

**Molekulare Konjugate mit neuartiger
Zielfindungsstruktur zur Verbesserung des
Gentransfers**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes-Peter Geiger

aus München

2010

1. **Gutachter:** Priv. Doz. Dr. rer. nat. Carsten Rudolph
2. **Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Rainer H. Müller

Disputation am 3. September 2010

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer **PD Dr. Carsten Rudolph** sehr herzlich bedanken. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe im Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals in München diese Dissertation auf dem wohl interessantesten Forschungsgebiet, nämlich der Gentherapie anzufertigen. Seine große Begeisterung für meine wissenschaftliche Arbeit, das in mich gesetzte Vertrauen und die mir gewährten Freiheiten haben mir die Motivation und die Möglichkeit gegeben neue Ideen zu entwickeln und auch umzusetzen. Die vielen konstruktiven Diskussionen mit PD Dr. Carsten Rudolph haben dabei meine Arbeit entscheidend gelenkt. Auch die Möglichkeit an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen hat mich enorm bereichert und mir immer wieder neue wissenschaftliche Sichtweisen eröffnet. Danken möchte ich PD Dr. Carsten Rudolph auch für seine herzliche und freundschaftliche Art mit der er mich betreute.

Danken darf ich auch meinem Zweitgutachter **Prof. Dr. Rainer H. Müller** für die externe Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie in Berlin zu promovieren. Nicht zu vergessen die angenehmen Treffen auf dem EWPS in Berlin und in München.

Außerdem möchte ich mich bei **PD Dr. Joseph Rosenecker** für die gute Zusammenarbeit bedanken. Nicht zu vergessen die humorvollen Momente und gemeinsame Begeisterung für klassische Musik.

Auch bin ich **PD Dr. Christian Plank** und **Christian Koch** zu Dank verpflichtet, für die Hilfe und die Möglichkeit zur Durchführung der Peptidsynthesen insbesondere zu Beginn meiner Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei **Dr. Ulrich Rothbauer** und **Dr. Tina Romer** für die Unterstützung bei den konfokal-mikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Ebenso gilt mein Dank **PD Dr. Burkhard Luy** und **Grit Kummerlöwe** für die Erstellung und Auswertung der NMR-Spektroskopie.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei **Dr. Manish Kumar Aneja** bedanken, der mir geduldig die Kunst des Klonierens beibrachte und mir bei vielen wissenschaftlichen Fragestellungen mit Rat und Tat stets zur Seite stand. Nicht zu vergessen die wissenschaftlichen Kaffeepausen, die vielen lustigen Momente im Laboralltag und darüber hinaus. Danke für die freundschaftliche Zusammenarbeit!

Mein Dank gilt auch insbesondere meinen Kolleginnen und Kollegen **Corinna Pfeifer, Dr. Michael Kormann, Senta Üzgün, Dr. Nihal Yüksekdağ** und **Dr. Markus Elfinger** für die vielen konstruktiven Diskussionen und Anregungen und die tolle und lustige Zeit innerhalb und außerhalb der „Denkerzelle“. Auch meinen Kollegen, **Rabea Imker, Marta Illenyi, Elisabeth Hennen, Anne Himmel, Dr. Eugenia Lesina, Günther Hasenpusch, Dr. Christof Maucksch, Dr. Kai Michaelis, Alexander Bohla, Dr. Gabriella Nica,** und **Dr. Michaela Rössner** danke ich für die freundschaftliche und inspirierende Zusammenarbeit.

Auch den Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen im Kubus Forschungszentrum möchte ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Familie und meine Maus Julia für Ihre liebevolle Unterstützung und Motivation zu jeder Zeit!

Außerdem möchte all meinen Freunden für die alltäglichen Kleinigkeiten danken und schließlich Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Und nicht zuletzt möchte ich selbstverständlich auch allen fleißigen Korrekturlesern danken.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 1.1 | Gentherapie – Von der Theorie zur klinische Anwendungen | 1 |
| 1.2 | Nukleinsäuren in der Gentherapie | 5 |
| 1.3 | Gentransfersysteme | 7 |
| 1.3.1 | Physikalische Methoden | 8 |
| 1.3.2 | Kationische Lipide | 10 |
| 1.3.3 | Kationische Polymere | 11 |
| 1.4 | Pulmonale Gentherapie und Ansätze für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer in die Lunge | 14 |
| 1.5 | Episomale Vektoren für den stabilen nichtviralen Gentransfer | 17 |
| 1.6 | Funktion der Nukleären Matrix und die Bedeutung von „Nuklear Matrix Targeting Signalen“ (NMTS) | 19 |
| 2 | Zielsetzung dieser Arbeit | 22 |
| 3 | Materialien und Methoden | 24 |
| 3.1 | Materialien | 24 |
| 3.1.1 | Reagenzien und Chemikalien | 24 |
| 3.1.2 | Chromatographie-Säulen, Gele, Membranen | 26 |
| 3.1.3 | Enzyme | 26 |
| 3.1.4 | Antikörper | 27 |
| 3.1.5 | Kits | 27 |
| 3.1.6 | Medien und Medienzusätze | 28 |
| 3.1.7 | Geräte | 28 |
| 3.1.8 | Oligonukleotide | 29 |
| 3.1.9 | Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) | 29 |
| 3.1.10 | Peptide | 30 |
| 3.1.11 | Arzneistoffe | 30 |
| 3.1.12 | Zusammensetzung und Herstellung von Puffern | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2 | Methoden..... | 32 |
| 3.2.1 | Peptid-Synthese der <i>NMTS</i> Sequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors..... | 32 |
| 3.2.2 | Zellkultur | 35 |
| 3.2.3 | Plasmid-DNA | 36 |
| 3.2.4 | Modifikationen von Plasmid-DNA | 39 |
| 3.2.5 | Synthese Prostaglandin I ₂ modifizierter Konjugate..... | 43 |
| 3.2.6 | Inkubationsstudien mit BSA-Konjugaten | 45 |
| 3.2.7 | Transfektion..... | 45 |
| 3.2.8 | Isolierung von DNA aus Jurkat-Zellen..... | 47 |
| 3.2.9 | Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase Verdau isolierter DNA... | 47 |
| 3.2.10 | Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) | 47 |
| 3.2.11 | DNA Freisetzungs-Assay | 48 |
| 3.2.12 | Messung von Luciferase- / β-Galaktosidase-Aktivität..... | 48 |
| 3.2.13 | Messung der cAMP-Freisetzung | 49 |
| 3.2.14 | Messung der Ca ²⁺ -Freisetzung..... | 50 |
| 3.2.15 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 50 |
| 3.2.16 | Durchflusszytometrie (FACS) | 51 |
| 3.2.17 | Messung der metabolischen Toxizität mittels MTT-Assay | 51 |
| 3.2.18 | Western-Blot-Analyse..... | 52 |
| 3.2.19 | Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) | 52 |
| 3.2.20 | Untersuchungen am Mausmodel | 53 |
| 3.2.21 | Zytokinbestimmung im Serum mittels ELISA | 55 |
| 3.2.22 | Statistik..... | 56 |
| 4 | Prostaglandin I₂ Analoga als Zielfindungsstruktur für den nichtviralen Gentransfer in Lungenzellen..... | 57 |
| 4.1 | Expression des IP ₁ -Rezeptor in Lungenzellen | 58 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | Gezielte Ansteuerung von Lungenepithelzellen mit unterschiedlichen IP ₁ -Rezeptoragonisten..... | 58 |
| 4.3 | Spezifität der FLUO-BSA-ILO Bindung an verschiedenen Lungenzellen.. | 60 |
| 4.4 | <i>In vitro</i> Transfektionsstudien mit PEI/BSA-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel | 64 |
| 4.5 | Charakterisierung der PEI und PEI- <i>g</i> -ILO Gen-Vektor-Nanopartikel ... | 65 |
| 4.6 | <i>In vitro</i> Transfektionsstudien mit PEI- <i>g</i> -ILO Gen-Vektor-Nanopartikel | 67 |
| 4.7 | <i>In vitro</i> Signaltransduktionsstudien nach Transfektion mit PEI- <i>g</i> -ILO Gen-Vektor-Nanopartikel..... | 71 |
| 4.8 | Untersuchungen zum <i>in vivo</i> Gentransfer mittels Aerosolapplikation... | 74 |
| 4.9 | Untersuchungen zur Toxizität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach Applikation von PEI- <i>g</i> -ILO Gen-Vektor-Nanopartikel..... | 78 |
| 4.10 | Zusammenfassende Betrachtung des Potentials von Iloprost als Zielfindungsstruktur für den nichtviralen Gentransfer | 81 |
| 5 | Stabiler Gentransfer durch Kombination episomaler replizierender Vektoren mit der „<i>Nuclear Matrix Targeting Signal</i>“-Peptidsequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors | 87 |
| 5.1 | Stabile Transgenexpression nach DNA-Bindung der <i>NMTS</i> -Peptidsequenz mittels Peptid-Nukleinsäuren (<i>PNAs</i>) | 89 |
| 5.1.1 | Nachweis der <i>PNA</i> -Bindung..... | 89 |
| 5.1.2 | Einfluss der <i>PNA</i> -Bindung auf die Transgenexpression | 93 |
| 5.1.3 | Nachweis der <i>NMTS</i> -Bindung..... | 94 |
| 5.1.4 | Untersuchungen zur stabilen Transgenexpression | 96 |
| 5.2 | Stabile Transgenexpression nach DNA-Bindung der <i>NMTS</i> -Peptidsequenz mittels <i>Aziridine Labeling Reagenz (ALR)</i> | 100 |
| 5.2.1 | Nachweis der <i>NMTS</i> -Bindung..... | 100 |
| 5.2.2 | Einfluss des Konjugationsgrades auf die stabile Transgenexpression mit und ohne Selektionsdruck | 102 |
| 5.2.3 | Untersuchungen zur stabilen Transgenexpression | 105 |
| 5.2.4 | Einfluss unterschiedlicher Crosslinker auf die stabile Transgenexpression | 111 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.2.5 | Einfluss der intermediären Kopplungsprodukte auf die stabile Transgenexpression | 112 |
| 5.2.6 | Einfluss der <i>S/MAR</i> in Kombination mit <i>ALR</i> auf die stabile Transgenexpression | 116 |
| 5.3 | Zusammenfassende Betrachtung zum stabilen Gentransfer durch Kombination episomale replizierender Vektoren mit der <i>NMTS</i> -Peptidsequenz | 118 |
| 6 | Zusammenfassung | 124 |
| 7 | Summary..... | 128 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 132 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 143 |
| 10 | Verzeichnis der Publikationen | 149 |

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Gentherapie – Von der Theorie zur klinische Anwendungen

In die Gentherapie werden seit Ende der 1980er Jahre große Erwartungen gesetzt, um Therapieoptionen gegen schwerste Erkrankungen zu finden. Entgegen der anfänglichen Hoffnung auf eine rasche Umsetzung erfordert das vielversprechende Konzept der Gentherapie jedoch noch viel Forschungsarbeit. Die Gentherapie hat sich daher mittlerweile zu einem sehr schnell fortschreitenden Gebiet der Grundlagenforschung als auch der klinischen Forschung entwickelt.

Unter Gentherapie versteht man das beabsichtigte Einbringen von genetischem Material in Zellen oder Gewebe eines Individuums unter Zuhilfenahme geeigneter Gentransfermethoden, mit dem Ziel durch die Funktion dieser Gene therapeutischen und/oder präventiven Nutzen zu erlangen (DFG, 2006). Generell wird das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen als Transfektion oder Transduktion bezeichnet. Der Begriff Transfektion wird im Zusammenhang mit nichtviralen Methoden verwendet, während Transduktion das Einbringen viraler Vektoren bezeichnet. Unterschieden wird bei gentherapeutischen Eingriffen zwischen der Korrektur von Gendefekten in Körperzellen (somatische Gentherapie) und Zellen der menschlichen Keimbahn, d.h. Eizelle und Spermium (Keimbahntherapie). Die Keimbahntherapie ist ethisch bedenklich und wegen der unvorhersehbaren unerwünschten Wirkungen nicht vertretbar und durch das deutsche Embryonenschutzgesetz verboten. Gentherapie in ihrer engsten Definition bedeutet die Reparatur eines defekten Genabschnitts, also ein gezielter Austausch der fehlerhaften Gensequenz („Genkorrektur“). Dieses ist allerdings aufgrund der geringen Effizienz der für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Systeme nur beschränkt erfolgreich. Im weiteren Sinne umfasst daher Gentherapie die Kompensation der Funktion defekter Gene durch das zusätzliche Einbringen einer korrespondierenden funktionell intakten Kopie in die erkrankte Zelle („Genaddition“ oder „Genkomplementierung“). Ebenfalls

zählt man zur Gentherapie auch die Inaktivierung pathogener Genprodukte durch das Ausschalten von Genen. Hierunter fällt die „Antisense-Therapie“ und die derzeitig intensiv beforschte RNA Interferenz. Eingriffe zur Korrektur von Gendefekten in Körperzellen eignen sich nicht nur zur Behandlung monogenetischer Erkrankungen wie der Hämophilie, der Mukoviszidose (auch Zystischen Fibrose genannt) oder des Surfactant Protein B Mangels, sondern auch zur Therapie anderer schwerer Erkrankungen. Fortschritte erhofft man sich unter anderem in der Therapie maligner Erkrankungen, bei Infektionskrankheiten wie HIV, bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems sowie des Herz-Kreislauf-Systems.

Bei der gentherapeutischen Applikation unterscheidet man grundlegend zwischen zwei Applikationsrouten: *in vivo* und *ex vivo* Gentherapie. Unter der *in vivo* Gentherapie versteht man die direkte Applikation des Gens in den erkrankten Patienten, während bei der *ex vivo* Gentherapie dem Patienten zunächst eigene Zellen entnommen werden. Diese werden dann gentherapeutisch behandelt und dem Patienten wieder re-infundiert.

Die ersten klinischen Studien in der Gentherapie wurden Ende der 1980er-Jahre begonnen. Die erste ausführlich dokumentierte klinische gentherapeutische Studie wurde am 14. September 1990 in den USA an zwei Patienten durchgeführt, die an einer Form des schweren kombinierten Immundefekts (severe combined immunodeficiency (SCID) litten (Blaese et al., 1995). Die ersten außerordentlichen Erfolge brachten zwei Studien zur gentherapeutischen Behandlung der X-chromosomalen schweren kombinierten Immundefizienz (engl. *X-SCID = X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease*) in Paris (Cavazzana-Calvo et al., 2000) und London (Gaspar et al., 2004). Mutationen des Interleukinrezeptor-gamma-C-Ketten-Gens (γ_c) wurden durch Applikation von replikationsdefizienten und für das korrekte γ_c -Gen-kodierenden Retroviren behandelt. Hierzu wurden den Patienten hämatopoetische Stammzellen (HSC) entnommen und *ex vivo* mit den für das γ_c -Gen kodierenden Retroviren transduziert. Anschließend wurden die γ_c -korrigierten HSC wieder in die Patienten re-infundiert. Insgesamt wurden in beiden Studien 17 von 20 Patienten erfolgreich behandelt. Eine

partielle oder komplette Rekonstitution von γ c-genkorrigierten T- und NK- (Natürliche Killer) Lymphozyten konnte hier erreicht werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Diese außerordentlichen Erfolge wurden zwei Jahre nach Behandlung der Patienten in Paris durch das Auftreten von Leukämien in mittlerweile fünf von insgesamt 20 Patienten überschattet (Check, 2002, Cole, 2008, Hacein-Bey-Abina et al., 2003a, Kaiser, 2003, Woods et al., 2006). Als Ursache dieser klonalen T-Zell-Proliferationen wurde die Aktivierung des Onkogens *LIM domain only 2* (LMO-2) durch Integration des Retrovirus in der Nähe oder direkt im LMO-2 Gen ermittelt (Nam and Rabbits, 2006). Aber auch eine onkogene Wirkung des γ c-Rezeptors in der Entwicklung von T-Lymphozyten wird diskutiert (Pike-Overzet et al., 2006). Die ersten vier Fälle von Leukämien traten bei Patienten die in Paris behandelt wurden auf, während unter den in London behandelten Patienten bis Ende 2007 keine ähnlichen Komplikationen auftraten. Als mögliche Erklärungen wurden Unterschiede im Virustyp und verschiedene Zusammensetzungen an Zytokinen zur Stimulation der HSC diskutiert (Nienhuis et al., 2006). Diese Überlegungen wurden allerdings im Jahr 2008 hinfällig, da der erste Fall einer Leukämie auch bei einem in London behandelten Patienten festgestellt wurde (Cole, 2008).

Trotz der Rückschläge birgt die Gentherapie große Potentiale und entwickelt sich stetig weiter. Bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolgten 1579 Gentherapiestudien weltweit (Stand Dezember 2009; <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Der überwiegende Teil der Studien wurde in den USA und Europa durchgeführt. In den ersten Jahren der Gentherapieforschung wurde noch angenommen, vor allem bekannte monogenetisch bedingte Erkrankungen könnten durch Einbringen des korrekten Gens behandelt werden (Kay and Woo, 1994). Mittlerweile wurden mehr als 64,5 Prozent der klinischen Studien zur Behandlung von Krebserkrankungen und nur 7,9 Prozent der Studien zu monogenetischen Erkrankungen durchgeführt. Zielmoleküle und Strukturen von Gentherapiestudien waren vor allem Antigene, Zytokine und Tumor Suppressorgene. Die überwiegende Zahl (60,3 Prozent) der klinischen Studien

waren vor allem Phase I Studien. Während in circa 70 Prozent aller dokumentierten klinischen Studien virale Vektoren verwendet wurden, wurden DNA-Lipid Komplexe und nackte Plasmid-DNA nur in circa 25 Prozent der Studien verwendet.

Drei Nukleinsäuretherapeutika befanden sich weltweit zwischenzeitlich in Verkehr (O'Brien et al., 2007, Monaco and Larin, 1994). Als erstes Antisense-Oligonukleotid wurde 1998 *Fomivirsen (Vitravene®)*, ein 20 Basen langes Oligodesoxyribonukleotid, für die Behandlung von Virustatika-refraktärer Cytomegalie-Virus-(CMV-)Retinitis bei Aids-Patienten (lokale Injektion in den Glaskörper) von der Amerikanischen Food and Drug Administration zugelassen. Durch die Erfolge bei der Therapie der HIV-Infektion mit Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und Proteaseinhibitoren wurde diese Indikation jedoch selten. Ein weiteres Präparat stellt Gendicine dar, welches Ende 2003 in der Volksrepublik China für den klinischen Einsatz bei Patienten mit Tumoren im Hals-Nasen-Ohren-Bereich zugelassen wurde. Das Arzneimittel enthält einen replikationsdefizienten, humanen Adenovirus, der für das humane Wildtyp p53 Tumorsuppressorgen kodiert. Ebenfalls wurde in China 2006 ein weiteres Präparat mit einem onkolytischen Adenovirus *Oncorine* für die gleiche Indikation zugelassen. Einige weitere Genterapeutika befinden sich derzeit in klinischen Studien der Phase III. So ist *Advexin* ebenfalls ein für p53 kodierender Adenovirus mit der gleichen Indikation wie *Gendicine*. *Affinitak*, *Alicaforsen* und *Oblimersen (Genasense®)* sind weitere Antisense-Oligonukleotide in klinische Studien. *Genasense®* Inhibiert die Produktion des Bcl-2 Proteins in Tumorzellen und befindet sich in Phase III Studien zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms und der Chronisch Lymphatischen Leukämie. Außerdem wird eine Phase II Studie zur Therapie des Non-Hodgkin-Lymphom durchgeführt. *Affinitak* und *Alicaforsen* befinden sich in Phase III Studien mit den jeweiligen Indikationen „Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom“ und „Morbus Crohn“.

1.2 Nukleinsäuren in der Gentherapie

Die am häufigsten in der Gentherapie eingesetzten Nukleinsäuren sind Plasmid-DNA, *small interfering* RNA (siRNA) und mRNA. Mit Plasmid-DNA können verschiedene Gene mit ihren Promotoren und zusätzlichen Elementen verwendet werden und damit zu entsprechender Expression des Transgens führen. Die Herabregulation oder komplette Inhibition von Expression kann durch siRNA erfolgen. Als Alternative zu Plasmid-DNA bietet sich die *messenger* RNA (mRNA) an. Im Gegensatz zu Plasmid-DNA muss die mRNA nur in das Zytoplasma gelangen. Dies hat den großen Vorteil, dass die Zellkernpore als Barriere wegfällt. Weitere Nukleinsäure-basierte Moleküle zum Gentransfer, wie *Yeast Artificial Chromosome* (YAC) DNA (Monaco and Larin, 1994, Lipps et al., 2003), *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) DNA, und *Human Artificial Chromosome* (HAC) DNA sowie Minichromosomen (Lipps et al., 2003, Harrington et al., 1997) seien hier ebenfalls erwähnt. Plasmid DNA kann in drei topologischen Formen, linear, offenkettig-zirkulär (*open-circular*) und kovalent-geschlossen zirkulär (*supercoiled* oder *covalently closed circles* (ccc)) auftreten (Abb. 1.1).

