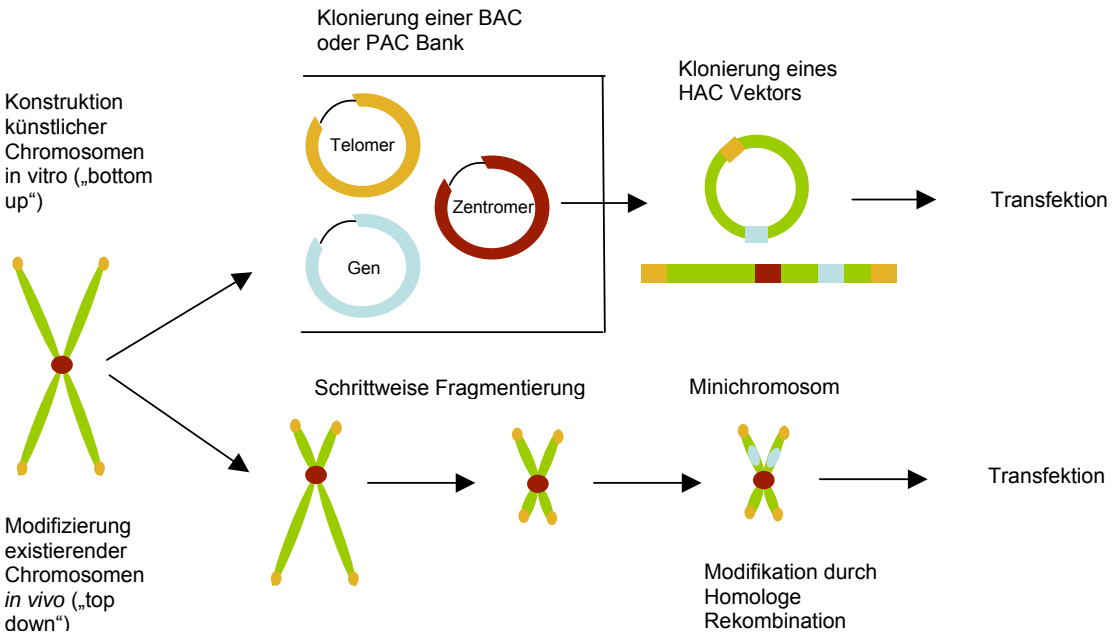


Abbildung 1.3: Herstellung artifizieller Chromosomen. Bei der „bottom up“-Methode werden artifizielle Chromosomen nach Transfektion nakter DNS Konstrukte aus funktionellen chromosomalen Sequenzelementen (Telomer, Zentromer, genomische Sequenzen) *de novo* synthetisiert. Zusätzlich können therapeutische Gene in die Chromosomen eingebracht werden. Ein alternativer Ansatz besteht in der Fragmentation existierender Chromosomen *in vivo*. Nach mehreren Verkürzungs-Schritten kann ein minimales menschliches Chromosom erzeugt werden, das durch homologe Rekombination weiter modifiziert werden kann.
Genomische Sequenzen: grün; zentromerische DNS: rot; telomerische Sequenzen: orange; therapeutisches Gen oder Selektionsmarker: blau.

Durch die Synthese künstlicher Chromosomen erhofft man sich einen wertvollen Beitrag für die Anwendung der Gentherapie bei angeborenen oder erworbenen Erkrankungen leisten zu können. Bisherige Ansätze der Gentherapie beruhten darauf, nur die kodierenden Sequenzen (Exons) der bei den Erbkrankheiten defekten Gene in großer Zahl in Körperzellen einzuschleusen. Nachdem die Gene zum Beispiel durch Viren in die Zellen gebracht werden (siehe 1.1.2 Genvektoren), hofft man, dass sie in das vorhandene Genom eingebaut, transkribiert und translatiert werden, und die Zellen somit ein funktionierendes Protein herstellen können. Dies scheitert unter anderem jedoch daran, dass die Zellen aufgrund der viralen Proteine abgestoßen werden. Zudem wird durch nicht-viralen Gentransfer eingebrachte DNS bei der Zellteilung nicht auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt, sondern geht im Verlauf einiger Zellteilungen verloren. Diejenige DNS, die tatsächlich in das zelleigene Genom eingebaut wird, landet meist in nichttranskribierten inaktiven Bereichen (Heterochromatin) oder innerhalb anderer wichtiger Teile des Genoms deren Funktion dadurch gestört werden kann.

Einige dieser Probleme hofft man durch künstliche Chromosomen umgehen zu können. Dadurch dass sie an den Enden mit Telomeren ausgestattet sind, will man verhindern, dass sie von der Zelle für Bruchstücke kaputter DNS gehalten werden und abgebaut, oder an irgendeiner Stelle des Genoms eingebaut werden. Durch die Existenz der Zentromere werden die Chromosomen bei jeder Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben und können sozusagen vollständig autonom in den Zellen existieren. Eine Regulation der Genexpression will man dadurch erreichen, dass nicht nur die Exons, d.h. die kodierenden Bereiche eines Gens, sondern das gesamte Gen, inklusive der Introns in die Zellen eingeschleust wird. Dadurch hofft man auch die regulatorisch wirksamen Bereiche der DNS in die Zellen zu transfizieren und somit eine kontrollierte Genexpression zu erreichen. Für den Transfer der künstlichen Chromosomen in die Zellen kommen vor allem nicht-virale Genvektor-Systeme in Frage, da diese Konstrukte höhere Verpackungskapazitäten als virale Vektoren aufweisen.

1.6 Zielsetzung der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, neuartige synthetische Genvektoren bzw. deren Aufnahme-Mechanismus in verschiedene Zelllinien und deren Anwendbarkeit für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer *in vivo* zu charakterisieren. Bei den zu analysierenden Vektoren handelt es sich um Uronsäure-funktionalisierte PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate, die sich durch den Besitz dreier funktioneller Bestandteile auszeichnen. Durch das Vorhandensein von PEI kann eine Bindung und Kondensierung der DNS gewährleistet werden, PEG besitzt u. a die Fähigkeit positive Ladungen abzuschirmen und eine Kopplung von Uronsäuren an die Konjugate sollte zu einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Komplexe führen.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Methode zur Transfektion von Minichromosomen in Zellen entwickelt werden. Für den Transfer von artifiziellen Chromsomen in Akzeptor-Zellen stehen derzeit nur aufwendige und komplizierte Verfahren zur Verfügung. Eine effiziente, jedoch einfache Methode zur Transfektion von künstlichen Chromsomen in verschiedene Zelllinien könnte daher deren Einsatz als Vektoren für die Gentherapie unterstützen.

2. Material und Methoden

2.1 Synthese der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate

2.1.1 Herstellung des PEI-PEG-Pfropfcopolymers

Die unter diesem Punkt beschriebenen Synthesen der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate sowie der fluoreszenzmarkierten Dextran-Konjugate und die unter 2.3 aufgeführten analytischen Methoden zur Charakterisierung der Polymere wurden von Nathalie Sieverling bzw. Maren Niclasen im Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm durchgeführt.

Als Ausgangs-Polymer wurde das hochmolekulare, wasserfreie Polyethylenimin (PEI) der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet. Durch Fraktionierung von PEI mit Hilfe von Ultrafiltration (regenerierte Cellulose, Cut-off: 10 kD) wurde eine engere Molmassenverteilung erhalten und niedermolekulare Verunreinigungen abgetrennt.

In einem 250ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer sowie Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr wurden 35,0 g Poly(ethylenglykol)-monomethylether (M=350 g/mol; 0,1 mol) zu einer Mischung aus 27,76 g Epichlorhydrin (0,3 mol; M=92,53 g/mol, Sdp.: 115-117°C), 3,2 g Natriumhydroxyd (0,08 mol; M=40 g/mol) und 0,5 ml Wasser gegeben und für 16 h auf 60°C unter Argonatmosphäre und anschließend für 1,5 h auf 90°C erhitzt. Das Produkt wurde in 150 ml Chloroform (Sdp.: 61,3°C; ρ=1,483 g/ml) suspendiert und mit 100 ml Wasser gemischt. Für die Justierung des pH-Wertes auf pH 7 wurde Natriumhydrogencarbonat (NaH_2PO_4) verwendet und der Feststoff wurde anschließend abfiltriert.

Nach der Phasenseparation wurde die organische Phase zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

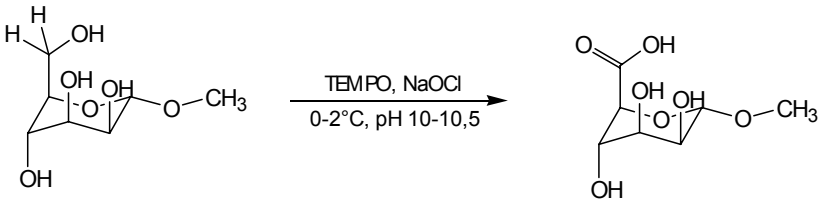
Das verbliebene Epichlorhydrin wurde im Hochvakuum bei 10^{-2}-10^{-3} mbar entfernt. Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung von Epichlorhydrin wurde der Methoxy-poly(ethylenglykol)-glycidylether im Basischen erwärmt, dann mittels Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitrat versetzt. Bei Anwesenheit von Epichlorhydrin wurde ein Niederschlag von Silberchlorid gebildet.

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer sowie Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr wurde zu einer Lösung aus 20,0 g PEI (0,56 mmol) in 50 ml Methanol eine Lösung aus 6,0 g Methoxy-poly(ethylenglykol)-glycidylethyer (14,8 mmol) in 20 ml Methanol gegeben und die homogene Mischung auf 80°C erhitzt und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das erhaltene Pfropf-copolymer wurde anschließend mittels Dialyse (MWCO 4000-6000 g/mol) gegen deionisiertem Wasser aufgereinigt, um ungebundenes PEG (Poly(ethylenglykol)) und Methanol zu entfernen. Nach der Gefriertrocknung wurde ein wachsartiges, gelbes Gel mit einer Ausbeute von 75% erhalten.

Es wurde ein Copolymer mit 20 PEG_8-Seitenketten pro PEI-Molekül synthetisiert.

2.1.2 Synthese von Mannuronsäure durch selektive Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid

In einen 250 ml Dreihalskolben mit Magnetrührstab und Thermometer wurden 10,0 g Methyl-α-D-Mannopyranosid (0,0515 mol; MW=194,13 g/mol) sowie 0,0523 g Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Radikal (TEMPO; $3{,}35 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=156,25 g/mol) und 1,033 g Natriumbromid (10,04 mol; MW=102,89 g/mol) in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst. In einem 250 ml Becherglas wurden 77,25 ml einer Natriumhypochlorit-Lösung (14%-ig; 0,1545 mol; MW=64,45 g/mol) mit 1 M Salzsäure auf pH 10 eingestellt. Beide Lösungen wurden in einem Eisbad auf 0-2°C abgekühlt. Anschließend wurde die Natriumhypochlorit-Lösung in die erste Lösung gegeben und der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf pH=10 eingestellt. Während der Reaktion wurde der pH-Wert ständig kontrolliert und gegebenenfalls nachgeregelt. Nach 2 h wurde die Reaktion mit 13 ml Ethanol abgebrochen, das Gemisch mit 1 M Salzsäure auf pH 7 eingestellt und gefriergetrocknet. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in 100 ml Methanol gelöst, die Salze abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer destilliert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Ausbeute an Methyl-Mannuronsäure betrug 76%. Abbildung 2.1 zeigt die Oxidation von Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid zu Methyl-Mannuronsäure.

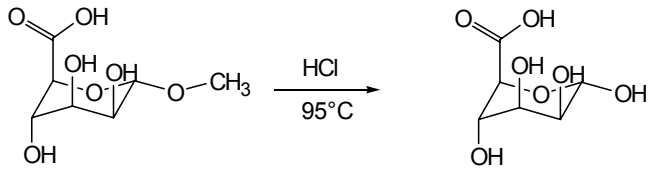


Methyl-α-D-Mannopyranosid Methyl-Mannuronsäure

Abbildung 2.1: Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid

Laut NMR-Analyse bestand das Produkt zu 70% aus Methyl-Mannuronsäure und zu 30% aus noch nicht umgesetzter Methyl-Mannose.

Anschließend wurde die glycosidische Schutzgruppe abgespalten (Abb. 2.2). In einen 250 ml Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer und Kühler wurde das Methyl-Mannuronsäure/Methyl-Mannose-Gemisch in 75 ml 1 M Salzsäure gelöst und für 20 min auf 95°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktion mit 75 ml 1 M Natronlauge abgebrochen und das Wasser am Rotationsverdampfer entfernt. Die Ausbeute betrug 12,4 g.



Methyl-Mannuronsäure Mannuronsäure

Abbildung 2.2: Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe

Bei der Reaktion fällt als Nebenprodukt Natriumchlorid (NaCl) an. Die Salzmenge kann jedoch abgeschätzt werden und sollte die Reaktion von Mannuronsäure mit den Polymeren nicht beeinflussen. Aus diesem Grund wurde das Produkt ungereinigt eingesetzt. Entsprechend des Gehaltes an Mannuronsäure in dem Gemisch (ca. 40%) wurden die für die Reaktionen mit den Basis-Polymeren einzusetzenden Massen hochgerechnet.

2.1.3 Synthese der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate am Beispiel von (ManAc-PEG)-PEI

In einen 100 ml Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Blasenzähler und Argon-Gaseinleitungsrohr wurden 0,106 g Mannuronsäure ($5{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=212 g/mol) und 0,105 g EDC ($5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=191,7 g/mol) in 10 ml deionisiertes Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 0,063 g NHS ($5{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol; MW=115,1 g/mol) versetzt. Nach ca. 3 min wurde eine Lösung aus 0,750 g O,O´-Bis-(3-aminopropyl)-poly(ethylenglykol)$_{32}$ ($5{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=1500 g/mol) in 5 ml Wasser zugefügt. Nach 2 h wurden zunächst 0,105 g EDC ($5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=191,7 g/mol) und 0,063 g NHS ($5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=115,1 g/mol) in 5 ml Wasser und anschließend eine Lösung aus 0,059 g Bernsteinsäure ($5{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=118,09 g/mol) in 5 ml Wasser zu dem Gemisch gegeben. Nach weiteren 2 h wurden abermals 0,105 g EDC ($5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=191,7 g/mol) und 0,063 g NHS ($5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol; MW=115,1 g/mol) in 5 ml Wasser und abschließend eine Lösung aus 2,0 g PEI ($5{,}0 \cdot 10^{-5}$ mol; M_P^{AUZ}=40000 g/mol) in 10 ml Wasser zugefügt. Die Lösung wurde unter einem Argongasstrom bei RT über Nacht gerührt, gegen deionisiertes Wasser dialysiert (MWCO 4000-6000 g/mol) und lyophilisiert. Die Ausbeute an (ManAc-PEG)-PEI nach der Gefriertrocknung betrug 35%.

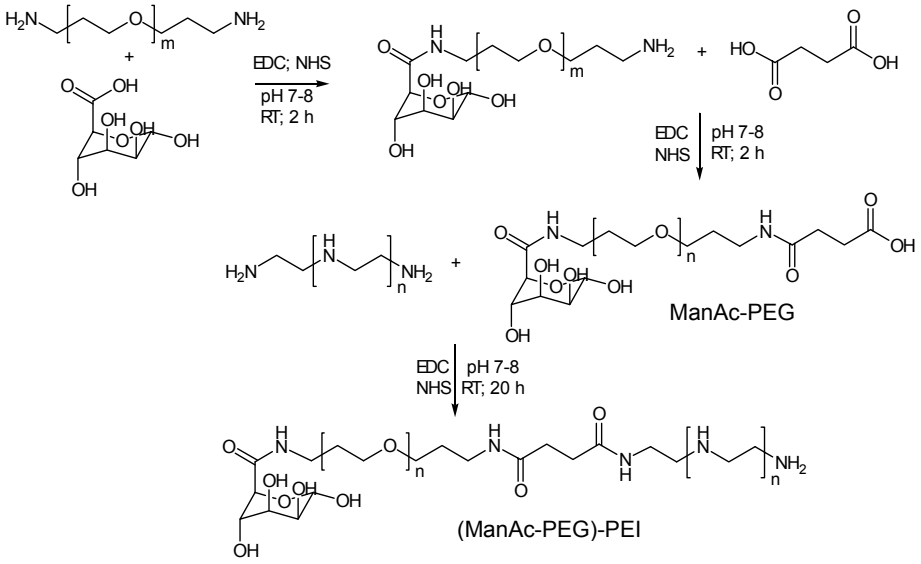


Abbildung 2.3: Synthese von (ManAc-PEG)-PEI

Alle anderen Uronsäure modifizierten-PEI-PEG-Konjugate wurden auf die selbe Art und Weise synthetisiert.

Die Konzentration jeder Konjugat-Lösung wurde nach der Methode von Ungaro *et al*. (2003), basierend auf einem Kupfer-Sulfat-Assay bestimmt.

2.2 Synthese der Dextran-Konjugate und Fluoreszenzmarkierung mit FLUOS

ManAc (4,6 mg, 0,0021 mmol) und EDC (4,6 mg, 0,024 mmol) wurden zusammen in 10 ml H_2O gelöst. Anschließend wurde NHS (2,7 mg, 0,024 mmol) und nach 3 min eine 0,0'-bis-(3-aminopropyl)-polyethylenglycol-Lösung (32,0 mg, 0,021 mmol) in H_2O zugegeben. Nach wiederum 2 h wurden erneut 4,6 mg EDC, 2,7 mg NHS (5 ml H_2O) und 5 ml Bernsteinsäure (2,5 mg, 0,021 mmol) zu dem Gemisch gegeben. Nach weiteren 2 h wurden 5 ml einer Lösung aus 4,6 mg EDC und 2,7 mg NHS zugegeben. Zuletzt wurden 10 ml einer wässrigen Amino-Dextran-Lösung (0,15 g, 0,0021 mmol) zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden 1,0 mg FLUOS (Carboxy-fluorescein-N-succinimidyl-ester; MW=473,4 g/mol; $1 \cdot 10^{-5}$ mol) als Feststoff hinzugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei 0°C gerührt und danach gegen deionisiertes Wasser im Kühlschrank dialysiert (MWCO 4000-6000). Nach dem Lyophilisieren wurde quantitativ ein gelb-orangener Feststoff erhalten. Der Gehalt an ManAc pro Dextran wurde durch UV/VIS bestimmt. Die Fluoreszenzmarkierung von (ManAc-PEG)-Dextran mit FLUOS ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

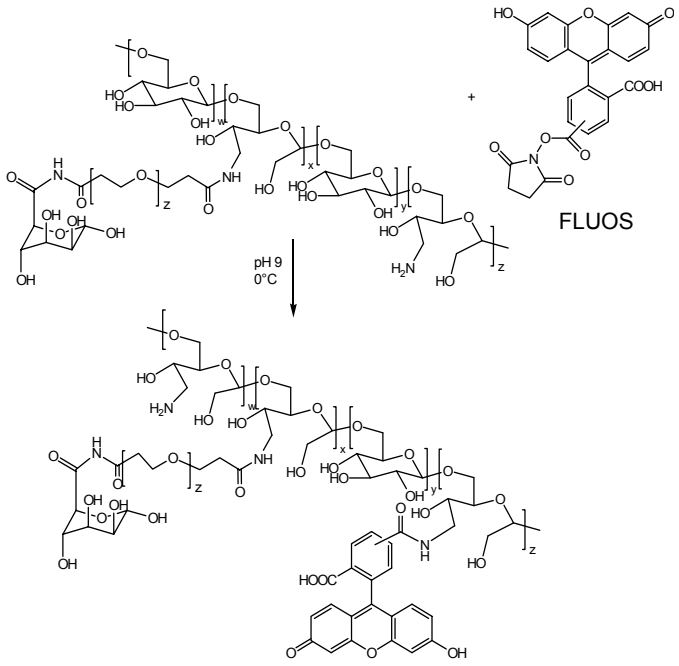


Abbildung 2.4: Fluoreszenzmarkierung von (ManAc-PEG)-Dextran mit FLUOS

2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Polymere

Die Messung der ^{1}H-NMR-Spektren erfolgte in Deuterium-Oxid (δ(1H) = 4,72 ppm, DHO) durch ein DPX 400 Bruker Spektrometer bei 400 MHz und 25°C.

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde in einer wässrigen 0,2 M Na_2SO_4-Lösung nach Beimengung 1%iger Essigsäure durchgeführt. Der Größenausschlußchromatograph war ausgestattet mit einem UV-Detektor (UV 2000, Spectra Physics, Deutschland), einem Brechungsindex-Detektor (Interferometrisches Refraktometer, Wyatt Technology Deutschland GmbH, Deutschland), einem Viskositäts-Detektions-System (WEG Dr. Bures, Deutschland) und mit einem Multi-Winkel-Laser-Lichtstreuungs-Detektor (MALLS, Wyatt Technology Deutschland GmbH, Deutschland).

Folgende fünf Säulen wurden für die SEC-Messungen verwendet:
TSK Säulen [Polyglycidyl(meth)acrylat-Gel] (Tosohaas, Japan)

1. PWH Guard (7.5 x 75 mm; 12 µm Partikelgröße)
2. 66000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikelgröße)
3. 65000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikelgröße)

4. 64000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikelgröße)
5. 63000 PW (7.5 x 300 mm; 10 µm Partikelgröße)

Für die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) wurde eine Optima XL-1 Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter, USA) mit Interferenzoptik verwendet. Die Proben wurden in Mehrkanalzellen (Sedimentationshöhe der Einzelzellen 2,7 mm) bei 50000 rpm und 20°C mit 0,01 M NaCl als Lösungsmittel zentrifugiert.

Die relative molare Masse (M_r) der Polymere wurde nach einer Methode von Linow und Phillip (1968) mit Hilfe der Formel

$$M_r = 2.406 \cdot 10^{25} \cdot \left(\frac{s_0 \cdot \eta_0}{1 - \bar{v} \cdot \rho_0} \right)^{3/2} \cdot ([\eta] \cdot k_{SB})^{1/2}$$

mit S_0 Svedbergkonstante [s]
$[\eta]$ Intrinsische Viskosität des Polymers [cm^3/g]
k_{SB} Schulz-Blaschke-Konstante
η Viskosität des Lösemittels [g/cm/s]
1-v partielles, spezifisches Volumen des Polymers [cm^3/g]
$\rho 0$ Dichte des Lösemittels [g/cm^3]

berechnet. Das spezifische Volumen wurde mit Hilfe eines DMA 60/602 Densitometers (Anton Paar, Österreich) bestimmt. Die Messung erfolgte in 0,01 M NaCl wobei fünf verschiedene Polymer-Konzentrationen vermessen wurden. Die Viskositätsmessungen wurden mit Hilfe des Viskosimeters TI 1 (SemaTech, Frankreich) durchgeführt und die intrinsische Viskosität wurde in 0,01 M NaCl bestimmt.

Die Konzentrationen der Uronsäuren wurde in einem Cary 100 Spektrometer (Varian, USA) ermittelt. Die Absorption der Uronsäuren wurde mittels eines Dinitro-Salicylsäure-Assays (Miller, 1959) bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Diese Methode ist nur für Zucker mit einem Halbacetal anwendbar. Der Grad der Substitutionen wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve mittels fünf bekannter Uronsäure-Konzentrationen (0,01-1,0 mg/ml) berechnet. Der Gehalt an LacAc pro Polymer wurde durch die so genannte Anthron-Methode (Scott *et al*., 1953) bei 630 nm bestimmt.

Der hydrodynamische Durchmesser und der Polydispersitätsindex (PDI) der Polymere wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Hierfür wurde ein HPPS 3.3 – ET (Malvern Instruments, UK) verwendet. Die Messung der in 0,01 M NaCl gelösten Polymere erfolgte bei 25°C (± 0,1°C) in PS-Einmalküvetten (1 cm).

Wie bereits erwähnt, wurden die Synthesen der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate sowie der fluoreszenzmarkierten Dextran-Konjugate und die analytischen Methoden zur Charakterisierung der Polymere von Nathalie Sieverling bzw. Maren Niclasen im Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm durchgeführt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2.1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind mit entsprechendem Zelltyp und Bezugsquelle.

Tabelle 2.1: **Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	**Zelltyp**	**Bezugsquelle**
16 HBE14o^{-}	humane Bronchialepithelzellen (SV40-transformiert)	Prof. Dr. Dieter C. Gruenert[1]
HeLa	humanes Cervixkarzinom	DSMZ No: ACC 57[2]
Hep-G2	humanes Leberzellkarzinom	DSMZ No: ACC 180[2]
HTLABGB-B5-4	humanes Fibrosarkom	Christine Farr[3]
1aGPZVeroFLAG-CB	„African Green Monkey"-Zellen	Christine Farr[3]

[1] University of Vermont, Burlington, VT, USA

[2] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

[3] University of Camebridge, Department of Genetics, Camebridge, UK

2.4.2 Anzuchtbedingungen und Subkultivierung

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in 75 cm^2-Zellkulturflaschen (BD Falcon; San Jose, CA, USA) bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus Instruments GmbH; Hanau). Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert/subkultiviert bzw. das Medium gewechselt. Für die Subkultivierung wurden die Zellen zuerst mit Phosphat gepufferter Saline (PBS) (pH 7,4) ohne Zusatz von Calcium- bzw. Magnesium-Ionen gewaschen und anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat). Nach ca. 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut (zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff in einer Mischung aus Medium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren). Zur Durchführung von Experimenten wurde zuerst die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25/Zeiss; Jena) bestimmt und anschließend die Zellen in 96-Well-Plates (TPP®; Trasadingen, Schweiz) bzw. 4-Chamber- oder 8-Chamber-Slides (BD Falcon; San Jose, CA, USA) ausgesät.

2.4.3 Kulturmedien und Supplemente

Die Zellen wurden entsprechend der Zelllinie entweder in „Minimal Essential Medium“ (MEM) (HeLa, Hep-G2 und 16 HBE14o$^-$ Zellen) oder in „Dulbeccos MEM“ (DMEM) (HTLABGB-B5-4, 1aGPZVeroFLAG-CB) kultiviert. Durch Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) zum Medium wurden den Zellen die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung gestellt. Da die Bestandteile des FCS mit den Genvektorkomplexen interagieren und so die Transfektionsexperimente stören, wurde während der Transfektionen auf den Zusatz von FCS im Medium verzichtet.

Nach den Transfektionen wurden, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:
0,1% Penicillin/Streptamycin (v/v)
0,5% Gentamicin (v/v)

2.5 Präparation der Genvektorkomplexe

2.5.1 Verwendete Plasmide und Vektoren

Zur Herstellung der Genvektorkomplexe wurde das Plasmid pCMV-Luc (Reportergen Luciferase; Prof. Dr. Ernst Wagner, Department Pharmazie, LMU München) verwendet. Es wurde in *Escherichia coli* amplifiziert und gereinigt von der PlasmidFactory GmbH & Co. KG (Bielefeld) bezogen.

Die zur Herstellung der Genvektorkomplexe verwendeten verschiedenen PEI sind unter Angabe der Bezugsquelle in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: **Verwendete Vektoren**

Vektor	**Vektortyp**	**Bezugsquelle**
B-PEI (25 kDa; durchschnittlicher Grad der Polymerisierung = 580; dialysiert gegen H_2O, Ausschlussgrenze: 10-12 kDa)	kationisches Polymer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-PEI (22 kDa)	kationisches Polymer	Jean-Serge Rémy[1]

[1] Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, Illkirch, France

Des Weiteren wurden neben PEI auch PEI-PEG und folgende Uronsäure-funktionalisierten-PEI-PEG-Konjugate zur Komplexierung der DNS verwendet:

GalAc(7)-PEI	LacAc(9)-PEI	ManAc(4)-PEI
GalAc(5)-PEI-PEG	LacAc(20)-PEI	ManAc(4)-PEI-PEG
(GalAc-PEG)5-PEI	LacAc(9)-PEI-PEG	(ManAc-PEG)3-PEI
(GalAc-PEG)5-PEI-PEG	LacAc(9)-PEI-PEG	(ManAc-PEG)3-PEI-PEG
	(LacAc-PEG)11-PEI	
	(LacAc-PEG)10-PEI-PEG	

2.5.2 Das N/P-Verhältnis

Das N/P-Verhältnis gibt das Verhältnis der Stoffmengen potentiell protonierbarer Aminogruppen (Träger der positiven Ladung) im kationischen Vektor zu Phosphat (Träger der negativen Ladung) in der Plasmid DNS an. Je höher das N/P-Verhältnis ist, desto mehr kationischer Vektor wird für die Komplexierung der DNS verwendet.

Das N/P-Verhältnis für PEI wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{N}{P} = \frac{m\,(PEI)}{43{,}069\ g\ mol^{-1}} \cdot \frac{330\ g\ mol^{-1}}{m\,(DNS)}$$

Hierbei gibt 330 g mol^{-1} den Mittelwert des Molekulargewichts der kleinsten sich wiederholenden (negative Ladung tragenden) Einheit der DNS, nämlich dem Deoxynukleotid an und 43,069 g mol^{-1} den Mittelwert des Molekulargewichts der kleinsten sich wiederholenden (mögliche positive Ladung tragenden) Einheit des Polymers PEI: -$N(CH_2)_2$-

2.5.3 Herstellung der Komplexe

Die Plasmid-DNS und PEI und die Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurden zunächst getrennt voneinander in je 25 µl HEPES gepufferter Saline (HBS) (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,3; sterilfiltriert durch einen 0,2 µm Membranfilter) verdünnt. Die Plasmid DNS-Lösung (25 µl) wurde behutsam zu der PEI-Lösung bzw. den Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugat-Lösungen (25 µl) gegeben und gründlich durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI bzw. den Uronsäure-funktionalisierten-PEI-PEG-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert.

Die Volumina der eingesetzten Plasmid DNS wurden wie folgt berechnet:

$$V_{(DNS)} = \frac{m\,(DNS) \cdot n \cdot 1{,}2}{c\,(DNS)}$$

$$V_{(Verdünnungslösung)} = n \cdot 25\ \mu l \cdot 1{,}2 - V_{(DNS)}$$

Wobei n der Anzahl der Wells entspricht, und der Faktor 1,2 für eine 20%ige Reserve an Volumen steht.

Die Volumina von PEI bzw. den Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten wurden wie folgt berechnet:

$$V_{(PEI)} = \frac{N}{P} \cdot \frac{m\,(DNS) \cdot n \cdot 1{,}2}{c\,(PEI) \cdot 7{,}662}$$

$$V_{(Verdünnungslösung)} = n \cdot 25\,\mu l \cdot 1{,}2 - V_{(PEI\ bzw.\ Konjugate)}$$

Die daraus resultierenden Genvektorlösungen wurden vor Gebrauch für 20 min bei RT inkubiert.

2.6 Transfektion

Für die Transfektions-Experimente wurden die Zellen mit Trypsin EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und in 96-Well-Platten (15 000 Zellen pro Well) ausgesät, so dass die Zellen am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 80% aufwiesen. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS (Gibco) gewaschen, 150 µl Medium ohne FCS vorgelegt und 50 µl Komplexlösung (siehe 2.5.3 Herstellung der Komplexe) zugegeben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 h bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 4h wurde das Medium abgesaugt und durch Medium mit 10% FCS und AB (Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24h im Brutschrank inkubiert.

2.7 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Transfektion gemessen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl Lysepuffer (250 mM N, N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 0,1 % Triton X-100, pH 7,8) pro Well zugegeben und die Zellen wurden für 15 min bei RT lysiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Proben in einem Wallac Victor^2/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer; Rodgau-

Jügesheim) vermessen. Hierbei wurden pro Probe automatisch 100 µl Luziferase-Assay-Puffer (470 µM D-Luziferin; 270 µM Coenzym A; 33,3 mM Dithiothreitol (DTT); 530 µM Adenosintriphosphat (ATP); 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg_2$ x 5 H_2O; 2,67 mM $MgSO_4$; 20 mM Tricin; 0,1 mM EDTA) (Surovoy *et al.*, 1998) injiziert und die daraus resultierende Lichtemission wurde über 5 s lang gemessen. Vor der Injektion wurde der Hintergrund jedes Wells gemessen und vom nach der Injektion gemessenen Wert subtrahiert. 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). Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde mit Hilfe eines Standard Protein Assays (BioRad; München) nach der Methode von Bradford bestimmt (1976).

2.8 Untersuchungen zur Zellvitalität

Um die Zellvitalität der mit Mannuronsäure inkubierten Zellen zu untersuchen wurde ein auf ATP basierender Zellproliferationstest (ATPlite/PerkinElmer; Boston, MA, USA) verwendet. Dieser Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen anhand der Anwesenheit von ATP in allen metabolisch aktiven Zellen. Die ATP-Konzentration korreliert mit der Vitalitätsrate und nimmt rapide ab, wenn die Zellen durch Nekrose sterben. Der Test beruht auf der Produktion von Licht, welches durch die Reaktion von ATP mit zugesetzter Luziferase und D-Luziferin entsteht. Das emittierte Licht ist der ATP-Konzentration proportional:

$$\text{ATP + D-Luziferin + } O_2 \xrightarrow{\text{Luziferase, } Mg^{2+}} \text{Oxyluziferin + AMP + PPi + } CO_2 \text{ + Licht}$$

Die Zellen (15 000 Zellen pro Well, 96-Well-Plate) wurden einen Tag vor der Zugabe von Mannuronsäure ausgesät und in Medium mit 10 % FCS kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit verschiedenen molaren Überschüssen (25, 50, 100, 200, 300, 500) an Mannuronsäure, bezogen auf die Konzentration der an PEI gebundenen Mannuronsäure, für 30 min zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 200 µl Medium supplementiert mit 10 % FCS, 0,1 % Penicillin/Streptamycin (v/v) and 0,5 % Gentamicin (v/v) wurden pro

Well zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 24 h bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden schließlich nochmals gewaschen und 100 µl Medium plus 10 % FCS wurden zugegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Die Lumineszenz wurde in einem Wallac Victor^2/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim) gemessen.

2.9 Messung des Zeta-Potentials und der Größe

Die Partikelgrößen (durch Dynamische Lichtsreuung) und das Zeta-Potential wurden mit einem ZetaPALS/Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Österreich) bestimmt. Die Genvektorkomplexe wurden bei verschiedenen Konzentrationen an pDNS in HBS bzw. aqua dest generiert. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10 Messungen/Probe; Viskosität für H_2O: 0,89 cP; Viskosität für NaCl: 1,17 cP, Temperatur 25°C; beam mode F(Ka)=1,50 (Smoluchowsky).

2.10 Analyse der zellulären Aufnahme verschiedener FLUOS-Dextran-Konjugate

2.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Einen Tag vor Durchführung des Experimentes wurden 15 000 Zellen/Chamber (8-Chamber-slides; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA) ausgesät und über Nacht in MEM plus 10 % FCS bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wurden 2 µM der FLUOS-Dextran-Konjugate (FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex, FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex) in MEM für 45 min zugegeben. Zu einigen der Zellen wurde vor der Inkubation der Konjugate ein 25-facher molarer Überschuß an Mannuronsäure für 30 min zugegeben (50 µM). Danach wurden die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und für 10 min in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0,33 µM DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) gegengefärbt. Zum Schutz vor Ausbleichen wurde ein „Mounting medium“ zu den Zellen gegeben (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA) und anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt. Für die Mikroskopie wurde ein Epifluorescence Axiovert 135 Mikroskop (Zeiss; Jena) mit einem 20 x, 63 x bzw. einem 100 x / 1,30 oil plan-neofluor Objektiv (Zeiss; Jena) benutzt.

Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera angefertigt und mit dem Programm Axiovision 3.0 (Zeiss; Jena) bzw. Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.10.2 Durchflußzytometrie

Vor Durchführung der Durchflußzytometrie wurden wieder 15 000 Zellen (24-Well-Platten) ausgesät und über Nacht in MEM plus 10 % FCS bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wurden 2 µM der FLUOS-Dextran-Konjugate (FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex, FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex) in MEM für 45 min zugegeben. Zu einigen der Zellen wurde vor der Inkubation der Konjugate ein 25-facher molarer Überschuß an Mannuronsäure für 30 min zugegeben (50 µM). Nach Inkubation der Konjugate wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 200 µl Trypsin in jedes Well gegeben und für 5 min inkubiert. Nach der Ablösung wurden die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen (Endvolumen 500 µl). Anschließend wurden der Fluoreszenzfarbstoff PI (3 µg/ml in PBS) für 3 min zugegeben, und danach die Zellen in einem Durchflußzytometer (FACScan; Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

2.11 Verneblung der Gen-Vektor-Komplexe und Agarosegel-Elektrophorese

Die Komplexlösungen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 10 und einer DNS-Konzentration von 10 µg/µl in destilliertem Wasser formuliert. Anschließend wurden 2.4 ml der formulierten Komplexe mit Hilfe eines PARI BOY® N Vernebler (PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) für 10 min vernebelt. Der Aerosol-Strom wurde mit Hilfe einer Spritze, die mit dem Vernebler verbunden wurde, in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen und aufkonzentriert (vernebelte Fraktion = v). Zusätzlich wurde vor der Verneblung eine Fraktion der jeweiligen Komplexlösungen abgenommen und gesammelt (nicht vernebelte Fraktion = n). Nach der Verneblung wurde der sich im Reservoir des Verneblers befindende Rest ebenfalls in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben (Reservoir-Fraktion = r). Abbildung 2.5 zeigt den Aufbau des Verneblers und die Fraktionen die gesammelt wurden.

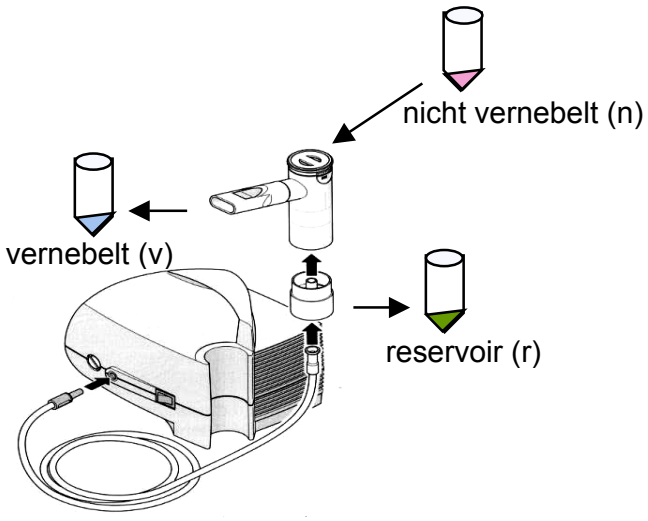


Abbildung 2.5: Aufbau des Verneblers und gesammelte Fraktionen.

Um die Komplex-Integrität zu überprüfen wurden zu je 20 µl der gesammelten Fraktionen 5 µl Heparan-Sulfat (um die Komplexe zu trennen) zugegeben, vermischt, und auf ein 0,6 % Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend 1 h lang bei 80 V in TEA-Puffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) laufen gelassen.

2.12 Verneblung von ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugat/DNS-Komplexen in die Mauslunge

Die Generierung der Gen-Vektor-Komplexe erfolgte unter Verwendung von destilliertem Wasser und mit einer DNS-Konzentration von 125 µg/µl und einem N/P-Verhältnis von 10 wie unter 2.5.3 beschrieben. 4 ml der pDNS-Lösung wurde zu jeweils 4 ml der ManAc-Konjugat-, PEI- und PEG-PEI-haltigen Lösungen pipettiert (Endvolumen 8 ml), sorgfältig gemischt und vor der Verneblung für 20 min inkubiert. Die Gen-Vektoren wurden wie unter Rudolph *et. al.* (2004) beschrieben an Balb-c-Mäuse vernebelt.

2.13 Injektion neu formulierter ManAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugat/DNS-Komplexe in die Schwanzvene von Mäusen

Für die Injektion der ManAc-modifizierten PEI-Konjugate in die Schwanzvene von Balb-c-Mäusen wurden neue Komplexe, bestehend aus 40% L-PEI und 10% PEI-PEG (350 KDa) bzw. (ManAc-PEG3)-PEI und 50% PEI-PEG (600 KDa), formuliert. Die

Generierung der Gen-Vektor-Komplexe erfolgte unter Verwendung von 5% Glucose mit einer DNS-Konzentration von 30 µg pro Maus und einem N/P-Verhältnis von 10 wie unter 2.4.5 beschrieben. 600 µl der pDNS-Lösung wurde zu jeweils 600 µl der neu formulierten ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugat-Lösungen bzw. der PEI-Lösung pipettiert (Endvolumen 1,2 ml; für 3 Mäuse je Versuchsansatz), sorgfältig gemischt und nach 20 min Inkubation wurden 400 µl je Maus in die Schwanzvene injiziert.

Nach 6h, 24h und 48h Inkubation wurden die Mäuse narkotisiert. Zur Narkose wurde eine Kombination aus 0,5 ml Medetomidin (1 mg/ml; handelsüblicher Name: Domitor; Pfizer), 1 ml Midazolam (5 mg/ml; Rathiopharm) und 1 ml Fentanyl (50 µg/µl; Janssen) pro Kilogramm Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden 3,3 mg Luziferin in 100 µl aqua ad injectabilia (pH 7,4) i.p. appliziert. Nach 10 min wurde Lumineszenz als Maß für die Luziferase-Expression im *in-vivo*-Imaging-Gerät „Xenogen Iris“ (10 min Belichtungszeit; 37°C) gemessen. Nach der Lumineszenzmessung wurde die Narkose mit 0,5 ml Antipamezol (5 mg/ml; handelsüblicher Name: Antisedan; Pfizer), 5 ml Flumazenil (0,1 mg/ml; handelsüblicher Name: Anexate; Roche) und 3 ml Naloxon (0,4 mg/ml; Inresa) pro kg Maus i.p. antagonisiert.

2.14 Experimente mit Chromosomen bzw. Minichromosomen

2.14.1 Extraktion von Chromosomen in der Metaphase

Die Extraktion der Chromosomen (Abbildung 2.6) erfolgte durch Zentrifugation nach einer Methode von Sone *et al*. (2002). Zur Arretierung der Chromosomen in der Metaphase wurden 1aGPZVeroFLAG-CB- bzw. HTLAGBG B5-4-Zellen zuerst für 15 h mit Colcemid (2 ng/ml) behandelt (Abb. 2.6). Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Danach wurden die Zellen in 500 µl 75 mM KCl resuspendiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen bei 2000 rpm wieder für 5 min zentrifugiert. Zur Lyse der Zellmembran wurden 500 µl einer CAS-Lösung bestehend aus 0,1 M Zitronensäure, 0,1 M Saccharose und 0,5% Tween 20 (pH 2,6) zugegeben. Um die Metaphase-Chromosomen von den Zellkernen zu separieren wurde das Zelllysat im Anschluß daran für 3 min bei 4°C und 1000 rpm erneut zentrifugiert. Danach befanden sich die Chromosomen im Überstand und die Zellkerne im Pellet. Der Überstand wurde noch einmal bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 500 µl CAS-Lösung resuspendiert.

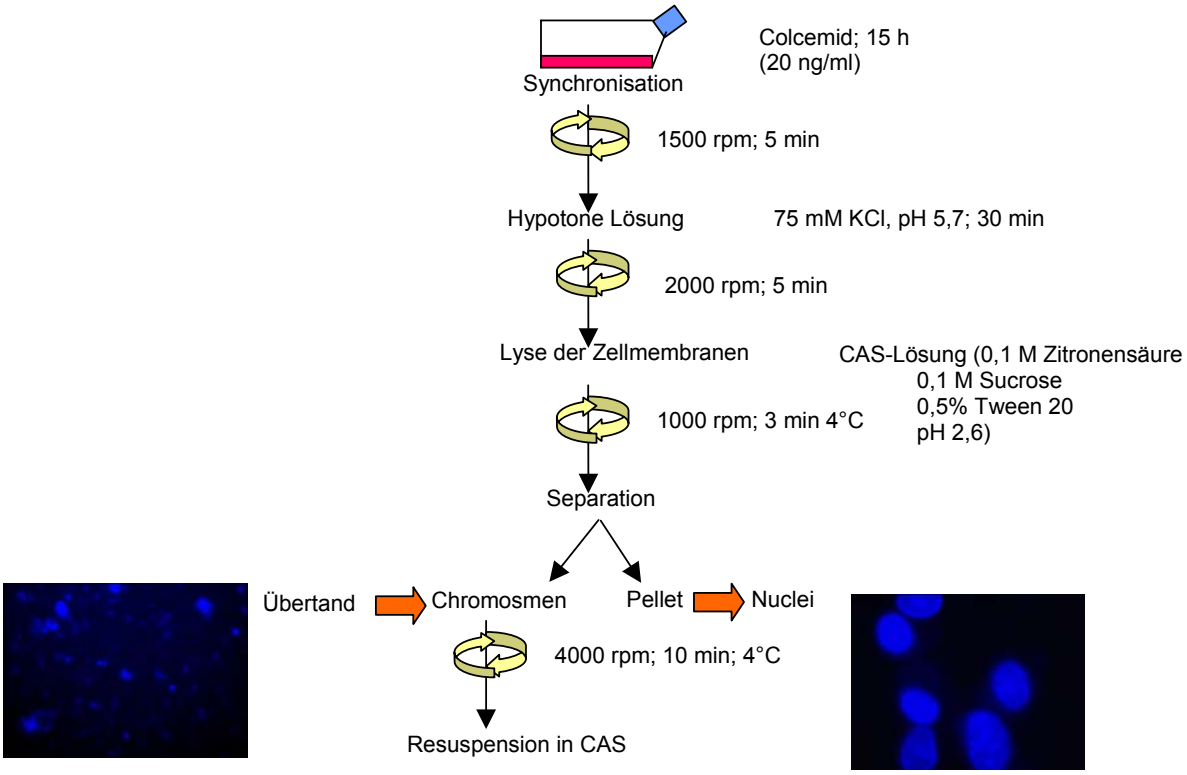


Abbildung 2.6: Extraktion von Chromosomen in der Metaphase. Die Extraktion der Chromosomen erfolgt durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte. Nach einer Arretierung der Chromosomen in der Metaphase werden Zellen abtrypsiniert und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 75 mM KCl resuspendiert. Und nach 30 min Inkubation bei 2000 rpm wieder für 5 min zentrifugiert. In einem weiteren Schritt wird die Membran der Zellen in einer CAS-Lösung lysiert und anschließend für 3 min bei 4°C und 1000 rpm erneut zentrifugiert. Danach befinden sich die Chromosomen im Überstand und die Zellkerne im Pellet. Der Überstand wird noch einmal bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in CAS-Lösung resuspendiert.

2.14.2 „Immunosurfaction“

Zunächst wurden GFP-Antikörper bzw. FLAG-Antikörper durch nicht-spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche von 2-Chamber-Slides (Lab-Tek^{TM} IICC2^{TM} Chamber-Slides; Nunc) gebunden. Hierfür wurden die GFP-Antikörper 1:1000 bzw. die FLAG-Antikörper 1:10 000 in 0,1 M $NaHCO_3$ gelöst, in die Chamber-Slides gegeben, und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Chamber-Slides gründlich drei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurde das

durch die Extraktion (unter Punkt 2.14.1 beschrieben) erhaltene Zelllysat der 1aGPZVeroFLAG-CB- bzw. HTLAGBG B5-4-Zellen zugegeben und für weitere 6 h bei 4°C inkubiert um die Chromosomen bzw. Minichromosomen an die Antikörper zu binden. Nach dreimaligem Waschen der Chamber-Slides mit PBS wurden 16HBE14o$^-$-Zellen (300 000 Zellen/Chamber) auf die gebundenen Chromosomen/Minichromosomen ausgesät und für 24 h bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei zusätzlicher Zugabe von PEI bzw. (ManAc-PEG)3-PEI wurde vor Zugabe des Zelllysats in die Chamber-Slides der DNS-Gehalt mittels eines Bio-Photometers (Eppendorf) bestimmt. Bezogen auf den Gehalt der DNS im Zelllysat wurde PEI bzw. (ManAc-PEG)3-PEI vor Zugabe der 16HBE14o$^-$-Zellen in einem N/P-Verhältnis von 5 zu den gebundenen Chromosomen/Minichromosomen gegeben und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Chamber-Slides erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden 16HBE14o$^-$-Zellen (300 000 Zellen/Chamber) ausgesät und für 24 h bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen, in die aus HTLAGBG B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen transfiziert wurden, wieder drei Mal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellkerne mit 0.33 µM DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) und das Zytoskellet der Zellen mit Alexa 568 Phalloidin (Molecular Probes) gegengefärbt. Anschließend wurden die Zellen zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA).

Zellen in die aus 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen extrahierte Chromosomen transfiziert wurden, wurden ebenfalls drei Mal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das „Mounting medium“ zugegeben. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet

2.15 Mikroskopie

2.15.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA). Es wurde ein Epifluorescence Axiovert 135 Mikroskop (Zeiss; Jena) mit einem 20 x, 63 x

bzw. einem 100 x / 1,30 oil plan-neofluor Objektiv (Zeiss; Jena) benutzt. Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera angefertigt und mit dem Programm Axiovision 3.0 (Zeiss; Jena) bzw. Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.15.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die konfokalen Aufnahmen wurden die Präparate wie unter 2.15.1 beschrieben vorbereitet. Es wurde ein Leica TCS 4D konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica; Solms, Deutschland) verwendet, das mit einem Argon-Krypton Laser ausgestattet ist. Das verwendete Objektiv ist ein PL APO, 63 x / 1,32 – 0,6 Öl Objektiv (Leica; Solms, Deutschland). Die Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.16 Statistische Auswertungen

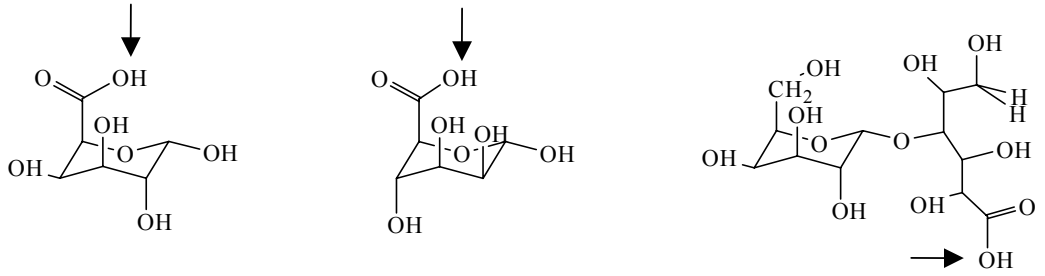
Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikanzen wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt. Falls nicht anders angegeben wurden die Experimente jeweils dreimal durchgeführt, wobei die einzelnen Bedingungen als Triplikate oder Quadruplikate gemessen wurden. Messergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn $p \leq 0{,}05$. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Physikochemische Charakterisierung der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate

3.1.1 Durchschnittliche Anzahl der Uronsäure-Liganden pro PEI- bzw. PEI-PEG-Molekül

Die Anzahl der GalAc- und ManAc-Liganden pro PEI- bzw. PEI-PEG-Molekül wurden mittels der Dinitro-Salicylsäure-Methode (siehe 2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Polymere), bei der die Zucker als Halbacetale mit reduzierenden Gruppen vorliegen müssen, analysiert. Da Lactobionsäure als Vollacetal ohne reduzierende Gruppen vorliegt, wurde für die Bestimmung der LacAc-Liganden pro Polymer die sogenannte Anthron-Methode (siehe 2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Polymere) angewendet. Abbildung 3.1 zeigt die Formeln von GalAc, ManAc und LacAc. Die Pfeile markieren die Stellen, an die PEI bzw. PEI-PEG gekoppelt wurde. Tabelle 3.1 zeigt die photometrisch bestimmten Anzahlen der Liganden. Pro PEI- bzw. PEI-PEG-Molekül sind je 9 bis 11 LacAc-Liganden gekoppelt. Im Gegensatz dazu weisen die ManAc- und GalAc-Polymere bei gleichen Synthesebedingungen weniger Liganden auf (3 bis 5 ManAc-Gruppen bzw. 5 bis 7 GalAc-Gruppen pro PEI/PEI-PEG).



Galakturonsäure (GalAc) Mannuronsäure (ManAc) Laktobionsäure (LacAcAc)

Abbildung 3.1: Strukturen von Galakturonsäure, Mannuronsäure und Laktobionsäure

Tabelle 3.1: Charakterisierung der Uronsäure-Konjugate. Die Zahlen in Klammern repräsentieren die durchschnittlichen Anzahlen der Uronsäure-Gruppen pro Polymer-Molekül; d_h = hydrodynamischer Durchmesser; PDI = Polydispersitätsindex bestimmt durch DLS (Dynamischer Lichtstreuung); M_p^{AUZ} = Molmasse berechnet aus dem Peakmaximum der Sedimentations-koeffizientenverteilung; $M_{W,UC}^{SEC}$ = Molmasse nach Größenausschluss-chromatographie (SEC) mit PVP-Standard; D^{SEC} = Polydispersität (M_w/M_n) der Polymere erhalten durch SEC, $M_{W,LS}^{SEC}$ = Molmasse nach SEC mit MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering) Detektor.

	d_h [nm]	PDI	M_P^{AUZ} [10^3 g/mol]	$M_{W,UC}^{SEC}$ [10^3 g/mol]	M_w/M_n	$M_{W,LS}^{SEC}$ [10^3 g/mol]
PEI-Konjugate						
PEI	10	0,25	35,8	50,1	1,5	49,8
GalAc(7)-PEI	11	0,30	35,9	56,6	2,3	70,4
(GalAc-PEG)5-PEI	10	0,31	43,4	88,5	2,4	88,1
LacAc(9)-PEI	9	0,34	36,7	38,9	1,9	34,4
LacAc(20)-PEI	10	0,36	40,8	133,9	2,1	105,9
(LacAc-PEG)11-PEI	10	0,36	40,3	195,4	2,2	81,8
ManAc(4)-PEI	11	0,43	30,5	91,6	2,1	86,1
(ManAc-PEG)3-PEI	13	0,37	41,2	59,0	2,0	66,7
PEI-PEG-Konjugate						
PEI-PEG(20)	17	0,40	56,2	74,0	1,9	102,7
GalAc(5)-PEI-PEG	26	0,42	61,0	304,1	1,9	344,5
(GalAc-PEG)5-PEI-PEG	19	0,41	59,3	212,5	3,2	200,0
LacAc(9)-PEI-PEG	22	0,44	60,4	195,4	3,4	154,6
(LacAc-PEG)10-PEI-PEG	17	0,44	55,6	220,0	2,7	145,5
ManAc(4)-PEI-PEG	14	0,38	44,2	135,7	3,2	109,9
(ManAc-PEG)3-PEI-PEG	15	0,43	48,6	146,8	3,2	140,7

3.1.2 Hydrodynamische Durchmesser der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate

Der hydrodynamische Durchmesser d_h und der Polydispersitätsindex PDI der Polymere wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die Durchmesser der Uronsäure-Konjugate auf PEI-Basis liegen im Bereich von 9 nm bis 13 nm und damit, trotz höherer Molmassen, nahe am Wert der für unmodifiziertes PEI gemessen wurde (10 nm) (Tabelle 3.1). Wie erwartet resultiert die Modifikation von PEI mit 20 PEG-Seitenketten in einer Erhöhung des hydrodynamischen Durchmesser von 10 nm (PEI) zu 17 nm (PEI-PEG). Die Uronsäure-funktionalisierten PEI-PEG-Polymere weisen für GalAc(5)-PEI-PEG (26 nm) und LacAc(9)-PEI-PEG (22 nm) höhere, für ManAc(4)-PEI-PEG (14 nm) jedoch niedrigere hydrodynamische Durchmesser auf. Die Durchmesser der Uronsäure-Konjugate bei denen die Liganden über eine PEG-Seitenkette an PEI gebunden [(GalAc-PEG)5-PEI-PEG; (LacAc-PEG)10-PEI-PEG; (ManAc-PEG)3-PEI-PEG)] sind geringer und liegen im Bereich von PEI-PEG.

3.1.3 Molmassencharakterisierung der Uronsäure-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate

Die Molmassen und Molmassenverteilungen der Polymere wurden mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ; Sedimentationsgeschwindigkeitslauf) ermittelt. Die Berechnung der Molmassen M_P^{AUZ} wurde nach einer Methode von Linow und Philipp (1968) (siehe 2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Polymere) durchgeführt. Die am Peakmaximum ermittelten Sedimentationskonstanten (Abb. 3.2) wurden den Svedbergkonstanten (S_0) bei c=0 g/l gleichgesetzt. Die erforderlichen Grenzviskositäten und Schulz-Blaschke-Konstanten wurden mittels Lösungsviskosimetrie ermittelt. Das partielle, spezifische Volumen wurde durch Verwendung eines Biegeschwingers bestimmt. Als weitere Methode zur Bestimmung der Molmassen wurde eine Größenausschlusschromatographie mit Multidetektion (SEC-MALLS) herangezogen.

Die Ergebnisse der Molmassencharakterisierung der Polymere sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Molmassen M_P^{AUZ} der Uronsäure-funktionalisierten PEI-Konjugate nehmen mit steigender Anzahl an Liganden zu. Diese Tendenz wird besonders in Bezug auf die beiden Konjugate LacAc(9)-PEI (M_P^{AUZ} of 36700 g/mol) und LacAc(20)-PEI (M_P^{AUZ} of 40800 g/mol) im Vergleich zu PEI (35800 g/mol) deutlich. Die ebenfalls durch AUZ

ermittelten Molmassen der Uronsäure-funktionalisierten PEI-PEG-Konjugate zeigen keine signifikante Änderung im Vergleich zu ihrem Ausgangspolymer.

Die SEC-Elugramme der Uronsäure-Copolymere weisen mit zunehmendem Umsetzunggrad eine höhere Polydispersität auf. Dies zeigt sich besonders bei den Copolymeren auf Basis von PEI-PEG.

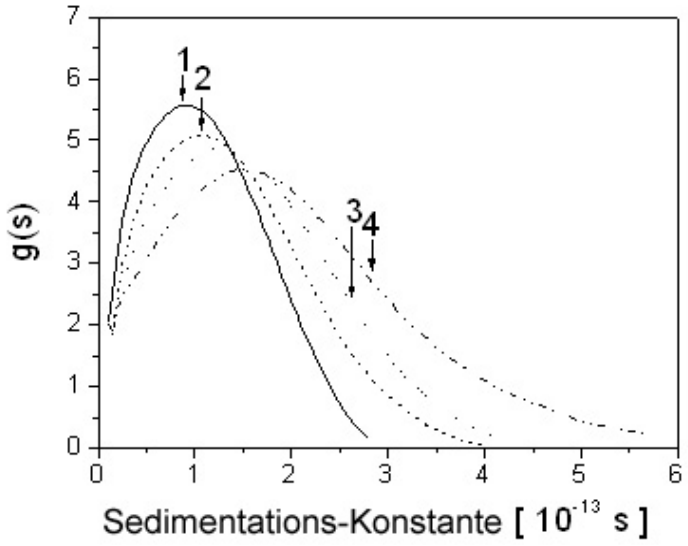


Abbildung 3.2: Verteilung der Sedimentationskonstanten. PEI (1), Uronsäure-PEI (2), PEI-PEG (3) und Uronsäure-PEI-PEG (4)

3.2 Gentransfereffizienz der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate

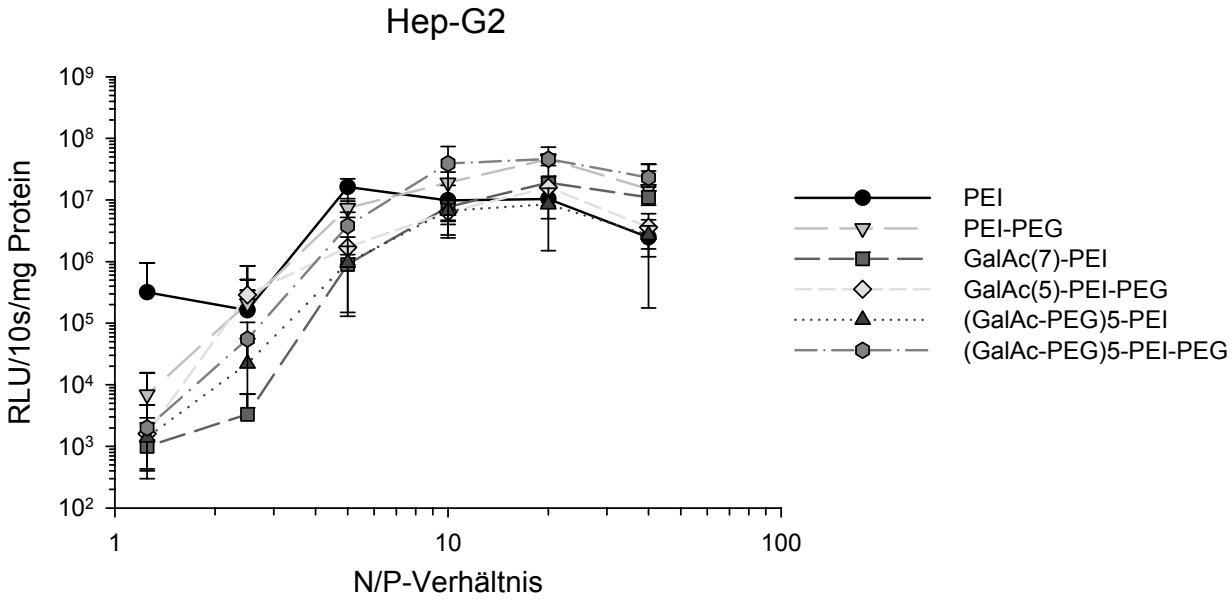
3.2.1 Gentransfereffizienz der Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate

Für die Ermittlung der Gentransfereffizienzen der Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurden die Konjugate mit pDNS (pCMV-Luc) bei N/P-Verhältnissen von 1.25, 2.5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert und in HeLa-, 16HBE14o$^-$-, und Hep-G2- Zellen transfiziert.