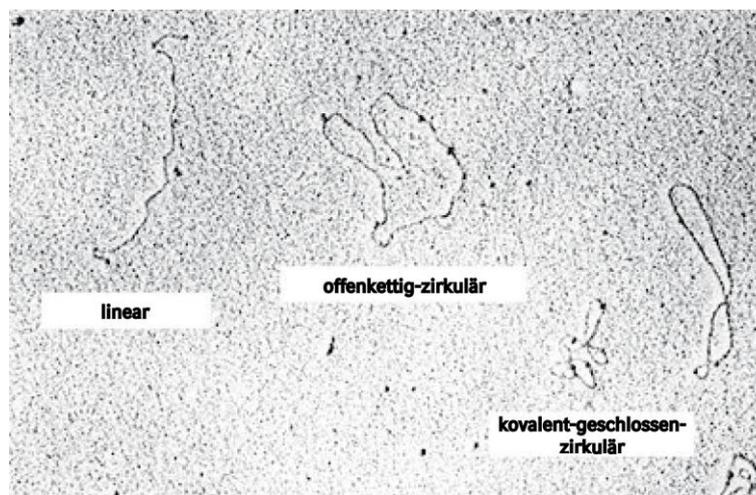


Abb. 1.1: Topologische Strukturen von Plasmid-DNA

Natürlicherweise kommt aber nur die kovalent-geschlossen zirkuläre Form in Bakterien vor. Durch teilweise Zerstörung, wie es bei der Isolation von

Plasmid-DNA vorkommen kann, tritt auch die offenkettig-zirkuläre Form auf. Lineare DNA kann beispielsweise durch einen Verdau mit Restriktionsenzymen erzeugt werden. Plasmid-DNA zur Anwendung in der Gentherapie besteht normalerweise aus einer Expressionskassette (meist eukaryontischen Ursprungs) und einem bakteriellen Plasmid-Rückgrat. Von großer Bedeutung ist der Promotor, über den das Transgen reguliert wird. Hier werden einerseits für hohe Expressionsraten starke virale Promotoren, wie z.B. Promotoren aus dem Cytomegalie (CMV)- oder Simian 40 (SV40)-Virus, verwendet. Andererseits werden gewebespezifische Promotoren eingesetzt (Pastore et al., 1999). Diese haben den Vorteil, dass das Transgen nur in den gewünschten Zielzellen exprimiert wird und die Proteinmenge physiologisch reguliert ist. Ein Beispiel hierfür ist der leberspezifische hAAT Promotor, der bei gentherapeutischen Entwicklungen der Hämophilie A und B eingesetzt wird. Die Transkription des Transgens und damit die Effizienz des Gentransfers ist in entscheidendem Maße von Promotor oder Transkriptionsverstärkenden Elementen (*enhancer*) abhängig (Pringle et al., 2007, Herweijer et al., 2001, Guo et al., 1996). Auch können regulatorische Sequenzen, wie beispielsweise Introns zwischen Promotor und Transgen, sowie Polyadenylierungssignale am Ende der Expressionskassette die Transgenexpression verstärken (Xu et al., 2001). Das Transgen selbst unterliegt kaum Beschränkungen. Für virale und nichtvirale Methoden allerdings besteht ein Größenlimit. Bei bestimmten Virustypen bestehen aufgrund eines relativ kurzen Wild-typ-Genoms Limitationen in der Größe des Transgens. Das Rückgrat eines Plasmids enthält zur Vermehrung und Selektion üblicherweise einen bakteriellen Replikationsursprung sowie einen Selektionsmarker. Gängige Selektionsmarker, um Plasmid tragende Bakterienklone zu selektieren, sind Ampicillin und Kanamycin-Resistenzgene. Für die Selektion von transgenen eukaryontischen Zellen wird häufig eine Neomycin-Geneticin-Resistenzkassette (Neo^R) zusätzlich zur Transgen-Expressionskassette ins Plasmid eingebracht. Durch Zugabe von zelltypspezifischen Konzentrationen an Geneticin (G418) ins Medium der eukaryontischen Zellen ist es damit möglich, Selektionsdruck zu erzeugen und

damit Neo^R-Plasmid-tragende Zellen zu isolieren. Je nach Konzentration des G418 kann Wachstumshemmung aber auch die Zerstörung von nicht-transfizierten Zellen bewirkt werden.

1.3 Gentransfersysteme

Die größte Hürde bei gentherapeutischen Entwicklungen stellt derzeit die Entwicklung von Gentransfersystemen, sogenannten Genfähren oder Vektoren, dar. Die Verfahren erfordern eine unterschiedliche Zellspezifität des Vektors. Darüber hinaus müssen solche Übertragungssysteme eine hohe Gentransfer-Effizienz haben, gepaart mit hoher Sicherheit für den Patienten und niedriger Zytotoxizität. Es gibt unterschiedliche Methoden und Vektoren, um Nukleinsäuren in die Zelle zu transferieren. Grundsätzlich unterscheidet man virale und nichtvirale Systeme. In den klinischen Studien mit viralen Systemen werden bislang immer modifizierte, nicht vermehrungsfähige virale Vektoren eingesetzt, die sich hauptsächlich von Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren (AAV) und Pockenviren ableiten. Bei diesen Vektoren werden die zur Replikation notwendigen Abschnitte im Virusgenom entfernt und durch das therapeutische Gen ersetzt. Die Vektoren werden anschließend in sogenannten Verpackungszelllinien vermehrt. Virale Vektoren eignen sich für den Gentransfer hervorragend, weil sie darauf spezialisiert sind, bestimmte Zelltypen zu infizieren, sich also an diese anzuheften und ihr Erbgut samt Fracht effizient ins Zellinnere zu bringen. Viele dieser viralen Vektoren können sehr effizient Zellen transduzieren, induzieren aber eine vielschichtige Immunantwort (Yang et al., 1995). Retroviren, aber auch Adenoviren bergen außerdem Sicherheitsrisiken wie insertionelle Mutagenese (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Desweiteren besitzen sie eine eingeschränkte DNA-Transportkapazität und sind oftmals aufgrund ihrer Immunantwort nicht geeignet für wiederholte Applikationen (Davis and Cooper, 2007). Im Vergleich zu viralen Gentransfersystemen können nichtvirale Gentransfersysteme mehrmals appliziert werden, da sie weniger immunogen sind. Mögliche Immunreaktionen durch kationische Polymere oder Lipide verlaufen mild.

Auch unerwünschte, zytotoxische Eigenschaften von Viren, wie Zelllyse, können durch die Verwendung nichtviraler Systeme vermieden werden. Zusätzlich ist die Gefahr einer insertionellen Mutagenese nichtviraler Systeme äußerst gering. Dieser Umstand gewann allerdings nach dem Auftreten von mittlerweile fünf Leukämiefällen in den zunächst sehr erfolgreichen klinischen X-SCID Studien mit Retroviren zusätzlich an Bedeutung. Allerdings könnte es durch unspezifische, nicht-gesteuerte Integration bei bestimmten nichtviralen Transfektionsmethoden, wie Elektroporation oder Nukleofektion theoretisch zufälligerweise zu insertioneller Mutagenese kommen. Der derzeit größte Nachteil nichtviraler Vektoren besteht in ihrer relativ geringen Transfektionseffizienz, insbesondere *in vivo*, sowie die transiente Transgenexpression. Es gibt verschiedene Ansätze, um die Effizienz des nichtviralen Gentransfers zu erhöhen, aber auch um stabile Transgenexpression zu erreichen. Durch das gezielte Einbringen von Liganden in Gentransfervehikel kann dadurch eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme, aber auch Zellspezifität erreicht werden (siehe Kapitel 1.4). Weiterhin wird versucht die Eigenschaften von viralen auf nicht virale Systeme zu übertragen, um somit integrierende oder stabil replizierende Vektoren zu etablieren (Glover et al., 2005). Zu den nichtviralen Systemen zählen physikalische Methoden, wie das Einbringen von nackten Nukleinsäuren z.B. durch Injektion in die Zelle oder direkt in den Zellkern, Elektroporation, Nukleofektion sowie Lipofektion oder Polymer-vermittelte Transfektion.

1.3.1 Physikalische Methoden

Für den Gentransfer können reine („nackte“) Nukleinsäuren verwendet und mittels verschiedener Applikationsarten verabreicht werden. Eine häufig angewandte Methode *ex vivo* und *in vitro*, aber auch *in vivo* ist die Elektroporation (Mehier-Humbert and Guy, 2005). Hierbei wird durch eine kontrolliert angelegte, gepulste Spannung eine kurze Öffnung von Zellmembranporen bewirkt (Phez et al., 2005, Golzio et al., 2004). Die nackten Nukleinsäuren können dann anschließend durch die geöffneten Poren ins

Zellinnere gelangen. Durch speziell entwickelte Elektroden können mittlerweile auch eine Vielzahl von Geweben durch Elektroporation *in vivo* transfiziert werden (Golzio et al., 2004, Dean et al., 2003). Von der Firma LONZA (ehemals AMAXA) wird die Nukleofektion als Transfektionsmethode angeboten (Gresch et al., 2004). Nukleofektion stellt eine Modifikation der Elektroporation dar und kombiniert zellspezifische Einstellungen bezüglich Spannung und Pulsdauer mit zellspezifischen Puffern. Dadurch ist es möglich, schwer zu transfizierende Zellen wie Jurkat-Zellen erfolgreich mit hoher Viabilität zu transfizieren (Martinet et al., 2003). Eine weitere Applikationsmethode ist die direkte Mikroinjektion nackter DNA in den Zellkern (Capecchi, 1980). Diese Methode ist auf dem *single-cell-level* sehr effektiv, da sie aber nicht geeignet ist, viele Zellen in kurzer Zeit zu transfizieren wird Mikroinjektion vorwiegend verwendet, um embryonale Stammzellen genetisch zu modifizieren und transgene Organismen zu generieren (Moreadith and Radford, 1997). Die direkte Injektion nackter DNA in Muskelgewebe (Wolff and Budker, 2005), insbesondere bei kleinen Tiermodellen, wie Maus und Ratte zeigte, dass ein effizienter Gentransfer in den Muskel möglich ist (Wolff et al., 1991). Hierbei spielt wohl das im Muskel relativ geringe Vorkommen von Nukleasen eine entscheidende Rolle. Insbesondere nach systemischer Applikation ist die Genexpression aufgrund von DNA-Degradation stark eingeschränkt. Eine Ausnahme bildet die hydrodynamische Applikation *in vivo*. Durch intravenöse Injektion großer Nukleinsäure-haltiger Flüssigkeitsvolumina innerhalb kurzer Zeit mit erhöhtem Druck ist es möglich eine hohe Genexpression der Hepatozyten zu erreichen (Zhang et al., 1999). Mittlerweile wurde diese Methode auch zur Anwendung am Schwein modifiziert (Yoshino et al., 2006) und am Menschen untersucht (Khorsandi et al., 2008). Des Weiteren besitzt auch die Vakzinierung mittels nackter Nukleinsäuren großes Potential. Somit konnten bereits einige erfolgsversprechende Resultate erzielt werden (Wang et al., 2004). Bislang konnten auch mit der *gene gun* Methode Erfolge erzielt werden. Hierbei wird Gewebe mit Mikropartikeln, deren Oberfläche mit DNA beladen ist beschossen. Im Tiermodell wurde diese Methode auf Gewebe, wie

Beispielsweise der Haut oder der Leber eingesetzt (Tan et al., 1999, Kuriyama et al., 2000). Nachdem die Verwendung nackter DNA *in vivo* meist jedoch stark eingeschränkt ist, wurden verschiedene nichtvirale Systeme entwickelt, um den Gentransfer zu verbessern. Große Relevanz besitzen hier kationische Lipide und Polymere. Negativ geladene Nukleinsäuren können somit aufgrund ihrer negativen Ladung durch elektrostatische Wechselwirkungen mit diesen zu Nanopartikeln kondensieren. Dadurch können die Nukleinsäuren beispielsweise wirkungsvoll vor enzymatischer Zerstörung geschützt werden.

1.3.2 Kationische Lipide

Lipide als nichtvirale Vektoren für den Gentransfer wurden 1987 erstmals für den *in vitro* Gentransfer beschrieben (Felgner et al., 1987). Bald darauf wurden auch Studien zu *in vivo* Versuchen publiziert (Zhu et al., 1993). Hierbei wurden kationische Lipide verwendet, die bei Dispersion in wässrigen Medien geschlossene Vesikel aus Phospholipid-Doppelschichten mit einem wässrigen Kern bilden. Diese positiv geladenen Liposomen, können aufgrund ihrer positiven Ladung Nukleinsäuren elektrostatisch binden und somit spontan Komplexe (Lipoplexe) ausbilden. Diese Lipoplexe besitzen eine insgesamt positive Ladung und dadurch die Möglichkeit an der negativ geladenen Zellmembran zu adsorbieren. Somit können diese über Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen werden (Zhou and Huang, 1994). Die überschüssige Ladung der Lipoplexe resultiert aus dem DNA zu Lipid-Verhältnis und hat somit einen erheblichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Die Freisetzung der Lipoplexe aus den Endosomen erfolgt durch Interaktion von kationischen Lipiden mit anionischen Bestandteilen und führt damit zur Destabilisierung der Membran (Wattiaux et al., 1997). Der Weg der DNA vom Zytoplasma in den Zellkern ist allerdings bisher ungeklärt und umstritten. Zur Herstellung von Liposomen für den Gentransfer werden heutzutage eine Vielzahl von unterschiedlichen kationischen Lipiden eingesetzt. Häufig verwendete sind beispielsweise N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-propyl-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA), 1,2-

Dioleyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP), 2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(Spermincarbox-amido)ethyl]-N,N-Dimethyl-1-propanaminium (DOSPA), Di-Octadecylamidoglycylspermin (DOCS) und 3,[N-(N1,N-Dimethylethylendiamin)-carbamoyl]cholesterol (DC-chol). Um die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* zu steigern, werden den kationischen Lipiden oftmals neutrale Lipide als sogenannte Co-oder Helferlipide zugesetzt, welche eine Fusion mit der Zellmembran und somit ein verbessertes Eindringen in die Zelle vermitteln sollen. Häufig eingesetzt werden hier Cholesterol und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) (Kikuchi et al., 1999). Die hohe Toxizität der kationischen Lipide stellt nach wie vor *in vivo* ein großes Problem bei der Verwendung als Gentransfervehikel dar. Dabei beeinflussen das DNA zu Lipid-Verhältnis, sowie die eingesetzte Menge der Lipoplexe das Ausmaß der Zytotoxizität (Dass, 2004). Außerdem induzieren viele Lipoplexe bei *in vivo*-Anwendung inflammatorische Reaktionen (Freimark et al., 1998, Dokka et al., 2000, Barron et al., 1998).

1.3.3 Kationische Polymere

Seit mehreren Jahren forschen Wissenschaftler an der Entwicklung von polykationischen Polymeren für den nichtviralen Gentransfer (Lungwitz et al., 2005). Prinzip dieser Polykationen ist, dass sie mit negativ geladenen Nukleinsäuren über elektrostatische Wechselwirkung kleinste Nanopartikel, sogenannte Polyplexe, bilden. Eingepackt in Polyplexe ist die Nukleinsäure auf ihrem Weg zur und innerhalb der Zelle weitgehend vor enzymatischem Abbau durch Nukleasen geschützt. Weitere Anforderungen an die Polykationen sind, wie für alle Übertragungssysteme, eine geringere Toxizität und Immunogenität und, besonders wichtig, eine hohe Gentransfer-Effizienz. Unter den vielen bereits eingesetzten Polymeren hat sich das Polyamin Polyethylenimin, kurz PEI, aufgrund seiner einfachen Handhabung und Modifizierbarkeit als günstiges Ausgangsmaterial erwiesen (Boussif et al., 1995). PEI ist sowohl mit verzweigter (*branched*) als auch linearer (*linear*)

Struktur in unterschiedlichen Molekulargewichten kommerziell erhältlich (Abb. 1.2).

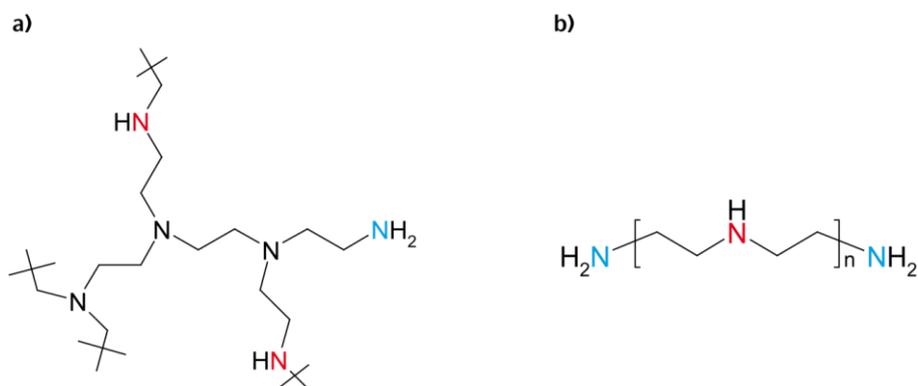


Abb. 1.2: Strukturformeln verzweigtes (a) und lineares (b) Polyethylenimin (Olschewski et al.). Primäre (blau), sekundäre (rot) und tertiäre (schwarz) Amine

Vor allem 25 kDa *branched* und 22 kDa lineares PEI wird zum nichtviralen Gentransfer eingesetzt, aber auch hoch- und niedermolekulares PEI wurden erfolgreich getestet (Shin et al., 2005, Choosakoonkriang et al., 2003).

Da jedes dritte Atom ein basischer Stickstoff ist, besitzt PEI bei einem physiologischen pH-Wert eine hohe Dichte an positiven Ladungen. Durch die Zugabe eines Überschusses an Polymer zur negativ geladenen DNA bilden sich kleinste Polyplexe in einer Größenordnung von bis zu hundert Nanometern, die eine positive Oberflächenladung tragen (Kneuer et al., 2006). In dem heterogenen Partikelkollektiv können sich in einem Polyplex über hundert Plasmid-DNA-Moleküle befinden. Die Größe der Polyplexe kann man durch das Verhältnis von Polymer zu Nukleinsäure und durch Variation der Elektrolytkonzentration in der Lösung technologisch steuern und mithilfe von Laserlichtstreuung messen. Gibt man PEI-DNA-Polyplexe beispielsweise *in vitro* zu Zellen, kommt es zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Partikeln und den negativ geladenen Glykoproteinen und Proteoglykanen auf der Zelloberfläche. Dadurch können die Polyplexe an die Zelle andocken. Die Polyplexe werden daraufhin hauptsächlich durch Adsorptions-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen und gelangen

in die Endosomen. PEI-Polyplexe zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus den Lysosomen sehr gut freigesetzt werden. Dies erfolgt unter anderem nach dem „Protonenschwammeffekt“ („*proton sponge effect*“) (Sonawane et al., 2003, Behr, 1994). Im Endosom herrscht ein pH-Wert von etwa 7. Hier ist nur ein Drittel der Stickstoffatome des PEI protoniert (Kircheis et al., 2001). Fällt der pH im Lysosom auf etwa 5 ab, kann PEI durch Protonierung der übrigen Stickstoffatome die einströmenden Protonen abpuffern. Ein nachfolgender Einstrom von Chlorid-Anionen und Wasser führt letztendlich zum Platzen der Lysosomen und die Polyplexe werden ins Zytosol freigesetzt. Die Pufferkapazität des Polymers hat noch einen weiteren Effekt: Das pH-Optimum der lysosomalen Nukleasen wird nicht erreicht und die eingeschlossene Nukleinsäure bleibt überwiegend intakt. Die Nukleinsäure kann von dort, entweder in freier Form oder weiterhin an PEI gebunden, in den Zellkern gelangen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht im Detail geklärt.

Polyamine besitzen die mitunter höchste Transfektionseffizienz innerhalb der nichtviralen Gentransfersysteme. So konnte verglichen mit Liposomen eine bis zu 1000-fach höhere *in vitro* Genexpression beobachtet werden (Wiseman et al., 2003). Die Effektivität von PEI erhöht sich dabei mit zunehmender Molmasse, während der pH-Wert scheinbar keinen bedeutenden Einfluss besitzt (Godbey et al., 1999). Im Allgemeinen zeigt lineares, verglichen mit verzweigtem PEI, eine höhere Gentransfereffizienz (Wiseman et al., 2003, Wightman et al., 2001). Bei *in vivo* Anwendungen konnten PEI-basierte Polyplexe bereits gute Ergebnisse im Hinblick auf den Gentransfer zur Niere (Boletta et al., 1997) und in die Lunge (Ferrari et al., 1997) liefern. Desweiteren konnte PEI bereits in klinischen Studien Phase II als Gentransfervehikel mit einem DTA-H19 Plasmid für die lokale Behandlung von Blasenkarzinomen eingesetzt werden (Sidi et al., 2008). Nichtsdestotrotz besitzt PEI eine gewisse Toxizität. Dies wurde mehrfach *in vitro* (Fischer et al., 2003) wie auch *in vivo* (Chollet et al., 2002) berichtet und schränkt die möglichen Einsatzgebiete ein.

Die Transfektionseffizienz und die Toxizität hängen von der zugesetzten PEI-Menge ab. Diese Polymermenge lässt sich im N/P-Verhältnis ausdrücken, das

als Anzahl der Stickstoffatome (N) im Polymer zu den Phosphatgruppen (P) in der DNA definiert ist. Da immer mit einem Polymerüberschuss gearbeitet wird, ist das N/P-Verhältnis größer als 1. Typische N/P-Verhältnisse zur effizienten Transfektion variieren je nach Anwendung zwischen vier und zwölf. Die Transfektionseffizienz steigt mit zunehmender Polymermenge zuerst an, sinkt dann jedoch aufgrund der Toxizität mit ansteigender Polymerkonzentration ab. Für das Toxizitätsprofil spielen weiterhin insbesondere das Molekulargewicht, der Grad der Verzweigung und das Zeta-Potential eine wesentliche Rolle (Zhang et al., 2004).