Die Gentransfereffizienzen der GalAc-PEI/pDNS- und GalAc-PEI-PEG/pDNS-Komplexe steigen mit ansteigendem N/P-Verhältnis (Abb. 3.3) und erreicht die höchsten Werte bei

N/P-Verhältnissen von 5 bis 15. Bei höheren N/P-Verhältnissen (N/P>15) sinken die Gentransfereffizienzen wieder. Verglichen mit PEI/pDNS Komplexen weisen die Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate bis zu 100-fach niedrigere Transfektionseffizienzen auf, besonders bei niedrigen N/P-Verhältnissen. Der Kurvenverlauf aller getesteten Komplexe ist bei allen verwendeten Zelllinien ähnlich.

Zusätzlich wurde die Transfereffizienz von selbst synthetisierten Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten getestet. Methyl-α-D-Galactopyranosid wurde zu Galacturonsäure oxidiert und an die kationischen Ausgangspolymere gebunden. Die dadurch entstandenen Gal_{ox}-Konjugate sind mit den zuvor getesten Polymeren (Abb. 3.3) identisch und unterscheiden sich nur in der Art der Herstellung. Die Gentransfereffizienzen der selbst synthetisierten $Galakturonsäure_{ox}$-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate sind vergleichbar mit den anderen Galakturonsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten (Abb. 3.4)



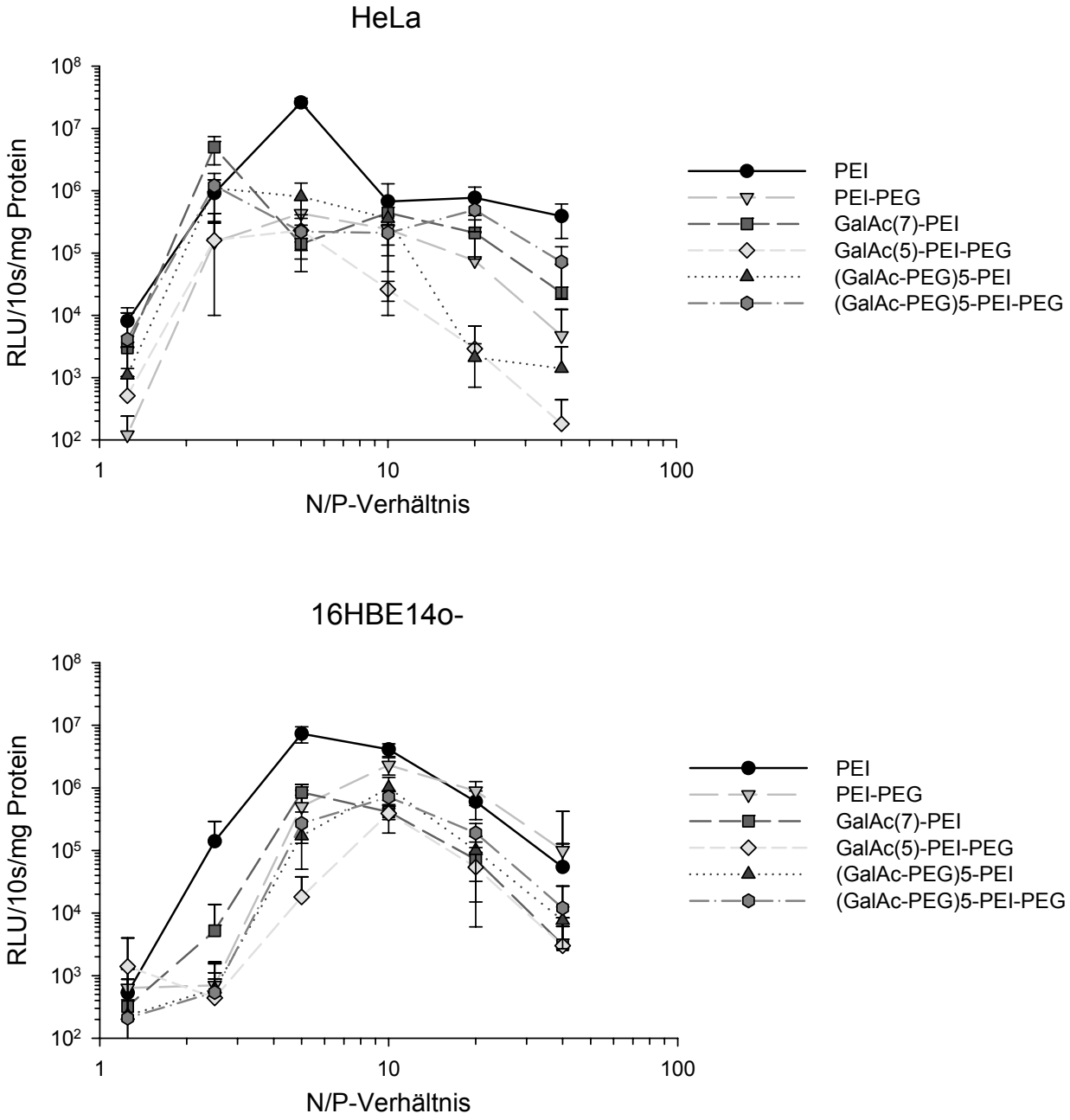


Abbildung 3.3: Ermittlung der Transfereffizienzen GalAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2-, HeLa- und 16HBE14o⁻ -Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI bzw. den Galacturonsäure-modifizierten-PEI-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert. Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

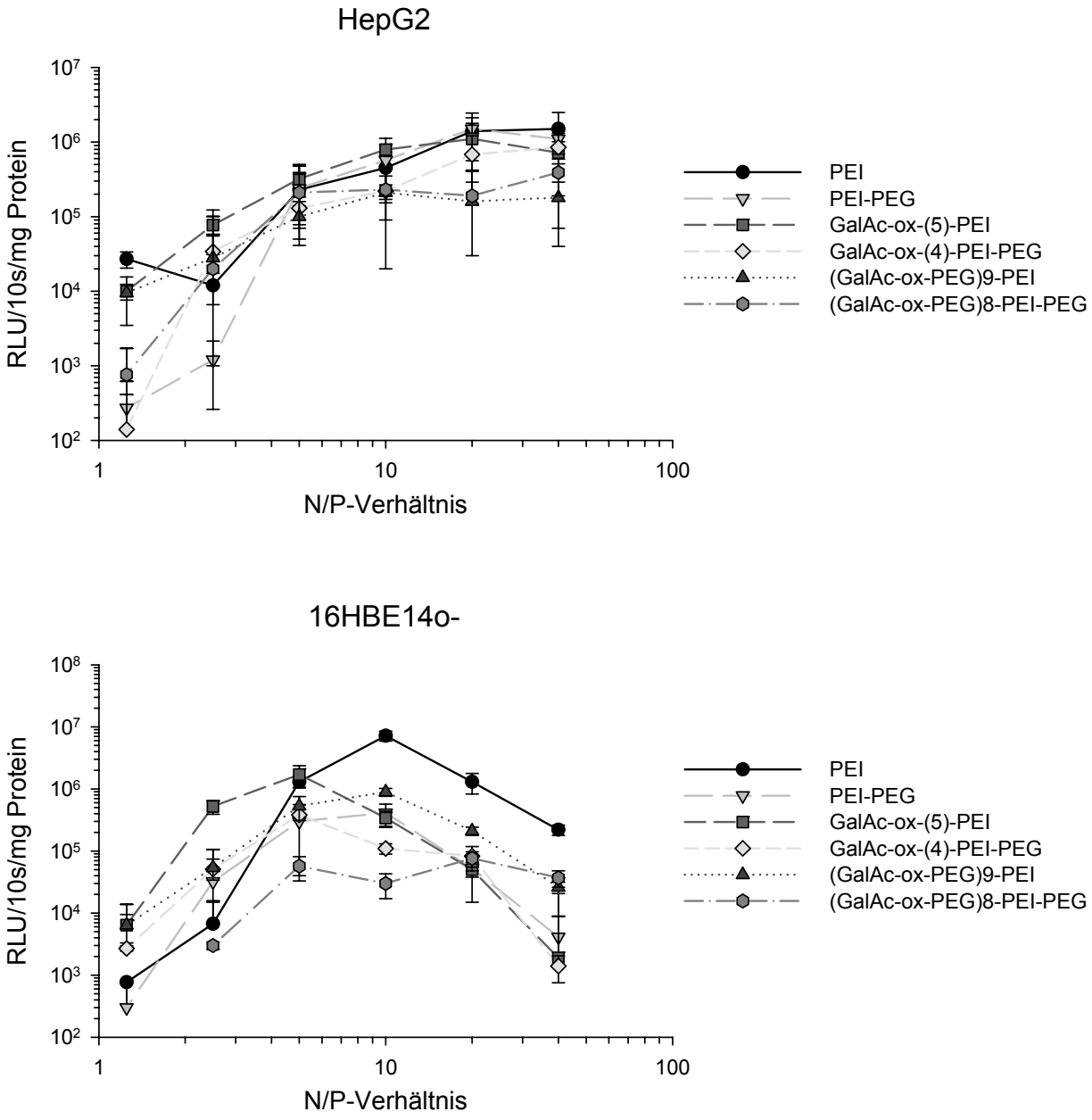


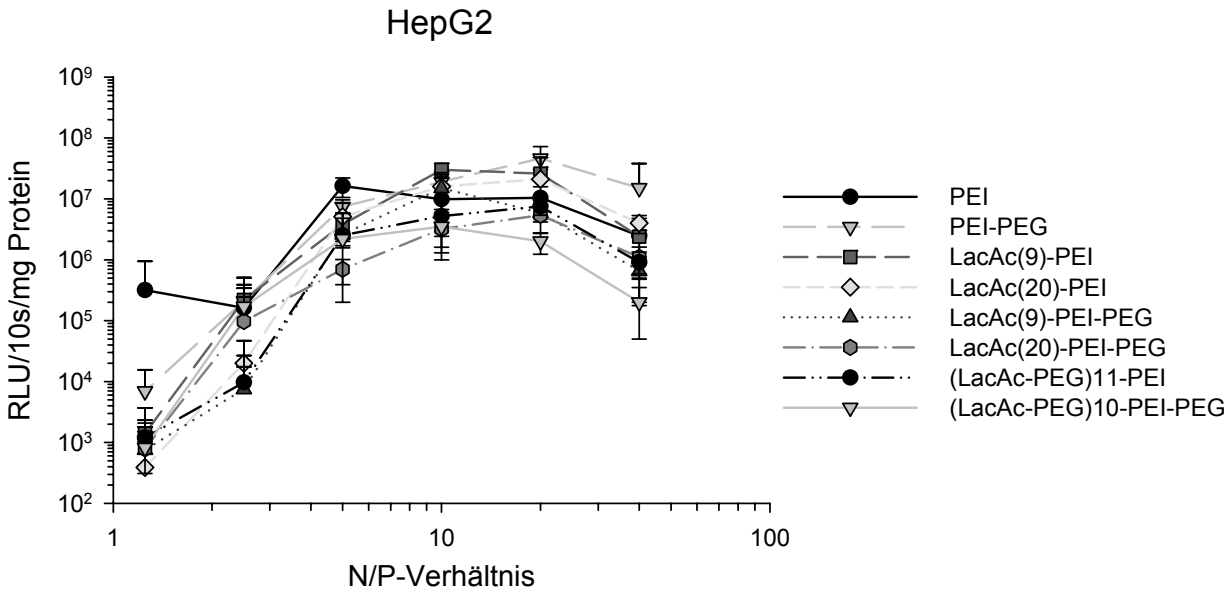
Abbildung 3.4: Ermittlung der Transfereffizienzen oxidierter GalAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2-, HeLa- und 16HBE14o^{-} -Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI bzw. den Galacturonsäure-modifizierten-PEI-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert. Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

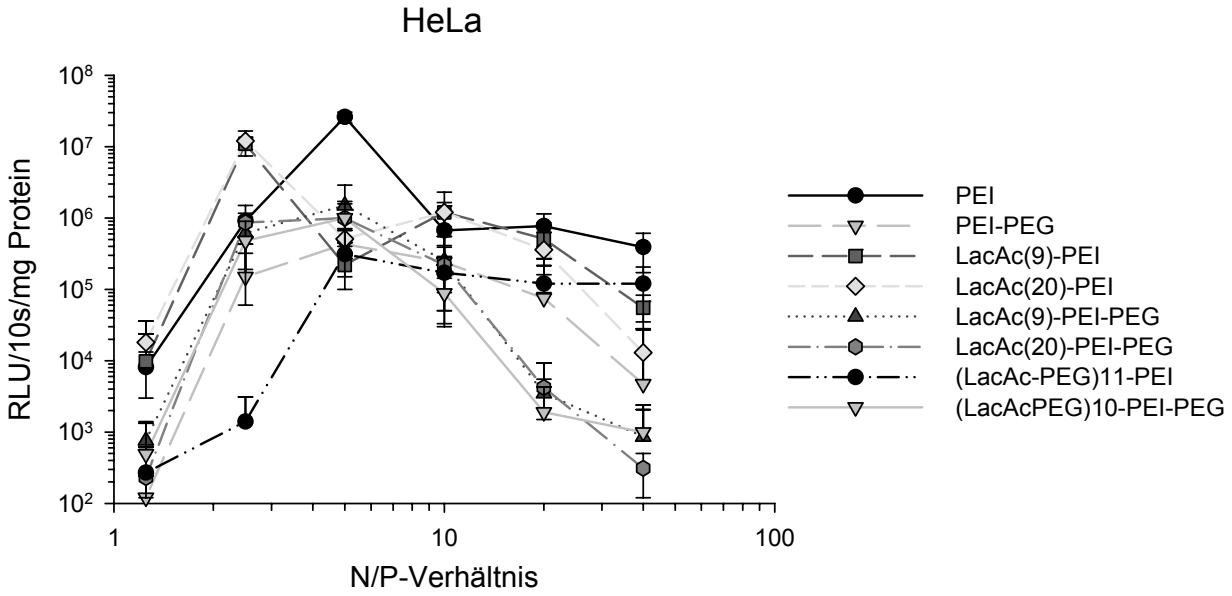
3.2.2 Gentransfereffizienz der Laktobionsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate

Für die Ermittlung der Gentransfereffizienzen der Lactobionsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurden die Konjugate ebenfalls mit pDNS (pCMV-Luc) bei N/P-Verhältnissen von 1.25, 2.5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert und in HeLa-, 16HBE14o$^-$-, und Hep-G2- Zellen transfiziert.

Die Gentransfereffizienzen der LacAc-PEI/pDNS- und LacAc-PEI-PEG/pDNS-Komplexe steigen wie die der GalAc-PEI/pDNS- und GalAc-PEI-PEG/pDNS-Komplexe mit ansteigendem N/P-Verhältnis (Abb. 3.5) und erreicht die höchsten Werte bei N/P-Verhältnissen von 5 bis 15. Bei höheren N/P-Verhältnissen (N/P>15) sinken die Gentransfereffizienzen wieder. Auch die Laktobionsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugat-Komplexe weisen im Vergleiche zu den PEI/pDNS Komplexen bis zu 100-fach niedrigere Transfektionseffizienzen auf, besonders bei niedrigen N/P-Verhältnissen. Der Kurvenverlauf aller getesteten Komplexe ist bei allen verwendeten Zelllinien auch hier ähnlich.

Zusätzlich zu den LacAc-funktionalisierten Konjugaten mit 9 LacAc-Liganden pro PEI-Molekül wurde die Gentransfereffizienz von LacAc-funktionalisierten Konjugaten mit 20 LacAc-Liganden pro PEI-Molekül ermittelt. Abbildung 3.5. zeigt, daß die Transfereffizienz der Konjugate mit 20 LacAc-Liganden im Bereich der Transfereffizienz der Konjugate mit 9 LacAc-Liganden oder sogar darunter liegt.


HepG2
RLU/10s/mg Protein
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
1
10
100
N/P-Verhältnis
PEI
PEI-PEG
LacAc(9)-PEI
LacAc(20)-PEI
LacAc(9)-PEI-PEG
LacAc(20)-PEI-PEG
(LacAc-PEG)11-PEI
(LacAc-PEG)10-PEI-PEG


HeLa
RLU/10s/mg Protein
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
1
10
100
N/P-Verhältnis
PEI
PEI-PEG
LacAc(9)-PEI
LacAc(20)-PEI
LacAc(9)-PEI-PEG
LacAc(20)-PEI-PEG
(LacAc-PEG)11-PEI
(LacAcPEG)10-PEI-PEG

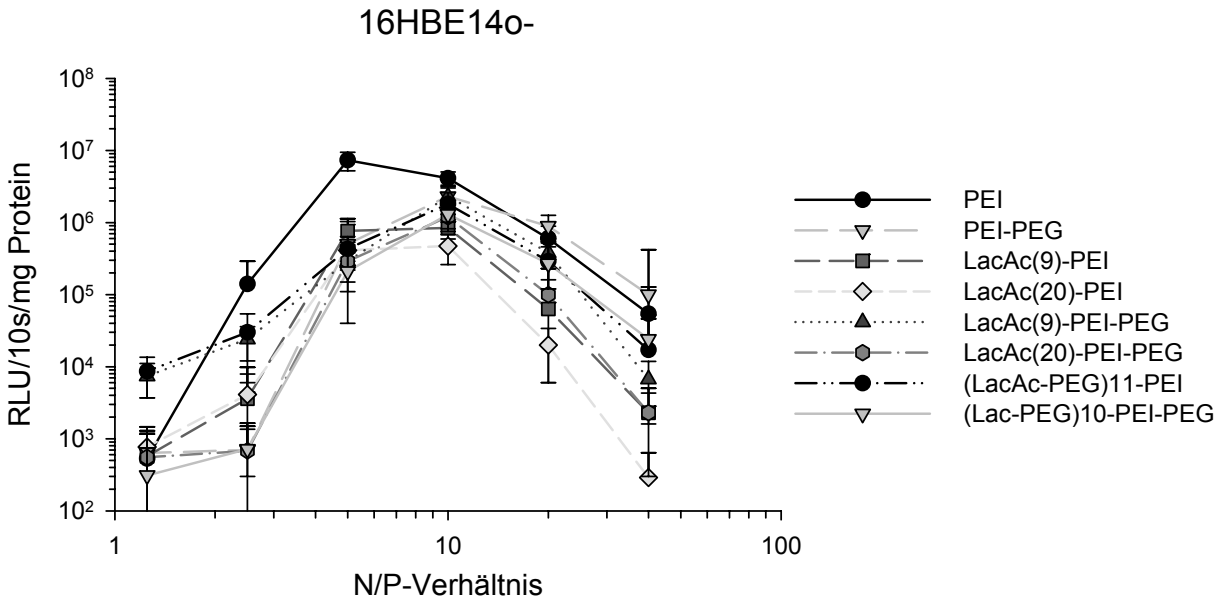
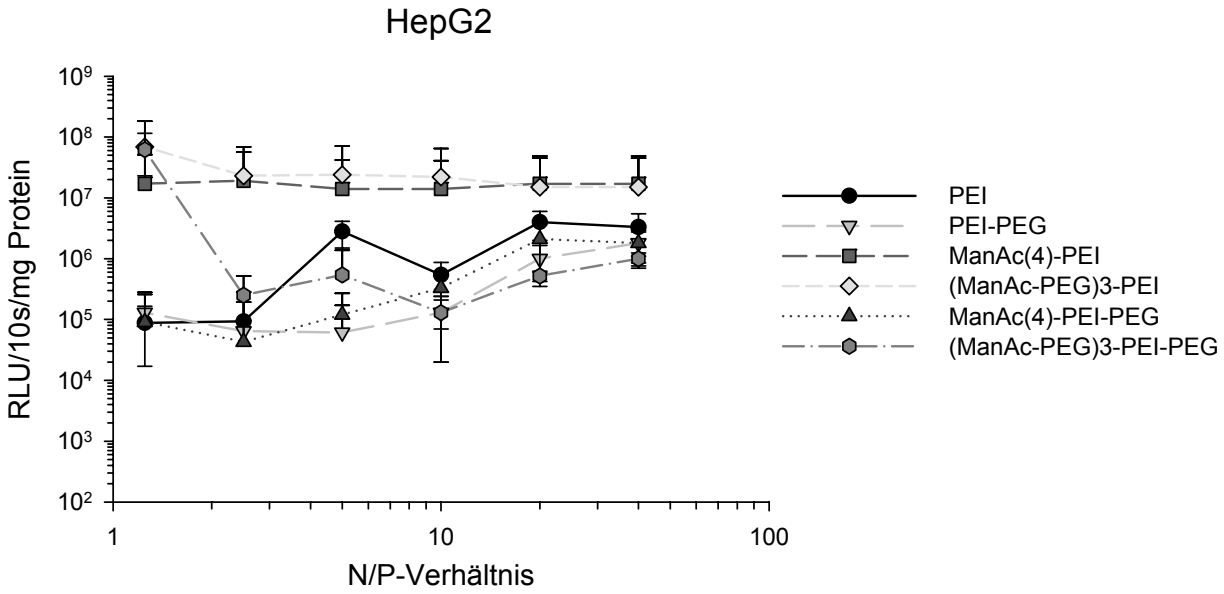


Abbildung 3.5: Ermittlung der Transfereffizienzen LacAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2-, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI bzw. den Galacturonsäure-modifizierten-PEI-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert. Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.2.3 Gentransfereffizienz der Mannuronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate

Mannuronsäure-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurden zur Ermittlung der Gentransfereffizienzen mit pDNS (pCMV-Luc) bei N/P-Verhältnissen von 1.25, 2.5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert und in HeLa-, 16HBE14o$^-$-, und Hep-G2- Zellen transfiziert. Abbildung 3.6 zeigt die Gentransfereffizienzen der Mannuronsäure-Konjugate. Im Gegensatz zu den Galakturonsäure-funktionalisierten und Lactobionsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten und im Gegensatz zu PEI vermitteln Mannuronsäure-funktionalisierte PEI und PEI-PEG-Konjugate signifikant höhere Gentransfereffizienzen. Die Kurvenverläufe der getesteten ManAc-PEI-pDNS and (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS Komplexe unterscheidet sich von den Kurvenverläufen der PEI-, GalAc-, und LacAc-PEI/pDNS Komplexe. Während die Transfektionsraten der LacAc-PEI- und GalAc-PEI-Konjugate und PEI mit ansteigendem N/P-Verhältnis steigen, zeigen ManAc(4)/PEI-pDNS and (ManAc-PEG)3/PEI-pDNS einen weitgehende konstanten Kurvenverlauf bei allen N/P-Verhältnissen mit einem leichten Abfall bei höheren N/P-Verhältnissen (N/P>15). Im Gegensatz dazu liegen die Gentransfereffizienz von ManAc(4)-PEI-PEG und (ManAc-PEG)3-PEI-PEG bei N/P-Verhältnissen höher als 1,25 im Bereich der Gentransfereffizienz von PEI oder niedriger.



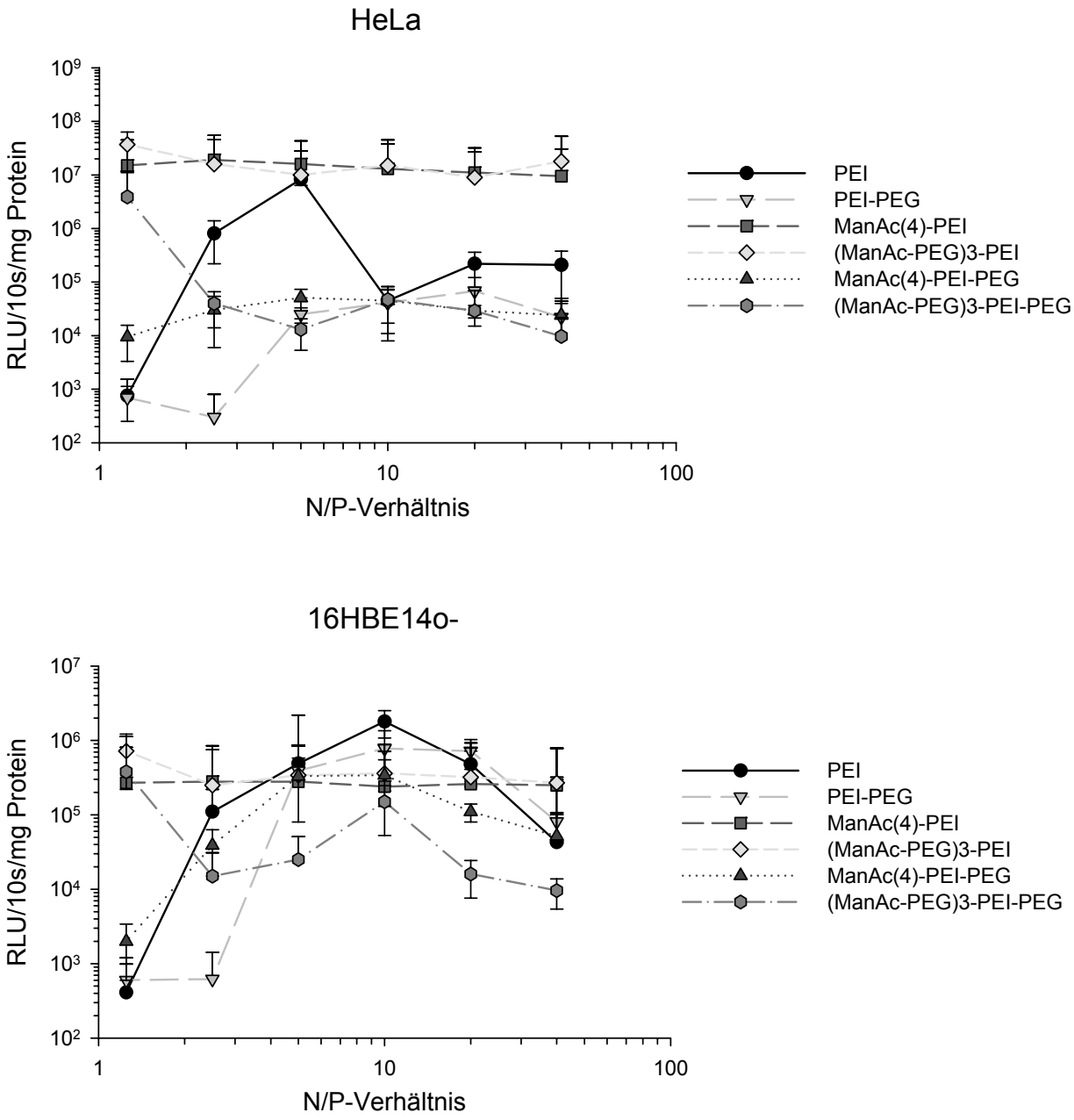


Abbildung 3.6: Ermittlung der Transfereffizienzen ManAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate anhand Hep-G2-, HeLa- und 16HBE14o$^-$ -Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI bzw. den Galacturonsäure-modifizierten-PEI-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 komplexiert. Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.3 Analyse von Zeta-Potential und Größe der Komplexe

Die Ergebnisse der Untersuchung der Gentransfereffizienz Mannuronsäure-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate deuten darauf hin, daß diese Konjugate mittels Rezeptor-vermittelten Gentransfer in die Zelle aufgenommen werden. Um diese Beobachtung weiter zu stützen wurden die Größen und Zeta-Potentiale der ManAc(4)-PEI-pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe gemessen. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch PEI vermittelter Gentrasfer in hohem Maße von der Oberflächenladung der Genvektorkomplexe abhängt (Rudolph *et al*., 2005) und dass die Größe der Komplexe deren Transfektionseffizienz entscheidend beeinflusst (Ogris *et al*., 1998).

Abbildung 3.7 zeigt die Zeta-Potentiale und Größen von PEI/pDNS-, PEI-PEG/pDNS, ManAc(4)-PEI/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexen. Die Komplexe wurden in destilliertem Wasser bei einer DNS-Konzentration von 30 µg/µl und N/P-Verhältnissen von 1,25, 5 und 10 generiert. Bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 weisen die Komplexe ein negatives Zeta-Potential auf, wohingegen die Zeta-Potentiale bei N/P-Verhältnissen von 5 und 10 positiv sind (Abb. 3.7A). Betrachtet man hierzu die Größen der Polymer-DNS-Komplexe in Abbildung 3.7B, so wird deutlich dass die Komplexe unabhängig von der Polymer-Struktur mit ansteigendem N/P-Verhältnis kleiner werden. Hierbei besitzen die PEI-pDNS-Komplexe die kleinsten Partikelgrößen über den gemessenen N/P-Bereich. Die Größen sinken von 100 nm auf 50 nm ab. Dagegen sind die Partikelgrößen der ManAc(4)-PEI/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe mit 180 nm bzw. 240 nm bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 höher und sinken auf 90 nm bzw. 65 nm bei einem N/P-Verhältnis von 10 ab. Über den gesamten N/P-Verhältnis-Bereich (N/P=1,25 - N/P=10) zeigen die PEI-PEG/pDNS-Komplexe die höchsten Partikelgrößen (280 nm - 150 nm). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Modifikation von PEI mit ManAc als auch mit PEG eine zwei- bis dreifache Zunahme der Komplexgrößen zur Folge hat.