1.4 Pulmonale Gentherapie und Ansätze für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer in die Lunge

Der Gentransfer in die Lunge stellt ein attraktives Ziel für die Therapie einer Vielzahl von angeborenen und erworbenen Erkrankungen wie der Zystischen Fibrose, des Surfactant Protein B Mangels, Lungenkarzinomen und dem Lungenemphysem dar (Gill et al., 2004).

Die Lunge ist ein komplexes Organ mit vielen unterschiedlichen Zelltypen. Trachea und Bronchien bis in die Bronchiolen sind mit einem Epithel ausgekleidet. In den oberen Atemwegen befinden sich unterschiedliche Zelltypen, wie Flimmerepithelzellen, Zylinderepithelzellen, Becherzellen und Basalzellen (Breeze and Wheeldon, 1977). Im Parenchym der Lunge befinden sich die für den Gasaustausch wichtigen Alveolarepithelzellen und durch die enorme Vaskularisierung viele Kapillarendothelzellen (Crapo et al., 1982). Ein therapeutischer Gentransfer setzt eine entsprechende Genexpression in bestimmten Zelltypen voraus. Dies kann durch die entsprechende Verwendung eines geeigneten Gentransfervehikels ermöglicht werden.

Da sich virale Vektoren aufgrund ihrer Immunantwort für die wiederholte Applikationen nur bedingt für den Gentransfer in die Lunge eignen (Yang et al., 1995), ist das Interesse an geeigneten nichtviralen Gentransfervehikeln groß, um die Gentransfereffizienz gezielt zu steigern (Gill et al., 2004).

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie ist der effektive Transport des therapeutischen Gens zu den entsprechenden pulmonalen zellulären Strukturen. Für die nichtvirale Applikation von Gentransfervehikeln zur Lunge mit PEI als Gentransfervehikel bietet sich sowohl die intravenöse systemische Applikation über die Blutbahn als auch die topische Applikation über die Atemwege an. Nach intravenöser Injektion gelangen die Gentransfervehikel über die Blutbahn in die Lungenkapillaren, von wo aus ein Übertritt in die Lungenzellen erfolgen kann. Ein effizienter Gentransfer zur Lunge konnte bereits mit unmodifizierten PEI/DNA Polyplexen gezeigt werden (Koshkina et al., 2003). Allerdings birgt diese Applikationsart gewisse Nachteile. So müssen intravenös verabreichte Partikel auf ihrem Weg zur Lunge neben physikalischen auch eine Vielzahl von biologischen Barrieren wie beispielsweise das retikuloendotheliale System oder das Gefäßendothel überwinden. Folglich erreicht oftmals nur eine kleine Fraktion des eingesetzten Materials die Lunge. Dies erfordert den Einsatz hoher Substratmengen und birgt hinsichtlich der Toxizität Probleme (Chollet et al., 2002).

Ein großer Vorteil in der Applikation von Gentransfervehikeln über die Atemwege zur Lunge mittels Aerosol besteht in der nichtinvasiven Anwendung. Durch die direkte Applikation in die Lunge können störende biologische und physiologische Barrieren, wie beispielsweise die Bindung an Plasmaproteine überwiegend umgangen werden (Koshkina et al., 2003). Bei der Aerosolapplikation werden die Gentransferkomplexe mittels Druckluft oder Ultraschall zu kleinen Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von circa 0,5-5 µm vernebelt. Es konnte gezeigt werden, dass PEI/DNA Polyplexe nach Verneblung in der Lage waren, effizient Atemwegsepithelzellen von Mäusen zu transfizieren (Rudolph et al., 2005b). Die erzielte Genexpression des Lungengewebes ist im Hinblick auf eine klinische Anwendung allerdings noch zu gering. Eine große Hürde stellt hierbei die Phagozytose der Gentransfervehikel durch Makrophagen dar, was letztendlich zur Elimination der Partikel aus der Lunge führt (Lombry et al., 2004, Dames et al., 2007). Desweiteren ist die Applikation von PEI/DNA Polyplexen mittels Aerosol auch

mit unerwünschten Wirkungen verbunden, da das Einschleusen der gewünschten Gene in die Zellen häufig nicht effizient genug geschieht (Parker et al., 2003). Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene Gentransfersysteme für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer in die Lunge untersucht. Durch Konjugation von Liganden an Gentransfervehikel kann sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Spezifität für gewisse Zelltypen enorm gesteigert werden (Schatzlein, 2003). Gleichzeitig wird der Internalisierungsmechanismus des Liganden als Weg in die Zelle genutzt. Ziel ist es, im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung, die zu applizierende Dosis senken zu können und somit toxische Effekte zu reduzieren. Um einen Liganden für den nichtviralen Gentransfer erfolgreich einsetzen zu können, sollten folgende Kriterien erfüllt sein (Kircheis et al., 2001). Zum einen sollten die Zielzellen eine hohe Rezeptor-Dichte an der Zelloberfläche aufweisen. Desweiteren sollte der Ligand eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzen und nach Bindung internalisiert werden. Für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer in die Lunge wurden bisher zahlreiche Liganden untersucht. Je nachdem welche Zelltypen in der Lunge angesteuert werden sollen unterscheidet man verschiedene Kategorien an Liganden.

Die erste Kategorie an Liganden erhöht in der gesamten Lunge die Gentransfereffizienz, d.h. unterscheidet nicht zwischen Alveolar- und Bronchialepithelzellen. Beispiel hierfür ist Mannurose (Weiss et al., 2006). Die zweite Kategorie von Liganden adressiert entweder Alveolarepithelzellen (Clenbuterol (Elfinger et al., 2009a), Insulin (Elfinger et al., 2009b)) oder das Bronchialepithel (Lactoferrin (Elfinger et al., 2007)). Trägermaterial stellte jeweils das kationische Polymer PEI mit einem Molekulargewicht von 25 kDa dar. Obwohl mit diesen Liganden der PEI-vermittelte Gentransfer hinsichtlich Zellspezifität und Toxizität deutlich verbessert werden konnte, ist es dennoch von großem Interesse Zielstrukturen auf Zellen zu identifizieren und geeignete Liganden für einen effizienten Gentransfer zu untersuchen.

1.5 Episomale Vektoren für den stabilen nichtviralen Gentransfer

Neben der geringeren Transfektionseffizienz ist lediglich die transiente Transgenexpression, verglichen mit viralen Vektoren, ein großer Nachteil des nichtviralen Gentransfers. Transiente Transgenexpression sowie stabile Langzeit-Genexpression kann mit verschiedenen Vektorsystemen erreicht werden. Zu nennen sind hier humane oder Gewebe-spezifischer Promotoren (Herweijer and Wolff, 2003, Griesenbach et al., 2002), integrierende virale Vektoren wie Lenti- oder Retroviren, sowie die stabile chromosomale Integration von Plasmid-DNA durch Verwendung der „Sleeping Beauty“ Transposase (Montini et al., 2002, Mikkelsen et al., 2003) oder der *PhiC31* Integrase (Ortiz-Urda et al., 2002, Ortiz-Urda et al., 2003). Allerdings bergen diese Vektorsysteme Sicherheitsrisiken wie insertionelle Mutagenese, Positions- und Transaktivierungseffekte. Extrachromosomal (episomal) selbst-replizierende Systeme sind daher im Fokus intensiver Forschungsarbeiten. Unterteilt werden können episomal replizierenden Vektoren allgemein in selbst-replizierende viral-basierende Vektoren (Mazda, 2002), in *Scaffold-Matrix Attachment Region (S/MAR)*-enthaltende (Jenke et al., 2004b) und Chromosomen-basierende Vektoren (Ebersole et al., 2000).

In ruhenden, sich nicht teilenden Zellen verbleibt Plasmid-DNA, die durch Transfektion in den Zellkern gelangt ist, normalerweise für einige Zeit dort bestehen. Anders verhält sich dies in sich teilenden Zellen, wo extrachromosomale Plasmid-DNA bei jedem Teilungsschritt „ausverdünnt“ wird. Daher wurden *S/MAR*-enthaltende Plasmide entwickelt. Diese Plasmide wurden bereits 1999 zusammen mit dem Simian Virus 40 (SV40) Replikationsursprung entwickelt (Piechaczek et al., 1999, Jenke et al., 2004b). *S/MAR*-Elemente sind DNA-Stücke, die an die Zellkern-Matrix binden und aktive Bereiche von inaktiven isolieren. Erstaunlicherweise besitzen sie keine allgemeingültige DNA-Sequenz, wie es für andere genetische Elemente üblich ist, wohl aber strukturelle Gemeinsamkeiten. *S/MAR*-Elemente und die damit assoziierten Sequenzen besitzen eine Reihe von Eigenschaften. So sind sie

bezüglich ihrer DNA-Sequenz heterogen und weisen keine Konsensussequenz auf. Es sind AT-reiche Sequenzen welche in der Organisation des Chromatins eine wichtige Rolle spielen (Goetze et al., 2003). *S/MAR*-Elemente befinden sich häufig zwischen transkriptionsaktiven Regionen und trennen diese in unabhängige Bereiche. Sie erhöhen Transkriptions-Initiationsraten durch Mechanismen, die eine Domänen-Organisation voraussetzen (*transcriptional augmentation*) und von einer Enhancer-Wirkung unterscheidbar sind. Damit gekoppelt verringern sich die Einflüsse der genomischen Umgebung und es werden zelluläre Abwehrmechanismen wie DNA-Methylierung und Histone-Deacetylierung unterdrückt (Goetze et al., 2005). Diese Insulatorfunktion von *S/MARs* konnte zur Stabilisierung von Transgenexpression *in vivo* genutzt werden (Namciu et al., 1998). Weiterhin entstehen häufig Strangtrennungen an *S/MAR*-Elementen, wodurch eine Bindung zur Kernmatrix etabliert wird (Bode et al., 1995). Weiterhin kann bei stabiler Integration von *S/MAR*-Elementen Transkription und damit Transgenexpression aktiviert oder verstärkt werden (Klehr et al., 1992, Bode et al., 1995). *S/MARs* konnten in vielen eukaryontischen Organismen identifiziert werden (Gasser and Laemmli, 1986, Amati and Gasser, 1990). Neben der Anwendung zur Gentherapie wurden *S/MARs* enthaltende Vektoren auch zur verbesserten rekombinanten Expression von Proteinen in Säugerzellen verwendet (Kim et al., 2004). Das humane β -Interferon-Gen enthält am 5'-Ende circa 1,7 kb der kodierenden Region entfernt eine circa 2000 bp umfassende *S/MAR* (Bode and Maass, 1988), die in den meisten Untersuchungen zur gentherapeutischen Anwendung von *S/MAR*-tragenden Plasmiden verwendet wurde. So konnten bereits *S/MAR*-Vektoren der pEPI-Familie erfolgreich für eine stabile Langzeitexpression von Transgenen und therapeutischen Genen aber auch für die stabile Langzeitexpression von shRNA und für die Herstellung genetisch modifizierter Versuchstiere eingesetzt werden (Papapetrou et al., 2006, Manzini et al., 2006, Jenke et al., 2004a, Jenke et al., 2005). Für die humane β -Interferon *S/MAR* wurde eine hohe Bindungsaffinität zum nukleären Matrixprotein *Scaffold Attachment Factor-A* (SAF-A) festgestellt, was die stabile Verankerung eines *S/MAR*-enthaltenden Plasmids ermöglicht (Stehle et

al., 2007, Jenke et al., 2002, Baiker et al., 2000). Für die Replikation von *S/MAR*-enthaltenden Vektoren ist die Lokalisation des *S/MAR*-Elements am 3'-Ende des Transgens und somit die teilweise Assoziation aktiver Transkription mit dem *S/MAR*-Element essentiell (Stehle et al., 2003, Jenke et al., 2004b). Eine große Hürde zur klinischen Anwendung von *S/MAR* enthaltenden Vektoren ist die Notwendigkeit eines initialen Selektionsdrucks mit einer Dauer von zwei bis drei Wochen. Nach dieser initialen Selektion ist es möglich, die Zellen ohne den Verlust des episomal replizierenden Plasmids zu kultivieren. Allerdings ist ein anfänglicher Selektionsdruck *in vivo* nicht praktikabel. Weiterhin ist die Etablierung stabiler Klone mit nur circa 0,5-5 Prozent der transfizierten Zellen sehr ineffizient. Es konnte gezeigt werden, dass die Etablierung stabiler Klone von der richtigen Chromatinstruktur, dem Transkriptionsstatus und dem Transfer in bestimmte Kernkompartimente abhängt (Jackson et al., 2006). Außerdem waren *S/MAR*-Vektoren ausschließlich in Transkriptionsaktiven Kernkompartimenten zu finden (Stehle et al., 2007).

1.6 Funktion der Nukleären Matrix und die Bedeutung von „Nuklear Matrix Targeting Signalen“ (NMTS)

Bei der Nukleären Matrix handelt es sich um ein Zellkern-Protein-Skelett, welches nach dem Entfernen sämtlicher DNA sowie löslichen und Chromatin gebundenen Proteinen resultiert und die Kernmorphologie mitbestimmt (Wan et al., 1999, Nickerson et al., 1997, Berezney and Coffey, 1974). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Nukleäre Matrix aus Kernporen eingebettet in die Kernlamina und einem Netzwerk aus Filamenten besteht in die die granulären Strukturen und Nukleoli integriert sind (Verheijen et al., 1988, Penman, 1995). Am besten charakterisiert sind die nukleären Lamine, eine Gruppe intermediärer Filamentproteine welche die Lamina bilden. Die Lamina ist ein faserartiges Proteinnetzwerk welches die Kernmembran auskleidet und mit den Kernporen verbunden ist. Die nukleären Lamine sind über Farnesylierung und Interaktionen mit Membran-assoziierten

Proteinen an die innere Kernmembran gebunden (Wilson, 2000, McKeon et al., 1986, Furukawa et al., 1995).

Die Nukleäre Matrix bindet an DNA Fragmente, welche als *scaffold matrix attachment regions (S/MARs)* bezeichnet werden (siehe Abschnitt 1.5). Diese *S/MARs* formen Chromatinschlaufen, welche während der Interphase an die nukleäre Matrix gebunden sind (Gasser SM, 1987). In Untersuchungen konnten *S/MAR*-Bindungsproteine identifiziert werden, die Bestandteile der nukleären Matrix sind (von Kries et al., 1991, Renz and Fackelmayer, 1996, Gohring et al., 1997). Weiterhin konnten Proteine identifiziert werden, die in Prozesse wie Transkription, Splicen und RNA-Prozessierung involviert sind (Zeng et al., 1998, van Wijnen et al., 1993, Guo et al., 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Prozesse an spezifischen Stellen bei isolierten Fraktionen der Nukleären Matrix stattfinden (Wei et al., 1999, Blencowe et al., 1994).

Zahlreiche mit der Nukleären Matrix assoziierte Proteine konnten identifiziert werden. So auch Aminosäuresequenzen, die für diese Lokalisation nötig sind. Diese nukleären Proteine reichen von Transkriptionsfaktoren, DNA- und RNA-Bindungsproteinen bis hin zu Kinasen (Parker et al., 2000, Feister et al., 2000). Diese Motive, welche für ein nukleäres „*Targeting*“ verantwortlich sind zeigen allerdings keine Konsensussequenzen auf.

Das am besten charakterisierte „*Nuklear Matrix Targeting Signal*“ (*NMTS*) ist das des Transkriptionsfaktors AML-1B. AML/CBF- α *runt* Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der hämatopoetischen und knochenmarksspezifischen Genexpression. AML-1 und AML-1B sind zwei Splicevarianten. Allerdings ist nur AML-1B transkriptionsaktiv und bindet an die nukleäre Matrix. Durch eine Punktmutation in der *runt* DNA Bindungsdomäne konnte gezeigt werden, dass keine DNA-Bindung mehr stattfand, allerdings war noch eine Bindung an die Nukleäre Matrix nachweisbar. Der Abschnitt des Transkriptionsfaktors AML-1B, der für die Bindung an die Nukleäre Matrix verantwortlich war, konnte auf einen Abschnitt des Proteins von 31 Aminosäuren Nähe des C-Terminus eingeschränkt werden. Diese Sequenz war von der nukleären

Lokalisierungssequenz getrennt und konnte in AML-1 nicht nachgewiesen werden (Zeng et al., 1997). Gentechnisch fusioniert an GAL4 transportiert sie diesen in die Nukleäre Matrix. Weiterhin konnte auch eine Ko-Lokalisation des AML-1B Transkriptionsfaktors mit hyperphosphorylierter Polymerase II in spezifischen nukleären Kompartimenten der Nukleären Matrix nachgewiesen werden (Zeng et al., 1998). Diese Ko-Lokalisation hängt von einer aktiven Transkription ab und bedingt die DNA-Bindungseigenschaften der *runt* DNA-Bindungsdomäne des AML-1B Transkriptionsfaktors.

Die Struktur der *NMTS* des AML-1B Transkriptionsfaktors, fusioniert an Glutathion S-Transferase, konnte mittels Röntgenstrukturanalyse in Bezug auf die *NMTS*-Funktion charakterisiert werden (Tang et al., 1999). Die Struktur der *NMTS* besteht aus zwei Schleifendomänen (*loops*), die über eine freidrehbare Gelenkregion (*hinge region*) miteinander verbunden sind. Über die beiden Schleifen der *NMTS* ließ sich dabei eine mögliche Bindung an die nukleäre Matrix ableiten. Diese Hypothese konnte auch in Untersuchungen mit Mutationen der *NMTS* belegt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Aminosäure Tyrosin an Position 380 essentiell für die Bindung an die Nukleäre Matrix ist (Tang et al., 1999, Chen et al., 1998). Die *NMTS*-Sequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors stellt somit das am weitesten charakterisierte Peptid für ein zielgerichtetes „*Targeting*“ in die Nukleäre Matrix dar.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine geringe Transfektionseffizienz und eine lediglich transiente Transgenexpression sind nach wie vor limitierend für die Anwendung nichtviraler Methoden in der Gentherapie. Daher wurde in dieser Arbeit intensiv an Innovationen geforscht, um sowohl durch „*Zelluläres Targeting*“ den Gentransfer in die Zielzellen und damit die Gentransfereffizienz zu steigern, als auch durch „*Intranukleäres Targeting*“ höhere und längere Transgenexpression zu erreichen.

Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) Analoga wie Iloprost oder Treprostinil werden bereits in der Klinik für die Behandlung der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie eingesetzt. Auch konnten bereits IP₁-Rezeptoren in Lungenzellen und eine Internalisierung des Prostacyclin-Rezeptor-Komplexes nachgewiesen werden. Daher konzentrierte sich der erste Teil dieser Dissertation auf die Möglichkeit Prostacyclin-Analoga als Zielfindungsliganden für das „*Zelluläre Targeting*“ zu entwickeln. Die wichtigsten Ziele waren hierbei:

- Vergleich und Charakterisierung von Prostacyclin-Analoga hinsichtlich Zellbindung und -aufnahme
- Modifikation von verzweigtem Polyethylenimin 25 kDa (PEI) mit dem effektivsten Prostacyclin-Analogen
- Untersuchung der *in vitro* Transfektionseffizienz der Prostacyclin Gen-Vektor Nanopartikel
- Untersuchung der Rezeptor-spezifischen Bindung
- Untersuchung der *in vivo* Effizienz der Prostacyclin Gen-Vektor Nanopartikel
- Untersuchung von Toxizität und Entzündungsparametern nach Applikation der Prostacyclin Gen-Vektor Nanopartikel
- Untersuchung der physiologischen Aktivität des Prostacyclin-Analogen nach Konjugation an PEI

Für das „*Intranukleäre Targeting*“ sollten im zweiten Teil dieser Dissertation funktionelle *S/MAR-NMTS* Hybridvektoren basierend auf der *NMTS*-Peptidsequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors entwickelt werden, um einen gezielten Gentransfer *S/MAR* modifizierter Plasmid-DNA in transkriptionsaktive Bereiche der Nukleären Matrix zu erzielen und somit die episomale Replikation zu begünstigen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt konnte die *NMTS* gentechnisch fusioniert an den GAL4 Transkriptionsfaktor diesen in die Nukleäre Matrix transportieren. Daher wurden in dieser Studie folgende Aspekte genauer untersucht:

- Konjugation der *NMTS*-Peptidsequenz an *S/MAR*-Plasmidvektoren über *Peptid-Nukleinsäuren* und kovalente Bindung
- Einfluss der *NMTS*-Konjugation auf die Transgenexpression
- Einfluss der *NMTS*-Konjugation auf den Status der Plasmid-DNA in Zellen
- Einfluss unterschiedlicher Crosslinker auf die Transgenexpression

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Im Folgenden sind sämtliche Reagenzien, Chemikalien, Enzyme, Kits, Medien und Medienzusätze sowie Geräte gelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Folgende Reagenzien und Chemikalien wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|---|
| Acetonitril | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Agarose | Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Alexa Fluor [®] phalloidin | Invitrogen GmbH, Germany |
| Alexa Fluor [®] 568 succinimidylester (NHS) | Invitrogen GmbH, Germany |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Carbachol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| CAY10449 (4,5-dihydro-N-[4-[[4-(1-methylethoxy)phenyl]carbonyl]phenyl]-1H-imidazol-2-amin) | Cayman Chemical, USA |
| Chloroform | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Complete [®] Protease Inhibitoren | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| Deuteriertes Wasser (D ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| D-(+)-Glucose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Dichlormethan (DCM) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Dimethylformamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| DIPEA (N,N-Diisopropylethylendiamin) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| D-Luciferin 99% | Synchem OHG, Deutschland |
| DPBS 1x | Invitrogen GmbH, Germany |
| DNA Ladder 100bp | PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland |
| DNA Ladder 1kbp | PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland |
| DTT (Dithiothreitol) | Amersham Biosciences |
| EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Ethanol 96% p.a. | Merck KGaA, Deutschland |
| Ethidiumbromid | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Ethandiol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Ellmans Reagenz | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Fluorescein-NHS (5-(6-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester) | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Fmoc-Tyr(tBu)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Ala-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Cys(Mmt)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Gly-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Ile-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Phe-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-His(Trt)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Pro-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Met-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Ser(tBu)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Thr(tBu)-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Val-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Fmoc-Leu-OH | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| GelRed™ | VWR International GmbH, Deutschland |
| Gluthation | Merck KGaA, Deutschland |
| Heparansulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| HOBt (1-Hydroxybenzotriazolhydrat) | Merck KGaA, Novabiochem, Deutschland |
| Iloprost | Cayman Chemical, USA |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Kanamycinsulfat | Invitrogen GmbH, Germany |
| KAPA™ SYBR® FAST BioRad iCycler™ | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland |
| Kupfersulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Lipofectamin 2000 | Invitrogen GmbH, Germany |
| Magermilchpulver | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Magnesiumsulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) | Merck KGaA, Deutschland |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Natriumcitrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Natriumdeoxycholsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Natriumhydrogencarbonat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Natriumphosphat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Natronlauge 1M | Merck KGaA, Deutschland |
| NMP (N-Methylpyrrolidon) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| PAL-Harz (100-200mesh, 0,5mmol/g) | Advanced Chem Tech, USA |
| Paraformaldehyd | Merck KGaA, Deutschland |
| Picrylsulfonsäure-Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Phenol | Merck KGaA, Deutschland |
| Polyethylenimin, verzweigt 25kDa | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Rekombinante Luciferase | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Rinderserumalbumin (BSA) Protein Standard | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Salzsäure 36% | Merck KGaA, Deutschland |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Standard Protein Assay | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Sulfo-SMCC | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| TAE 50x buffer | Invitrogen GmbH, Germany |
| Thioanisol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Treprostinil | Cayman Chemical, USA |
| Trifluoressigsäure (TFA) 99% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Tris/HCL (pH7,5) | VWR International GmbH, Deutschland |
| Triton-X | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Trypsin-EDTA | Invitrogen GmbH, Germany |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Vectashield® | Vector Laboratories Inc., USA |
| Wasser für Injektionszwecke | B. Braun Melsungen AG, Deutschland |
| Xylencyanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |

3.1.2 Chromatographie-Säulen, Gele, Membranen

Folgende Säulen, Gele und Membranen wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| PVDF Membran | Millipore Corporation, Deutschland |
| Sephadex G-25 M PD 10 Säule | GE Healthcare, Germany |
| 7,5% Tris/HCL Gel | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| VYDAC® C18 Protein & Peptides 2,5x25 | Grace, USA |

3.1.3 Enzyme

Folgende Enzyme wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---------------|-------------------------------|
| <i>Apal</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |
| <i>BamHI</i> | New England Biolabs Inc., USA |
| <i>BspEI</i> | New England Biolabs Inc., USA |
| <i>DraIII</i> | New England Biolabs Inc., USA |
| <i>EcoRI</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |

| | |
|--|--------------------------------|
| <i>KpnI</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |
| Ligase T4 | Fermentas GmbH, Deutschland |
| <i>NheI</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |
| <i>NotI</i> | New England Biolabs Inc., USA |
| Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase | Epicentre Biotechnologies, USA |
| <i>PmeI</i> | New England Biolabs Inc., USA |
| Polymerase T4 | Fermentas GmbH, Deutschland |
| <i>SacI</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |
| <i>SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)</i> | Fermentas GmbH, Deutschland |

3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---------------------------------------|
| Hase-anti-menschlicher IP ₁ -Rezeptor polyklonal | Cayman Chemical, USA |
| Ziege-anti-Hase HRP-konjugiert | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |

3.1.5 Kits

Folgende Kits wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|---------------------------------------|
| BetaGal Reportergene Assay Kit | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| cAMP-Glo™ Assay | Promega GmbH, Germany |
| Cell Proliferation Kit I (MTT) | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| DNEasy® Blood & Tissue Kit | Quiagen AG, Deutschland |
| Fluo-4 NW Calcium Assay Kit | Invitrogen GmbH, Germany |
| LabelIT® Nucleic Acid Modifying Kit, Amine | Mirus Bio LLC, USA |
| NucleoBond PC 2000 EF | MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland |
| NucleoSpin extract II | MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland |
| NucleoSpin plasmid | MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland |
| pGeneGrip Site 1 Cloning Kit | Genlantis, USA |
| pGeneGrip Site 2 Cloning Kit | Genlantis, USA |
| Pierce Fast Western Blot Kit, ECL Substrat | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| RayBio® Mouse IL-12 P40/P70 ELISA Kit | RayBiotech Inc., USA |
| RayBio® Mouse INF-γ ELISA Kit | RayBiotech Inc., USA |

3.1.6 Medien und Medienzusätze

Folgende Medien und Medienzusätze wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Fetal Bovine Serum (FBS) | PAA Laboratories GmbH, Österreich |
| Gentamycin 10 mg/ml | PAA Laboratories GmbH, Österreich |
| Minimum Essential Media mit GlutaMAX™ | Invitrogen GmbH, Germany |
| McCoy's 5A Medium mit GlutaMAX™ | Invitrogen GmbH, Germany |
| Penicillin/Streptomycin 100x | PAA Laboratories GmbH, Österreich |
| RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™ | Invitrogen GmbH, Germany |

3.1.7 Geräte

Folgende Geräte wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|--|
| Analysenwaage Electronic Balance ABJ 80-4M | Kern & Sohn GmbH, Deutschland |
| Axiovert 135 Epifluoreszenzmikroskop | Carl Zeiss AG, Deutschland |
| BD FACScan | BD GmbH, Deutschland |
| BD FACSCanto II | BD GmbH, Deutschland |
| BioRad GenPulser II Gerät | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Brookhaven 90 Plus Partikelgrößenmessgerät | BIC Brookhaven Inst. Corp., Österreich |
| Bruker AV 250 MHz Spektrometer | Bruker BioSpin GmbH, Deutschland |
| CP 1000 Typ 9 | AGFA Gevaert N.V., Deutschland |
| Digital Sonifier 250 | Branson Inc., USA |
| Excella E24 Incubator shaker series | New Brunswick Scientific GmbH, Deutschland |
| Geldokumentation, Camera system Diana II | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland |
| Gelelektrophoresekammer Horizon® 11x14 | GIBCO BRL, Deutschland |
| Haematologie-System KX-21 | Sysmex, Deutschland |
| Heizblock Thermomixer compact | Eppendorf AG, Deutschland |
| Heizplatte Tempcontrol-37 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland |
| iCycler IQ Real Time PCR Detection System | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Inkubator CO ₂ -Series | Sheldon Mfg Inc., USA |
| Inkubator-Shaker Excella E24 | New Brunswick Scientific Inc., USA |
| Inkubator 1000/Schüttler Polymax 1040 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG |
| IVIS 100 <i>in vivo</i> imaging System | Xenogen Inc., USA |
| Kühlschrank FKS 1800 | Liebherr GmbH, Deutschland |
| Kühlschrank Liebherr Comfort | Eppendorf AG, Deutschland |
| Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, |

| | |
|--|--|
| | Deutschland |
| Lichtmikroskop Axiovert 25 | Carl Zeiss AG, Deutschland |
| Luminometer Lumat LB9507 | Berthold AG, Deutschland |
| Mini Trans-Blot Cell | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Mini Protean [®] Cell | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Nanodrop ND-1000 | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Nucleofector II (Amaya, Deutschland) | Amaya GmbH, Deutschland |
| Peptide Synthesizer Model 431A | Applied Biosystems Inc., USA |
| pH-Meter pH 330i | WTW, Deutschland |
| Power Pac 300 | BioRad Laboratories GmbH, Deutschland |
| Steilwerkbank Herasafe | Heraeus Holding GmbH, Deutschland |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf AG, Deutschland |
| Tiefkühler Liebherr Premium | Liebherr GmbH, Deutschland |
| Tischwaage Navigator [™] | Ohaus GmbH, Deutschland |
| Tischzentrifuge Centrifuge 5417R | Eppendorf AG, Deutschland |
| Turbo Boy [®] N / LC Plus | PARI GmbH, Deutschland |
| Ultrospec 3100pro | GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland |
| Ultraschallbad Sonorex RK100 | Bandelin Elektronik, Deutschland |
| Vortexer MS2 Minishaker | Ika GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Wallac Victor ² / 1420 Multilabel Counter | PerkinElmer Inc., USA |
| Wasserbad 1008 | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland |
| Zentrifuge, J2-21 Centrifuge | Beckmann Coulter GmbH, Deutschland |
| Zentrifuge, Centrifuge 5417R | Eppendorf AG, Deutschland |
| Zentrifuge, Universal 16R | Hettrich GmbH & Co. KG, Deutschland |

3.1.8 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für diese Arbeit verwendet. Die Synthese der aufgeführten Oligonukleotide wurde von der Firma Biomers GmbH, Deutschland durchgeführt.

| Bezeichnung | Sequenz (5' – 3') |
|---------------|----------------------------|
| FP Luciferase | tca aag agg cga act gtg tg |
| RP Luciferase | ggt gtt gga gca aga tgg at |

3.1.9 Peptid-Nukleinsäuren (PNAs)

Folgende PNAs wurden für diese Arbeit verwendet. Die Synthese der aufgeführten PNAs wurde von der Firma PANAGENE, Korea durchgeführt.

| Bezeichnung | Sequenz (5' – 3') |
|-------------|---|
| PNA 1 | NH ₂ -OO-TCTCTCTC-000-JTJTJTJT |
| PNA 2 | NH ₂ -OO-TTCCTTCC-000-JJTJTJT |

O: 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Linker, J: Pseudoisocytosin

3.1.10 Peptide

Folgende Peptide wurden für diese Arbeit verwendet. Die Synthese der aufgeführten Peptide wurde selbst bzw. von der Firma Peptide 2.0 Inc., USA durchgeführt. Modifikationen sind in fett gedruckter Schrift dargestellt.

| Bezeichnung | Sequenz (N-Terminus nach C-Terminus) |
|-----------------------------------|--|
| Wildtyp, eigene Synthese (eNMTS) | CGAFTYSPTPVTSGIGIGMSAMGSATRYHTYL-NH ₂ |
| Wildtyp (NMTS) | FITC-Ahx-GC GAFTYSPTPVTSGIGIGMSAMGSATRYHTYL-NH ₂ |
| Mutante (Y380A) | FITC-Ahx-GC GAFTYSPTPVTSGIGIGMSAMGSATRYHTAL-NH ₂ |
| Randomisierte Sequenz (Scrambled) | FITC-Ahx-GC GGGYGPTFTYLVSIHSMTAYMTRAASIPTSG-NH ₂ |

FITC: Fluoresceinisothiocyanat; Ahx: Aminohexansäure(Linker);-NH₂: Carbonsäureamid

3.1.11 Arzneistoffe

Folgende Arzneimittel wurden für diese Arbeit verwendet.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---------------------------------|
| Domitor [®] ad us. vet., Injektionslösung (Medetomidin 1 mg/ml) | Pfizer AG, Deutschland |
| Fentanyl [®] -Janssen 0,1 mg Injektionslösung (Fentanyl 0,1 mg/ml) | Janssen-Cilag GmbH, Deutschland |
| Midazolam-ratiopharm [®] 15 mg/3 ml Injektionslösung (Midazolam 5 mg/ml) | Ratiopharm GmbH, Deutschland |

3.1.12 Zusammensetzung und Herstellung von Puffern

Für die Arbeit wurden Puffer mit folgenden Zusammensetzungen hergestellt. Die Puffer wurden mit demineralisiertem, sterilem Wasser hergestellt.

Nukleofektionspuffer

0,4 mM Ca(NO₃)₂; 5,4 mM KCl; 0,41 mM MgSO₄; 103 mM NaCl; 23,8 mM NaHCO₃; 5,6 mM Na₂HPO₄; 11,1 mM D-(+)Glucose; 3,25 µM Gluthation; 20 mM HEPES; Einstellen auf pH 7,3

Zellysepuffer (Luciferase-Messung / Bradford-Bestimmung)

250 mM Tris ; 0,1% Triton X-100; Einstellen auf pH 7,8

Luciferase-Assay-Puffer

470 μ M D-Luciferin ; 270 μ M Coenzym A ; 33,3 mM DTT ; 530 μ M ATP ; 1,1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 2,7 mM MgSO_4 ; 20 mM Tricin ; 0,1 mM EDTA

Elektrophorese-Auftragspuffer

0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerol in H_2O

Zellysepuffer (Western Blot)

20 mM Tris/HCl (pH7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,05% Natriumdeoxycholsäure. Complete[®] Protease Inhibitoren und 1 mM DTT frisch zusetzen.

SDS Probenpuffer (Western Blot)

62,5 mM Tris/HCl (pH6,8); 2% SDS; 10% Glycerol; 2% DTT; 0,001% Bromphenolblau

TBS-T (Western Blot)

20 mM Tris/HCl (pH7,6); 137 mM NaCl; 0,1 % Tween-20. Je nach Verwendung werden 0,5% oder 5% Magermilchpulver zugegeben.

3.2 Methoden

3.2.1 Peptid-Synthese der *NMTS* Sequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors

3.2.1.1 *Synthese*

Die Peptid-Synthese erfolgte nach einem Standardprotokoll mittels Fmoc-Chemie (FastMocTM) über Festphasen-Peptid-Synthese mit Hilfe eines automatisierten Peptid-Synthesizer im Labor von Herrn PD Dr. C. Plank, TU München. Als Schutzgruppe der α -Aminogruppe der Aminosäuren diene Fmoc (9-Fluorenmethoxycarbonyl). Die Fmoc- Schutzgruppe ist im Basischen labil und wird durch Zugabe von Piperidin abgespalten. Im darauffolgenden Schritt kann dann eine über HBTU/HOBt aktivierte Aminosäure gekoppelt werden. Die Festphasen-Peptidsynthese besteht folglich aus alternierender Fmoc-Abspaltung und anschließender Kopplung der aktivierten Carboxyl-Gruppe an die zuletzt gekoppelte Aminosäure. Das Peptid wächst während der Synthese vom C-Terminus in Richtung N-Terminus. Das Kopplungsschema ist in **Abbildung 2.1** dargestellt.

Detaillierter Ablauf der Kopplung (Abb. 2.2) ...

Im ersten Schritt der Synthese wird die zu koppelnde Aminosäure mit NMP und 0,45 M HBTU/HOBt in DMF versetzt und dadurch die Aminosäure unter schütteln gelöst (A). Währenddessen wird das Harz 0,25 mmol, welches sich im Reaktionsgefäß befindet mit NMP gewaschen. Danach wird eine Lösung aus 20% Piperidin in NMP zupipettiert und inkubiert (B). Dies dient dazu die Fmoc-Gruppe des am Harz befindlichen Peptids abzuspalten. Anschließend wird zur vollständigen Entfernung des Piperidin das Harz gründlich mit NMP gewaschen (C). Jetzt wird die in NMP/HBTU/HOBt gelöste Aminosäure ins Reaktionsgefäß überführt und 0,3 ml DIPEA zupipettiert (D), wodurch die Kopplung der Aminosäure an das Harz unter Schütteln stattfindet (E).

Nachdem die Kopplung abgeschlossen ist, wird das Harz mit NMP gewaschen (F) und der Zyklus beginnt von Neuem.

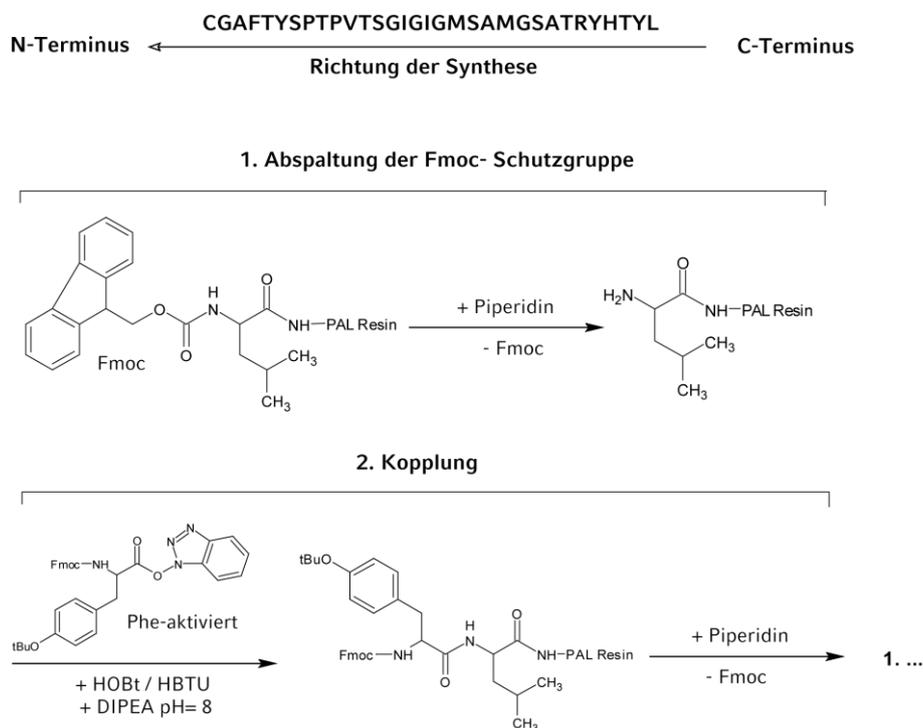


Abb. 2.1: Schematischer Ablauf der Synthese.

Die Fmoc-Schutzgruppe wird im Basischen durch Piperidin abgespalten, und im darauffolgenden Schritt an die nächste über HBTU/HOBt aktivierte Aminosäure gekoppelt. Die Festphasen-Peptidsynthese besteht folglich aus alternierender Fmoc-Abspaltung und anschließender Kopplung der aktivierten Carboxylgruppe an die zuletzt gekoppelte Aminosäure. Das Peptid wächst während der Synthese vom C-Terminus in Richtung N-Terminus.

| Reaktionsschritte | Zeit [min] |
|---|------------|
| A-Lösen der Aminosäure in NMP und HBTU/HOBt | 7 |
| B-Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin vom Harz | 6 |
| C-Waschen des Harzes mit NMP | 6 |
| D-Zugabe der Aminosäurelösung aus A | 5 |
| E-Kopplung der Aminosäure | 25 |
| F-Waschen des Harzes mit NMP | 6 |
| Gesamt | 55 |

Abb. 2.2: Zeitlicher Ablauf der Peptidsynthese.

Die Peptidsynthese besteht aus mehreren nacheinander ablaufenden Operationen. Ein Kopplungszyklus dauert 44 min.

Nach der Synthese der NMTS-Sequenz bestehend aus folgender Aminosäure-Sequenz, **CGAFTYSPTPVTSGIGIGMSAMGSATRYHTYL**, wurde das Peptid-Harz mit Dichlormethan gewaschen und lyophilisiert. Es wurden zwei Modifikationen des Peptids vorgenommen: a) N-Terminal wurde zusätzlich ein Cystein eingeführt um eine selektive Konjugation des Peptids über eine Sulfhydryl-Gruppe zu ermöglichen und b) es wurde ein PAL-Harz verwendet, wodurch bei der Abspaltung C-Terminal ein Carbonsäure-Amid entsteht.

3.2.1.2 Abspaltung der Schutzgruppen und des Peptids vom Harz

In diesem Schritt wurden die Schutzgruppen der Seitenketten und zugleich das NMTS-Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Peptid-Harz mit einem Abspaltungsmix aus 10 ml Trifluoressigsäure 99%, 0,75 g Phenol, 0,5 ml Thioanisol, 0,5 ml demineralisiertem Wasser und 0,25 ml Ethandithiol versetzt und für 2 h unter ständigem schütteln inkubiert. Die Mischung wurde durch eine Fritte in einen Glaskolben filtriert und das Harz zweimal mit je 5 ml Trifluoressigsäure 99% gewaschen. Anschließend wurde das Filtrat in drei gleiche Teile aufgeteilt und in 50 ml kaltem Diethylether gefällt, 10 min bei 4°C 4000 rpm zentrifugiert und der Rückstand lyophilisiert.

3.2.1.3 Aufreinigung des NMTS-Peptid mittels HPLC

Das Peptid wurde nach der Abspaltung vom Harz, sowie der Schutzgruppen über präparative RP-HPLC aufgereinigt. Säule: Vydac C18 2,5 cm x 25 cm; Flussrate: 25 mlmin⁻¹, Gradient: 100% A (H₂O/0,1%TFA) und 0% B (Acetonitril/0,1%TFA) auf 0% A und 100% B in 60 min. Die Fraktionen um den Hauptpeak nach ca. 10 min wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Identität des Peptids wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) bestimmt (NMTS (AML1B) 3298,7 [3296,8]).