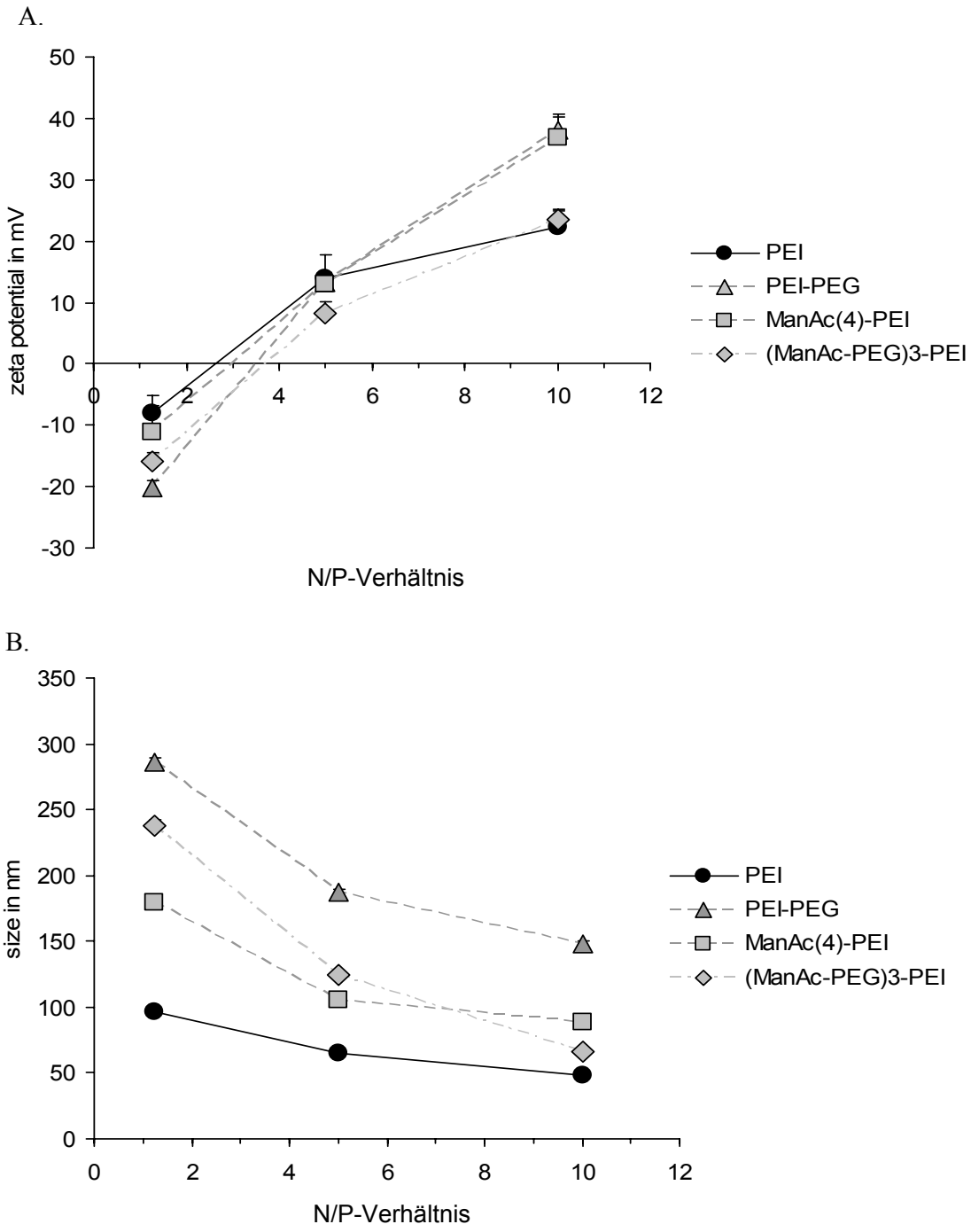


Abbildung 3.7: Zeta-Potentiale und Größen der PEI/pDNS-, PEI-PEG/pDNS, ManAc(4)-PEI/pDNS und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe. Die Komplexe wurden in destilliertem Wasser bei einer DNS-Konzentration von 30 µg/µl und N/P-Verhältnissen von 1,25, 5 und 10 generiert.

Zeta-Potential (A) und Größe (B) der Komplexe.

3.4 Vergleich der Gentransfereffizienzen methylierter- und nicht-methylierter ManAc-Konjugate

Neben der Untersuchung der Gentransfereffizienz Mannuronsäure-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurde auch die Transfereffizienz methylierter Mannuronsäure-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate ermittelt. Im Rahmen der Synthese der ManAc-Konjugate wurde Mannose zur Mannuronsäure oxidiert. Die gezielte Oxidation einer OH-Gruppe des Zuckers ist hierbei erst durch die Einführung einer Schutzgruppe (CH_3-Gruppe) möglich.

Abbildung 3.8 zeigt den Vergleich der Gentransfereffizienzen methylierter- und nicht-methylierter ManAc-PEI-Konjugate anhand von 16HBE14o$^-$-Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit den ManAc-Konjugaten bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 2,5 komplexiert. Sowohl Methyl-ManAc(4)-PEI als auch Methyl-(ManAc-PEG)3-PEI vermitteln signifikant niedrigere Gentransfereffizienzen als die nicht-methylierten Konjugate ManAc(4)-PEI und (ManAc-PEG)3-PEI.

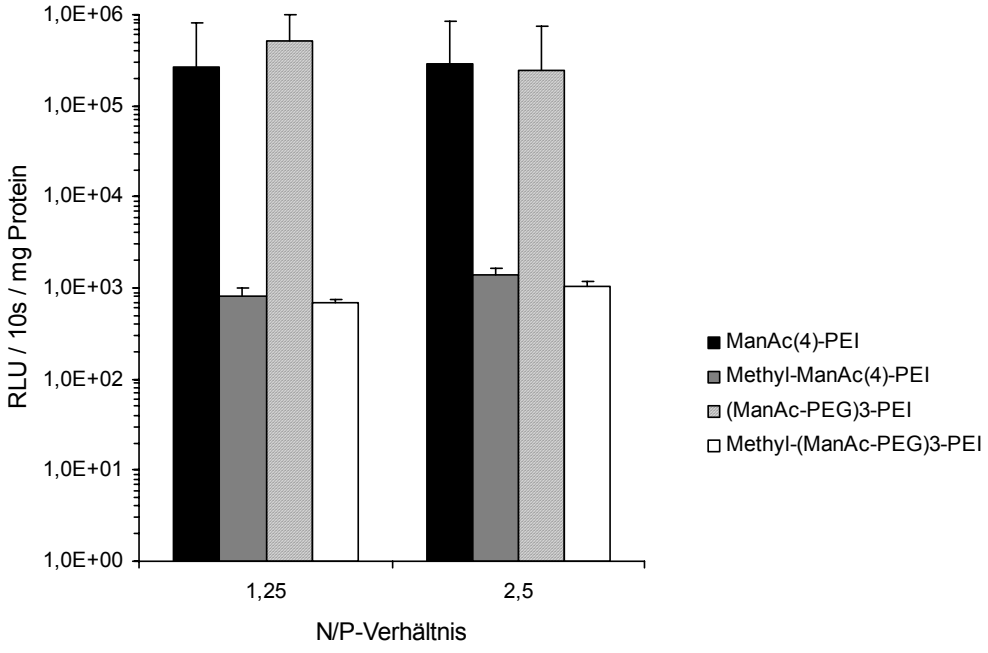


Abbildung 3.8: Vergleich der Gentransfereffizienzen methylierter- und nicht-methylierter ManAc-PEI-Konjugate anhand von 16HBE14o$^-$-Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit ManAc(4)-PEI, (ManAc-PEG)3-PEI und (ManAcPEG)3-PEI bzw. Methyl-(ManAc-PEG)3-PEI bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 2,5 komplexiert.

3.4 Analyse des Aufnahme-Mechanismus der ManAc-Konjugate in die Zelle

3.4.1 Inhibierung der ManAc-Rezeptoren durch freie Mannuronsäure

Nach der Bestimmung der Transfereffizienz der ManAc-Konjugate sollte der Mechanismus der Aufnahme dieser Konjugate in die Zelle untersucht werden. Eine Methode hierfür ist die Zugabe von freier Mannuronsäure zu den Zellen vor Durchführung der Transfektion um die vermutlich für die Aufnahme verantwortlichen ManAc-Rezeptoren zu blockieren. Hierzu wurde zunächst die toxische Wirkung der ManAc auf die Zellen mit Hilfe eines Zellproliferationstests bestimmt. Dieser Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen anhand der Anwesenheit von ATP in allen metabolisch aktiven Zellen. HepG2- HeLa- und 16HBE14o$^-$-Zellen wurden mit verschiedenen molaren Überschüssen (25fach – 500fach) an ManAc inkubiert und anschließend wurde die Konzentration von ATP in den Zellen gemessen. Die Ergebnisse des Zellproliferationstests (Abb. 3.9) zeigen, dass die Zugabe von 25fachem bis hin zu 300fachem molaren Überschuss an Mannuronsäure keinen toxischen Effekt auf HepG2- HeLa- und 16HBE14o$^-$-Zellen ausüben. Im Gegensatz dazu zeigen alle drei untersuchten Zelllinien eine signifikant reduzierte Zellvitalität nach Zugabe eines 500fachen Überschusses an ManAc.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die nachfolgende Inhibierung der ManAc-Rezeptoren durch freie ManAc eine Zugabe von 25-fachem molaren Überschuss gewählt. Hierzu wurden wiederholt HepG2-, HeLa- und 16HBE14o$^-$-Zellen vor Durchführung der Transfektion mit und ohne Zugabe eines (25-fachen molaren) Überschuß an Mannuronsäure inkubiert. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit ManAc(4)-PEI, (ManAc-PEG)3-PEI, ManAc(4)-PEI-PEG und (ManAcPEG)3-PEI-PEG bei einem N/P-Verhältniss von 1,25 komplexiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass nur die Genexpression ManAc-tragender Konjugate in Anwesenheit des Überschusses an ManAc signifikant abnimmt. Demgegenüber weisen die kationischen Ausgangspolymere PEI bzw. PEI-PEG auch nach Zugabe des 25fachen molaren Überschusses an ManAc nahezu identische Transfereffizienzen auf. Dieses Ergebnis legt einen anderen Aufnahmemechanismus der ManAc-Konjugate nahe.

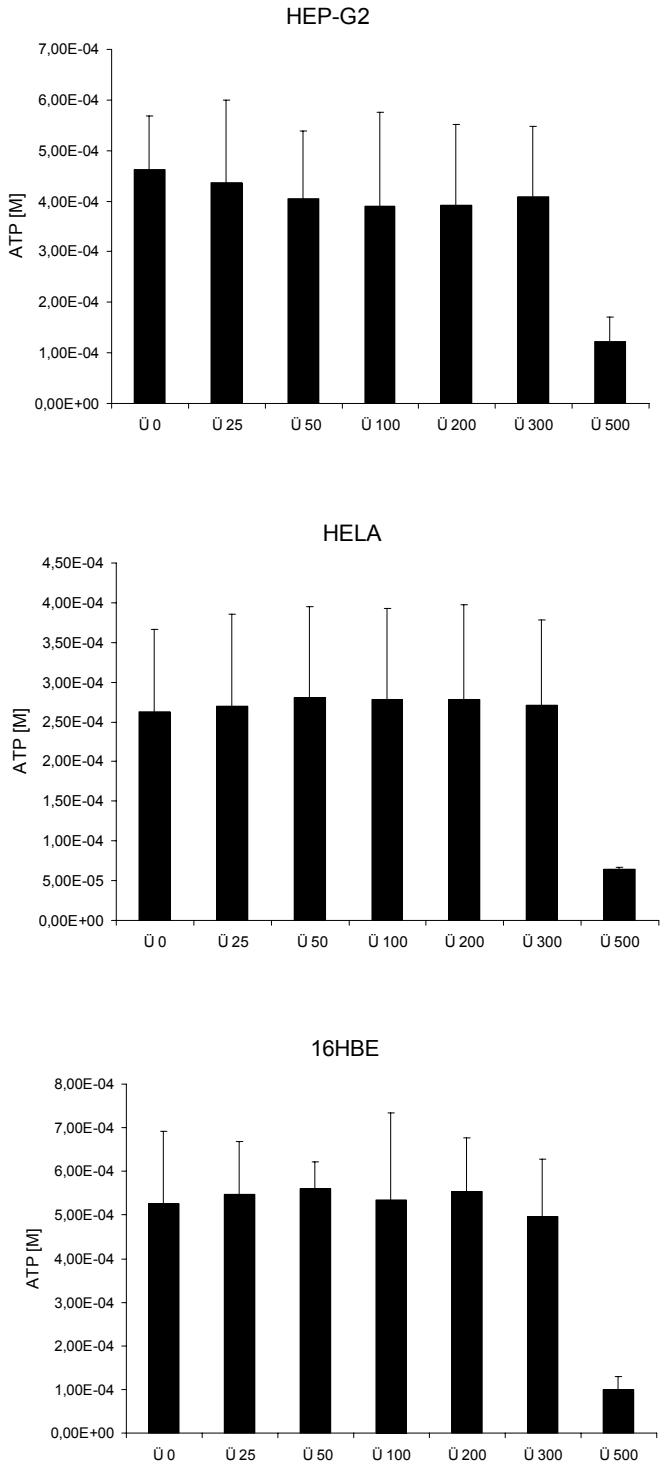
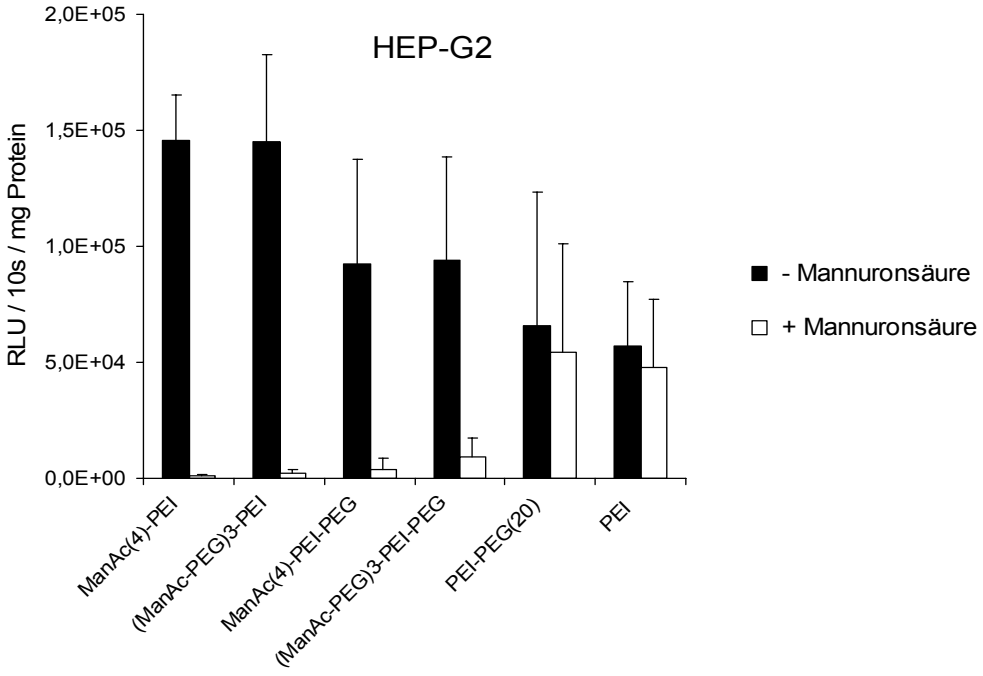
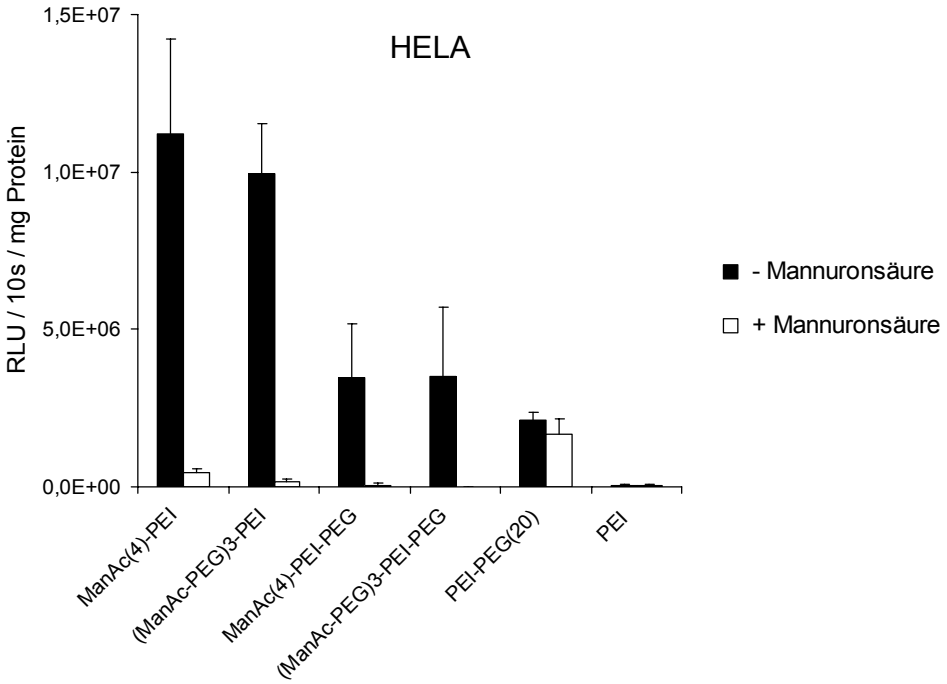


Abbildung 3.9: Toxizität der ManAc. Zur Bestimmung der Vitalitätsrate wurde die Konzentration von ATP in HepG2- HeLa- und 16HBE14o$^-$-Zellen nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen molaren Überständen an Mannuronsäure gemessen.


HEP-G2
RLU / 10s / mg Protein
2,0E+05
1,5E+05
1,0E+05
5,0E+04
0,0E+00
ManAc(4)-PEI
(ManAc-PEG)3-PEI
ManAc(4)-PEI-PEG
(ManAc-PEG)3-PEI-PEG
PEI-PEG(20)
PEI
- Mannuronsäure
+ Mannuronsäure


HELA
RLU / 10s / mg Protein
1,5E+07
1,0E+07
5,0E+06
0,0E+00
ManAc(4)-PEI
(ManAc-PEG)3-PEI
ManAc(4)-PEI-PEG
(ManAc-PEG)3-PEI-PEG
PEI-PEG(20)
PEI
- Mannuronsäure
+ Mannuronsäure

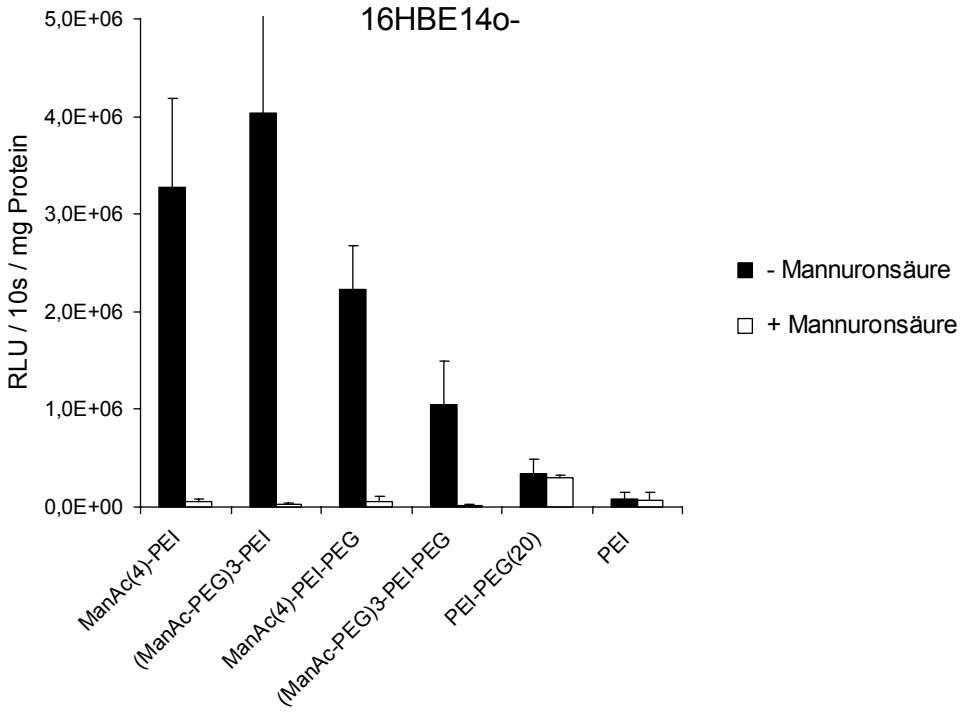


Abbildung 3.10: Inhibierung der ManAc-Rezeptoren durch Zugabe freier ManAc vor der Transfektion. HepG2-, HeLa- und 16HBE14o^{-}-Zellen wurden vor Durchführung der Transfektion mit einem 25-fachen molaren Überschuß an Mannuronsäure inkubiert. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit ManAc(4)-PEI, (ManAc-PEG)3-PEI ManAc(4)-PEI-PEG und (ManAcPEG)3-PEI-PEG bei einem N/P-Verhältniss von 1,25 komplexiert.

* Werte, die sich signifikant unterscheiden. ($p<0.05$; $n=4$). Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.5.2. ManAc-vermittelte Aufnahme Fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate

3.5.2.1 Analyse der rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine Aufnahme der ManAc-Konjugate durch Rezeptor-vermittelter Endozytose hin. Einen weiteren Beweis sollte eine Untersuchung der Transfektion mittels floureszenzmarkierter Dextran-Konjugate erbringen. Hierzu wurden HepG2- HeLa- und 16HBE14o$^-$-Zellen mit entweder fluoreszenzmarkiertem Dextran (FLUOS-Dex), fluoreszenzmarkiertem PEG-Dex (FLUOS-PEG-Dex) oder fluoreszenzmarkierten ManAc-modifizierten Dextran-Molekülen (FLUOS-ManAc-Dex, FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex) in Abwesenheit und Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an ManAc und Mannose inkubiert.

Die Abbildungen 3.11 bis 3.13 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HepG2- (Abb 3.11), HeLa- (Abb. 3.12) und 16HBE14o$^-$-Zellen (Abb. 3.13) nach 45 min Inkubation der Zellen mit den Dextran-Konjugaten mit und ohne Zugabe von ManAc zu den Zellen. Abbildung 3.14 zeigt Aufnahmen von 16HBE14o$^-$-Zellen nach ebenfalls 45 min Inkubation der Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Dextran-Konjugaten mit und ohne Zugabe von Mannose. Die Dextran-Konjugate FLUOS-Dex und FLUOS-PEG-Dex wurden in keine der drei untersuchten Zelllinien internalisiert (Abb. 3.11a+b, 3.12a+b, 3.13a+b, 3.14a+b). Im Gegensatz dazu ist auf den Fluoreszenzaufnahmen der Zellen die mit ManAc-modifizierten Dextran-Molekülen inkubiert wurden deutlich die Aufnahme der Konjugate in die Zellen und in die Endosomen sichtbar (Abb. 3.11c+d, 3.12c+d, 3.13c+d, 3.14c+d). Nach vorheriger Inkubation der Zellen mit ManAc sind die ManAc-Rezeptoren offensichtlich blockiert so dass die ManAc-modifizierten Dextran-Moleküle nicht aufgenommen werden konnten (Abb. 3.11e+f, 3.12e+f, 3.13e+f). Die Präinkubation der Zellen mit Mannose jedoch inhibiert die Aufnahme von FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex in die Zellen (Abb. 3.14e+f) nicht.

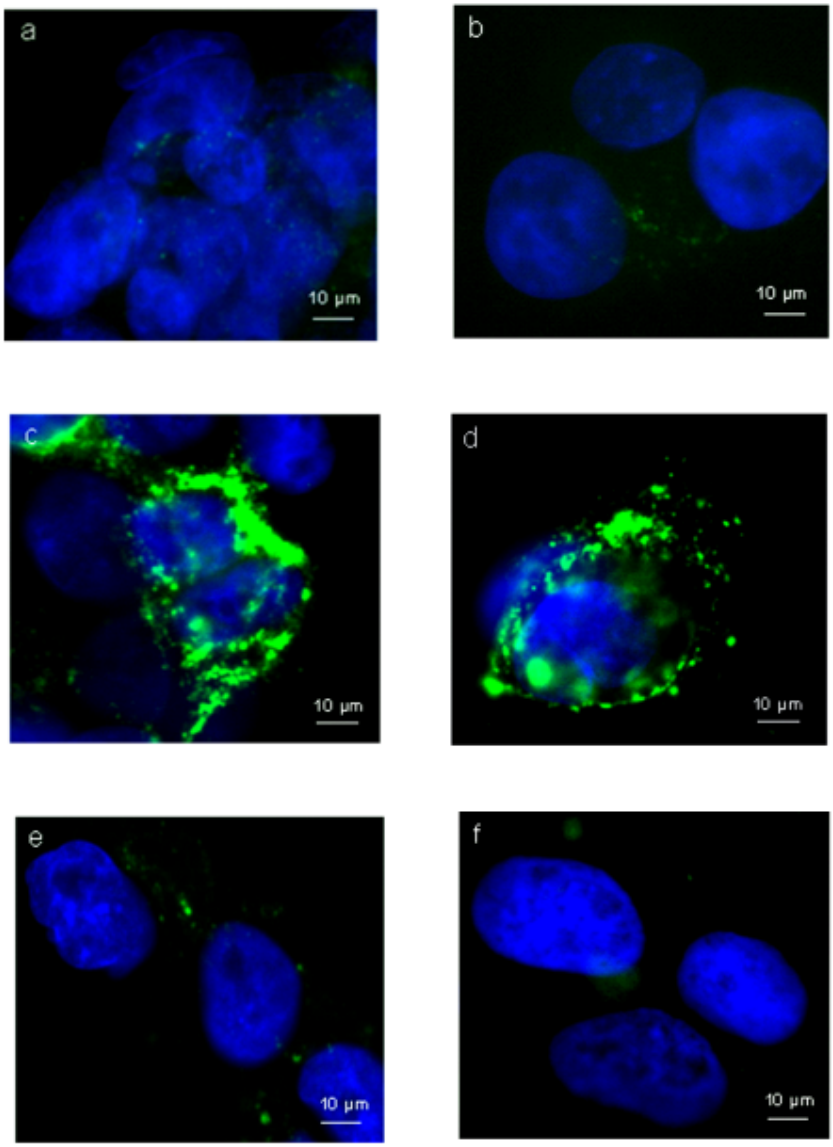


Abbildung 3.11: Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate mittels fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate. HepG2-Zellen wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex inkubiert. Die mit FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex behandelten Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an ManAc (50 µM) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.
FLUOS-Dex (a), FLUOS-PEG-Dex (b), FLUOS-ManAc-Dex (c), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (d), FLUOS-ManAc-Dex + ManAc-Überschuß (e), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex + ManAc-Überschuß.

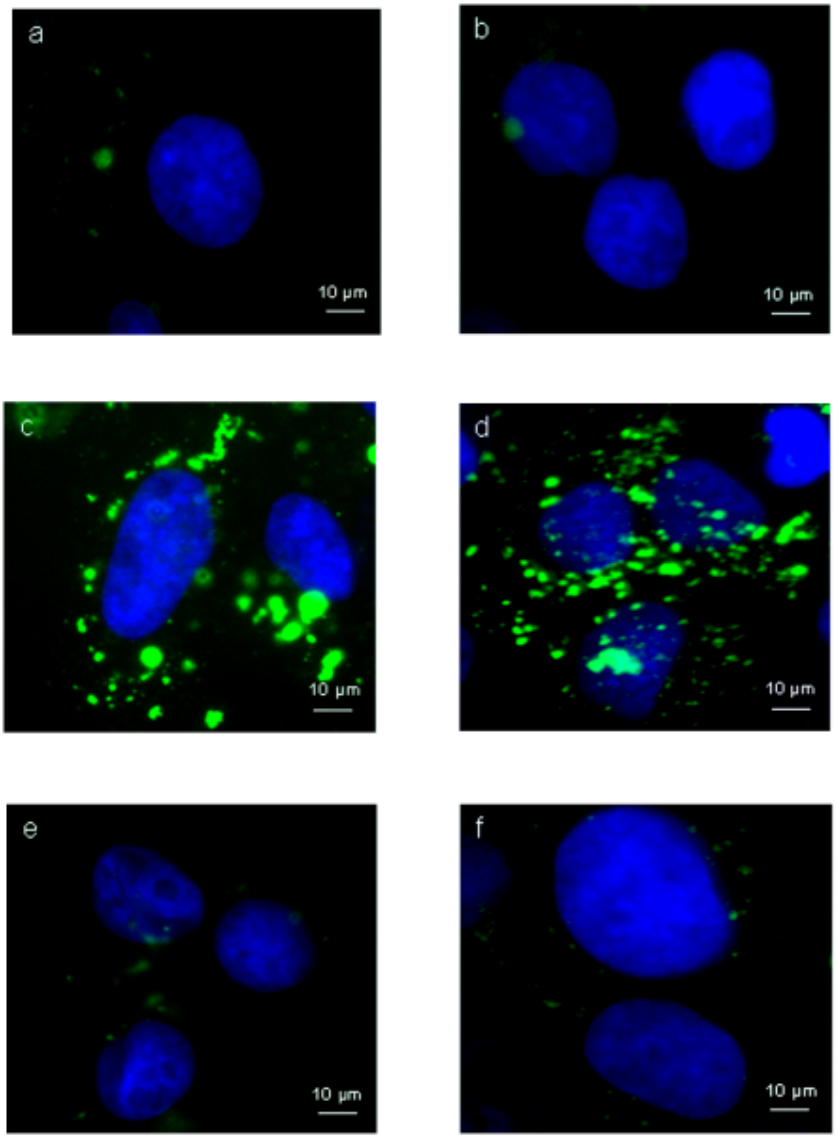


Abbildung 3.12: Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate mittels fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate. HeLa-Zellen wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex inkubiert. Die mit FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex behandelten Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an ManAc (50 µM) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.
FLUOS-Dex (a), FLUOS-PEG-Dex (b), FLUOS-ManAc-Dex (c), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (d), FLUOS-ManAc-Dex + ManAc-Überschuß (e), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex + ManAc-Überschuß.

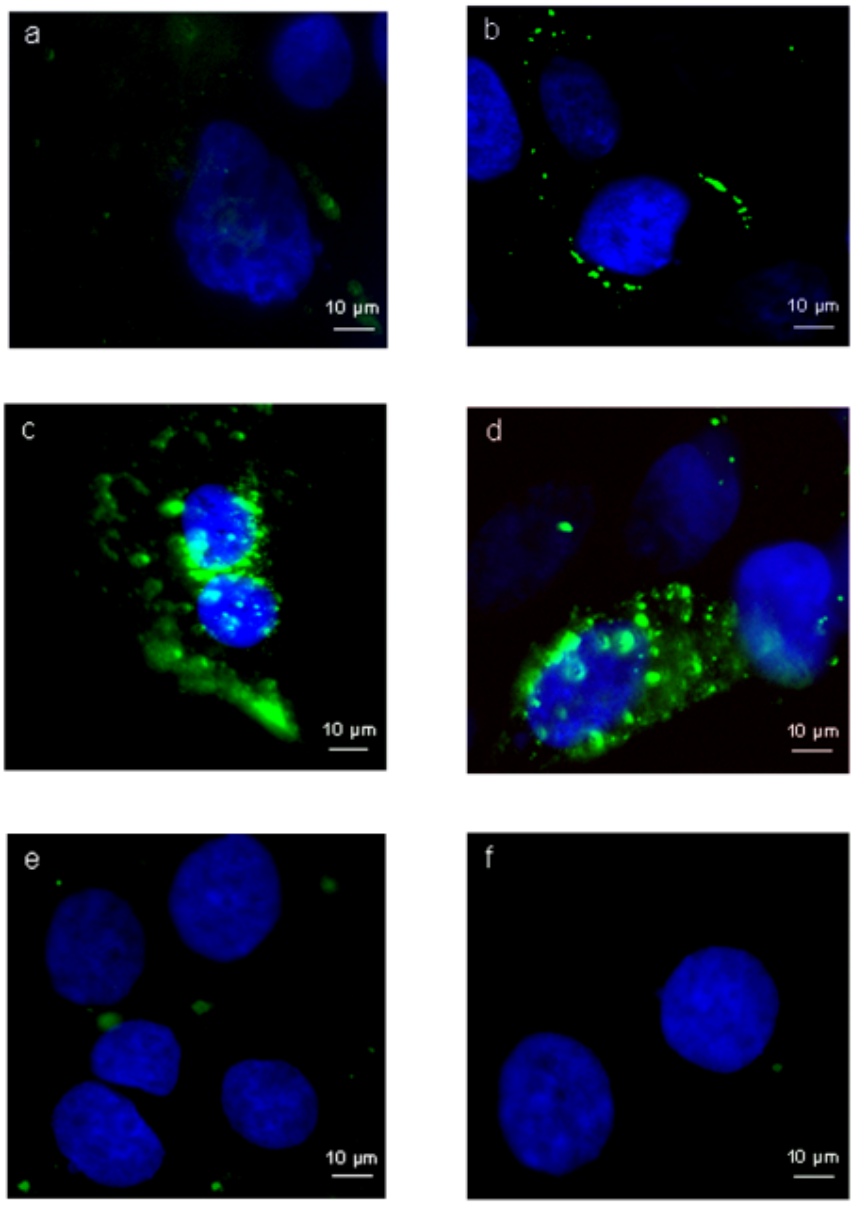


Abbildung 3.13: Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate mittels fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate. 16HBE14o$^-$-Zellen wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex inkubiert. Die mit FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex behandelten Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an ManAc (50 µM) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.
FLUOS-Dex (a), FLUOS-PEG-Dex (b), FLUOS-ManAc-Dex (c), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (d), FLUOS-ManAc-Dex + ManAc-Überschuß (e), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex + ManAc-Überschuß.