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für diese Arbeit verwendet:

| Bezeichnung/Zelltyp | Bezugsquelle |
|---|-------------------------------|
| A549 / humane Alveolar Typ II Zelllinie | DSMZ Nr. ACC 107, Deutschland |
| BEAS-2B / humane Bronchialepithel Zelllinie | ATCC Nr. CRL-9609, USA |
| 16HBE14o- / humane Bronchialepithel Zelllinie | Prof. D. C. Gruenert* |
| HEK 293 / humane embryonale Nieren Zelllinie | ATCC Nr. CRL-1573, USA |
| Jurkat / humane T-Lymphozyten Zelllinie | DSMZ Nr. ACC 282, Deutschland |
| SAOS-2 / humane Osteosarkom Zelllinie | DSMZ Nr. ACC 243, Deutschland |

*Prof. D. C. Gruenert, University of Vermont, Burlington, USA

3.2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Die humanen Alveolar- und Bronchialepithelzelllinien A549, BEAS-2B und 16HBE14o- wurden in „Minimum Essential Medium“ (MEM) kultiviert. HEK293-Zellen wurden in DMEM kultiviert. Die humane T-Zelllinie Jurkat wurde in „Roswell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI) kultiviert. MEM, DMEM und RPMI wurden mit jeweils mit 10% und McCoy's 5A mit 15% Bovinem Serumalbumin (FBS) versetzt. Die adhärenenten Zelllinien A549, BEAS-2B, 16HBE14o-, HEK293 und SAOS-2 wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS frei von Calcium- und Magnesiumionen gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Ein Teil der gelösten Zellen wurde entnommen und frisches Medium zugefügt. Die Passagierung erfolgte maximal 20 Mal, um die Transfizierbarkeit der Zellen zu erhalten. Die Suspensionszellen Jurkat wurden ebenfalls alle 3-4 Tage passagiert und maximal bis zu 20 Passagen kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen resuspendiert, ein Teil der Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Transfektionen wurden die Zellen in den jeweiligen Medien mit Antibiotika-Zusatz (Penicillin/ Streptomycin 10U/ml; Gentamycin 50µg/ml) kultiviert.

3.2.3 Plasmid-DNA

3.2.3.1 Klonierung

Zur Klonierung der Konstrukte pEGFP-C1Bs1,2, pLUC-C1Bs1,2, pCubBILucS/MARBS2,2attB1,1 wurden die im Folgenden beschriebenen Standardmethoden verwendet. Durch enzymatischen Verdau von Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen wurden die DNA-Zielstrukturen (Rückgrat und Insert) generiert. Hierbei wurden jeweils die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur, Konzentration und Puffer angewendet. Anschließend wurden die DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt. Dazu wurden zwischen 0,8 und 1,5 g Agarose in 100 ml kochendem TAE-Puffer gelöst und das damit erhaltene 0,8%- bis 1,5%-ige Gel vor dem Erstarren mit 3 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Nach dem Erkalten und Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Referenz wurde zusätzlich stets ein entsprechender DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 Volt. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit einem NucleoSpin extract II Kit nach Protokoll des Herstellers. Bei der Mehrzahl der Restriktions-Endonukleasen entstehen beim Trennen der DNA kohäsive (*sticky*) 5'-Enden. Bei bestimmten Klonierungsstrategien ist es nötig, glatte (*blunt*) Enden zu erhalten, weshalb die überstehenden 5'-Enden durch eine enzymatische Reaktion aufgefüllt wurden. Hierfür wurde eine T4-Polymerase mit einem Mix an dNTPs nach Protokoll des Herstellers verwendet. Um die Zirkularisierung (*self-ligation*) des Plasmid-DNA-Rückgrats zu verhindern und die Klonierung des gewünschten DNA-Fragments zu ermöglichen, wurden ebenfalls in einer enzymatischen Reaktion die Phosphatgruppen von den Enden des DNA-Rückgrats entfernt. Hierfür wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Anschließend wurden die DNA-Zielstrukturen Insert und Rückgrat in einem molaren Verhältnis von 5:1 mittels T4-Ligase nach Protokoll des Herstellers miteinander verknüpft (*ligation*). Aus diesem 20 µl *ligation* Reaktionsansatz wurde 1 µl zur Transformation in DH10B *E. coli*-Bakterien (Invitrogen GmbH, Deutschland) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden bis zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotika-Resistenz für eine Stunde in Antibiotika-freiem LB Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten für 16-18 Stunden bei 37°C wurden einzelne Klone amplifiziert und die Plasmid-DNA wie unter **Abschnitt 2.2.3.2** „Amplifizierung und Aufreinigung“ beschrieben aufgereinigt. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch entsprechenden Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG, Deutschland durchgeführt. Um die Bindungsstellen 1 und 2 (Bs1 und 2) für die *PNA*s für sämtliche Klonierungen verwenden zu können wurden die DNA-Fragmente für die Bindungsstellen aus dem entsprechenden pGeneGrip site 1 oder site 2 cloning kit jeweils in die Multiple Cloning Site des pVAX1 Vektors kloniert. Es resultierten die Vektoren pVAX1Bs1 und pVAX1Bs2. Somit konnte die Bindungsstellen amplifiziert, isoliert und für die weiteren Klonierungen verwendet werden. Wichtig ist bei der Klonierung der Bindungsstellen zu beachten, dass diese einen Abstand von mindestens 300bp zur Expressionskassette besitzen.

3.2.3.2 Amplifizierung und Aufreinigung

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die jeweiligen Plasmid-DNA-tragenden *E. coli*-Klone gepickt und in 5 ml („Mini-Präp“) oder in 500 ml LB-Medium („Mega-Präp“) mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde aus den resultierenden *E. coli*-Kulturen unter Verwendung der Kits NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond PC 2000 EF durchgeführt. Anschließend wurde die erhaltene Plasmid-DNA in 50 µl oder 500 µl Wasser für Injektionszwecke gelöst und die

Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop 1000 bestimmt. Im Fall von pCLuc und pCpG-luc ccc wurde die in *E. coli* amplifizierte und aufreinite Plasmid-DNA von Plasmid Factory (PlasmidFactory GmbH, Deutschland) bezogen.

3.2.3.3 Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte

Im Folgenden sind schematisch die Expressionskassetten sowie wichtige spezifische Elemente der verwendeten Plasmid-DNA Konstrukte dargestellt. Die jeweiligen Plasmid-Rückrate bestehen aus den Elementen bakterieller Replikationsursprung und Selektionsmarker mit Promotor. Diese Elemente sind aber im Folgenden nicht näher dargestellt.

Für die Arbeit in **Kapitel 3** wurden folgende Plasmid-DNA Konstrukte verwendet:

pCLuc

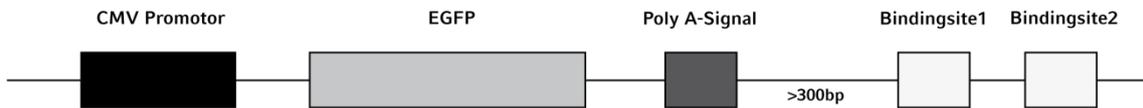


pCpG-luc



Für die Arbeit zu **Kapitel 4** wurden folgende Plasmid-DNA Konstrukte verwendet:

pEGFP-C1Bs1,2



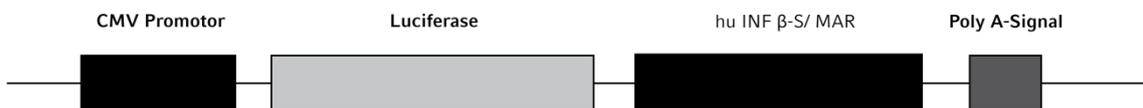
pLUC-C1Bs1,2



pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1



pEPI-luc



3.2.4 Modifikationen von Plasmid-DNA

3.2.4.1 Modifikation der Peptid-Nukleinsäuren (PNA) mit Fluoreszenzfarbstoffen und Bindung an Plasmid-DNA

Bei der Herstellung der Plasmid-DNA/PNA1/2-Fluorescein/AlexaFluor[®]568-Konstrukte wurden zuerst die PNA mit Fluorescein-NHS und AlexaFluor[®]568-NHS umgesetzt. Hierbei reagiert die primäre Amino-Gruppe der PNA mit der aktivierten Carbonsäure (NHS) der Fluoreszenzfarbstoffe zu einem stabilen Carbonsäureamid. Anschließend wurden die PNA1/2-

Fluorescein/AlexaFluor[®]568-Konjugate über die klonierten Bindungsstellen 1 und 2 (Bs1 und 2) an die Plasmid-DNA gebunden.

Für die Modifikation von pEGFP-C1Bs1,2 bzw. pLUC-C1Bs1,2 mit PNA1-Fluorescein und PNA2-AlexaFluor[®]568 wurden jeweils 100 pmol PNA1- bzw. PNA2 mit 500 pmol Fluorescein-NHS oder AlexaFluor[®]568-NHS in 10 µl Phosphatpuffer 20 mM bei pH 7,5 für 1 h bei Raumtemperatur (RT) umgesetzt. Anschließend wurden beide Reaktionsansätze zu je 5 pmol pEGFP-C1Bs1,2 bzw. pLUC-C1Bs1,2 in 10 µl Wasser für Injektionszwecke pipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Beide Ansätze wurden mittels NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt. Allerdings wurden hierfür die Säulen aus dem NucleoSpin Plasmid Kit verwendet, da diese eine wesentlich höhere Bindungskapazität aufweisen. Die Elution erfolgte mit 40 µl Wasser für Injektionszwecke mit anschließender DNA-Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 1000. Die Kontrolle der Bindung erfolgte über Agarosegelelektrophorese und anschließender Fluoreszenzdetektion (Diana II Geldokumentationssystem) sowie mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Axiovert 135) nach Transfektion.

3.2.4.2 Modifikation der Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) mit Peptiden

Bei der Herstellung der Plasmid-DNA/PNA1/2-SMCC-NMTS Konstrukte wurden die PNAs über einen bi-funktionalen Crosslinker Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat) mit der eNMTS bzw. NMTS gekoppelt. In einem ersten Schritt reagiert hierbei die aktivierte Carbonsäure (Sulfonsäure-N-Hydroxysuccinimide; sulfo-NHS) von Sulfo-SMCC mit der primären Aminogruppe der PNA. Nach darauffolgender Zugabe eines Überschusses an Peptid, reagiert dieses über die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins mit dem Maleimid des an die PNA gekoppelten SMCC. Anschließend wurden die PNA1/2-Fluorescein/AlexaFluor[®]568 Konjugate über die klonierten Bindungsstellen 1 und 2 (Bs1 und 2) an die Plasmid-DNA gebunden.

Für die Modifikation von pLUC-C1Bs1,2 und pCubBILucS/MARBs2,2attB1,1 mit PNA1- und PNA2-SMCC-eNMTS bzw. NMTS wurden 150 pmol PNA1 und

2 mit 12,1 pmol Sulfo-SMCC in 17 µl Phosphatpuffer 50 mM bei pH 7,5 für 30 min bei RT umgesetzt. Anschließend wurden sofort 6,4 µl einer 9,7 mM Lösung des *eNMTS* bzw. *NMTS*-Peptid in DMSO zugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden 3,8 pmol pEPICUBILucBs2,2attB1,1 bzw. 7,6 pmol pLUC-C1Bs1,2 und 5 µl DMSO zu einem Gesamtvolumen von 32 µl zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der Kopplungen erfolgte mittels NucleoSpin Extract II Kit. Allerdings wurden hierfür die Säulen aus dem NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Die Elution erfolgte mit 30 µl Wasser für Injektionszwecke mit anschließender DNA-Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 1000. Die Kontrolle der Bindung erfolgte über Agarosegelelektrophorese und anschließender Fluoreszenzdetektion an einem Diana II Geldokumentationssystem.

3.2.4.3 Modifikation von Plasmid-DNA mittels „Aziridine Labeling Reagenz“ (ALR) und Kopplung der Peptide

Mit Hilfe des „Aziridine Labeling Reagenz“ (ALR; N-[N'-(4-[(2-chloroethyl)-methylamino]-benzylamine)-3-aminopropyl]-N,N-dimethyl-aminopropylamine) Amin Reagenzes kann über eine Alkylierung der Nukleinsäure-Basen, überwiegend an Position N⁷ von Guanin-Basen (Belikova et al., 1967), ein primäres Amin eingeführt werden, wodurch eine simple Funktionalisierung von Plasmid-DNA möglich wird. Dieses Reagenz wurde im Folgenden verwendet um Plasmid-DNA mit Peptiden zu modifizieren. Hierbei wurde zunächst die Plasmid-DNA mit dem ALR Amin Reagenz umgesetzt und anschließend mit Hilfe eines bi-funktionalen Linkers Sulfo-SMCC das gewünschte Peptid über die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins gekoppelt.

Für die Kopplung von ALR Amin an Plasmid-DNA wurden jeweils 19,2 pmol Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Mengen an ALR Reagenz (23,2 pmol, 46,3 pmol, 92,6 pmol und 277,8 pmol) in 1 ml MOPS-Puffer (Morpholinopropansulfonsäure) 20 mM pH 7,5 für 1 h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Nach anschließender Ethanol-Präzipitation wurden

die modifizierten Plasmid-DNA/ALR-Konjugate in jeweils 40 µl Wasser für Injektionszwecke resuspendiert und die Konzentration mittels NanoDrop 1000 bestimmt. Zur Modifikation der Plasmid-DNA/ALR Konjugate mit den Peptiden (*NMTS*, *Y380A*, *Scrambled*) wurden je 7 pmol an Plasmid-DNA/ALR Konjugat mit 700 nmol Sulfo-SMCC in 35 µl Phosphatpuffer 50 mM pH 7,5 für 30 min bei RT inkubiert. Zügig erfolgte nun die Aufreinigung des Reaktionsansatzes mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits. Hierbei wurden allerdings die Säulen des NucleoSpin Plasmid Kit aufgrund der höheren Bindungskapazität verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde drei Mal mit je 600 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution der aktivierten Konjugate erfolgte nun mit 42 µl Wasser für Injektionszwecke. Sofort wurden 2,1 µl Phosphatpuffer 1 M pH 7,5, sowie 70 nmol Peptid gelöst in 26,9 µl DMSO zupipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei RT inkubiert und anschließend mittels NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt. Hierbei wurden wiederum die Säulen des NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde drei Mal mit 300 µl Bindungspuffer gewaschen, um ungebundenes Peptid vollständig zu entfernen. Die Elution je Konjugat erfolgte mit 40 µl Wasser für Injektionszwecke. Die erhaltenen Plasmid-DNA/ALR -SMCC Peptid Konjugate wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Peptide wurde mittels Agarosegelelektrophorese mit anschließender Fluoreszenzdetektion an einem Diana II Geldokumentationssystem überprüft. Die Quantitative Bestimmung der Kopplungsgrade erfolgte durch Fluoreszenzmessung der DNA-Konjugate in Phosphatpuffer 10 mM pH 8. Als Standard wurde Fluorescein verwendet. Durch die zusätzliche Messung der Plasmid-DNA Konzentration konnte der Kopplungsgrad der Plasmid-DNA/ALR-SMCC Peptid Konjugate ermittelt werden. Dieser betrug im Mittel 3-24 Mol Peptid pro Mol Plasmid-DNA ($F_{\text{Peptid}} = 3, 7, 10, 24$). Die Kopplung der Peptide an die Plasmid-DNA ergab einen linearen Zusammenhang (**Abb. 2.3**). Hieraus kann unter Einbeziehung der Anzahl an Nukleotiden die Menge an ALR Amin für einen beliebigen Kopplungsgrad innerhalb des linearen Bereichs abgelesen werden.

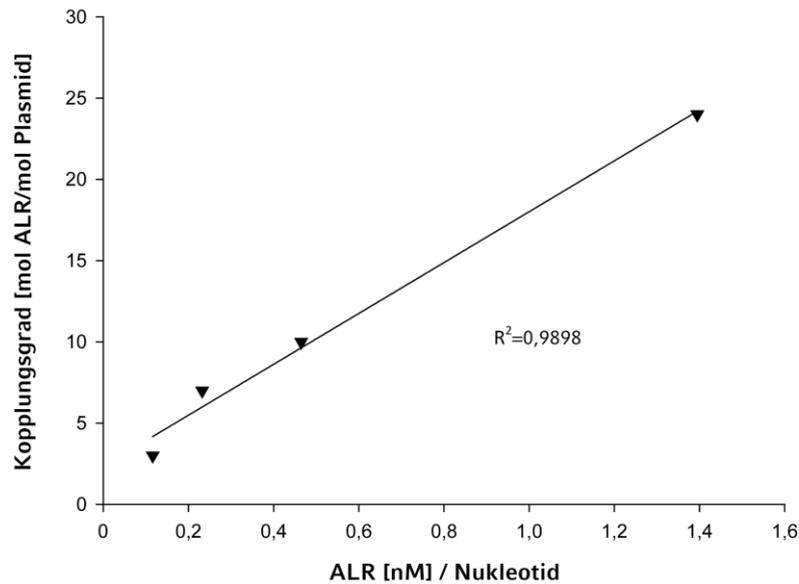


Abb. 2.3: Linearer Zusammenhang der Reaktion von Plasmid-DNA mit ALR Amin.

3.2.5 Synthese Prostaglandin I₂ modifizierter Konjugate

3.2.5.1 Synthese von Fluorescein-BSA-Iloprost (FLUO-BSA-ILO) oder Treprostinil (FLUO-BSA-TRP) Konjugaten

20 mg (0,3 µmol) BSA wurden in 2,5 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,5 verdünnt und mit einem zehnfach molaren Überschuss an Fluorescein-NHS vermischt. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung über einer mit PBS equilibrierten Sephadex G25 MPD-10-Säule (GE Health Care, Uppsala, Schweden) aufgereinigt. Entweder 0,7 mg (1,8 µmol) ILO oder 0,8 mg (1,8 µmol) TRP wurden in 130 µl Ethanol p.a. gelöst und mit 370 µl MOPS-Puffer 0,1 M pH 6 vermischt. 0,5 mg (5 mM) sulfo-NHS (in MOPS-Puffer) und 0,2 mg (2 mM) EDC (in MOPS-Puffer) wurden zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Danach wurden 5 µl (20 mM) DTT (in destilliertem Wasser) zugefügt und sofort 3 mg (45,2 nmol) FLUO-BSA in 190 µl und 210 µl Phosphatpuffer 0,5 M in die Reaktionsmischung pipettiert. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung auf einer mit PBS equilibrierten Sephadex G25 MPD-10-Säule gereinigt. Die BSA-

Mengen wurden quantitativ mit einem BioRad Proteinassay unter Verwendung einer BSA-Standardkurve bestimmt. Die Kopplungseffizienz der End- und Zwischenprodukte wurde durch einen TNBS-Assay (Snyder and Sobocinski, 1975) und die Messung der Absorption bei 495 nm bestimmt. Der Kopplungsgrad von BSA-ILO und BSA-TRP ergab sich als 10 Mol ILO bzw. TRP pro Mol BSA.

3.2.5.2 Synthese von PEI-graft-Iloprost (PEI-g-ILO) Konjugaten

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an EDC bei der Synthese von PEI-g-ILO, wurden unterschiedliche Kopplungsgrade erreicht. Hierzu wurde 1 mg (2,8 μ mol) ILO in 100 μ l Ethanol p.a. gelöst. Anschließend wurden 68 nmol PEI in 900 μ l HEPES-Puffer 0,1 M pH 7,4 und 1 mg (5 mM) sulfo-NHS beigemischt. Um die Reaktion zu starten wurden verschiedene Mengen an EDC, berechnet auf eine Endkonzentration von 25 mM, 50 mM, 60 mM bzw. 100 mM zugegeben und die Reaktionsmischung 4 h lang unter Rühren bei RT inkubiert. Die Reaktionsmischungen wurden über, mit destilliertem Wasser equilibrierten Sephadex G25 M PD-10-Säulen aufgereinigt. Die Konzentration an PEI wurde mit einem CuSO_4 -Test gemäß Ungaro *et al.* (Ungaro *et al.*, 2003) bestimmt. ^1H -1D-NMR-Spektren von PEI-g-ILO wurden in D_2O auf einem Brooker AV 250 MHz Spektrometer aufgezeichnet. Die Kopplungsgrade von PEI-g-ILO wurden durch Integration des breiten Multipletts von PEI ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) bei δ (1H) = 2,5 bis 3,1 ppm und des Singulett der endständigen Methylgruppe von ILO ($-\text{C}\equiv\text{C-CH}_3$) bei δ (1H) = 1,73 ppm berechnet. Die kovalente Konjugation von ILO an PEI führte zu vier verschiedenen Kopplungsgraden (F_{ILO} (Mol ILO/Mol PEI) = 2, 5, 8, 16). PEI-g-ILO Konjugate wurden in kleine Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.6 Inkubationsstudien mit BSA-Konjugaten

3.2.6.1 Inkubationsexperimente mit FLUO-BSA-ILO und FLUO-BSA-TRP

Die Rezeptor-Bindung bzw. -Aufnahme von FLUO-BSA-ILO wurde in A549-, H441-, 16HBE14o- und BEAS-2B-Zellen untersucht. Für die Durchflusszytometrie (FACS) wurden 24 Stunden vor Zugabe der Konjugate in einer 24-Wellplatte (TPP, Schweiz) 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Die FLUO-BSA-ILO, FLUO-BSA-TRP und FLUO-BSA-Konjugate wurden in MEM auf eine Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ verdünnt und die Zellen damit 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mittels FACS hinsichtlich Fluoreszenz analysiert.