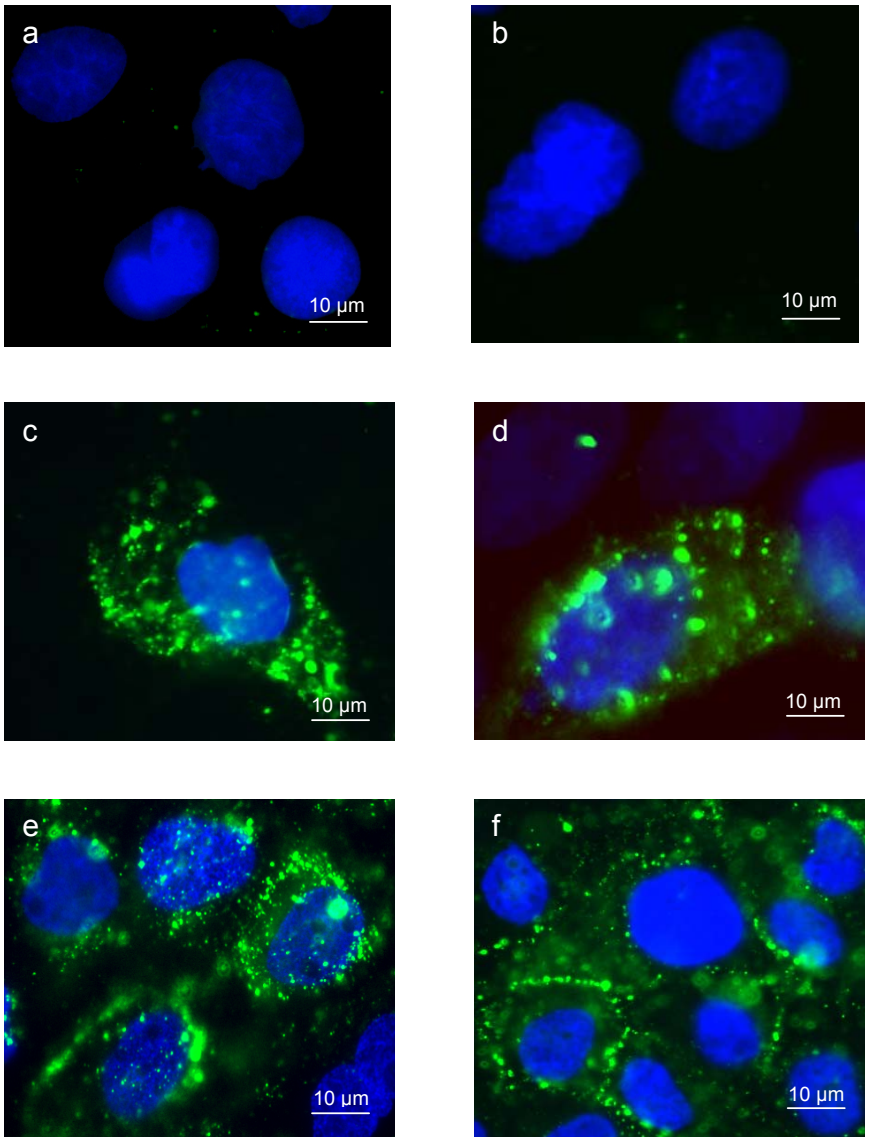


Abbildung 3.14: Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-Konjugate mittels fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate. 16HBE14o$^-$-Zellen wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-Dex, FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex inkubiert. Die mit FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex behandelten Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an Mannose (50 µM) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.
FLUOS-Dex (a), FLUOS-PEG-Dex (b), FLUOS-ManAc-Dex (c), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (d), FLUOS-ManAc-Dex + Mannose-Überschuß (e), FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex + Mannose-Überschuß.

3.5.2.2 Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-funktionalisierten Konjugate mittels Durchflusszytometrie

Des Weiteren wurde die ManAc-vermittelte zelluläre Aufnahme der Konjugate mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden 16HBE14o$^-$-Zellen erneut mit entweder fluoreszenzmarkiertem Dextran (FLUOS-Dex), fluoreszenzmarkiertem PEG-Dex (FLUOS-PEG-Dex) oder fluoreszenzmarkierten ManAc-modifizierten Dextran-Molekülen (FLUOS-ManAc-Dex, FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex) in Abwesenheit und Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an ManAc und Mannose inkubiert und anschließend per FACS untersucht.

In Abbildung 3.15 sind die erzielten Transfereffizienzen der verschiedenen fluoreszenz-markierten Dextran-Konjugate dargestellt. Bei Verwendung der fluoreszenzmarkierten Dextran-Konjugate FLUOS-Dex und FLUOS-PEG-Dex konnte nur geringe Transfereffizienz erzielt werden. Der Anteil an Fluoreszenz-positiven Zellen ist gering bzw. vergleichbar mit dem Anteil an Fluoreszenz-positiven Zellen die unbehandelte Zellen erzielten. Dagegen wurden nach Inkubation der Zellen mit FLUOS-ManAc-Dex bzw. FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex 58% bzw. 50% positive Zellen erlangt.

Abbildung 3.16 zeigt die Durchflußzytrometrische Analyse der erzielten Transfereffizienzen von FLUOS-PEG-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex mit Zugaben 25-facher molarer Überschüsse an ManAc bzw. Mannose. Die Aufnahme von FLUOS-PEG-Dex ist gering (IA, IIA, IIIA; gelbe Kurve). Die Anzahl an Fluoreszenz-positiven Zellen ist vergleichbar mit der Anzahl Fluoreszenz-positiver Zellen unbehandelter Zellen (violette Kurve). Dies trifft auf alle der getesteten Zelllinien zu. Im Gegensatz dazu findet eine Aufnahme von FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex ohne Überschuss an ManAc bzw. Mannose in die Zellen statt (IB, IIB, IIIB; gelbe Kurve). Nach vorheriger Inkubation der Zellen mit ManAc können die ManAc-modifizierten Dextran-Moleküle jedoch nicht mehr aufgenommen werden (IB, IIB, IIIB; rote Kurve). Die Rezeptoren sind blockiert. Die Präinkubation der Zellen mit Mannose inhibiert die Aufnahme von FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex in die Zellen nicht (IB, IIB, IIIB; grüne Kurve).

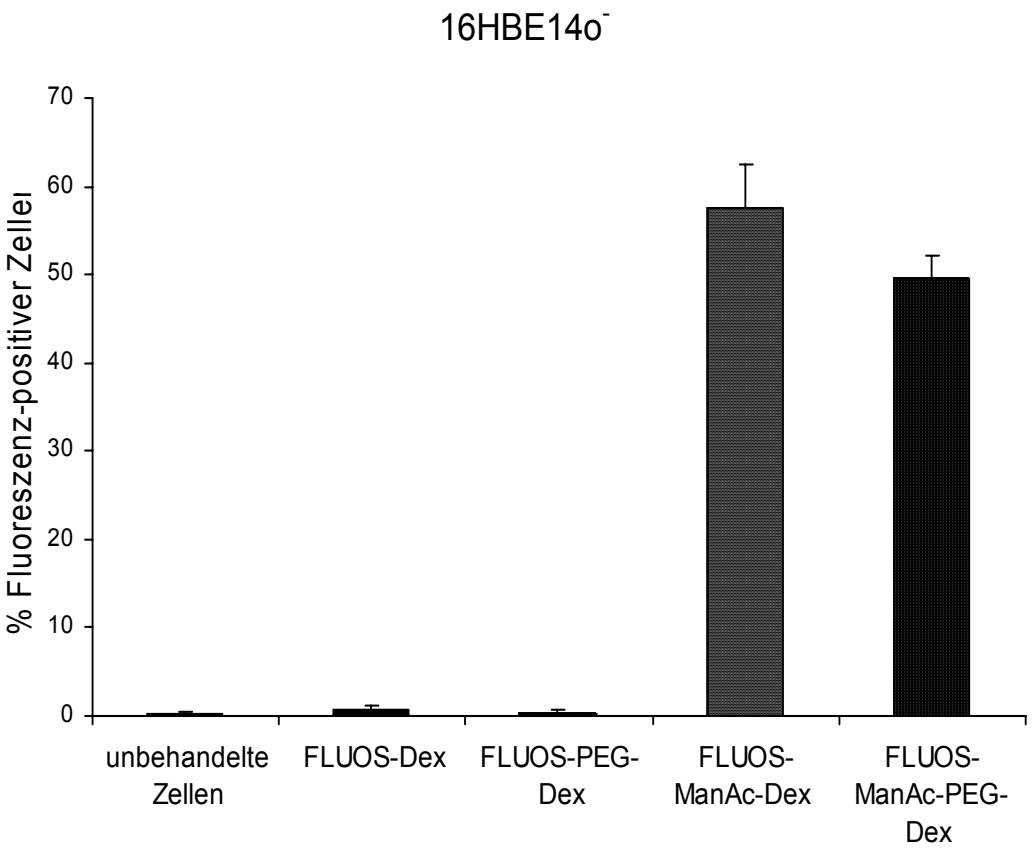


Abbildung 3.15: Durchflußzytrometrische Quantifizierung der erzielten Transfereffizienzen verschiedener fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate. 16HBE14o$^-$-Zellen wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-PEG-Dex, FLUOS-ManAc-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

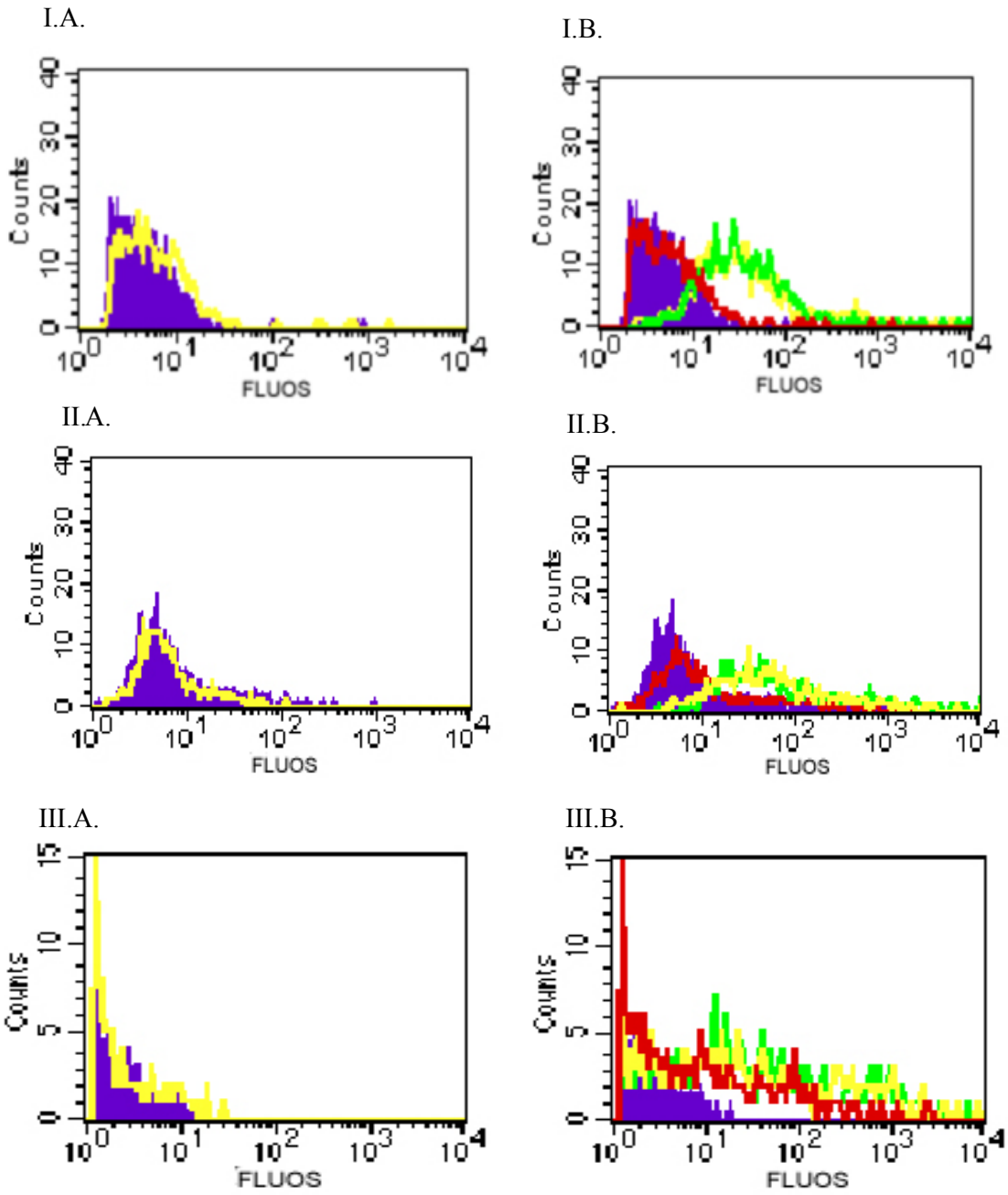


Abbildung 3.16: Durchflußzytrometrische Analyse der erzielten Transfereffizienzen von FLUOS-PEG-Dex und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex mit Zugaben molarer Überschüsse an ManAc und Mannose. 16HBE14o$^-$-Zellen (I.), HeLa-Zellen (II.) HepG2-Zellen (III.) wurden mit 2 µM fluoreszenz-markiertem FLUOS-PEG-Dex (A) und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (B) inkubiert. Die mit FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex behandelten Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit eines 25-fachen molaren Überschusses an Mannose bzw. Mannuronsäure (50 µM) inkubiert.
Violett: 16HBE14o$^-$-Zellen, unbehandelt; gelb: FLUOS-PEG-Dex (A) und FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex (B) in Abwesenheit von ManAc bzw. Mannose; rot: FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex in Anwesenheit von ManAc; grün: FLUOS-(ManAc-PEG)-Dex in Anwesenheit von Mannose.

3.6 Untersuchung der Gentransfereffizienz der ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate *in vivo*

3.6.1 Aerosol-Applikation der ManAc-funktionalisierten PEI- bzw. PEI-PEG-Konjugate in die Mauslunge

Die Untersuchungen der Gentransfereffizienz der ManAc-funktionalisierten Konjugate *in vitro* zeigten, dass diese Konjugate sehr effizient humane Bronchialepithelzellen (16HBE14o$^-$) transfizieren können. Aus diesem Grund bestand die Annahme, dass ManAc-funktionalisierte Konjugate ideale Kandidaten für den Gentransfer in die Lunge darstellen. Um die mögliche Anwendbarkeit dieser Konjugate für den Gentransfer in die Lunge und deren Effizienz *in vivo* zu testen, wurden in einer ersten Reihe von Experimenten die Genvektoren bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 10 und einer DNS-Konzentration von 10 µg/µl formuliert. Ein N/P-Verhältnis von 1,25 wurde gewählt, da bei diesem N/P-Verhältnis die ManAc-funktionalisierten Konjugate *in vitro* die höchsten Gentransfereffizienzen erzielten. Untersuchungen von Rudolph et. al. (2005) zeigten, dass bei einem N/P-Verhältnis von 10 formulierte Genvektoren erfolgreich *in vivo* vernebelt werden konnten. Anschließend an die Formulierung wurden die Genvektoren mit einem handelsüblichen Vernebler vernebelt und die Intaktheit der DNS nach Verneblung der Genvektorkomplexe analysiert. Um die Integrität der DNS nach dem Vernebeln zu untersuchen, wurden vor und nach der Aerosolisierung von jedem Genvektorkomplex Fraktionen gesammelt. Zusätzlich wurden Reservoir-Fraktionen, also die Anteile die nach der Verneblung im Gerät zurück blieben, analysiert. Die erhaltenen Fraktionen (n = nicht vernebelte Fraktion; v = vernebelte Fraktion; r = Reservoirfraktion) wurden nach Zugabe von Heparan-Sulfat (um die DNS von den Konjugaten zu trennen) auf ein 0,6%-iges Agarose-Gel aufgetragen.

In Abbildung 3.17 ist die Analyse der Intaktheit der DNS nach Verneblung der Genvektorkomplexe dargestellt. Die Vernebelung von PEI/pDNS- , PEI-PEG/pDNS-, ManAc(4)-PE/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PE/pDNS-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 führte zu einer Fragmentierung der pDNS. Dies zeigt sich durch das Vorhandensein von „Schmieren“ in den Spuren in die die v- und r-Fraktionen aufgetragen wurden. Dagegen wird deutlich, dass nach dem Vernebeln von Komplexen die bei einem N/P-Verhältnis von 10 generiert wurden, die DNS sich in einem intakten Zustand befindet. Aus diesem Grund wurde für die im Anschluß an dieses Experiment durchgeführte

Verneblung der Genvektoren in die Mauslunge trotz der niedrigeren Gentransfereffizienz der ManAc-funktionalisierten Konjugate *in vitro* ein N/P-Verhältnis von 10 gewählt.

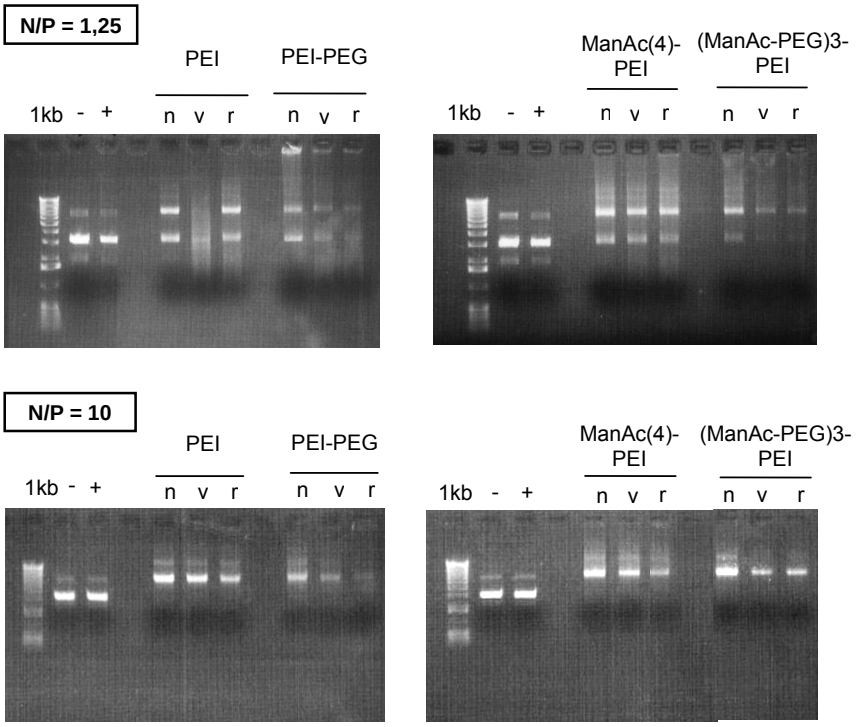


Abbildung 3.16: Analyse der Intaktheit der DNS nach Vernebelung der Genvektorkomplexe. DNS (c_{pDNS} = 10 µg/ml; pCMV-Luc) wurde mit PEI, PEI-PEG, ManAc(4)-PEI und (ManAc-PEG)3-PEI bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 10 komplexiert und anschließend für 10 min vernebelt. 20 µl der Komplex-Lösungen aus der nicht-vernebelten (n), vernebelten (v) und Reservoir- (r) Fraktion wurden auf ein Agarosegel aufgetragen.
(+) nicht-komplexierte pDNS nach Zugabe von 5 µl Heparan-Sulfat; (-) nicht-komplexierte pDNS ohne Zugabe von Heparan-Sulfat.

Für die Verneblung der Genvektoren in Mauslungen wurden die Genvektorkomplexe bei einem N/P-Verhältnis von 10 und einer DNS-Konzentration von 125µg/µl formuliert. Vor der Vernebelung wurden jeweils die Größen der generierten Komplexe bestimmt.

Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse der *in vivo*-Verneblung der PEI/pDNS-, PEI-PEG/pDNS-, ManAc(4)-PEI/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe. Die durch

PEI-PEG vermittelte Gentransfer-Effizienz lag signifikant 68-fach unter der durch PEI vermittelte Gentransfereffizienz. Diese Berechnung erfolgte anhand der gemessenen Menge an Luziferase bezogen auf ein Gramm Lungengewebe. Die Gentransfereffizienzen der auf ManAc-PEI- bzw. (ManAc-PEG)-PEI-basierenden Genvektoren lag ebenfalls signifikant 64- bzw. 140-fach unter der Gentransfereffizienz der PEI-Genvektoren. Bei Betrachtung der Größen der Genvektor-Komplexe wird deutlich, dass PEI-PEG/pDNS-, ManAc(4)-PEI/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe Aggregate von 400 nm [(ManAc(4)-PEI/pDNS-Komplexe] bis hin zu einem Durchmesser von 900 nm [(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe] bilden. Die PEI/pDNS-Komplexe besitzen im Gegensatz dazu einen durchschnittlichen Durchmesser von 80 nm.

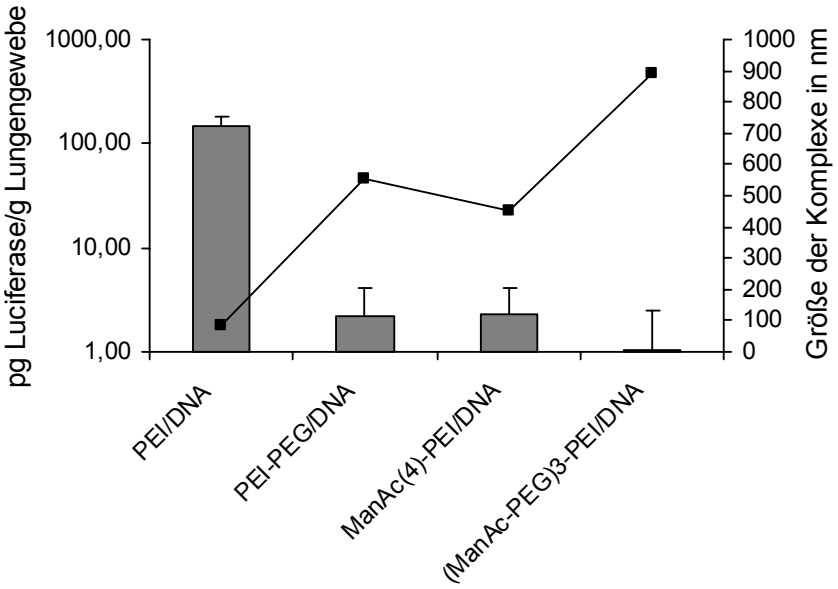


Abbildung 3.18: Verneblung der Gen-Vektoren in die Mauslunge. DNS (c_{pDNS} = 125 µg/ml; pCMV-Luc) wurde mit PEI, PEI-PEG, ManAc(4)-PEI und (ManAc-PEG)3-PEI bei einem N/P-Verhältniss von 10 komplexiert und nach Messung der Größen der Gen-Vektor-Komplexe an Mäuse vernebelt. Der Graph repräsentiert die Größen der Gen-Vektor-Komplexe und die Säulen die Gentransfereffizienzen (n = 4).

3.6.2 Neue Formulierungen ManAc-funktionalisierter PEI-PEG-Konjugate

3.6.2.1 Biophysikalische Charakterisierung und Gentansfereffizienz *in vitro*

Die unter 3.6.1 aufgeführten Ergebnisse der *in vivo*-Experimente ergaben dass die Gentransfereffizienz der ManAc-funktionalisierter Konjugate ManAc(4)-PEI und (ManAc-PEG)3-PEI vermutlich aufgrund einer Aggregat-Bildung der Komplexe nur gering war. Kursa et al. (2003) konnten beobachten, dass aus einer Zugabe von freiem PEI-PEG zu den Komplexen eine Verringerung deren Größe resultiert. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Komplexe neu formuliert um anschließend weitere *in vivo*-Versuche durchführen zu können. Hierfür wurden neue Komplexe, bestehend aus verschiedenen Anteilen an PEI, PEI-PEG mit dem Molekulargewicht von 600 KDa und (ManAc-PEG)3-PEI bzw. PEI-PEG mit dem Molekulargewicht von 350 KDa bei einem N/P-Verhältnis von 10 und einer DNS-Konzentration von 30 µg in HBS formuliert. Die prozentualen Anteile an den einzelnen Bestandteilen waren folgende:

- (ManAc-PEG)3-PEI bzw. PEI-PEG (350 KDa): 10%
- PEI-PEG (600 KDa): 10%, 30% bzw. 50%
- PEI: 80%, 60% bzw. 40%

Anschließend an die Formulierung wurden Zeta-Potential und Größen der Komplexe gemessen. Tabelle 3.2 zeigt die gemessenen Zeta-Potentiale und Größen der neu formulierten Komplexe im Vergleich zu PEI, PEI-PEG (350 KDa) und (ManAc-PEG3)-PEI.

Tabelle 3.2: Zetapotential und Größe der neu formulierten ManAc-funktionaliserten PEI-PEG-Konjugate

	Anteil an PEI-PEG(600)	Zeta-Potential in mV	Größe in nm
PEI	-	22,27	69
PEI-PEG(350)	-	37,97	200
(ManAc-PEG)3-PEI	-	23,59	150
PEI-PEG(350)	10%	10,91	89,4
+ PEI-PEG(600)	30%	12,31	87,6
+ PEI	50%	11,23	96,5
(ManAc-PEG)3-PEI	10%	12,07	82,6
+ PEI-PEG(600)	30%	17,52	94,0
+ PEI	50%	20,92	85,0

Die Zeta-Potentiale der neu formulierten Komplexe liegen im Bereich von 10,91 nm und 20,92 nm und damit unter den Zetapotentialen von PEI/pDNS (22,27 mV), PEI-PEG/pDNS (350 KDa) (37,97 mV) und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS (23,59 mV). Die Größen der PEI/PEI-PEG(600)/PEI-PEG(350)/pDNS- und PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe liegen mit 87,6 nm bis 96,5 nm bzw. 82,6 nm bis 94,0 nm ebenfalls deutlich unter denen der PEI-PEG/pDNS- (200 nm) und (ManAc-PEG3)-PEI/pDNS-Komplexe (150 nm). Der Anteil an PEI-PEG (600) bzw. PEI an den Komplexen scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Größen zu haben. So haben z.B. PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe mit einem Anteil von 10% PEI-PEG (600) ähnliche Größen (82,6 nm) wie PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe mit einem Anteil von 50% PEI-PEG (600) (85,0 nm).

Im Anschluss an die Messungen der Größen und Zeta-Potentiale der neu formulierten Komplexe die in HBS und bei einer DNS-Konzentration von 30 µg generiert wurden, wurden die selben Komplexe in destilliertem Wasser und bei einer DNS-Konzentration von 0,125 mg/ml formuliert und deren Größen gemessen. Der Grund hierfür war diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der vorangegangenen Größenmessungen, die vor der *in vivo*-Vernebelung (3.6.1) durchgeführt wurden, zu vergleichen.

Tabelle 3.3 zeigt die Größen neu formulierter PEI/PEI-PEG(600)/PEI-PEG(350)/pDNS- und PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe mit einem PEI-PEG(600)-Anteil von 50% im Vergleich zu den Größen der entsprechenden PEI(350)/pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe.

Tabelle 3.3: Vergleich der Größen der ursprünglich generierten Komplexe mit den Größen neu formulierter Komplexe

	Größe in nm
PEI-PEG(350)	554,9
10% PEI-PEG(350) + 50% PEI-PEG(600) + 40% PEI	86,0
(ManAc-PEG)3-PEI	890,9
10% (ManAc-PEG)3-PEI + 50% PEI-PEG(600) + 40% PEI	69,5

Die Größen der neu formulierten Komplexe liegen mit 86,0 nm bzw. 69,5 nm deutlich unter der Größe der ursprünglich formulierten Komplexe (554,9 nm bzw. 890,9 nm). Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Gentransfereffizienz der neu formulierten Komplexe anschließend *in vitro* getestet. Hierfür wurden neu formulierte PEI/PEG-PEI(600)/PEI-PEG(350)/pDNS- und PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe mit den prozentualen Anteilen an PEI-PEG(600) von 10%, 30% und 50% und ebenfalls PEI/pDNS-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 10 komplexiert und in 16HBE14o$^-$-Zellen transfiziert.

Abbildung 3.19 zeigt dass die höchsten Gentransfereffizienzen bei der Verwendung von PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexen mit einem prozentualen Anteil an PEI-PEG(600) von 30 erzielt werden.