3.2.6.2 Inhibitionsexperimente mittels Iloprost (ILO) und IP_1 -Rezeptorantagonist (CAY10449)

Die Inhibition der Rezeptor-Bindung bzw. -Aufnahme von FLUO-BSA-ILO wurde an 16HBE14o-Zellen untersucht. Hierzu wurden 24 h vor dem Experiment in einer 24-Wellplatte 1×10^5 Zellen je Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde CAY10449 in MEM-Medium in Konzentrationen von $15 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ und $150 \mu\text{M}$ verdünnt und für 15 min bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Danach wurden sofort FLUO-BSA-ILO und FLUO-BSA, berechnet auf eine Endkonzentration von 25 nM , zugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde die Inhibierung der Rezeptor-Bindung bzw. -Aufnahme mittels FACS untersucht.

3.2.7 Transfektion

3.2.7.1 Transfektion mit Lipofectamin

Für die Transfektion mit kationischen Lipiden wurde das kommerziell erhältliche Lipofectamin 2000 verwendet. Die Herstellung der Lipoplexe und

Durchführung der Lipofektion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA-Lipid Komplexe wurden in FBS-freiem Medium durch Inkubation für 20 min gebildet. Anschließend wurden die Komplexe auf die Zellen in FBS-freiem Medium gegeben. Nach 4 h wurde Antibiotika-haltiges Medium zugegeben. Bei Suspensionszellen wurde nach Inkubation der Lipoplexe von 4 h im serumfreien Medium einfach die entsprechende Menge an FBS und Antibiotika zugegeben.

3.2.7.2 Transfektion mit PEI bzw. PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

Zur Herstellung der PEI oder PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel wurden sowohl die benötigte Menge an Plasmid-DNA als auch die dafür je nach N/P-Verhältnis berechnete Menge an PEI bzw. PEI-g-ILO in gleichen Volumina Wasser für Injektionszwecke gelöst. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zur Polymerlösung pipettiert, mit dieser durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Die Konzentration der resultierenden Gen-Vektor-Nanopartikel berechnet auf die Plasmid-DNA in Wasser für Injektionszwecke betrug 20 µg pro ml für die *in vitro* und 125 µg pro ml für die *in vivo* Experimente.

Für die *in vitro* Transfektionen wurden 24 Stunden vor Durchführung der Experimente 1×10^5 Zellen pro Well in eine 24-Wellplatte ausgesät. Die Transfektionen erfolgten in 500 µl FBS-freiem Medium. Pro Well wurden PEI bzw. PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel berechnet auf 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und für 4 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch Antibiotika- und FBS-haltiges Medium ersetzt.

3.2.7.3 Transfektion mittels Nucleofektion

Transfektionen mittels Nucleofektion wurden mit dem Gerät Nucleofector II durchgeführt. Hierbei wurden 1×10^6 Zellen in 100 µl Nucleofectionsbuffer mit 2 µg Plasmid suspendiert. Die Nucleofektion wurde mit den jeweiligen

zellspezifischen Programmen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Antibiotika- und FBS-haltiges Medium gegeben.

3.2.8 Isolierung von DNA aus Jurkat-Zellen

Die Extraktion der Gesamt-DNA aus Jurkat-Zellen, bestehend aus genomischer DNA der Zellen und applizierter Plasmid-DNA, erfolgte mittels DNEasy® Blood & Tissue Kit. Die Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Eluiert wurde mit 100 µl Elutions-Puffer. Die quantitative Bestimmung der isolierten Gesamt-DNA wurde durch Messung der Absorption mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

3.2.9 Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase Verdau isolierter DNA

Mit der Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase ist es möglich selektiv lineare doppelsträngige DNA zu verdauen. Zirkuläre Plasmid-DNA bleibt hierbei unberührt. Für den Verdau wurden pro Ansatz 500 ng isolierte Gesamt-DNA (**siehe Abschnitt 2.2.8**) verwendet. Diese wurden je mit zwei Einheiten Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase, 1,3 mM ATP und Plasmid-Safe 10 x Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase für 30 min bei 70°C inaktiviert. Der Ansatz wurde anschließend direkt für die qRT-PCR (**siehe Abschnitt 2.2.10**) verwendet.

3.2.10 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die direkte Quantifizierung von DNA in Zellkulturmaterial vor (siehe Abschnitt 2.2.8) und nach (siehe Abschnitt 2.2.9) Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase Verdau erfolgte mittels qRT-PCR in einem iCycler IQ Real Time PCR Detection System. Die Quantifizierung des Luciferase-Gens erfolgte mit den spezifischen Primern FP Luciferase und RP Luciferase. Die Reaktionsansätze enthielten

jeweils 500 ng Zellisolat (*template*), je 0,25 µM Vorwärts und Rückwärtsprimer sowie zweifach KAPA SYBR FAST qPCR BioRad iCycler Mastermix in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die PCR-Reaktionen wurden mit einer initialen Denaturierung des *templates* bei 95°C für 3 min gestartet. Darauf folgten 40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die zyklische Denaturierung wurde ebenfalls bei 95°C für 20 sec durchgeführt. Das Annealing der Primer verlief bei der vorher ermittelten spezifischen Schmelztemperatur von 60°C über 20 sec. Der Elongationsschritt erfolgte bei 72°C für 20 sec. Die Zeit der Elongation richtet sich nach der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des PCR Produktes und wurde jeweils mit einer Minute pro 1000 Basenpaare berechnet. Die Quantifizierung der Menge erfolgte mittels Eichgerade, wobei das jeweilige Plasmid als Standard diente. Zur Auswertung wurde die iQ5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, Deutschland) verwendet.

3.2.11 DNA Freisetzungs-Assay

Für den DNA Freisetzungs-Assay wurden jeweils Gen-Vektor-Nanopartikel berechnet auf 100 ng Plasmid-DNA in 10 µl demineralisiertem Wasser mit 10 µg Heparansulfat versetzt. Heparansulfat ist ein negativ geladenes Molekül und verdrängt kompetitiv Plasmid-DNA aus dem DNA-Polymer-Komplex. Nach 45 min Inkubation bei RT wurde den Proben Auftragspuffer zugesetzt und diese im direkten Anschluss auf ein 0,8% Agarosegel mit 3 µg Ethidiumbromid aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 125 Volt Spannung in TAE-Puffer. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte im UV-Licht mittels DIANA II Geldokumentationssystem.

3.2.12 Messung von Luciferase- / β -Galaktosidase-Aktivität

Luciferase- und β -Galaktosidase-Expression wurden 24 und 72 Stunden nach der Transfektion gemessen. Im Falle von Langzeitversuchen wurde die

Luciferase Expression zu verschiedenen Zeitpunkten über mehrere Wochen nach Transfektion bestimmt. Für die Messungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 μ l Lysepuffer zugegeben und die Zellen für 10 min bei RT lysiert. Anschließend wurden jeweils 50 μ l des Lysats für die Luciferase- oder β -Galaktosidase Expressionsbestimmung und 5 μ l für die Proteinbestimmung mittels BioRad Protein-Assay verwendet. Die Bestimmungen wurden in einem Wallac Victor² / 1420 Multilabel Counter durchgeführt. Im Falle der Luciferase Bestimmung wurden pro Replikat automatisch 100 μ l Luciferase-Assay-Puffer (Surovoy et al., 1998) zugegeben und die daraus resultierende Lichtemission fünf oder zehn Sekunden lang vermessen. Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression wurde das BetaGal Reportergene Assay Kit verwendet. Alle Messwerte wurden stets auf den Proteingehalt des Replikats normalisiert.

3.2.13 Messung der cAMP-Freisetzung

Um die cAMP-Freisetzung nach Stimulation mittels PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel zu bestimmen, wurden 24 h vor der Untersuchung 1×10^4 Zellen pro Well in einer weißen 96-Well Platte (Perkin Elmer, USA) ausgesät. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well PEI (N/P 4), PEI-*g*-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel mit einer Konzentration von 2 ng/ μ l, berechnet auf die DNA, 0,21 pmol/ μ l ungebundenes ILO, äquivalent der Menge an gebundenem ILO in PEI-*g*-ILO für 15 min auf den Zellen inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung von cAMP mittels cAMP-GloTM Assay gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Messung der Lumineszenz wurde in einem Wallac Victor² / 1420 Multilabel Counter durchgeführt.

3.2.14 Messung der Ca²⁺-Freisetzung

Um die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation mittels PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel zu bestimmen, wurden 24 h vor der Untersuchung 5x10⁴ Zellen pro Well in einer schwarzen 96-Well Platte (Perkin Elmer, USA) ausgesät. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Behandlung der Zellen erfolgte nun gemäß Anleitung des Fluo-4NW Calcium-Assay Kit. Anschließend wurden pro Well PEI (N/P 4), PEI-g-ILO (F_{ILO}= 5, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel mit einer Konzentration von 2 ng/μl, berechnet auf die DNA, 0,21 pmol/μl ungebundenes ILO, äquivalent der Menge an gebundenem ILO in PEI-g-ILO, sowie ungebundenes ILO in einer 1000-fach höheren Konzentration (211 pmol/μl) für 30 Sekunden auf den Zellen inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz bei (Ex. 494 nm / Em. 516 nm) erfolgte in einem Wallac Victor² / 1420 Multilabel Counter. Als Positiv-Kontrolle wurden HEK 293-Zellen verwendet, welche mit 10 μM Carbachol je Well stimuliert worden waren.

3.2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Versuche auf Trägern mit 4 Kammern und 2,5x10⁴ Zellen pro Kammer von BD Falcon Culture (BD Biosciences San Jose, USA) durchgeführt. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0,33 μM DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) in PBS, und F-Actin mit AlexaFluor[®]568-Phalloidin nach Standardprotokollen des Herstellers angefärbt. Danach wurden die fixierten Zellen mit Vectashield[®] bedeckt und die Deckgläser fixiert. Aufnahmen wurden sowohl mit einem Axiovert 135 Epifluoreszenzmikroskop, als auch mit einem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop angefertigt. Die Digitalbilder wurden mit Image J 1.41n (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

3.2.16 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein FACScan Gerät bzw. ein BD FACSCanto II verwendet. Die Analysen wurden zur Detektion von Fluorescein-Fluoreszenz-Signalen durchgeführt. Mit der Bestimmung der Fluorescein-Fluoreszenz wurden die Bindung bzw. Aufnahme von BSA-Konjugaten bestimmt. Die Zellen wurden jeweils mit PBS gewaschen, trypsinisiert und für die Messungen in 500 µl PBS resuspendiert. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden jeweils durch die Parameter Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Angle Light Scatter*) für die Größe und Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Angle Light Scatter*) für die Granularität bestimmt. Die Fluoreszenz-Emission von Fluorescein wurde bei 530 nm detektiert. Pro Replikat wurden mindestens 2×10^3 Zellen analysiert. Für die Auswertung wurde die CellQuest 3.1 bzw. FACSDiva Software (BD GmbH, Deutschland) verwendet.

3.2.17 Messung der metabolischen Toxizität mittels MTT-Assay

Für die Bestimmung der metabolischen Toxizität nach Transfektion von 16HBE14o-Zellen mit PEI (N/P 4) und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) Gen-Vektor Nanopartikel, wurde ein MTT-Assay mit dem Cell Proliferation Kit I durchgeführt. Hierzu wurden 24 h vor Transfektion in einer 24-Wellplatte 8×10^4 Zellen je Well ausgesät. Anschließend wurde eine Transfektion wie unter **Abschnitt 2.2.7.2** beschrieben durchgeführt. Nach 4 Stunden wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 400 µl FBS-haltiges Medium ersetzt. Die Durchführung des MTT-Assay erfolgte anschließend gemäß der Vorschrift des Herstellers. Die Absorptionsmessung bei 600 nm erfolgte in einem Wallac Victor² / 1420 Multilabel Counter. Die Absorption von unbehandelten Zellen wurde als Referenzwert für 100% Viabilität verwendet.

3.2.18 Western-Blot-Analyse

Das membran-ständige IP₁-Rezeptorprotein wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden A549-, BEAS-2B- und 16HBE14o-Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 100 µl Zellysepuffer auf Eis für 30 min lysiert und durch Ultraschallbehandlung mit einem Digital Sonifier 250 weiter aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellysate durch Zentrifugation bei 19000 g und 4°C von ungelöstem Material abgetrennt. Nach Proteinbestimmung mittels BioRad Protein-Assay (BioRad laboratories GmbH, Deutschland) wurden je Zelllinie 40 µg Gesamtprotein in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend mittels Elektrophorese auf einem 7,5%-igen Tris/HCL Gel aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5%-iger Magermilch für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde der primäre polyklonale Hase-anti-human IP₁-Rezeptor Antikörper über Nacht bei 4°C mit einer Verdünnung von 1:500 in 0,5%-iger Magermilch inkubiert. Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Ziege-anti-Hase HRP-konjugierte Antikörper mit einer Verdünnung von 1:15000 in 0,5%-iger Magermilch für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz unter Verwendung eines Pierce Fast Western Blot Kit, ECL Substrat.

3.2.19 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die hydrodynamischen Durchmesser der Gen-Vektor-Nanopartikel und deren jeweilige Polydispersitätsindizes wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, dessen Messprinzip auf der Korrelation zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln im Medium und ihrer Größe basiert (Müller, 1996). Für die Untersuchungen wurde das Gerät „90 Plus Partikelgrößenmessgerät“ (BIC Brookhaven Inst. Corp., USA) verwendet. Dazu wurden jeweils 600 µl der hergestellten Gen-Vektor-Nanopartikel mit

einer Konzentration von 20 µg DNA / ml in einer Halb-Mikro-Küvette vermessen. Jede Probe wurde bei einer Messdauer von einer Minute fünf Mal vermessen. Die folgenden Einstellungen wurden verwendet: Viskosität von Wasser 0,89 cP; Temperatur 25°C; Ref-Index 1,330; Dielektrizitätskonstante 78,54.

3.2.20 Untersuchungen am Mausmodell

3.2.20.1 Versuchstiere

Weibliche BALB/c Mäuse wurden mit einem Alter von sechs bis acht Wochen von Charles River Laboratories (Germany) gekauft und unter speziellen Pathogen-freien Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden an die Umgebung der Tierversuchsanstalt über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen vor der Versuchsdurchführung akklimatisiert. Alle Tierversuche wurden vom lokalen Ethikkomitee genehmigt und kontrolliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.2.20.2 Aerosolapplikation von PEI und PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikeln

Für die Aerosolapplikation wurden pCpG-luc und PEI bzw. PEI-g-ILO $F_{ILO}=5$ jeweils in 4 ml Wasser für Injektionszwecke verdünnt, was zu Konzentrationen von 250 µg/ml pCpG-luc bzw. 130,4 µg/ml PEI oder PEI-g-ILO $F_{ILO}=5$, entsprechend einem N/P-Verhältnis von 4, führte. Die pCpG-luc Lösung wurde zu der PEI bzw. PEI-g-ILO Lösung pipettiert, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierenden Gen-Vektor-Nanopartikel wurden unter Verwendung einer PARI Turboboy N Kompressor mit einem PARI LC Plus Vernebler, der über einen Spacer mit einer vertikalen Ganzkörpervernebelungskammer verbunden war (Rudolph et al., 2005a), vernebelt. Der Spacer war mit 150 g Kieselgel bedeckt, um eine Verschiebung der Tröpfchengröße des Aerosols hin zu

kleineren und damit effektiveren Partikeln zu erreichen. In der Kammer aus Plexiglas befanden sich pro Gruppe fünf BALB/c Mäuse. Je 8 ml Gen-Vektor-Nanopartikel wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten vernebelt. Um die Atemfrequenz zu erhöhen, wurde ein synthetisches Luftgemisch (Linde AG, Deutschland) mit einem CO₂-Anteil von 4,5% und einer Flussrate von 5 Litern pro Minute verwendet.

3.2.20.3 *Messung der in vivo Luciferaseaktivität*

Die Luciferaseaktivität *in vivo* erfolgte 24 h nach Aerosolapplikation der PEI und PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel. Hierzu wurden die Mäuse durch Injektionsnarkose (i.p.-Injektion von Medetomidin 0,5 mg/kg; Midazolam (5 mg/kg); Fentanyl 50 µg/kg) betäubt und mittels *sniffing* 1,5 mg D-Luciferin in 50 µl PBS je Maus pulmonal appliziert (Buckley et al., 2008). Während der Verteilung des Luciferin in der Lunge wurden die Mäuse für 10 min bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt. Dabei wurden folgende Kammeraeinstellungen verwendet: Gesichtsfeld 10, High Resolution Binning und Belichtungszeit 10 Minuten. Anschließend wurde Blut entnommen und die Mäuse sofort durch Genickbruch getötet.

3.2.20.4 *Organentnahme und Aufbereitung*

Nach der Tötung der Mäuse wurde der Brustkorb durch zervikale Dislokation eröffnet. Durch Injektion isotonischer Kochsalzlösung in den rechten Vorhof des Herzen wurde die Lunge perfundiert um verbliebenes Blut aus den Organen zu entfernen. Anschließend wurden die Lungen entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mechanisch mittels Mörser und Pistill homogenisiert. Die Lungenhomogenisate wurden bis zur Lumineszenzbestimmung bei -80 °C gelagert.

3.2.20.5 *Messung der Luciferaseaktivität im homogenisierten Lungengewebe*

Für die Luciferaseaktivitätsbestimmung wurden circa 200 mg homogenisiertes Lungengewebe in 400 µl Lysepuffer für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zehn Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes für die Luciferasebestimmung verwendet. Nach Zugabe von 100 µl Luciferase-Assay Puffer wurde die Lumineszenz in einem Lumat LB9507 Röhrenluminometer bestimmt. Zur Quantifizierung der im Lungengewebe exprimierten Luciferase wurde eine Eichgerade mit rekombinanter Luciferase als Standard angefertigt.

3.2.20.6 *Blutentnahme und Aufbereitung*

Die Blutentnahme erfolgte vor Tötung der Mäuse in Narkose durch retroorbitale Punktion. Hierbei wurden je Maus circa 500 µl Blut entnommen. Sofort wurde in einem Haematologie-System KX-21 die Anzahl der Lymphozyten pro Mikroliter Blut bestimmt. Das restliche Blut wurde zur Gewinnung von Serum über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag bei 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und bei -80 °C bis zur Durchführung der ELISA gelagert.

3.2.21 **Zytokinbestimmung im Serum mittels ELISA**

Die quantitative Bestimmung der Zytokine Interferon- γ (INF- γ) und Interleukin-12 (IL-12) erfolgte aus dem Blutserum der Mäuse (**siehe Abschnitt 2.2.20.6**). Hierzu wurden die beiden Kits RayBio[®] Mouse IL-12 P40/P70 ELISA und RayBio[®] Mouse INF- γ ELISA (RayBiotech Inc., USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Unbehandelte Mäuse wurden als Referenz verwendet, indem die entsprechende Konzentration gleich 1 gesetzt wurden.

3.2.22 Statistik

Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Die Untersuchungen wurden, falls nicht anders angegeben, in drei bis fünf Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*; signifikant) sowie $p < 0,01$ (**; hoch signifikant) angenommen.

4 Prostaglandin I₂ Analoga als Zielfindungsstruktur für den nichtviralen Gentransfer in Lungenzellen

Prostacyclin gehört zur Klasse der Prostaglandine und ist als Prostaglandin I₂ (PGI₂) bekannt. Es adressiert und bindet den Prostacyclin (IP₁) Rezeptor. Dieser gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und konnte bereits in vielen Geweben/Organen einschließlich der Lunge nachgewiesen werden (Stitham et al., 2007, Narumiya et al., 1999, Coleman et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IP₁-Rezeptoragonisten über einen Clathrin-vermittelten Mechanismus zur endosomalen Internalisierung des Rezeptor/Agonist-Komplexes führt (Ferguson, 2001, Clark et al., 1999). Prostaglandin I₂ Analoga wie Iloprost (ILO) oder Treprostinil (TRP) besitzen eine wesentlich längere Halbwertszeit (30-60min) und werden bereits in der Klinik zur Therapie von pulmonalem arteriellem Hochdruck intravenös oder mittels Aerosol topisch verabreicht (**Abb. 3.1**) (Strauss and Edelman, 2007). Daher wurden in den folgenden Untersuchungen Prostaglandin I₂ Analoga für den Liganden vermittelten Gentransfer in die Lunge verwendet.

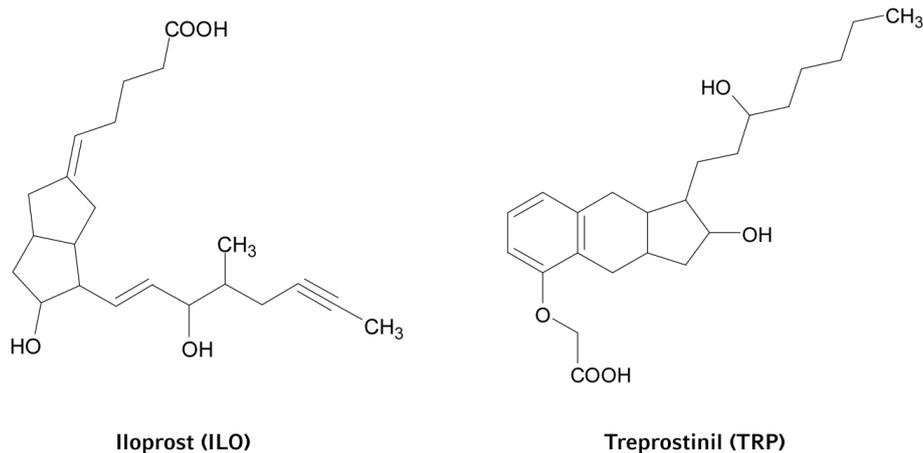


Abb. 3.1: Strukturformeln der Prostaglandin I₂-Analoga Iloprost (ILO) und Treprostinil (TRP)

4.1 Expression des IP₁-Rezeptor in Lungenzellen

Unbekannt war, von welchen Zelltypen der Lunge IP₁-Rezeptoren exprimiert werden. Daher wurde mittels Western-Blot-Analyse die Anwesenheit des IP₁-Rezeptor in menschlichen Alveolar (A549)- und Bronchial- (BEAS-2B, 16HBE14o-) Epithelzelllinien untersucht. Für den IP₁-Rezeptor konnte eine Proteinbande bei 67 kDa sowohl auf A549-Zellen als auch auf BEAS-2B- und 16HBE14o--Zellen detektiert werden (**Abb. 3.2**). Diese entspricht der aktiven glykosylierten Form des IP₁-Rezeptorproteins, welches, auf der Zellmembran vorhanden ist (Zhang et al., 2001). Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Aufgrund der Expression des IP₁-Rezeptors auf A549, BEAS-2B und 16HBE14o- Zellen wurde im Folgenden untersucht, ob die gezielte Ansteuerung dieses Rezeptors für die Zuführung von Proteinen oder Genen möglich ist.

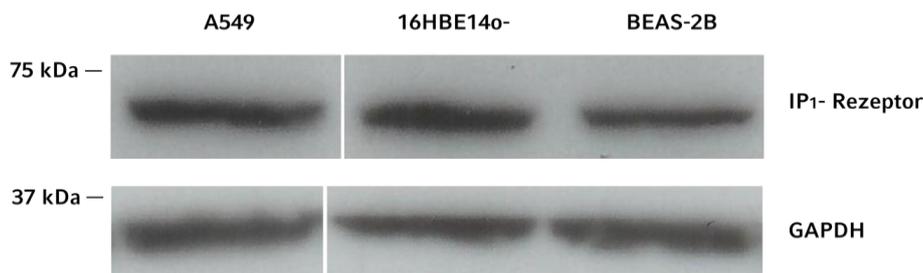


Abb. 3.2: Untersuchung der IP₁-Rezeptorexpression auf Alveolar (A549)- und Bronchial- (BEAS-2B, 16HBE14o-) Epithelzellen mittels Western Blot. Zelllysate von A549, 16HBE14o- und BEAS-2B Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte eine Proteinbande bei 67 kDa detektiert werden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH

4.2 Gezielte Ansteuerung von Lungenepithelzellen mit unterschiedlichen IP₁-Rezeptoragonisten

Um die Zielfindung zu IP₁-Rezeptoren für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer zu untersuchen, wurden die beiden Prostaglandin I₂ Analoga Iloprost (ILO) und Treprostinil (TRP) chemisch an Fluorescein-markiertes

Rinderserumalbumin (FLUO-BSA) gekoppelt. Die daraus resultierenden Konjugate, FLUO-BSA-ILO und FLUO-BSA-TRP wurden für Inkubationen auf Alveolar(A549)- und Bronchial- (16HBE14o-) Epithelzellen verwendet (Abb. 3.3).

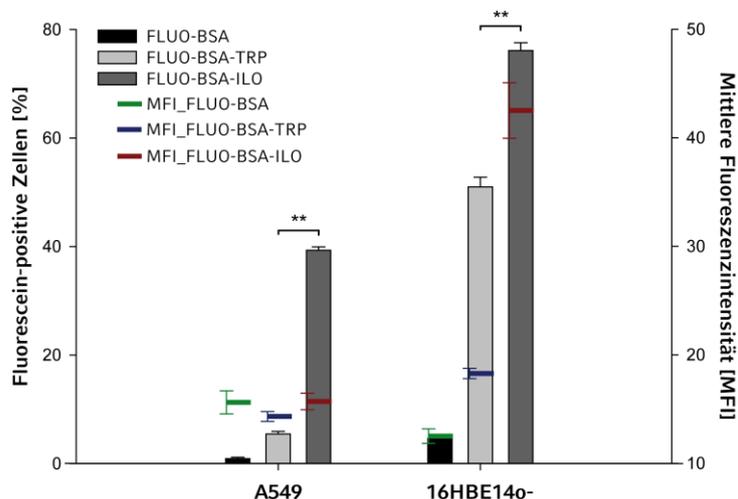


Abb. 3.3: Vergleich der Bindungsaffinität von Iloprost (ILO) und Treprostinin (TRP) mittels Durchflusszytometrie (FACS) nach Inkubation auf Alveolar (A549)- und Bronchial- (16HBE14o-) Epithelzellen. A549 und 16HBE14o- wurden mit je 0,5 μ M FLUO-BSA-ILO, FLUO-BSA-TRP und FLUO-BSA inkubiert. Die anschließende FACS-Analyse zeigte im Vergleich zu FLUO-BSA-TRP eine signifikant (** $p < 0,01$) höhere Bindung/Aufnahme von FLUO-BSA-ILO an/in beide Zelllinien. FLUO-BSA diente als Kontrolle und zeigte nur eine sehr schwache Bindung/Aufnahme.

Während die Inkubation von A549 und 16HBE14o- Zellen mit FLUO-BSA zu einer nur geringen unspezifischen Bindung führte, resultierte die Inkubation mit FLUO-BSA-TRP und FLUO-BSA-ILO in $5,5 \pm 0,5\%$ bzw. $39,3 \pm 0,6\%$ A549- und $51,0 \pm 1,8\%$ bzw. $76,1 \pm 1,4\%$ 16HBE14o- Fluorescein-positiven Zellen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von A549- und 16HBE14o- Zellen war nach Inkubation mit FLUO-BSA-ILO ebenso signifikant höher als nach Inkubation mit FLUO-BSA-TRP.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass ILO und TRP eine erfolgreiche Bindung/Aufnahme von FLUO-BSA an/in Lungenzellen vermitteln können,

dass aber ILO den effektiveren Zielfindungsligand darstellt. Für die weitere Charakterisierung wurde daher das FLUO-BSA-ILO Konjugat verwendet.

4.3 Spezifität der FLUO-BSA-ILO Bindung an verschiedenen Lungenzellen

Aufgrund des hohen Bindungspotentials des FLUO-BSA-ILO Konjugates, wurde dieses hinsichtlich der Zellbindung bzw. Aufnahme näher untersucht. Gleichmaßen wie in A549- und 16HBE14o- Zellen führte die Inkubation von H441- und BEAS-2B-Zellen mit FLUO-BSA-ILO im Vergleich mit FLUO-BSA zu einer signifikant ($p < 0,01$) höheren Anzahl an Fluorescein-positiven Zellen und MFI; $38,0 \pm 1,8\%$ bzw. $82,7 \pm 1,6\%$ gegenüber $9,1 \pm 1,9\%$ bzw. $13,7 \pm 1,2\%$ (Abb. 3.4).

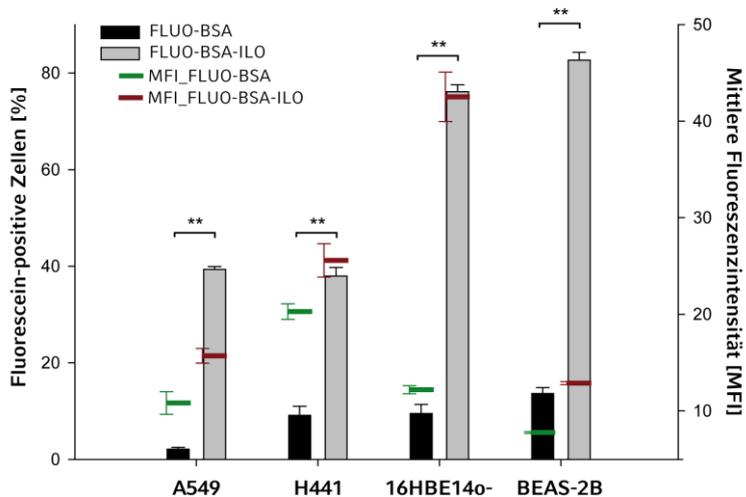


Abb. 3.4: Untersuchung der Bindungsaffinität von Iloprost (ILO) auf Alveolar- (A549), Bronchial- (BEAS-2B, 16HBE14o-) Epithelzellen und Clara (H441) Zellen. A549, BEAS-2B, 16HBE14o- und H441 wurden mit $0,5 \mu\text{M}$ FLUO-BSA-ILO inkubiert. In der anschließenden FACS-Messung ergab sich eine unterschiedlich starke Bindung/Aufnahme der Proteinkonjugate an/in die unterschiedlichen Zelltypen. Die Bindung/Aufnahme verglichen mit FLUO-BSA war bei jeder Zelllinie signifikant (** $p < 0,01$).

Anzumerken ist, dass die Bindung bzw. Aufnahme von FLUO-BSA-ILO deutlicher in Bronchialzellen stattfindet. Diese Ergebnisse weisen klar auf eine unterschiedliche Zelloberflächenexpression des IP₁-Rezeptors zwischen den einzelnen Zelllinien hin.

Um nun die Spezifität der Bindung von FLUO-BSA-ILO auf Lungenzellen zu bestätigen, wurden 16HBE14o- und A549-Zellen mit je 25 nM FLUO-BSA-ILO in Gegenwart unterschiedlicher Mengen eines selektiven und potenten Antagonisten (CAY10449) des humanen IP₁-Rezeptors (Clark et al., 2004, Bley et al., 2006) inkubiert (**Abb. 3.5 und 3.6**).

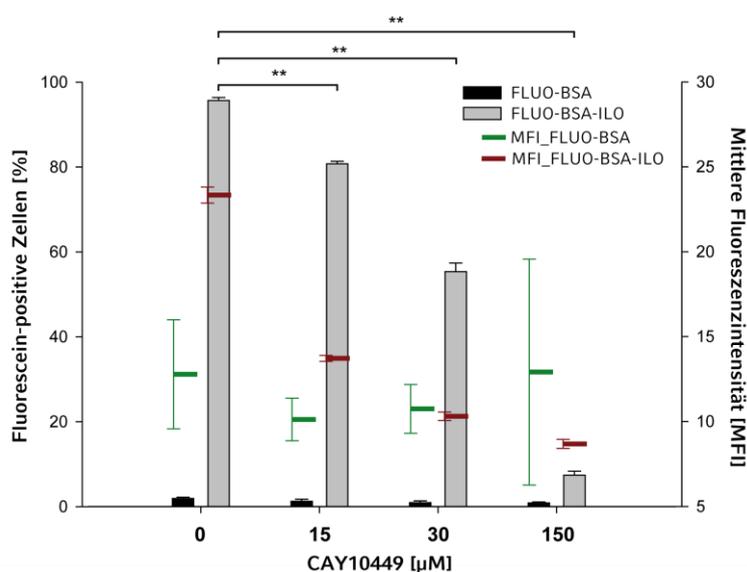


Abb. 3.5: Inhibierung der Bindung/Aufnahme von FITC-BSA-ILO mittels eines spezifischen Antagonisten CAY10449 an/in Bronchialepithelzellen (16HBE14o-). Inkubation von 16HBE14o- mit 25 nM FLUO-BSA-ILO in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Antagonist. Bei den FACS-Messungen war eine signifikante (**p<0,01) Reduktion der Bindung/Aufnahme von FLUO-BSA-ILO messbar.

Die Zugabe von CAY10449 führte zu einer signifikanten (p<0,01) Dosis-abhängigen Reduktion sowohl der Anzahl an Fluorescein-positiven Zellen als auch der MFI. Bei der höchsten Konzentration von CAY10449 nahm die Anzahl der Fluorescein-positiven Zellen in 16HBE14o- von 95,7 ± 0,7% auf 7,4 ± 0,9% und in A549 von 56,0 ± 3,7% auf 18,9 ± 2,7% ab. Außerdem war eine

deutliche Reduktion der MFI zu erkennen. Das FLUO-BSA-Konjugat wurde als Kontrolle verwendet und zeigte keinen auffälligen Anstieg oder Abfall der Fluorescein-positiven Zellen oder MFI bei Zugabe von CAY10449.

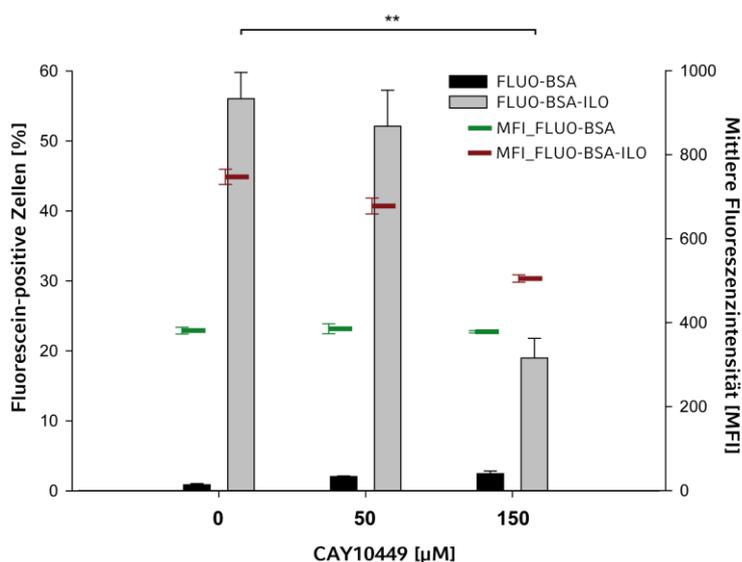


Abb. 3.6: Inhibierung der Bindung/Aufnahme von FITC-BSA-ILO mittels eines spezifischen Antagonisten CAY10449 an/in Alveolarepithelzellen (A549). Inkubation von 16HBE14o- mit 0,5 μM FLUO-BSA-ILO in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Antagonist. Bei den FACS-Messungen war eine signifikante (**p<0,01) Reduktion der Bindung/Aufnahme von FLUO-BSA-ILO messbar.

Eine signifikante Reduktion der Bindung bzw. Aufnahme von FLUO-BSA-ILO konnte auch in 16HBE14o- Zellen mit verschiedenen Überschüssen von unkonjugiertem ILO erzielt werden (**Abb. 3.7**).

Diese FACS-Untersuchungen deuten auf eine zelltypabhängige Zelloberflächenexpression von IP₁-Rezeptoren auf Lungenepithelzellen hin. Ungeklärt ist allerdings noch, ob ILO eine intrazelluläre Aufnahme von FLUO-BSA-ILO vermittelt. Um dies genauer zu untersuchen wurden 16HBE14o- Zellen entweder mit 0,5 μM FLUO-BSA oder FLUO-BSA-ILO inkubiert.

Bei der anschließend konfokalen Laserrastermikroskopie konnte eine klare Zelloberflächenbindung und anschließende intrazelluläre Aufnahme von FLUO-BSA-ILO gezeigt werden (**Abb. 3.8**). Wie erwartet konnte keine Zelloberflächenbindung oder Aufnahme mit FLUO-BSA beobachtet werden.

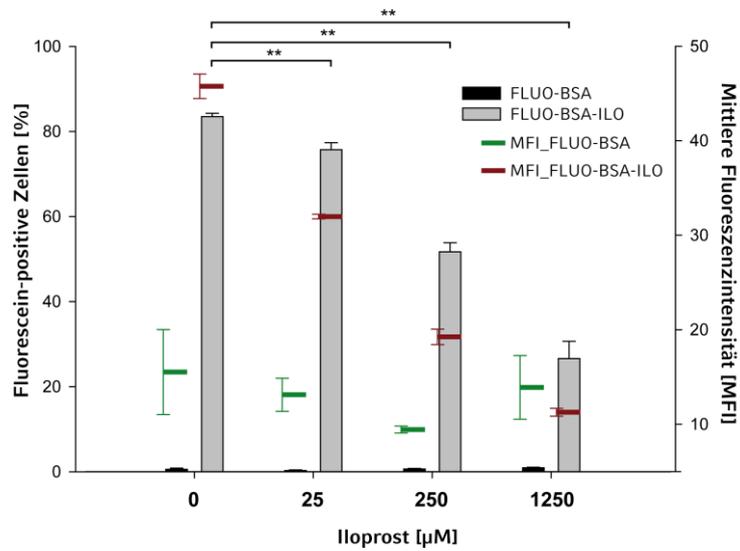
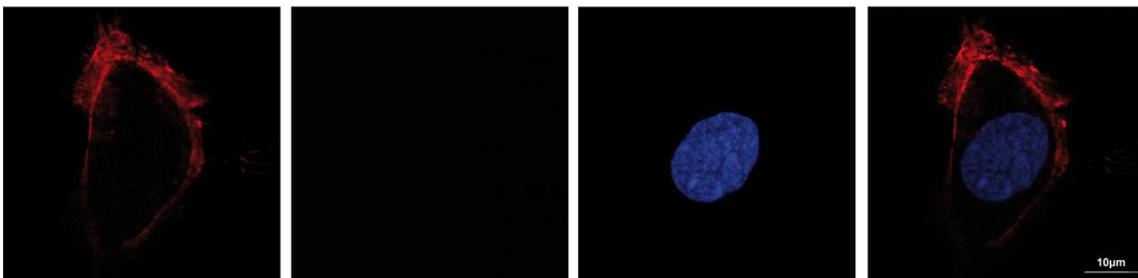


Abb. 3.7: Kompetitive Inhibierung der Bindung/Aufnahme von FITC-BSA-ILO mit freiem ILO an/in Bronchialepithelzellen (16HBE14o-). Inkubation von 16HBE14o- mit 25 nM FLUO-BSA-ILO in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an freiem ILO. Bei den FACS-Messungen war eine signifikante (** $p < 0,01$) Reduktion der Bindung/Aufnahme von FLUO-BSA-ILO messbar.

FLUO-BSA



FLUO-BSA-ILO

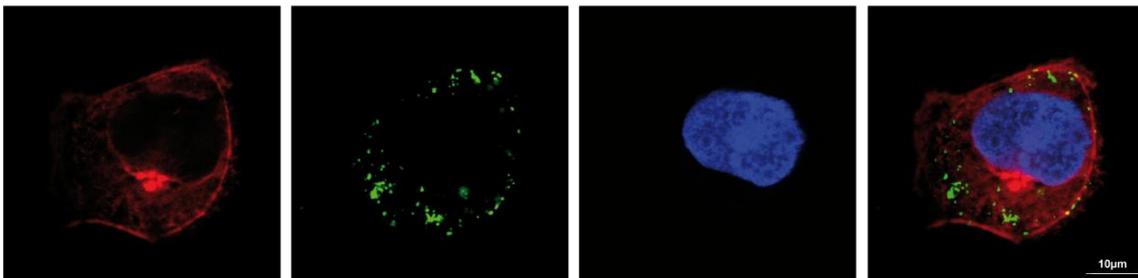


Abb. 3.8: Konfokale Laserrastermikroskopie Visualisierung der Bindung und Aufnahme von FLUO-BSA-ILO in Bronchialepithelzellen (16HBE14o-). 16HBE14o- Zellen wurden mit 0,5 µM FLUO-BSA-ILO inkubiert. Bei der anschließenden Konfokalmikroskopie konnte sowohl

eine Bindung an die Zelloberfläche, als auch eine vesikuläre Aufnahme ins Zytoplasma beobachtet werden. Die Kontrolle FLUO-BSA zeigte keinerlei Fluoreszenzsignal im grünen Kanal.

4.4 *In vitro* Transfektionsstudien mit PEI/BSA-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass negativ geladenes Serumalbumin an PEI/DNA-Nanopartikel adsorbiert werden kann und somit *in vitro* und *in vivo* zu einer Steigerung des Gentransfers führt (Di Gioia et al., 2008). Im Folgenden wurde daher versucht BSA-ILO an PEI/DNA(pCLuc)-Nanopartikel zu adsorbieren. Bei einem N/P-Verhältnis von 8 hergestellte PEI/DNA-Nanopartikel wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA oder BSA-ILO für 15 min inkubiert. Anschließend wurden damit 16HBE14o-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden konnte bei der PEI/DNA/BSA-ILO Gruppe bei 100 nM BSA-ILO eine signifikante ($p < 0,01$) maximale 6,5-fache Steigerung der Luciferaseaktivität gemessen werden (**Abb. 3.9**).