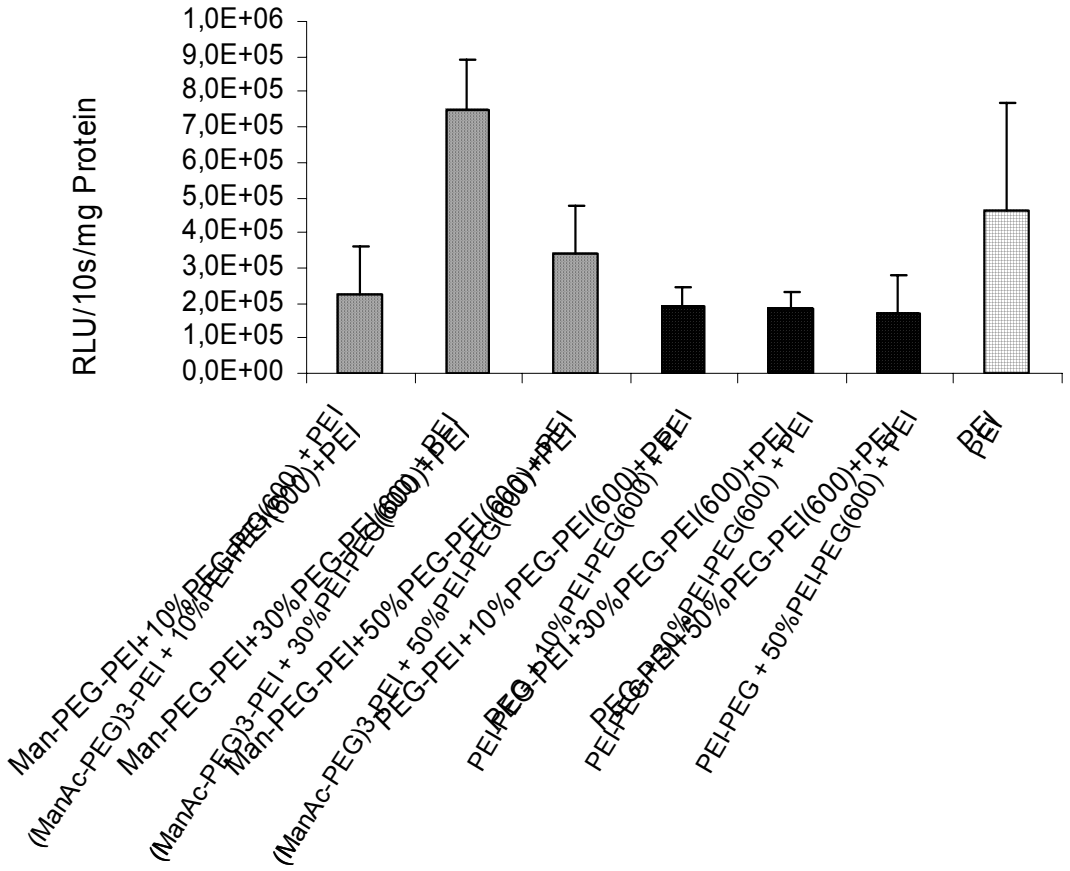


Abbildung 3.19: Ermittlung der Transfereffizienzen neu formulierter ManAc-funktionalisierter PEI-PEG-Konjugate anhand von 16HBE14o- Zellen. Für die Transfektion wurden 0,5 µg DNS (pCMV-Luc) pro Well mit PEI, PEI-PEG bzw. den neu formulierten Mannuronsäure-modifizierten-PEI-Konjugaten bei einem N/P-Verhältnis von 10 komplexiert.

3.6.2.2 Gentransfereffizienz *in vivo*

Die Analyse der Gentransfereffizienz neu formulierter ManAc-modifizierter PEI-Konjugate *in vitro* zeigte, dass die höchsten Gentransfereffizienzen bei der Verwendung von PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexen mit einem prozentualen Anteil an PEI-PEG(600) von 30% erzielt werden konnten. Aus diesem Grund wurden diese Komplexe, sowie die entsprechenden PEI/PEI-PEG(600)/PEI-PEG(350)/pDNS-Komplexe und PEI/pDNS-Komplexe in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Nach 6 h bzw. 24 h wurde Lumineszenz als Maß für die Luziferase-Expression mit Hilfe eines *in vivo*-Imaging-Gerätes bestimmt.

Nach 6 und 24 h Inkubationszeit konnte in den Lungen von Mäusen denen PEI/pDNS-Komplexe injiziert wurden, Luziferase-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.20 I+II a). Dagegen wiesen Lungen von Mäusen denen PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe bzw. die entsprechenden PEI/PEG-PEI(600)/PEI-PEG(350)/pDNS-Komplexe verabreicht wurden, weder nach 6 (Abb. 3.20 I c bzw. b) noch nach 24 h (Abb. 3.20 II c bzw. b) Luziferase-Expression auf. Auch eine Messung 48 h nach Injektion der PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS- bzw. PEI/PEI-PEG(600)/PEG-PEI(350)/ pDNS-Komplexe zeigte keine positiven Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). In den Lungen der Mäuse denen PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe bzw. die entsprechenden PEI/PEG-PEI(600)/PEI-PEG(350)/pDNS-Komplexe verabreicht wurden konnte also im Gegensatz zu den Lungen der Mäuse denen PEI/pDNS-Komplexe injiziert wurden, keine Gen-Expression nachgewiesen werden. Neben einer Luziferase-Expression in den Lungen der Mäuse denen PEI/PEI-PEG(600)/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe injiziert wurden, wäre aufgrund der hohen Gentransfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate die *in vitro* in HepG2-Zellen erzielt wurden (siehe 3.2.3 Gentransfereffizienz der Mannuronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate), auch eine Gen-Expression in der Leber denkbar gewesen. Jedoch auch in diesem Organ konnte kein positives Signal visualisiert werden.

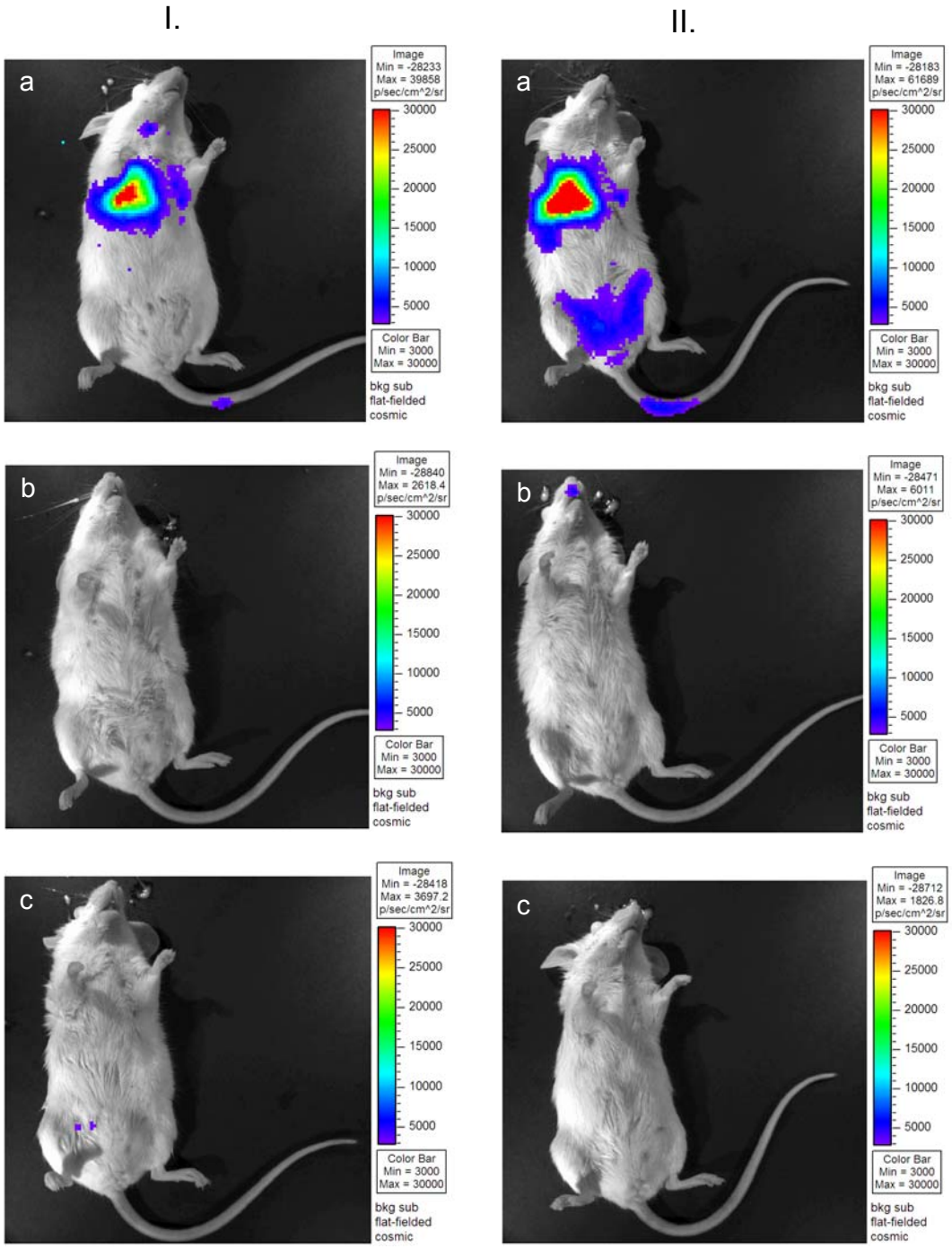


Abbildung 3.20: Gentransfereffizienz neu formulierter ManAc-funktionalisierter-PEI-PEG-Konjugate *in vivo*. Neu formulierte Mannuronsäure-funktionalisierte PEI bzw. PEG-PEI-Konjugate [(ManAc-PEG)3-PEI bzw. PEG-PEI = 10%; PEI-PEG(600) = 50%; PEI = 40%] und PEI wurden mit 30 µg DNS (pCMV-Luc) pro Maus in 5% Glucose bei einem N/P-Verhältniss von 10 komplexiert. Nach 6 h (I) bzw. 24 h (II) wurde die Luziferase-Expression *in vivo* bestimmt.

In vivo-Images von Mäusen denen (a) PEI/pDNS-Komplexe, (b) PEI/PEG-PEI(600)/PEG-PEI(350)/pDNS-Komplexe und (c) PEI/PEG-PEI(600)/(ManAc-PEG3)-PEI/pDNS-Komplexe injiziert wurden.

3.7 „Immunosurfaction“ – eine neuartige Methode zur Transfektion von Minichromosomen in Zellen

3.7.2 „Immunosurfaction“ von aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen in 16HBE14o$^-$-Zellen

Für den Transfer von artifiziellen Chromosomen wie HACs bzw. Minichromosomen in die zu transfizierenden Zellen stehen derzeit nur komplizierte und aufwendige Verfahren zur Verfügung. So können synthetisierte Chromosomen durch Mikrozell-vermittelten Chromosomen-Transfer (Fournier and Ruddle, 1977; Fournier, 1981; Goodfellow *et al*., 1982) in Akzeptor-Zellen überführt werden. Um diese zeitaufwendige Prozedur zu umgehen und den Transfer von Minichromosomen zu vereinfachen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methode der „Immunosurfaction“ entwickelt. Dieser Methode liegt das Verfahren der „Surfaction“ (Chang F.-H. *et al*., 2004) zu Grunde bei dem genetisches Material über kationische Polymere, beispielsweise PEI, an Oberflächen von Zelkulturplatten gebunden wird und anschließend in darauf ausgesäte Zellen transfiziert wird.

Zur Entwicklung und Durchführung der „Immunosurfaction" in vorliegender Arbeit wurden zunächst sich in der Methaphase des Zellzyklus befindende Chromosomen aus einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie, den HTLABGB-B5-4-Zellen, isoliert (siehe 2.14.1 Extraktion von Chromosomen in der Metaphase). Diese Zelllinie wurde permanent transfiziert mit dem humanen Minichromosom 1aA1 und einem Plasmid das für ein GFP-CENP-B-Fusionsprotein kodiert. Dieses Fusionsprotein bindet über CENP-B (Zentromer-bindendes Protein B) an das Zentromer humaner Chromosomen, also an des Zentromer aller Chromosomen, inklusive der Minichromosomen, in dieser Zelllinie (Abbildung 3.21). Nach Extraktion der Chromosomen/Minichromosomen wurden diese über an die Oberfläche von Objektträgern fixierte GFP-Antikörper gebunden. Anschließend wurde entweder PEI zugegeben das an die negativ geladene DNS bindet, bzw. direkt die zu transfizierenden Zellen auf die über Antikörper an die Oberfläche der Objektträger gebundenen Chromosomen/Minichromosomen ausgesät (Abbildung 3.22).

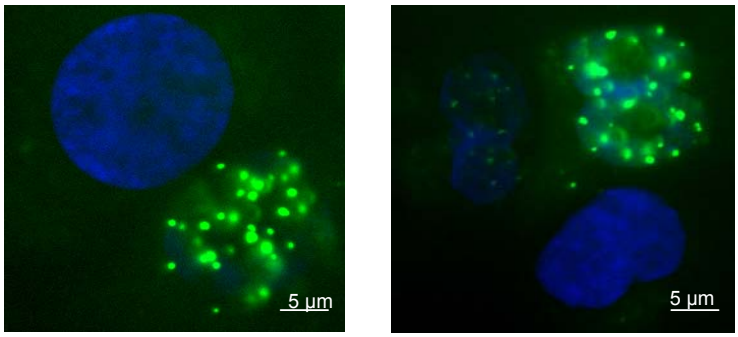


Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HTLAGBG B5-4-Zellen. Die Zellen wurden ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Fluoreszenzsignal) sichtbar gemacht. Die Zelllinie ist permanent transfiziert mit einem Plasmid das für ein GFP-CENP-B-Fusionsprotein kodiert, welches über CENP-B an das Zentromer humaner Chromosomen bindet. Die grünen Signale stellen somit die EGFP-markierten Zentromere der Chromosomen/Minichromosomen dar.

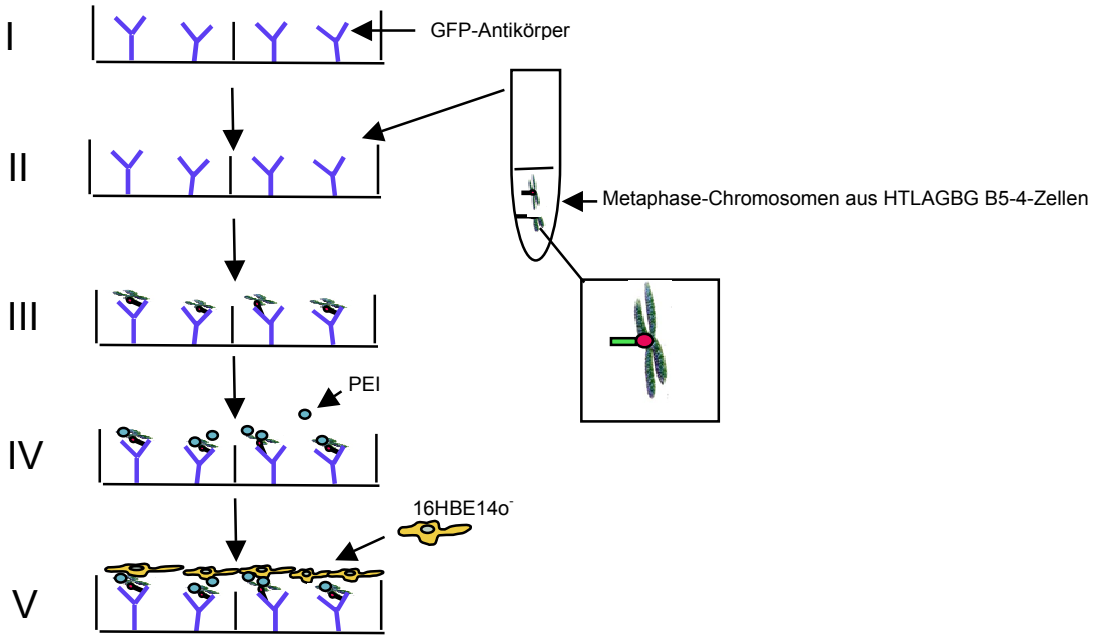


Abbildung 3.22: Darstellung der einzelnen Schritte der „Immunosurfaction“. In einem ersten Schritt werden Antikörper an die Oberfläche von Objektträgern (2-Chamber-Slides) gebunden. Nach mehrmaligem Waschen werden extrahierte Chromosomen bzw. Minichromosomen zu den gebundenen Antikörpern gegeben. Die Chromosomen binden über ein CENP-B/GFP-Fusionsprotein an die fixierten Antikörper. Nach weiteren Waschschritten wird entweder PEI zugegeben und dann die zu transfizierenden Zellen darauf ausgesät, oder es werden direkt die Zellen auf die über Antikörper an die Oberfläche der Objektträger gebundenen Chromosomen bzw. Minichromosomen ausgesät.

Um die Bindung der Chromosomen/Minichromosomen zu visualisieren und somit zu überprüfen, wurden diese nach der Extraktion und Fixierung an die Oberfläche der Objektträger mit DAPI gegengefärbt. Anschließend wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt Abbildung 3.23 zeigt die gebundenen Chromosomen /Minichromosomen. Das blaue Fluoreszenzsignal (3.23a) zeigt mit DAPI angefärbte Chromosomen, das grüne Fluoreszenzsignal wird vom EGFP-Signal emittiert und zeigt, das das CENP-B/GFP-Fusionsprotein an die Chromosomen/Minichromosomen gebunden hat (3.23b). In Abbildung 3.23c wurden die Abbildungen a und b übereinander gelegt.

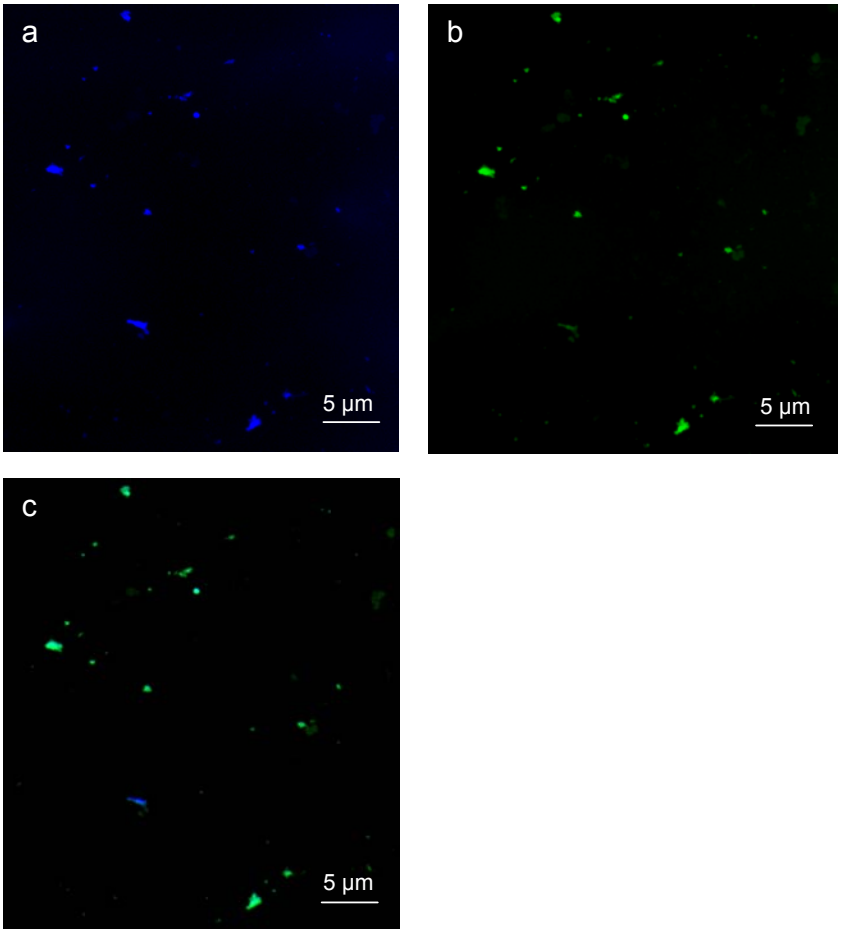


Abbildung 3.23: Visualisierung fixierter Chromosomen/Minichromosomen. Die Chromosomen/Minichromosomen wurden in der Metaphase aus HTLAGBG B5-4-Zellen extrahiert, mit DAPI gegengefärbt und an auf Oberflächen von Objektträgern (2-Chamber-Slides) fixierte GFP-Antikörper gebunden. Das blaue Fluoreszenzsignal (a) zeigt mit DAPI angefärbte Chromosomen, das grüne Fluoreszenzsignal (b) wird vom EGFP-Signal emittiert und zeigt, das das CENP-B/GFP-Fusionsprotein an die Chromosomen/Minichromosomen gebunden hat. In Abbildung c wurden die Abbildungen a und b übereinander gelegt.

3.7.2.1 Transfer von GFP-markierten Chromosomen/Minichromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen

Um zu testen, ob Chromosomen/Minichromosomen, welche auf Oberflächen von Objektträgern adherieren von darauf ausgesäten Zellen aufgenomen werden, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Sich in der Metaphase befindende Chromosomen/Minichromosomen wurden aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahiert (siehe 2.14.1 Extraktion von Chromosomen in der Metaphase), in 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert (siehe 2.14.2 „Immunosurfaction“) und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzbilder (Abb. 3.24) zeigen anhand der sich in den Zellen befindenden grünen EGFP-Signale, dass Chromosomen/Minichromosomen in die 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert wurden (b). Um zu testen, ob sich die Chromosomen/Minichromosomen tatsächlich in den Zellen, und nicht unterhalb der Zellen auf dem Objektträger befinden ohne in die Zellen internalisiert worden zu sein, wurden die Zellen nach der „Immunosurfaction“ von den Objektträgern abgelöst, auf neue Objektträger ausgesät und erneut fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abbildung 3.24c zeigt dass sich die Chromosomen/Minichromosomen innerhalb der 16HBE14o$^-$ -Zellen befinden. Die Internalisierung der Chromosomen/Minichromosomen in die Zellen wurde zusätzlich durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dabei wurden im Abstand von 500 nm horizontale Schnitte von Zellen angefertigt. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass Chromosomen/Minichromosomen mittels „Immunosurafction“ in Zellen transfiziert werden können (Abb.3.25).

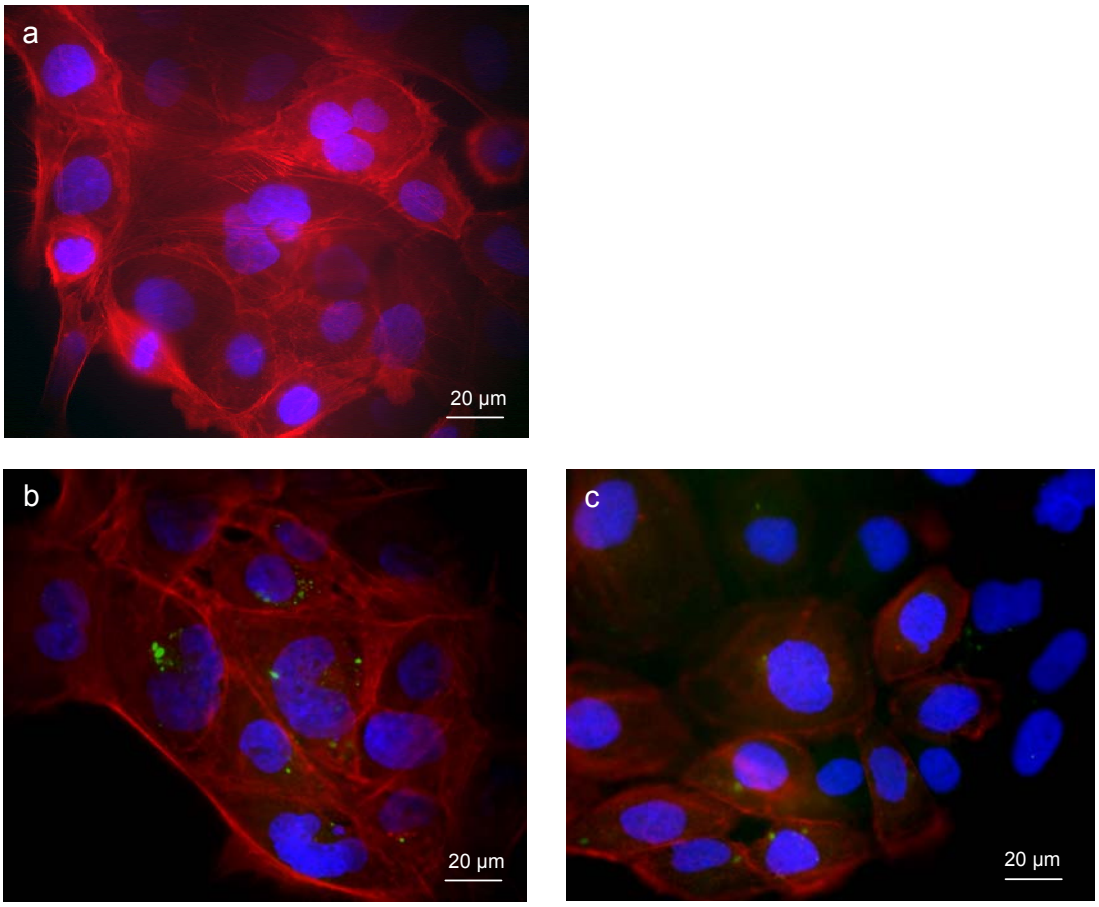


Abbildung 3.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$- Zellen nach Durchführung der „Immunosurfaction“. Aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen wurden über an Objektträger (2-Chamber-Slides) gebundene GFP-Antikörper fixiert. Im Anschluss wurden 16HBE14o$^-$ -Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und das Zytoskelett der Zellen wurde mit Alexa 568 Phalloidin gegengefärbt.
16HBE14o$^-$ -Zellen unbehandelt (a), 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert mit aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen/Minichromosomen mittels „Immunosurfaction“ (b), 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert mit aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen/Minichromosomen mittels „Immunosurfaction“ und anschließender Ablösung und Neuaussäung in Chamber-Slides (c). Die grünen Signale stellen die EGFP-markierten Zentromere der transfizierten Chromosomen/Minichromosomen dar.

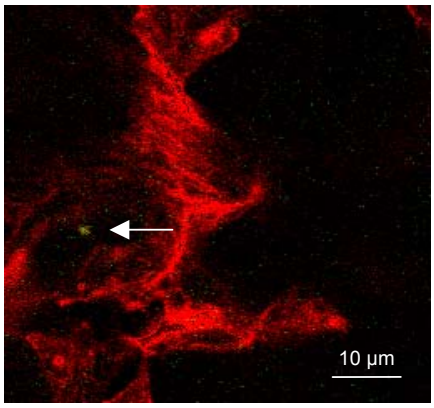


Abbildung 3.25: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Untersuchung der Aufnahme der Chromosomen/Minichromosomen in die Zellen. Aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen wurden über an Objektträger (2-Chamber-Slides) gebundene GFP-Antikörper fixiert. Im Anschluss wurden 16HBE14o$^-$ -Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und das Zytoskelett der Zellen wurde mit Alexa 568 Phalloidin gegengefärbt. Pfeil: Chromosom/Minichromosom.

3.7.2.2 PEI-vermittelter Transfer von GFP-markierten Chromosomen/Minichromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen

Wie in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, werden an Oberflächen adherierende Chromosomen von darauf wachsenden Zellen aufgenommen. In folgendem Experiment wurden extrahierte Chromosomen/Minichromosomen ebenfalls über an die Oberfläche von Objektträgern fixierte GFP-Antikörper gebunden. Anschließend wurde PEI zugegeben und die zu transfizierenden Zellen auf die über Antikörper an die Oberfläche der Objektträger gebundenen Chromosomen/Minichromosomen ausgesät (Abb. 3.22). PEI eignet sich wegen seiner Eigenschaften hervorragend für den Transfer genetischen Materials in verschiedenste Zelllinien. Aufgrund seiner hohen Pufferkapazität wirkt PEI als „Protonenschwamm“ und führt zum osmotischen Anschwellen und schließlich zum Platzen des Endolysosoms und damit zur Freisetzung des genetischen Materials in das Zytoplasma (siehe 1.3 Nicht-virale Genvektoren) (Boussif *et al*., 1995). Die nach der „Immunosurfaction“ erstellten Fluoreszenzbilder (Abb. 3.26) zeigen, dass sich die transfizierten Chromosomen/Minichromosomen nicht nur innerhalb der 16HBE14o$^-$ -Zellen, sondern vereinzelt auch innerhalb der Zellkerne befinden (b).

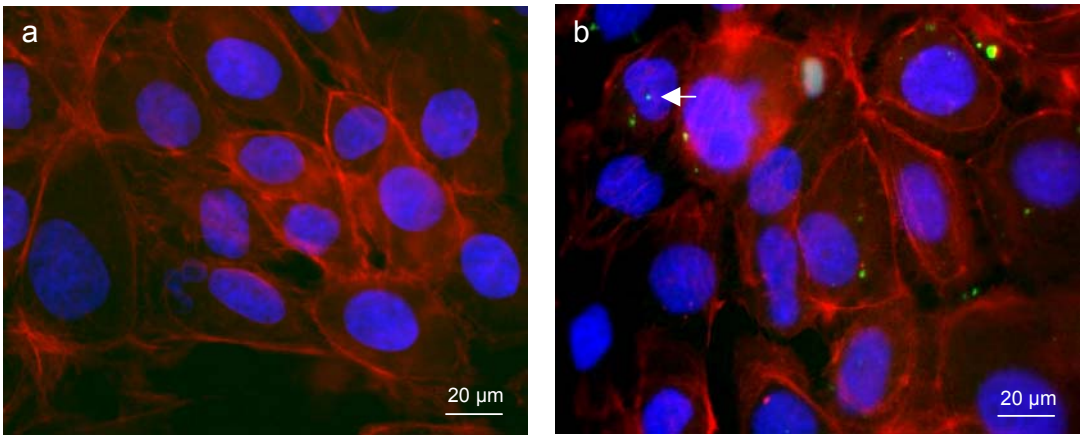


Abbildung 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$- Zellen nach Durchführung der „Immunosurfaction“. Aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen wurden über an Objektträger (2-Chamber-Slides) gebundene GFP-Antikörper fixiert. Im Anschluss wurde PEI zugegeben und 16HBE14o$^-$ -Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und das Zytoskelett der Zellen wurde mit Alexa 568 Phalloidin gegengefärbt.
16HBE14o$^-$ -Zellen unbehandelt (a), 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert mit aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen/Minichromosomen mittels „Immunosurfaction“ mit Zugabe von PEI (b). Die grünen Signale stellen die EGFP-markierten Zentromere der transfizierten Chromosomen/Minichromosomen dar. Pfeil: Chromosom/Minichromosom innerhalb des Zellkerns.

3.7.2.3 (ManAc-PEG)3-PEI-vermittelter Transfer von GFP-markierten Chromosomen/Minichromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen

Die Durchführung der „Immunosurfaction“ mit Zugabe von PEI (siehe 3.7.1.2 „Immunosurfaction“ mit PEI) zeigte, dass die transfizierten Chromosomen/Minichromosomen nicht nur im Zytoplasma der 16HBE14o$^-$ -Zellen, sondern auch innerhalb des Zellkerns visualisiert werden konnten. Die Aufnahme von PEI findet allerdings unspezifisch statt. Durch die Verwendung von mit Liganden modifziertem PEI können gezielt Zellen angesteuert und transfiziert werden. Um zu analysieren ob die in vorliegender Arbeit untersuchten ManAc-funktionalisierten PEI-Konjugate sich für die „Immunosurfaction“ eignen, wurden erneut aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen /Minichromosomen über an die Oberfläche von Objektträgern fixierte GFP-Antikörper gebunden. Anschließend wurde (ManAc-PEG)3-PEI zugegeben und die zu

transfizierenden 16HBE14o$^-$ -Zellen auf die über Antikörper an die Oberfläche der Objektträger gebundenen Chromosomen/Minichromosomen ausgesät. Abbildung 3.27 zeigt dass Chromosomen/Minichromosomen mittels der „Immunosurafction“ mit (ManAc-PEG)3-PEI ebenfalls in die Zellen transfiziert werden konnten. Die transfizierten Chromosomen/Minichromosomen befinden sich im Zytoplasma und im Zellkern der Zellen (b).

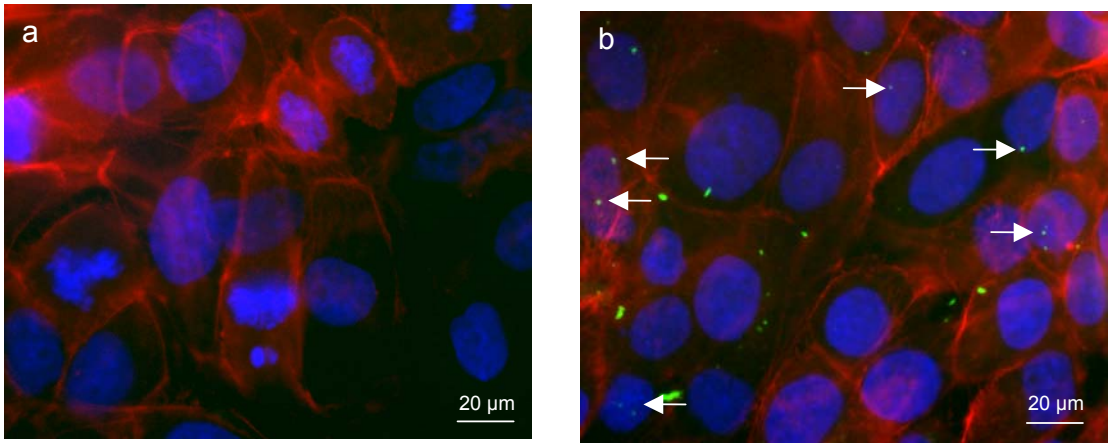


Abbildung 3.27: Fluoreszenmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$-Zellen nach Durchführung der „Immunosurfaction“. Aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen wurden über an Objektträger (2-Chamber-Slides) gebundene GFP-Antikörper fixiert. Im Anschluss wurde PEI zugegeben und 16HBE14o$^-$ -Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und das Zytoskelett der Zellen wurde mit Alexa 568 Phalloidin gegengefärbt.
16HBE14o$^-$ -Zellen unbehandelt (a), 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert mit aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierten Chromosomen/Minichromosomen mittels „Immunosurfaction“ mit Zugabe von (ManAc-PEG)3-PEI (b). Die grünen Signale stellen die EGFP-markierten Zentromere der transfizierten Chromosomen/Mini-chromosomen dar. Pfeile: Chromosom/Minichromosom innerhalb der Zellkerne.

3.7.3 „Immunosurfaction“ von aus 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen extrahierten Chromosomen in 16HBE14o$^-$-Zellen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass mittels „Immunsurfaction“ aus HTLAGBG-B5-4-Zellen extrahierte Chromosomen in 16HBE14o$^-$ -Zellen transfiziert werden konnten. Der Nachteil bei Verwendung der HTLAGBG-B5-4-Zellen jedoch ist, dass zwischen den ursprünglichen Chromosomen dieser Zelllinie und den Minichromosomen nicht unterschieden werden kann, da das GFP-CENP-B-Fusionsprotein an das Zentromer aller Chromosomen bindet. Aus diesem Grund wurden für die nächsten „Immunosurfaction“-Experimente 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen, eine „African Green Monkey“-Zellinie, verwendet. Auch diese Zelllinie wurde permanent transifziert mit dem humanen Minichromosom 1aA1 und einem Plasmid das für ein Fusionsprotein kodiert. Das Fusionsprotein in dieser Zelllinie setzt sich wiederum aus dem CENP-B-Protein, das an Zentromere humaner Chromosomen bindet, und diesmal jedoch aus einem FLAG-Protein zusammen. Das FLAG-CENP-B-Protein bindet in den1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen im Gegensatz zu den HTLAGBG-B5-4-Zellen nur an das Zentromer der Minichromosomen. Da in das Minichromosom 1aA1 nachträglich die Sequenz für GFP kloniert wurde, können alle Zellen die das Minichromosom tragen unter dem Fluoreszenzmikroskop als grüne Zellen visualisiert werden (Abb. 3.28).

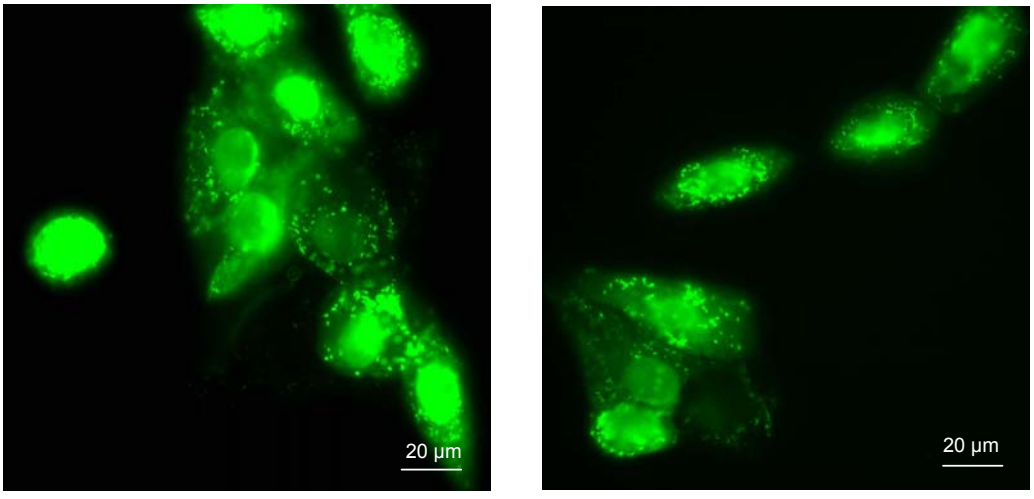


Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen. Die Zellen wurden ausgesät, für 24 h inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikorskop betrachtet.

Bei der Durchführung der „Immunosurfaction“ wurden erneut in einem ersten Schritt Antikörper, in diesem Fall FLAG-Antikörper, an die Oberfläche von Objektträgern

gebunden, extrahierte Chromosomen über das FLAG-CENP-B-Fusionsprotein an die Antikörper gebunden, PEI zugegeben und dann die zu transfizierenden 16HBE14o$^-$ -Zellen darauf ausgesät (Abb.3.29).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten 16HBE14o$^-$ -Zellen (Abb. 3.30) zeigen einige grün fluoreszierende Zellen, d.h. dass Minichromosomen durch „Immunosurfaction“ in die Zellen transfiziert wurden.

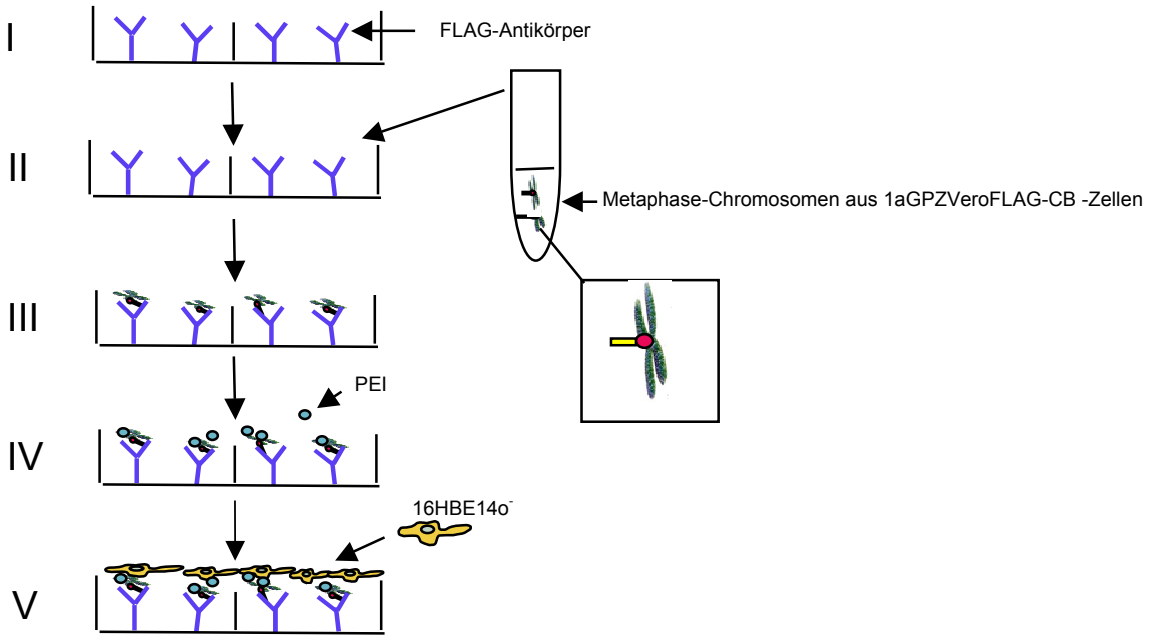


Abbildung 3.29: Darstellung der einzelnen Schritte der „Immunosurfaction“. In einem ersten Schritt werden Antikörper an die Oberfläche von Objektträgern gebunden. Nach mehrmaligem Waschen werden extrahierte Chromosomen bzw. Minichromosomen zu den gebundenen Antikörpern gegeben. Die Chromosomen binden über ein Cenp-B/FLAG-Fusionsprotein an die fixierten Antikörper. Nach weiteren Waschschritten wird PEI zugegeben und dann die zu transfizierenden Zellen darauf ausgesät.

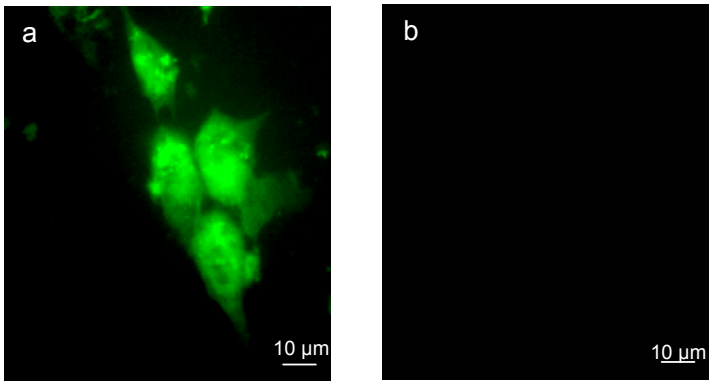


Abbildung 3.30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o$^-$- Zellen nach Durchführung der „Immunosurfaction“. Aus 1aGPZVeroFLAG-CB-Zellen extrahierte Chromosomen wurden über an Objektträger (2-Chamber-Slides) gebundene FLAG-Antikörper fixiert. Nach Zugabe von PEI zu den gebundenen Chromosomen wurden 16HBE14o$^-$ -Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert (a); 16HBE14o$^-$ -Zellen, Negativ-Kontrolle (b).

4. Diskussion

4.1 Verwendung von Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer

4.1.1 ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate vermitteln unter den Uronsäure-funktionalisierten-PEI- und PEI-PEG-Konjugaten die höchsten Gentransfereffizienzen

Durch Rezeptor-vermittelten Gentransfer wird eine spezifische Aufnahme der DNS in die Zelle über Liganden vermittelt (Wu and Wu, 1987). Der erfolgreiche Transfer von Genvektorkomplexen mittels Zucker-Liganden wie Galaktose, Laktose oder Mannose wurde bereits beschrieben (Bettinger *et al*., 1999; Grosse *et al.* 2004; Diebold *et al.,* 1999). In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden ob die Uronsäuren Galakturonsäure und Mannuronsäure bzw. die der Galakuronsäure strukturell ähnliche Laktobionsäure sich ebenfalls als Liganden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer eignen.

Zunächst wurden die Uronsäure-funktionalisierten-PEI- und PEI-PEG-Konjugate physikochemisch charakterisiert und analysiert. Die Bestimmung der Anzahl der GalAc-, LacAc- und ManAc-Liganden pro PEI- bzw. PEI-PEG-Molekül zeigte, dass an die PEI bzw. PEI-PEG-Moleküle 9 bis 11 LacAc-Liganden gekoppelt sind. Dies liegt im Bereich des theoretisch möglichen Modifizierungsgrades. Im Gegensatz dazu weisen die ManAc- und GalAc-Polymere bei gleichen Synthesebedingungen weniger Liganden auf (3 bis 5 ManAc-Gruppen bzw. 5 bis 7 GalAc-Gruppen pro PEI/PEI-PEG). Die reduzierte Anzahl an ManAc- und GalAc-Liganden ist vermutlich auf eine sterische Hinderung zurückzuführen. Die Carboxyl-Gruppe der LacAc sitzt im Gegnsatz zu den Carboxyl-Gruppen der ManAc und GalAc an der Seitenkette mit einer relativ großen Distanz zum Zuckerring und kann dadurch vermutlich schneller mit den PEI- bzw. PEI-PEG-Molekülen reagieren.

Mittels DLS wurde der hydrodynamische Durchmesser der Uronsäure-funktionalisierten-PEI- und PEI-PEG-Konjugate bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Durchmesser der Uronsäure-Konjugate auf PEI-Basis trotz steigender Molmassen in etwa die gleiche Größe besitzen wie unmodifiziertes PEI. Eine Erklärung hierfür kann eine Konformationsänderung von PEI nach dessen Modifikation mit den Liganden sein. Ähnliches wurde von Park und Choi (1996) beschrieben die feststellten, dass selbst unmodifiziertes B-PEI mit zunehmender Molmasse zunehmend kompakter wird. Die Kopplung von PEG an PEI führt wie erwartet zu einer Zunahme des hydrodynamischen

Durchmessers. Während GalAc- bzw. LacAc-Modifikationen von PEI-PEG [(GalAc(5)-PEI-PEG; LacAc(9)-PEI-PEG)] in einer Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers resultieren, weisen durch ManAc modifizierte PEI-PEG-Konjugate (ManAc(4)-PEI-PEG) geringere Durchmesser auf. Eine Erklärung hierfür könnte sich aus den unterschiedlichen Orientierungen der OH-Gruppen innerhalb des Zuckerrings ergeben. Polymere, bei denen die Liganden über eine PEG-Seitenkette an PEI gebunden sind [(GalAc-PEG)5-PEI-PEG; (LacAc-PEG)10-PEI-PEG; (ManAc-PEG)3-PEI-PEG)] sind kleiner als die Konjugate, bei denen GalAc bzw. LacAc direkt an PEI gekoppelt wurden, wahrscheinlich aufgrund der Flexibilität der PEG-Seitenketten.

Die Molmassencharakterisierungen zeigen, dass die molekularen Massen der auf PEI basierenden Konjugate mit steigender Anzahl an Liganden zunehmen. Die SEC-Elugramme der Konjugate weisen mit zunehmendem Umsetzungsgrad eine höhere Polydispersität auf. Dies zeigt sich besonders bei auf PEI-PEG basierenden Konjugaten. Durch eine uneinheitliche Kopplung von PEI mit PEG wurden Mischungen aus unmodifiziertem PEI und PEI-PEG mit uneinheitlicher chemischer Zusammensetzung erhalten und somit stieg die Inhomogenität von PEI-PEG gegenüber PEI. In der weiteren Modifikation mit den Uronsäuren reagieren die Liganden bevorzugt mit den Polymeren höherer molekularer Massen und die Polydispersitäten steigen stark an. Dies ist z. T. zu sehen an der Bildung einer Schulter im hochmolekularen Molmassenbereich des SEC-Elugramms. Die Molmassen und die Polydispersität nehmen wie erwartet mit zunehmendem Umsetzungsgrad zu. Ferner weisen hoch-substituierte Konjugate in wässriger Lösung eine zunehmend kompaktere Struktur auf.

Um die Gentransfereffizienzen der Uronsäure-funktionalisierten-PEI- und PEI-PEG-Konjugate und deren Anwendungsmöglichkeit für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer zu analysieren wurden die Konjugate in verschiedene Zelllinien transfiziert. Die im Vergleich zu PEI 100-fach niedrigeren Gentransfereffizienzen der GalAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in allen getesteten Zellinien deuten darauf hin, dass eine Kopplung von PEI bzw. PEI-PEG an GalAc in unmittelbarer Nähe des Zuckerringes zu einer Hemmung der Rezeptor-Liganden-Bindung führt.

Aus diesem Grund wurden LacAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate synthetisiert und deren Gentransfereffizienzen bestimmt. Der Zuckerring der LacAc ist dem der GalAc strukturell ähnlich, da die OH-Gruppen beider Säuren innerhalb des Ringes an gleicher Position stehen. Zusätzlich zur GalAc besitzt die LacAc jedoch eine Glukonsäure in offenkettiger Form an die PEI bzw. PEI-PEG im Abstand von 4 C-Atomen

gekoppelt werden konnte. Somit sollte einer eventuellen Inhibierung der Rezeptor-Liganden-Bindung vorgebeugt werden. Nachdem aber die ermittelten Gentransfereffizienzen der LacAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate ähnlich wie die der GalAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in allen getesteten Zelllinien im Vergleich zu PEI besonders bei niedrigen N/P-Verhältnissen 100-fach geringer lagen stellte sich die Frage, ob der Grad an Lactobionsäure-Modifikation (9 LacAc-Liganden pro PEI-Molekül) zu gering war für die Aufnahme der Komplexe mittels Rezeptor-vermittelten Gentransfer. Aus diesem Grund wurden zusätzlich LacAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate mit 20 LacAc-Liganden pro PEI-Molekül synthetisiert. Die Transfereffizienzen der Konjugate mit 20 LacAc-Liganden lagen jedoch im Bereich der Konjugate mit 9 LacAc-Liganden oder darunter. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit GalAc- bzw. LacAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten deuten darauf hin, dass weder GalAc noch LacAc geeignete Liganden für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer darstellen. Es hat sogar den Anschein, dass die Modifikation von PEI bzw. PEI-PEG mit GalAc bzw. LacAc zu inhibitorischen Interaktionen der Genvektorkomplexe mit der Zelloberfläche führen und dadurch die Genexpression im Vergleich zu PEI deutlich vermindert ist.

Dagegen vermitteln ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate signifikant höhere Gentransfereffizienzen als GalAc- bzw. LacAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate und PEI, besonders bei niedrigen N/P-Verhältnissen. Die konstanten Gentransfereffizienzen der ManAc-Konjugate über den gesamten N/P-Bereich sprechen für einen von der Internalisierung von PEI/pDNS-Komplexen differierenden Aufnahmemechanismus der ManAc-Konjugat/Komplexe. Während die Aufnahme von PEI und der GalAc- bzw. LacAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate, wie für kationische Polymere üblich (Erbacher *et al*., 1999), von der Ladung der Polyplexe abhängig ist, findet die Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate scheinbar unabhängig von unspezifischen Interaktionen der ManAc-Konjugat/Komplexe mit der Zell-Oberfläche statt. Die Internalisierung der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate erfolgt anscheinend über für ManAc spezifische Rezeptoren. Die niedrigen Transfektionsergebnisse der ManAc-Vektoren an die zusätzliche PEG-Seitenketten gekoppelt wurden [ManAc(4)-PEI-PEG bzw. (ManAc-PEG)3-PEI-PEG], sind vermutlich auf die kompakte Struktur der Polymere und eine Abschirmung der ManAc durch die PEG-Seitenketten zurückzuführen, die eine Wechselwirkung der Liganden mit den Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen verhindern.

Die ManAc zur Herstellung der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurde durch selektive Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid selbst synthetisiert, während GalAc bzw. LacAc bezogen wurden. Um zu testen ob Unterschiede in der chemischen Synthese für die hohen Gentransfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate verantwortlich sind, wurde GalAc ebenfalls durch Oxidation von Methyl-α-D-Galactopyranosid synthetisiert und anschließend an PEI bzw. PEI-PEG gekoppelt. Die GalAc-ox-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate sind mit den zuvor getesteten GalAc-Konjugaten identisch, sie unterscheiden sich nur in der Art der Herstellung der GalAc. Die guten Transfektionsergebnisse der ManAc-Konjugate konnten von den neu synthetisierten GalAc-Konjugate nicht erreicht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass nicht die Art der Herstellung ausschlaggebend für die hohen Gentransfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate ist, sondern dass die Aufnahme dieser Konjugate in die Zellen über ManAc-Liganden erfolgt. ManAc und GalAc unterscheiden sich in der Stellung zweier OH-Gruppen, an Position 2 und Position 4, des Zucker-Rings. Dieser geringe Unterschied nimmt offenbar entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz, denn für Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen ist die Konstitution des signalübertragenden Moleküls von entscheidender Bedeutung (Varga *et al*., 2000). GalAc und LacAc vermitteln vermutlich durch die gleiche Struktur ihrer Zuckerringe ähnliche Gentransfereffizienzen. LacAc kann strukturell gesehen als GalAc betrachtet werden, an die über eine glykosidische Bindung Glukonsäure gekoppelt wurde.

4.1.2 Die Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate erfolgt mittels ManAc-spezifische Rezeptoren

Weiteren Aufschluss über die Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in die Zelle ergibt die Analyse der Oberflächenladungen (Zeta-Potentiale) der ManAc(4)-PEI-pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI-pDNS-Komplexe. PEI-vermittelter Gentransfer ist in hohem Maße von der Ladung der Polyplexe abhängig. Nur positiv geladenen Genvektor-Komplexen ist es möglich mit den negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen in Wechselwirkung zu treten um somit effizienten Gentransfer vermitteln zu können (Godbey *et al.,* 1999). ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate zeigen im Vergleich zu PEI besonders bei niedrigen N/P-Verhältnissen hohe Transfereffizienzen. Die Messungen des Zeta-Potential der ManAc(4)-PEI-pDNS- und (ManAc-PEG)3-PEI-pDNS-Komplexe lassen

erkennen, dass die Komplexe bis zu einem N/P-Verhältnis von etwa 3 negativ geladen sind, d.h. die DNS nicht vollständig komplexiert ist. Da negativ geladene Polykation/pDNS-Komplexe schwer an die negativ geladene Zelloberfläche binden können, sollten die Gentransfereffizienzen im niedrigen Bereich liegen. Dies konnte im Fall der PEI- und PEI-PEG/pDNS-Komplexe festgestellt werden. Die hohen Gentransfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate bei niedrigen N/P-Verhältnissen jedoch zeigen, dass die Aufnahme dieser Konjugate Ladungs-unabhängig, vermutlich über Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen, erfolgt.

Die These der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wird weiter gestützt durch Untersuchungen der Gentransfereffizienzen methylierter ManAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate. Die Synthese der ManAc erfolgte durch selektive Oxidation von Methyl-α-D-Mannopyranosid. Bei der Methyl-Gruppe handelt es sich um eine so genannte glykosidische Schutzgruppe die verhindert, dass ManAc in wässriger Lösung in offenkettiger Form vorliegt. Anschließend an die Synthese und vor der Kopplung von PEI bzw. PEI-PEG an die ManAc musste die glykosidische Schutzgruppe abgespalten werden da sich zeigte, dass methylierte ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate nur geringe Gentransferraten erzielen. Die kleinste Abweichung der Struktur des ManAc-Liganden führt also offensichtlich dazu, dass die ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugat/Komplexe nicht mehr Rezeptor-vermittelt aufgenommen werden können. Dies deutet auf eine hohe Spezifität des Rezeptors hin.

Zur weiteren Analyse des Aufnahme-Mechanismus der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate wurde vor Durchführung der Transfektionen ein Überschuß an ManAc zu den Zellen gegeben. Der Grund hierfür war durch eine Blockierung der vermutlich für die Aufnahme verantwortlichen Rezeptoren und eine daraus resultierende verminderten Transfereffizienz zu demonstrieren, dass die ManAc-Konjugate Rezeptor-vermittelt in die Zellen aufgenommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate im Gegensatz zu den Transfereffizienzen der kationischen Ausgangspolymere PEI und PEI-PEG nach Zugabe von ManAc vor der Transfektion an allen getesteten Zellen signifikant abnimmt. Durch die Blockierung der Rezeptoren mit niedermolekularer ManAc konnten die ManAc-Vektoren scheinbar nicht Rezeptor-vermittelt endozytiert werden.

Ein weiterer Beweis für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate konnte anhand Fluoreszenz-markierter Dextran-Konjugate

erbracht werden. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass ManAc-modifizierte Dextran-Konjugate über Endosomen in die Zellen internalisiert werden. Die Konjugate konnten in kleinen Vesikeln, den Endosomen, die sich zum Teil an der Zellkernmembran befinden, detektiert werden. Ähnliches konnte von Park *et al*. (2003) beobachtet werden, die nach Transfektion von Gal-(Chitosan-PEG) in HepG2-Zellen kleine fluoreszierende Vesikel mittels Fluoreszenzmikroskopie in den Zellen detektieren konnten. Die Gal-Konjugate wurden mittels sich auf den HepG2-Zellen befindenden Gal-Rezeptoren in die Zellen aufgenommen. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation der Zellen mit einem Überschuss an freier ManAc die Fluoreszenzintensität in den Zellen nahezu gleich null sinkt da die niedermolekularen ManAc-Moleküle die Rezeptoren auf den Zellmembranen besetzen. Somit können die ManAc-modifizierten Dextran-Konjugate nicht Rezeptor-vermittelt endozytiert werden. Im Gegensatz dazu hemmt eine Inkubation mit einem Überschuss an Mannose die Aufnahme der ManAc-modifizierten Dextran-Konjugate in die Zellen nicht. Dies deutet erneut auf eine hohe Spezifität des Rezeptors für ManAc hin.

Die durch Fluoreszenzmikroskopie erzielten Ergebnisse konnten mittels Durchflußzytometrie bestätigt werden. Hierbei wurden ebenfalls fluoreszenzmarkierte ManAc-modifizierte Dextran-Konjugate mit und ohne vorherige Zugabe von ManAc bzw. Mannose in verschiedene Zelllinien transfiziert. Während die ManAc-Konjugate in Anwesenheit eines Überschusses an ManAc nicht in die Zellen internalisiert werden konnten, inhibierte ein Überschuss an Mannose die Aufnahme der Konjugate in die Zellen nicht. Diese Beobachtung führt erneut zu der Annahme der Existenz von ManAc-Rezeptoren auf den Zellen, die eine spezifische Aufnahme von Konjugaten, die ManAc als Liganden tragen, erlauben. Dabei scheint die Anwesenheit der ManAc-Rezeptoren nicht auf einen bestimmten Zelltyp reduziert zu sein. Die Untersuchungen an humanen Bronchialepithelzellen (16HBE14o$^-$), humanan Cervixkarzinomzellen (HeLa) und humanen Leberkarzinomzellen (HepG2), und die Aufnahme der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in diese Zelllinien deuten darauf hin, dass der für ManAc spezifische Rezeptor ubiqutär vorhanden ist. Mannuronsäure stellt einen Bestandteil von Alginat dar. Bei Alginat handelt es sich um ein Polysaccharid, das aus 1,4 verknüpfter α-L-Guluronsäure und β-D-Mannuronsäure besteht. Schleimbildende Stämme des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* sind umgeben von einer Alginat-Kapsel. Diese Kapsel stellt für die Bakterien eine Barriere gegen den Angriff antimikrobieller Substanzen dar (Baltimore, 1985). Das Vorhandensein von ManAc-Rezeptoren auf den Zellen könnte bei bakteriellen Infektionen eine Rolle spielen.

4.1.3 Verwendung von ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten für *in vivo*-Applikationen

Die Transfektions-Experimente demonstrierten, dass ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate in der Lage sind humane Bronchialepithelzellen effizient zu transfizieren. Eine Verwendung dieser Konjugate für den Transfer genetischen Materials in die Lunge ist aus diesem Grund nahe liegend. Ein Vorteil bei der Verwendung von Gen-Vektoren die Rezeptor-vermittelt in Bronchialepithelzellen aufgenommen werden können, ist die Vermeidung einer Phagozytose der Gen-Vektor-Komplexe durch Alveolarmakrophagen (Rudolph *et al*., 2005). Für den Gentransfer in die Lunge sind prinzipiell zwei verschiedene Applikationsmethoden denkbar. Die Gen-Vektor-Komplexe können direkt intratrachela via Intubation oder Bronchoskopie appliziert, oder vernebelt werden. Letztere Methode stellt eine für den Patienten schonende und weit verbreitete Applikationsmethode dar. Aus diesem Grund wurde zunächst diese Methode für den Gentransfer mittels ManAc-funktionalisierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate in die Mauslunge gewählt.

Um das für die *in vivo*-Versuche geeignete N/P-Verhältnis zu ermitteln wurde zuerst die Integrität der DNS nach Verneblung der Genvektorkomplexe analysiert. Hierfür wurde ein N/P-Verhältnis von 1,25 gewählt, da bei diesem N/P-Verhältnis humane Bronchialepithelzellen (16HBE14o$^-$) mittels der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate am effizientesten transfiziert werden konnten. Eine Verneblung der Komplexe die bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 generiert wurden, führte jedoch polymerunabhängig zu einer Fragmentierung der DNS. Weitere Analysen ergaben, dass in Komplexen die bei einem N/P-Verhältnis von 10 formuliert wurden die DNS intakt blieb. Der Grund für die Zerstörung der DNS bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 ist eine unzureichende Komplexierung der DNS, die somit nicht ausreichend geschützt, und den Kräften die bei der Verneblung auf die Komplexe einwirken, ausgesetzt ist. Für die nachfolgenden *in vivo*-Versuche musste aus diesem Grund ein N/P-Verhältnis von 10 gewählt werden, obwohl bei diesem N/P-Verhältnis die Transfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate *in vitro* geringer lagen als bei einem N/P-Verhältnis von 1,25.

Die Verneblung der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in die Lunge von Mäusen zeigte für die ManAc-Konjugate im Vergleich zu PEI signifikant geringere Gentransfereffizienzen. Dieses Ergebnis korreliert zu einem Gewissen Maß mit den Gentransfereffizienzen die *in vitro* ermittelt wurden. Die Gentransfereffizienzen der

ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate in Bronchialepithelzellen lagen im Vergleich zu PEI 2-8-fach niedriger. Für die Interpretation der Ergebnisse müssen jedoch ebenfalls die Größen der Komplexe, die vor der Verneblung gemessen wurden, herangezogen werden. Die Kopplung von PEG an PEI und die Modifikation von PEI bzw. PEI-PEG mit ManAc resultiert in einer Zunahme der Größe der Gen-Vektor-Komplexe (siehe 3.3 Analyse von Zeta-Potential und Größe der Komplexe) und bei hohen DNS-Konzentrationen, die für *in vivo*-Verneblungen von Gen-Vektoren erforderlich sind, zu Aggregationen der Komplexe von einer Größe bis zu 1 µm. Da die Größe der Komplexe einen entscheidenden Einfluss auf die Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo* nimmt (Rudolph, 2002) ist zu vermuten, dass aufgrund der hohen Komplexdurchmesser der ManAc-Vektoren nur geringe Genexpression in den Lungengeweben der Mäuse erzielt wurden. Rudolph *et al*. (2005) konnten zeigen, dass in PBS formulierte und aufgrund einer hohen DNS-Konzentration aggregierte PEI/pDNS-Komplexe bei einer Aerosol-Applikation in die Lunge von Mäusen geringe bzw. keine Gentransfereffizienzen vermitteln. Die Aggregation der ManAc-Vektoren bei hohen DNS-Konzentrationen zu festen, teilweise enorm großen Partikeln stellt demnach einen limitierenden Faktor für die *in vivo*-Verneblung der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate dar.

Um eine Aggregation der ManAc-Vektoren zu verhindern bzw. die Größe der Komplexe zu verringern, wurde für die nachfolgenden Experimente zusätzlich freies PEI-PEG und PEI bei der Formulierung der Komplexe beigemischt. Hierbei sollte PEI zur Kondensierung der DNS und PEI-PEG zu einer Verringerung der Größe und zur Abschirmung der positiven Ladung der Komplexe dienen. Ogris *et al*. (2001) zeigten, dass Tf-PEI-Konjugate erst nach Zugabe von unmodifizierten PEI in der Lage waren DNS effizient zu komplexieren. Die Zufügung von PEI-PEG bei der Komplexformulierung erhöht die Löslichkeit der Polyplexe und erlaubt eine Bildung der Komplexe bei hohen DNS-Konzentrationen ohne Aggregation (Ogris *et al*., 1999; Kichler *et al*., 2002). Ein weiterer Vorteil der Zugabe von zusätzlichem PEI-PEG stellt eine Vorbeugung nicht-spezifischer Interaktionen der Komplexe mit der physiologischen Umgebung bei *in vivo*-Applikationen, und eine daraus resultierende verlängerte Zirkulationszeit, die wiederum zu erhöhten Transfektionsraten führt, dar (Ogris *et al.,* 1999). Des Weiteren führt der Abschirmungseffekt, der durch PEI-PEG erreicht wird zu einer Reduktion der Toxizität, die gewöhnlich bei der Applikation von auf PEI basierenden Gen-Vektor-Komplexen *in vivo* beobachtet wird (Kircheis *et al.,* 1999). Kursa *et al.* (2003) konnten nach Formierung von Komplexen bei verschiedenen N/P-Verhältnissen die neben DNS und Tf-PEG-PEI auch PEI-PEG enthielten beobachten, dass mit steigendem Anteil an PEI-PEG die

Oberflächenladung und die Größe der Komplexe, aber auch die Transfereffizienz *in vitro* geringer wird. Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit untersucht bei welchem Anteil an PEI-PEG PEI/PEI-PEG/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe klein, deren Gentransfer jedoch effizient genug ist. Die Untersuchungen ergaben bei allen getesteten prozentualen Anteilen an PEI-PEG eine Verringerung des Zeta-Potentials und der Größen der PEI/PEI-PEG/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexe. Die anschließende Ermittlung der Gentransfereffizienzen der neu formulierten ManAc-funktionalisierten PEI-PEG-Konjugate zeigte, dass die höchsten Gentransfereffizienzen bei der Verwendung von PEI/PEI-PEG/(ManAc-PEG)3-PEI/pDNS-Komplexen mit einem prozentualen Anteil an PEI-PEG von 30 erzielt werden konnten. Aus diesem Grund wurden diese Komplexe für die darauf folgende *in vivo*-Applikation verwendet und in die Schwanzvene von Mäusen injiziert.

Nach Applikation der neu formulierten ManAc-funktionalisierten PEI-PEG-Konjugate konnte weder in der Lunge noch in einem anderen Organ der Mäuse Gen-Expression nachgewiesen werden. Neben einer Luziferase-Expression in den Lungen der Mäuse wäre aufgrund der hohen Gentransfereffizienzen der ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate die *in vitro* in HepG2-Zellen erzielt wurden auch eine Gen-Expression in der Leber denkbar gewesen. Vermutlich konnten die neu formulierten Komplexe aufgrund eines zu hohen Anteils an PEI-PEG und einer daraus resultierenden Abschirmung der ManAc-Liganden *in vivo* nicht bzw. in einem zu geringen Maße in die Zellen aufgenommen werden. Eine andere Erklärung könnte in einer Bindung von Proteinen oder anderen Bestandteilen des Blutes an die Liganden liegen, so dass diese nicht mehr von ihren Rezeptoren erkannt werden können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ManAc-funktionalisierte PEI-und PEI-PEG-Konjugate aufgrund eines für ManAc spezifischen ubiquitär existierenden Rezeptors ideale Kandidaten für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer in verschiedenste Zellen darstellen.

4.2 Mittels “Immunosurfaction” können Chromosomen effizient in Zellen transfiziert werden

Derzeit stehen für den Transfer von artifiziellen Chromosomen, wie Minichromosomen, nur sehr aufwendige Verfahren zur Verfügung. Der Mikrozell-vermittelte Chromosomen-Transfer der von Fournier und Ruddle (1977) entwickelt wurde, stellt eine komplizierte und langwierige Prozedur dar. Erst nach 3 – 4 Wochen kann analysiert werden, ob Chromosomen in die Akzeptor-Zellen transfiziert werden konnten. Aus diesem Grund sollte in vorliegender Arbeit ein Verfahren entwickelt werden durch das artifizielle Chromosomen, im speziellen Minichromosomen, vereinfacht, aber effizient in verschiedene Zellen transfiziert werden können. Bei der neu entwickelten „Immunosrufaction“ werden sich in der Metaphase befindende Chromsomen über AK an eine Oberfläche gebunden. Darauf werden die zu transfizierenden Zellen ausgesät. Die Chromosomen werden anschließend mit Hilfe von endozytotischen Vesikeln in die Zellen internalisiert. Im Anschluss daran können die transfizierten Zellen mittels Antibiotika selektiert werden.

Zunächst sollte die Funktionalität und Durchführbarkeit der „Immunosurfaction“ getestet werden. Dies erfolgte mittels aus humanen HTLAGBG-B5-4 extrahierten Chromosomen/Minichromosomen. Diese Zelllinie ist permanent transfiziert mit einem humanen Minichromosom und einem Plasmid das für ein GFP-CENP-B Fusionsprotein kodiert. Über das Fusionsprotein binden die Chromosomen/Minichromosomen an GFP-Antikörper die an eine Oberfläche fixiert worden sind. Diese Bindung konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Bronchialepithelzellen (16HBE14o$^-$) in die mit Hilfe der „Immunosurfaction“ Chromosomen/Minichromosomen transfiziert wurden, zeigen grüne Signale. Um sicher zu gehen dass die Signale, also die transfizierten Chromosomen/Minichromosomen sich innerhalb der Zellen befinden, wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und erneut ausgesät, bzw. mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Eine Internalisierung der Chromosomen/Minichromosomen in die Zellen konnte bestätigt werden. Bei Zugabe von PEI zu den gebundenen Chromosomen/Minichromosomen und einer anschließenden Transfektion konnten die von den Chromosomen/Minichromsomen ausgehenden Fluoreszenzsignale auch in den Zellkernen detektiert werden. Damit genetisches Material in den Zellkern transportiert werden kann, muss es zuerst aus den Endo- bzw. Lysosomen freigestzt werden. PEI ist aufgrund seiner hohen Pufferkapazität über ein breites pH-Spektrum hinweg (Tang and Szoka, 1997) in der Lage die endosomale Membran zu destabilisieren und induziert so eine Lyse der Endosomen

(Boussif *et al.,* 1995). Durch die Zugabe von PEI konnten die Chromosomen/Minichromosomen anscheinend von den Endosomen freigegeben, und in den Zellkern transportiert werden. Dies ist die Voraussetzung für die im Zellkern stattfindende Transkription der auf den artifiziellen Chromosomen liegenden Gene. Zwischen der Zentromer-Region und den Telomeren von Minichromosomen können Gene, die in Zellen eingeschleust werden sollen, verankert werden. Somit kann eine intakte Kopie des für eine Krankheit verantwortlichen, defekten Gens in erkrankte Körperzellen eingeschleust und im Zellkern transkribiert werden um anschließend im Zytoplasma translatiert werden zu können.

Zusätzlich zu PEI wurde in einem weiteren Experiment (ManAc-PEG)3-PEI zu den gebundenen Chromosomen/Minichromosomen gegeben und anschließend die zu transfizierenden Zellen darauf ausgesät. Auch in diesem Fall konnten Chromosomen/Minichromosomen in den mittels „Immunosurfaction“ behandelten Zellen im Zytoplasma und im Zellkern detektiert werden. Die über Endosomen in die Zellen aufgenommenen Chromosomen/Minichromosomen konnten durch die Eigenschaft von PEI eine massive Akkumulation von Protonen in den Endosomen, gefolgt von einem passiven Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser zu induzieren, in das Zytoplasma freigesetzt werden. Durch die Kopplung eines Liganden (ManAc) an PEI könnten *in vivo* gezielt Zellen angesteuert und transfiziert werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass extrahierte Chromosomen/Minichromosomen durch „Immunosurfaction“ in Bronchialepithelzellen transfiziert werden konnten, wurden weitere Versuch mit „African Green Monkey“-Zellen durchgeführt. Auch diese Zelllinie ist permanent transfiziert mit einem humanen Minichromosom und einem Fusionsprotein (FLAG-CENP-B). Da CENP-B nur an Zentromere humaner Chromosomen bindet, können die Minichromosomen von den Chromosomen der „African Green Monkey“-Zellen selektiert werden. Da in das Minichromosom eine Sequenz, die für GFP kodiert, kloniert wurde, können alle Zellen die das Minichromosom tragen unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Die Detektion grüner Zellen nach Durchführung der „Immunosurfaction“ zeigt, dass Minichromosomen in humane Bronchialzellen transfiziert werden konnten. Des Weiteren konnte somit gezeigt werden, dass GFP in den Zellen synthetisiert werden konnte, die Minichromsomen also in den Zellkern transportiert werden konnten.

Mit der „Immunosurfaction“ konnte eine Methode entwickelt werden, durch die Minichromosomen in andere Zellen transfiziert werden können. Der Vorteil dieser

Methode liegt in ihrer einfachen Durchführbarkeit ohne großen Zeitaufwand in Anspruch zu nehmen. Die Anwendung der „Immunosurfaction“ an 16HBE14o$^-$ -Zellen hat gezeigt, dass humane Bronchialepithelzellen transfiziert werden konnten. So können beispielsweise Minichromosomen die das therapeutische CFTR-Gen tragen zur Gentherapie der Mukoviszidose eingesetzt werden. Die Verwendung von Minichromsomen macht es möglich Mutagenese zu verhindern und stellt sicher, dass das Transgen über viele Generationen in den Zellen verfügbar ist.

5. Zusammenfassung

Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose können spezifisch Zellen angesteuert und die Aufnahme von Genvektorkomplexen gesteigert werden. Der Rezeptor-vermittelte Gentransfer von galaktosylierten, laktosylierten und mannosylierten PEI/pDNS-Komplexen erzielte vielversprechende Ergebnisse. Basierend darauf, sollten in vorliegender Arbeit die Gentransfereffizienzen Uronsäure-modifizierter PEI- und PEI-PEG-Konjugate, bei denen Galakturonsäure, Laktobionsäure und Mannuronsäure entweder direkt an PEI oder über PEG an PEI gekoppelt wurden, *in vitro* und *in vivo* ermittelt werden, und deren Aufnahme-Mechanismus in verschiedene Zelllinien analysiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate signifikant höhere Gentransfereffizienzen als die anderen Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate und unmodifiziertes PEI aufweisen. Durch konstante Gentransfereffizienzen der ManAc-Konjugate über den gesamten getesteten N/P-Bereich lag die Vermutung nahe, dass diese Konjugate auf einen von der Internalisierung von PEI bzw. der GalAc- und LacAc funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate differierenden Mechanismus in Zellen aufgenommen werden. Weitere Transfektions-Experimente mit methylierten ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugaten und mit Überschüssen an freier Mannuronsäure deuteten darauf hin, dass die ManAc-Konjugate Rezeptor-vermittelt aufgenommen werden. Diese Vermutung wurde durch Messungen des Zeta-Potentials und durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt und konnte durch Ergebnisse die mittels Durchflußzytometrie ermittelt wurden, weiter gestützt werden. Aufgrund einer erfolgreichen Transfektion von humanen Bronchialepithelzellen durch die ManAc-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate lag eine Anwendung dieser Konjugate für den Transfer genetischen Materials in die Lunge nahe. Die Ausbildung von Aggregaten nach Komplexierung der ManAc-Vektoren mit Plasmid-DNS stellte jedoch einen limitierenden Faktor für eine Aerosolisierung der Genvektor-Komplexe dar und führte daher zu niedrigen Transfereffizienzen *in vivo*. Aus diesem Grund sollten die ManAc-Vektor/pDNS-Komplexe durch Zugabe von freiem PEI-PEG und PEI neu formuliert werden um danach erneut *in vivo* appliziert zu werden. Nach Injektion der neu formulierten Komplexe in die Schwanzvene konnte jedoch in den Lungen der Mäuse aufgrund einer Abschirmung der Liganden durch PEI-PEG keine Gen-Expression nachgewiesen werden. Trotzdem stellen ManAc-funktionalisierte PEI- und PEI-PEG-Konjugate aufgrund eines sich auf verschiedenen Zellen befindenden für ManAc spezifischen Rezeptors ideale Kandidaten für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer dar.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte ein Verfahren erstellt werden, durch das artifizielle Chromosomen, im speziellen Minichromsomen, wirksam in Zellen transfiziert werden können. Derzeit stehen hierfür nur komplizierte und langwierige Methoden zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass aus Zellen extrahierte Chromosomen /Minichromosomen mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten „Immunosurfaction“ effizient in humane Bronchialepithelzellen transfiziert werden können.

6. Literatur

Abdallah B., Hassan A., Benoist C., Goula D., Behr J.P. and Demeneix B. 1996. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* **7:** 1947-1954.

Anderson W.F. 1992. Human gene therapy. *Scince* **256**(5058):808-813.

Ascenzioni F., Donini P. and Lipps H.J. 1997. Mammalian artificial chromosomes for somatic gene therapy. *Cancer Lett* **118**(2):135-142.

Auriche C., Donini P. and Ascenzioni F. 2001. Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome. *EMBO Reb* **2**(2):102-107.

Baltimore R.S. 1985. Prospects for a mucoid exopolysaccharide vaccine for the prevention of infection due to mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa. *Antibiot Chemother* **36:**147-56.

Behr J.P. 1996. The proton sponge, a means to enter cells viruses never thought of. *M/S-Med Sci* **12:**56-58.

Bettinger T., Remy J.S. and Erbacher P. 1999. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Biochonjug Chem* **10:**558-561.

Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P., Greenblatt J.J., Rosenberg S.A., Klein H., Berger M., Mullen C.A., Ramsey W.J., Muul L., Morgan R.A. and Anderson W.F. 1995. T lymphocyte-direct gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. **270:**475-480.

Bordignon C., Notarangelo L.D., Nobili N., Ferrari G., Casorati G., Panina P., Mazzolari E., Maggioni D., Rossi C., Servida P., Ugazio A.G. and Mavilio F.1995. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-imunodeficient patients. *Science*. **270:**470-475.

Boussif O., Lezoualch F., Zanta M. A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B. and Behr J.P. 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:** 7297-7301.

Boussif O,. Zanta M.A. and Behr J. P. 1996. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* **3:**1074-1080.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem* **72:**248-254.

Bremner K.H., Seymour L.W. and Pouton C.W. 2001 Harnessing nuclear localization pathways for transgene delivery. *Curr Opin Mol Ther* **3:**170-177.

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L. and Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288:**669-672.

Chang F.-H., Lee C.-H., Chen M.-T., Kuo C.-C. Chiang Y.-L., Hang C.-Y., and Roffler S. 2004. Surfection: a new platform for transfected cell arrays. *Nuc Ac Res* **32:**e33.

Check E. 2005. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* **422:**561.

Cherng J.Y, Van de Weterung P., Talsma H., Crommelin D.J.A. and Hennink W.E. 1996. Name. *Pharm Res* **13:**1038-1042.

Cristiano R.J. and Roth J.A. 1995. Molecular conjugates: a targeted gene delivery vector for molecular medicine. *J Mol Med* **73:**479-486.

Diebold S.S., Kursa M., Wagner E., Cotten M. and Zenke M. 1999. Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J Biol Chem* **274:**19087-19094.

Durrbach A., Louvard D. and Coudrier E. 1996. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* **109:**457-465.

Edelstein M.L., Abedi, M.R., Wixon J. and Edelstein R.M. 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* **6:**597-602.

El-Aneed A. 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Contr Release* **94**(1):1-14.

Erbacher P., Bettinger T., Belguise-Valladier P., Zou S., Coll J.L., Behr J.P. and Remy J.S. 1999. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med* **3:**210-22.

Farr C., Stevanovic M., Thomson E.J., Goodfellow P. and Cooke H. 1992. Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat Genet* **2**(4):275-282.

Fattal Fattal E., Youssef M., Couvreur P. and Andremont A. 1989. Treatment of experimental salmonellosis in mice with mpicillin-bound nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother* **33:**1540-1543.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M. and Danielsen M. 1987 Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNS-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:**7413-7417.

Felgner P.L. and Rhodes G.1991. Gene therapeutics. *Nature* **349:**351-352.

Fournier R.E.K. 1981. A general high-efficiency procedure for production of microcell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* **78:**6349-6353.

Fournier R.E.K. and Ruddle F.H. 1977. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster and human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **74:**319-323.

Godbey W.T., Wu K.K. and Mikos A.G. 1999. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. J Cont Rel **60:**149-160.

Goodfellow P.N., and Solomon E. 1982. In **McMichael A. and Fabre J.W. (Hrsg.).** Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. Academic Press. NY.

Goula D., Remy J.S., Erbacher P., Wasowicz M., Levi G., Abdallah B. and Demeneix BA. 1998. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Therapy* **5:**174-177.

Goula D., Benoist C. Mantero S., Merlo G., Levi G. and Demeneix B.A. 1998. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Therapy* **5:**1291-1295.

Grimm D. and Kleinschmidt J.A. 1999. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther* **10**(15):2445-2450.

Grosse S., Aron Y., Honore I., Thevenot G., Danel C., Roche A.C., Monsigny M. and Fajac I. 2004. Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes. *J Gene Medicine* **6:**345-356.

Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., Le Deist F., Wulffraat N., McIntyre E., Radford I., Villeval J.L., Fraser C.C., Cavazzana-Calvo M. and Fischer A. 2003a. A serious adverse event after successful gene theapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348:**255-256.

Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillin E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., McIntyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A. and Cavazzana-Calvo M. 2003b. LMO"-associated clonal T cell proliferaton in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302:**415-419.

Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K. and Willard H.F. 1997. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial chromosomes. *Nat Genet* **15**(4):345-355.

Huxley C. 1994. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. *Gene Ther* **1**(1):7-12.

Jiao, S., Williams P., Berg R.K., Hodgeman B.A., Liu L., Repetto G. And Wolff J.A. 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum Gene Ther* **3**(1):21-33.

Kabanov A.V., Astafyeva I.V., Chikindas M.L., Rosenblat G.F., Kiselev V.I., Severin E.S., Kabanov V.A. 1991. DNA interpolyelectrolyte complexes as a tool for efficient cell transformation. *Biopolymers* **37:**1437-1443.

Kabanov A.V. and Kabanov V.A. 1995. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconj Chem* **6:**7-20.

Kichler A. Erbacher P., Behr J.P. Non-Viral Vectors for Gene Therapy, In: Huang L., Hung M., Wagner E., San Diego, CA, USA: Academic press.

Kichler A., Chillion M., Leborgne C., Danos O. and Frisch B. 2002. Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-PEG conjugate. *J Control Release* **81:**379-88.

Kircheis R., Wightman L. and Wager E. 2001. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* **53:**341-358.

Kircheis, R., Chillin M., Leborgne C., Danos O. and Frisch B. 1999. Polycation-based DNS complexes for tumor targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* **1:**111-120.

Kneuer C., Sameti M., Haltner E.G., Schiestel T., Schirra H., Schmidt H. and Lehr C.M. 2000. A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem* **11:**926-932.

Kumar M., Behera A.K., Lockey R.F., Zhang J., Bhullar G., De La Cruz C.P., Chen L.C., Leong K.W., Huang S.K. and Mohapatra S.S. 2002. Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. *Hum Gene Ther* **13:**1415-1425.

Kursa M., Walker G.F., Roessler V., Ogris M., Roedl W., Kircheis R. and Wagner E. 2003. Novel shielded Transferrin-Polyethylene Glycol-Polyethylenimine/DNA Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer. *Bioconj Chem* **14:**222-231.

Leclercq F. Dubertret C., Pitard B., Scherman D. and Herscovici J. 2000. Synthesis of glycosylated polyethylenimine with reduced toxicity and high transfecting efficiency. *Bioorg Med Chem Lett* **10:**1233-1235.

Leventis R. and Silvius J.R. 1990. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochem Biophys* **1023:**124-132.

Linow, K.-J. and Philipp, B. 1968. Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse von Hochpolymeren durch Messung von Sedimentationsgeschwindigkeit und Viskositätszahl. Faserforschung und Textilforschung **19:**509.

Lipps H.J., Jenke A.C., Nehlsen K., Scinteie M.F., Stehle I.M. and Bode J. 2003. Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene* **304:**23-33.

Merdan T., Kunath K., Fischer D., Kopecek J and Kissel T. 2002. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res* **19:**140-146.

MeunierDurmort C., Grimal H. Sachs L. M. Demeneix B. A. Forest C. 1997.Adenovirus enhancement of polyethylenimine-mediated transfer of regulated genes in differentiated cells. *Gene Ther* **4:** 808-814.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31:**426-428.

Mislick K.A. and Baldeschwieler J.D. 1996. Evidence fort the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:**12349-12354.

Nguyen H.-K., Lemineux P., Vinogradov S.V., Gebhart C.L., Guerin N., Paradis G., Bronich T.K., Alakhov V.Y. and Kabanov A.V. 2000. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Therapy* **7:**126-38.

de Nooy, A. E. J. and Besemer, A. C. 1995. Selective oxidation of primary alcohols mediated by nitroxyl radical in aqueous solution – kinetics and mechanism. *Tetrahedron* **51:**8023-8032.

Ogris M., Steinlein P., Kursa M., Mechtler K., Kircheis R. and Wagner E. 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* **5:**1425-1433.

Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R. and Wagner E. 1999. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* **6:**595-605.

Ogris M., Steinlein P., Carotta S., Brunner S. And Wagner E. 2001. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS Pharm Sci* 3, E21.

Olbrich C., Bakowsky U., Lehr C.M., Muller R.H. and Kneuer C. 2001. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release* **77:**345-355.

Panno J. 2005. In: Gene Therapy – treating disease by repairing genes. Facts on file library. N.Y., USA.

Park, H. I. and Choi, E.-J. 1996. Characterization of branched polyethyleneimine by laser light scattering and viscosimtetry. *Polymer* **37:**313-319

Park I.K., Kim T.H., Kim S.I., Park Y.H., Kim W.J., Akaike T. and Cho C.S. 2003. Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosn-graft poly(ethylene glycol)/DNA complexes by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm* **257:**103-110.

Perales J.C., Ferkol T., Beegen H., Ratnoff O.D. and Hanson R.W. 1994. Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **91:**4086-4090.

Petersen H., Fechner P.M., Martin A.L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C.J., Fischer D., Davies M.C. and Kissel T. 2002. Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem* **13:**845-54.

Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M. and Batshaw M.L. 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80:**148-158.

Rosenberg, S.A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R.A., Meon R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L. and 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:**570-578.

Rosenecker, J., und Rudolph C. 2001. Somatische Gentherapie der Mukoviszidose – Aktueller Forschungsstand. *Monatsschr Kinderheilkd* **149:**270-280.

Rosenecker J. 2004. Neue Behandlungskonzepte durch Gentherapie. In: **Reinhardt, D. (Hrsg.)** Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Rosenfeld M.A., Yoshimura K., Trapnell B.C., Yoneyama K., Rosenthal E.R., Dalemans W., Fukayama M., Bargon J., Stier L.E., Stratford-Pericaudet M., Guggino W.B., Pavirani A., Lecocq J.P., and Crystal R.G. 1992. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* **68:**143-155.

Rudolph C. 2002. Dissertation. FU Berlin.

Rudolph C., Schillinger U., Plank C., Gessner A., Nicklaus P., Muller R. und Rosenecker J. 2002. Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta* **1573:**75-83.

Rudolph C., Palnk C., Lausier J., Schillinger U., Müller R.H. and Rosenecker J. 2003. Oligomers of the Arginine-rich Motif of the HIV-a TAT Protein Are Capable of Transferring Plasmid DNA into Cells. *J Biol Chem* **278:**11411-11418.

Rudolph C., Schillinger U., Ortiz A., Tabatt K., Plank C., Müller R.H. and Rosenecker J. 2004. Application of Novel Solid Lipid Nanoparticle (SLN)-Gene Vector Formulations Based on a Dimeric HIV-1 TAT-Peptide *in Vitro* and *in Vivo. Pharmaceutical Research* **21:**1662-1669.

Rudolph C., Schillinger U., Ortiz A., Plank C., Golas M.M., Sander B., Stark H., and Rosenecker J. 2005. Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. Molecular Therapy **12:**493-501

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

Scott, T. A. and Melvin, E. H. 1953. Determination of dextran with anthrone. *Anal Chem* **25:**1656-1661.

Sedlák, M. and Cölfen, H. 2001. Synthesis of double-hydrophilic block copolymers with hydrophobic moieties for the controlled crystallization of minerals. Macromol. *Chem Phys* **202:**587-597.

Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N. and Ernst LK. 1998. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands *in vivo*. *J Biol Chem* **273:**7928-7933.

Sone T., Iwano M., Kobayashi S., Ishihara T., Hori N., Takata H., Ushiki T., Uchiyama S. and Fukui K. 2002. Changes in Chromosomal Surface Sructure by Different Isolation Conditions. Arch. *Histol Cytol* **65:**445-455.

Stryer L. 1995. Die Koordination des Stoffwechsels. In: Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Surovoy A., Flechseler I., Gaunitz F., Papke M. and Jung G. 1998. Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol* **451:**457-460.

Tachibana R., Harashima H., Shinohara Y. and Kiwada H. 2001. Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev* **52:**219-226.

Tang M.X. and Szoka F.C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* **4:**823-832.

Ungaro F., De Rosa G., Miro A. and Quaglia F. 2003. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal 31* **1:**143-149.

Varga C.M., Wickham T.J. and Lauffenburger D.A. 2000. Rezeptor-Mediated Targeting of Gene Delivery Vectors: Insights from Molecular Mechanisms for Improved Vehicle Design. Biotechnol Bioeng **70:**593-605.

Volpers C. and Kochanek S. 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6:**152-163.

Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H. and Birnstiel M.L. 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. Proc Natl Acad Sci USA **87**(9):3410-3414.

Wagner E., Cotten M., Foisner R. und Birnstiel M.L. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci* USA **88:**4255-4259.

Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicke R., Kursa M. and Wagner E. 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* **3:**362-372.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams P., Chong W., Ascadi G., Jani A. and Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247:**1465-1468.

Wolff J.A., Williams P., Ascadi G., Jiao S., Jani A. and Chong W. 1991. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* **11:**474-485.

Wu G.Y. and Wu C.H. 1987. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* **262:**4429-4432.

Wu G.Y. and Wu C.H. 1988. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* **263:**14621-14624.

Zabner J., Seiler M., Walters R., Kotin R.M., Fulgeras W., Davidson B.L. and Chiorini J.A. 2000. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surface of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* **74:**3852-3858.

Zanta M.A., Boussif O., Adib A. and Behr J.P. 1997. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Biochonjug Chem* **10:**558-561.

Zimmermann U., Schulz J. and Pilwat G. 1973. Transcellular ion flow in Escherichia coli B and electrical sizing of bacterias. *Biophys J* **13:**1005-1013.

Anhang: Bezugsliste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

ATP	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
Coenzym A	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
D-Luziferin	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
DMEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Gentamicin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
MEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptamycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien und Reagenzien wurden, falls im Text nicht anders erwähnt, über Sigma-Aldrich, Schnelldorf bezogen.

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Sabine Isabella Weiss
Geburtsdatum	25.05.1974
Geburtsort	München

Schulausbildung

9/80 – 7/86	Grund- und Hauptschule in München und Weil / Landkreis Landsberg am Lech
9/86 – 7/90	Mädchenrealschule in Diessen / Ammersee mit Internat Abschluss Mittlere Reife
9/90 – 7/92	Fachoberschule I der Landeshauptstadt München für Wirtschaft, Verwaltung und Rechtspflege Abschluss Fachhochschulreife
9/94 – 7/96	Berufsoberschule für Hauswirtschaft und Sozialpflege München Abschluss Fachgebundene Hochschulreife Abiturnote: 1,8

Berufsausbildung

9/92 – 8/94	Ausbildung zur medizinisch-technischen Radiologieassistentin (MTRA) am Klinikum der Universität München, Großhadern

Studium

11/96 – 7/02	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilans-Universität München Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Humangenetik, Immunologie Diplomnote: 1,4
16.11.1998	Diplom-Vorprüfung
09/01-07/02	Diplomarbeit am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der LMU München
22.08.2002	Diplom-Hauptprüfung

Dissertation

seit 02/03	Dissertation im Forschungszentrum Kubus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Arbeitsgruppe Molekulare Pneumologie unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. J. Rosenecker (LMU München)

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München,

(Sabine Isabella Weiss)

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. med. Joseph Rosenecker danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen.

Dr. rer. nat. Carsten Rudolph danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Durch sein umfassendes Fachwissen und seine Anregungen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof Dr. med Dietrich Reinhardt danke ich für die große Unterstützung des Forschungszentrum Kubus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

Dr. rer nat. Nathalie Sieverling und Dipl. Ing. (FH) Maren Niclasen danke ich für die Synthesen der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-PEG-Konjugate sowie der fluoreszenzmarkierten Dextran-Konjugate, die Durchführung der analytischen Methoden zur Charakterisierung der Polymere und den regen wissenschaftlichen Austausch.

Bei Dr. med. vet. Ulrike Schillinger möchte ich mich für ihre Hilfe bei den *in vivo*-Versuchen bedanken.

Danken möchte ich auch der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. rer nat. Daniele Zink, die mir ihr konfokales Laser-Scanning-Mikroskop zur Verfügung gestellt hat.

Christof Maucksch danke ich für seine Hilfe bei den FACS-Analysen und den *in vivo*-Imaging-Versuchen und die zahlreichen lustigen Stunden im Labor und beim Kaffeetrinken.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. rer. biol. hum. Stephanie (Puddi) Huth für die zahlreichen größeren und kleineren Hilfen und die vielen unvergesslichen Erlebnisse im und außerhalb des Labors (z.B auf unserer „Dreiländerreise“) und deine Freundschaft.

Nicht zuletzt möchte ich auch allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pneumologie und Experimentelle Therapieforschung“ danken:

Sven Bullerjahn, Aurora Ortiz, Corinna Pauls, Wolfgang Schuster, Tina Meyer, Johannes Matschke, Petra Dames, Eugenia Lesina, Dr. rer nat Christa Schmidt und Markus Elfinger.