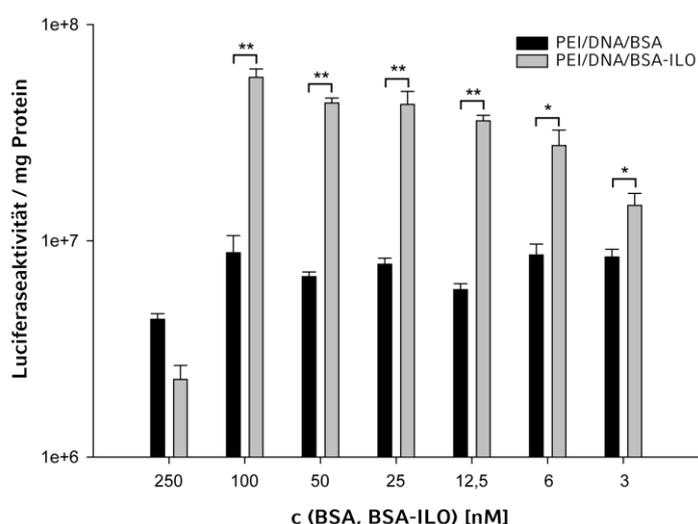


Abb. 3.9: Transfektion von Bronchialepithelzellen (16HBE14o-) mit PEI/DNA/BSO-ILO Nanopartikeln. PEI/DNA(pCLuc)-Nanopartikel wurden mit einem N/P-Verhältnis von 8 generiert. Anschließend wurde BSA und BSA-ILO in unterschiedliche Konzentrationen

zugegeben. 16HBE14o- Zellen wurden damit transfiziert und nach 24 Stunden die Luciferaseaktivität bestimmt. Bei 100 nM BSA-ILO konnte eine signifikante (**p<0,01) maximale 6,5-fache Steigerung der Luciferaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Messung der Partikelgrößen zeigte eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers analog der Menge an zugegebenem BSA-Konjugat von 63 nm bei 3nM BSA-ILO bis 160 nm bei 100nM (**Tab. 3.1**). Bei 250 nM BSA-Konjugat war eine Zunahme der Partikelgröße zu verzeichnen, was letztendlich zur Präzipitation der Partikel führte. Auf eine Partikelgrößenmessung der PEI/DNA/BSA-Nanopartikel wurde aufgrund des eindeutigen Transfektionsergebnisses verzichtet.

| | 250 nM | 100 nM | 50 nM | 25 nM | 12,5 nM | 6 nM | 3 nM |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| PEI/DNA | 2622±378 | 160±1 | 122±1 | 105±3 | 84±24 | 70±6 | 63±6 |
| /BSA-ILO | (0.14±0.07) | (0.14±0.02) | (0.28±0.01) | (0.17±0.03) | (0.48±0.24) | (0.2±0.1) | (0.22±0.09) |

Tab. 3.1: Partikelgrößenmessung der PEI/DNA(pCLuc)/BSA-ILO Nanopartikel mittels PCS. Dargestellt sind Mittelwert des Hydrodynamischen Durchmessers, sowie Polydispersität ± Standardfehler.

4.5 Charakterisierung der PEI und PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

Die kovalente Bindung von ILO an PEI erfolgte über eine Aktivierung der Carbonsäure von ILO mittels EDC/Sulfo-NHS. Dabei wird ein reaktives Intermediat erzeugt, welches effektiv und nahezu selektiv mit primären Aminen zu einem Carbonsäureamid kondensiert. Die aufgereinigten PEI-*g*-ILO Konjugate zeigten Kopplungsgrade von 2, 5, 8 und 16 Mol ILO pro Mol PEI ($F_{ILO} = 2, 5, 8, 16$). Nach Formulierung der PEI und PEI-*g*-ILO Gen-Vektor Nanopartikel bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen wurde der hydrodynamische Durchmesser mittels PCS bestimmt (**Tab. 3.2**). Gen-Vektor Nanopartikel mit einem Konjugationsgrad von $F_{ILO} = 2$ sowie 5 und einem N/P-Verhältnis von 4 bis 8 zeigten hydrodynamische Durchmesser von 50 nm bis

100 nm, vergleichbar mit PEI Gen-Vektor Nanopartikeln. Partikel, die mit PEI bei N/P 2, PEI-g-ILO $F_{ILO}=2$ bei N/P 2 bis 3 und $F_{ILO}=16$ bei N/P 4 hergestellt wurden, bildeten Aggregate und präzipitierten. Gen-Vektor Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser < 150 nm wiesen Polydispersitäten von $< 0,2$ auf.

| | N/P 2 | N/P 3 | N/P 4 | N/P 5 | N/P 6 | N/P 8 |
|--------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| PEI | 1258±787 (0.34±0.04) | 69±11 (0.15±0.03) | 61±10 (0.17±0.01) | 60±11 (0.19±0.02) | 53±8 (0.16±0.05) | 51±3 (0.14±0.01) |
| $F_{ILO}=2$ | 1197±1729 (0.37±0.23) | 604±804 (0.25±0.13) | 97±20 (0.17±0.07) | 77±19 (0.15±0.03) | 73±17 (0.15±0.08) | 70±17 (0.16±0.05) |
| $F_{ILO}=5$ | 149±16 (0.17±0.04) | 169±35 (0.10±0.02) | 82±4 (0.11±0.03) | 75±15 (0.13±0.02) | 74±11 (0.13±0.01) | 76±16 (0.14±0.04) |
| $F_{ILO}=8$ | 207±137 (0.19±0.10) | 366±31 (0.25±0.06) | 261±13 (0.12±0.03) | 165±43 (0.08±0.04) | 106±7 (0.08±0.01) | 87±12 (0.12±0.03) |
| $F_{ILO}=16$ | 141±26 (0.18±0.02) | 292±73 (0.22±0.05) | 2314±946 (0.26±0.14) | 418±156 (0.17±0.13) | 258±61 (0.12±0.03) | 213±48 (0.08±0.02) |

Tab. 3.2: Partikelgrößenmessung der PEI und PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikel in Abhängigkeit vom Konjugationsgrad und N/P-Verhältnis mittels PCS. Dargestellt sind Mittelwert des Hydrodynamischen Durchmessers, sowie Polydispersität \pm Standardabweichung.

Um den Einfluss des Liganden auf die Bindungsstärke zu untersuchen, wurden PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO}=2, 5, 8, 16$) Gen-Vektor Partikel mit einem N/P-Verhältnis von 4 hergestellt. Nach Zugabe und Inkubation von Heparansulfat wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (**Abb. 3.10**). Für PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO}=2$ und 5) war nach Zugabe von Heparansulfat eine vollständige Freisetzung der DNA sichtbar. Bei den PEI-g-ILO Konjugaten mit einem Kopplungsgrad von $F_{ILO}=8$ sowie 16 konnte entweder keine oder eine nur teilweise Freisetzung der DNA beobachtet werden. Die Bindungsstärke scheint bei einem höheren Konjugationsgrad von $F_{ILO}=16$ wieder abzunehmen. Dies lässt sich bei Betrachtung der in Tabelle 1 dargestellten Partikelgrößen erklären. Hier ist eine Zunahme des hydrodynamischen Partikeldurchmessers auf 2,314 μm zu erkennen. Dies ist auf eine Aggregation der PEI-g-ILO ($F_{ILO}=16$) Gen-Vektor Nanopartikel zurückzuführen, was möglicherweise zu

einem veränderten DNA-Bindungsverhalten und einer erhöhten Freisetzung der DNA führt.

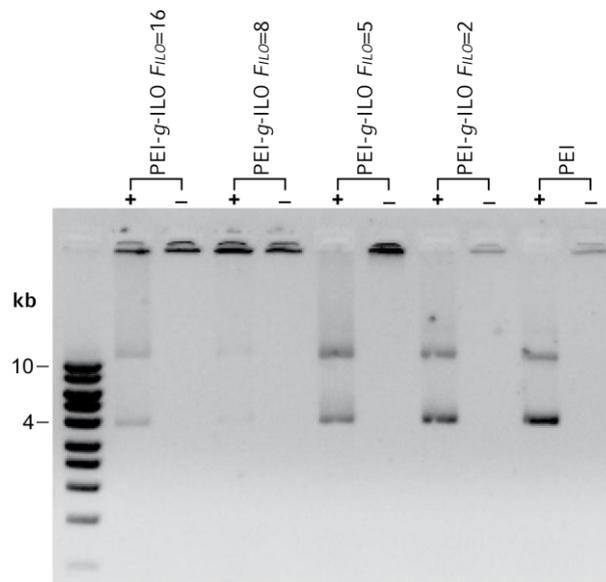


Abb. 3.10: DNA Freisetzungs-Assay aus PEI-*g*-ILO Gen-Vektor Nanopartikel mit unterschiedlichen Konjugationsgraden $F_{ILO}=2-16$ bei einem N/P-Verhältnis von 4. Polyplexe mit pCMV-luc wurden mit (+) oder ohne (-) Heparansulfat inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach Ethidiumbromidfärbung konnte in der anschließenden Detektion im UV-Licht eine vollständige Freisetzung der DNA aus dem Polyplex bei den Konjugationsgraden $F_{ILO}=2$ und 4 beobachtet werden.

4.6 *In vitro* Transfektionsstudien mit PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

Die erhöhte Bindung und Aufnahme von FLUO-BSA-ILO Partikel in verschiedene Lungenzellen, die Steigerung der Transgenexpression durch Adsorption von BSA-ILO an PEI Gen-Vektor Nanopartikel und die gute Partikelcharakteristik waren Anlass, ILO als Liganden für den Gentransfer *in vitro* näher zu untersuchen und zu optimieren. Dazu wurden 16HBE14o-Zellen mit unterschiedlichen PEI-*g*-ILO Gen-Vektorpartikeln $F_{ILO}=2, 5, 8, 16$ bei verschiedenen N/P-Verhältnissen transfiziert und mit unmodifiziertem PEI als Kontrolle verglichen (**Abb. 3.11**). Die Gentransfereffizienz nahm dabei mit steigendem N/P-Verhältnis zu. Die höchste Transgenexpression fand sich bei

einem Kopplungsgrad von $F_{ILO}=5$ bei N/P 4. Unter diesen optimierten Bedingungen war die Luciferaseaktivität signifikant 46-fach höher im Vergleich zu PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln bei N/P 4. Die Partikelbildung bei höheren N/P-Verhältnissen (> 4) führte zu keiner weiteren Steigerung der Transgenexpression. PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel mit anderen Kopplungsgraden führten entweder zu geringerer oder vergleichbarer Transgenexpression wie PEI Gen-Vektor Nanopartikel.

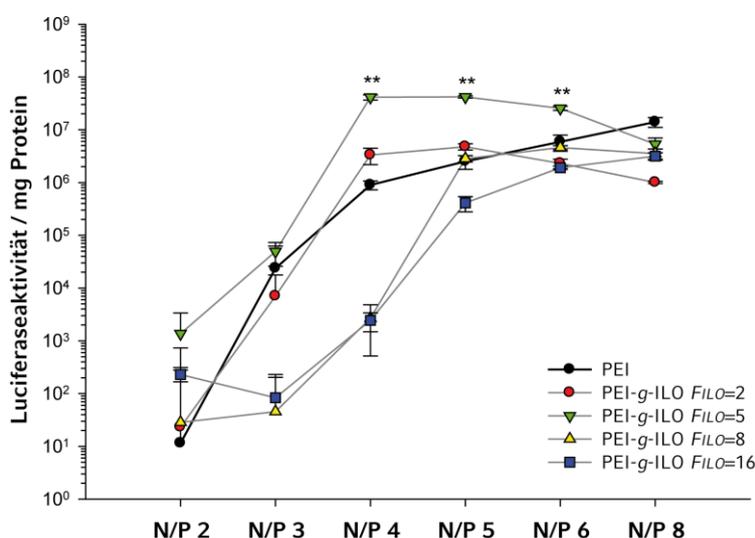


Abb. 3.11: Transfektionseffizienz von PEI-*g*-ILO Gen-Vektor Nanopartikeln bei unterschiedlichen Konjugationsgraden und N/P-Verhältnissen. Transfektion von 16HBE14o- Zellen mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=2-16$) Gen-Vektor Nanopartikeln mit N/P-Verhältnissen von 2-8. Ein signifikanter (** $p<0,01$) Anstieg der Luciferaseaktivität ergab sich bei einem Konjugationsgrad von $F_{ILO}=5$ und einem N/P-Verhältnis von 4.

Um die Spezifität des Rezeptor-vermittelten Gentransfer von PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikeln auf Lungenzellen zu überprüfen, wurden Inhibierungsexperimente mit CAY10449, ähnlich der Inhibierung von FLUO-BSA-ILO (**Abschnitt 3.1.3**), durchgeführt. Hierzu wurden 16HBE14o- Zellen entweder mit PEI oder PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor-Nanopartikeln mit einem N/P-Verhältnis von 4 in Abwesenheit oder Gegenwart von 150 μ M CAY10449 transfiziert (**Abb. 3.12**). Die mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor-Nanopartikeln

beobachtete Transgenexpression war signifikant ($p < 0,01$) 33-fach gegenüber PEI reduziert. Wichtig ist ebenfalls, dass CAY10449 auf den mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln transfizierten Zellen keinerlei Auswirkungen auf die Transgenexpression zeigte.

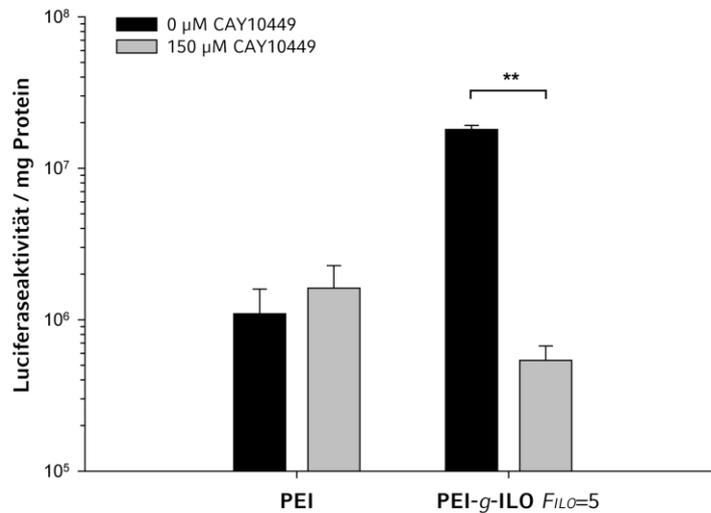


Abb. 3.12: Inhibierung der Transfektion von PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikel mittels spezifischem IP_1 -Rezeptorantagonisten CAY10449. 16HBE14o- Zellen wurden in Anwesenheit von 150 μM CAY10449 mit PEI-g-ILO $FILO=5$ Gen-Vektor Nanopartikel bei einem N/P-Verhältnis von 4 transfiziert. Die Steigerung Transgenexpression mit PEI-g-ILO $FILO=5$ Gen-Vektor Nanopartikel konnte signifikant (** $p < 0,01$) durch Zugabe von CAY10449 auf die Werte von unkonjugiertem PEI reduziert werden.

Desweiteren wurden A549- und BEAS-2B-Zellen mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor-Nanopartikel transfiziert (**Abb. 3.13**). Bei optimierten Bedingungen war die vermittelte Transgenexpression gegenüber PEI signifikant 14 bis 45-fach höher.

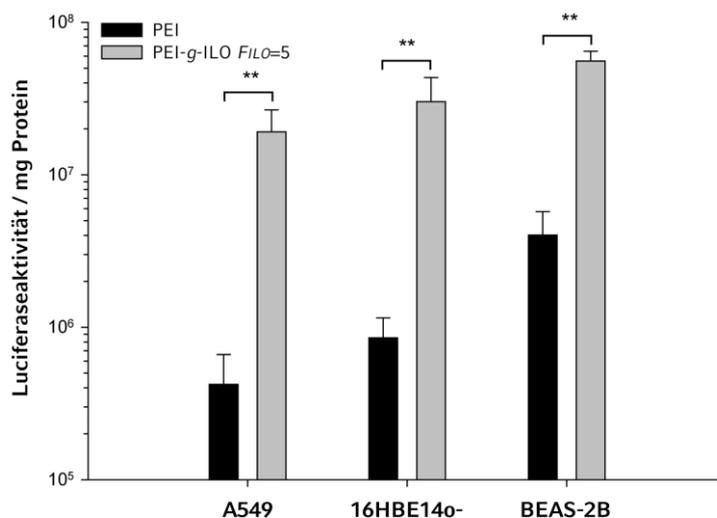


Abb. 3.13: Transfektionseffizienz von PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln mit einem N/P-Verhältnis von 4 in Alveolar- (A549) und Bronchial- (16HBE14o-, BEAS-2B) Epithelzellen. A549, 16HBE14o- und BEAS-2B Zellen wurden mit PEI-*g*-ILO $F_{ILO}=5$ Genvektornanopartikeln bei einem N/P-Verhältnis von 4 transfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität 24 Stunden post Transfektion resultierte in allen Zelllinien in einem bis zu 45-fach signifikanten (** $p < 0,01$) Anstieg, verglichen mit PEI Gen-Vektor Nanopartikeln.

Aufgrund der enormen Steigerung der Transgenexpression sollte nun untersucht werden, ob eine Dosis-Reduktion möglich ist. 16HBE14o- Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor-Nanopartikeln transfiziert (**Abb. 3.14**). Dabei variierte die DNA-Menge von 1 μ g bis 250 ng pro Well und es konnte beobachtet werden, dass mit der halben Menge an DNA und Polymer eine vergleichbare Luciferaseaktivität zu PEI Gen-Vektor-Nanopartikel erzielt werden konnte ($3.3 \cdot 10^5$ vs. $3.2 \cdot 10^5$ Luciferaseaktivität / mg Protein).

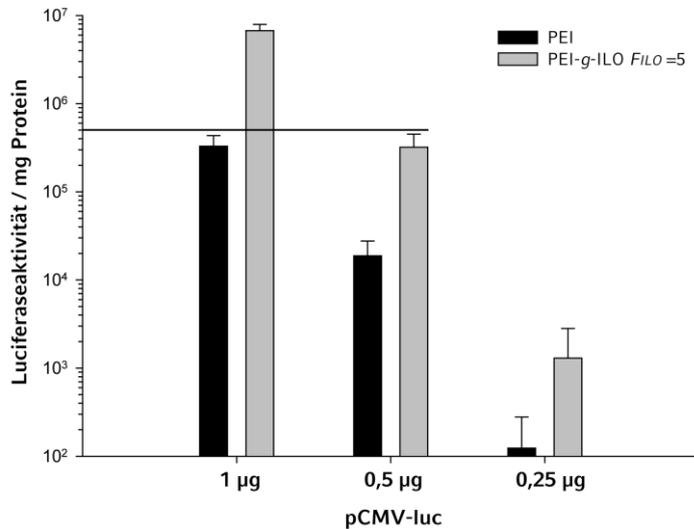


Abb. 3.14: Dosis-Wirkungsbeziehung von PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln in 16HBE14o- Zellen. 16HBE14o- Zellen wurden mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln bei einem N/P-Verhältnis von 4 transfiziert. Dabei wurde die Menge an Polyplexen, gemessen an der Menge Plasmid-DNA (pCMV-luc) von 1 µg auf 0,25 µg reduziert. Die Messung der Luciferaseaktivität 24 Stunden post Transfektion zeigte, dass durch den Einsatz von ILO als Zielfindungsligand die Menge an Plasmid-DNA und somit auch an Polymer um 50 Prozent reduziert werden konnte, ohne Einbußen bei der Transfektionseffizienz zu erleiden.

4.7 *In vitro* Signaltransduktionsstudien nach Transfektion mit PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

Es konnte unter **Abschnitt 3.1.7** gezeigt werden, dass die Steigerung des Gentransfers in Lungenzellen über die Bindung an den IP_1 -Rezeptor verläuft. Für diesen Rezeptor ist eine Kopplung hauptsächlich über G_s -oder G_i -Proteine beschrieben (Olschewski et al., 2004, Bos et al., 2004). Dies führt entweder zu einer Stimulation oder Inhibition der Adenylatcyclase und damit zu einem Anstieg oder einer Abnahme der cAMP-Konzentration im Zytoplasma. Nach Zugabe von PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor-Nanopartikeln zu A549-, 16HBE14o- und BEAS-2B-Zellen wurde zunächst die cAMP-Freisetzung mittels cAMP-GloTM-Assay gemessen (**Abb. 3.15**).

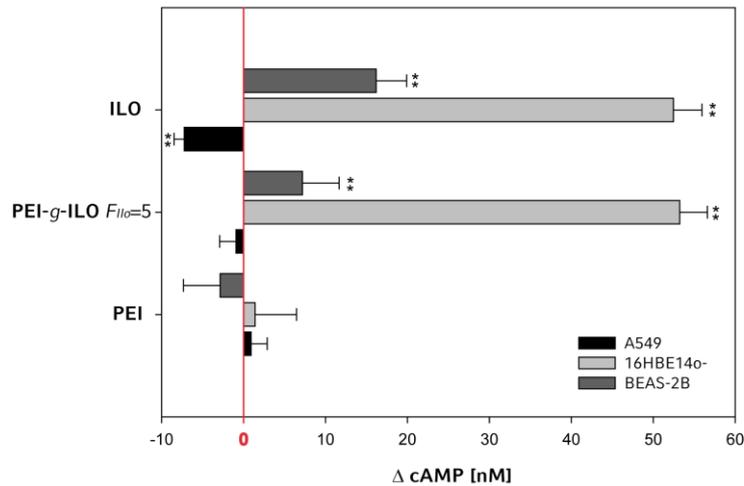


Abb. 3.15: Freisetzung von cAMP nach Inkubation von Alveolar- (A549) und Bronchial- (16HBE14o-, BEAS-2B) Epithelzellen mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln bei einem N/P-Verhältnis von 4. A549, 16HBE14o- und BEAS-2B Zellen wurden mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln (N/P-Verhältnis 4) inkubiert. Ein signifikanter (** $p<0,01$) Effekt, vergleichbar mit der gleichen Menge an freiem ILO konnte bei 16HBE14o- und BEAS-2B, verglichen mit unmodifizierten PEI Gen-Vektor Nanopartikeln beobachtet werden.

Zusätzlich wurde ungebundenes ILO in Mengen äquivalent zu dem an PEI-g-ILO gebundenem auf die Zellen inkubiert. 16HBE14o-Zellen zeigten nach Zugabe von PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel und freiem ILO einen 53-fach signifikanten ($p<0,01$) Anstieg der cAMP-Konzentration verglichen mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln (53.2 ± 3.4 nM und 52.5 ± 3.5 nM vs. 1.4 ± 5.0 nM). In BEAS-2B-Zellen konnte ebenfalls eine signifikante ($p<0,01$) Erhöhung von cAMP mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln und ungebundenem ILO (7.2 ± 4.5 nM und 16.3 ± 2.7 nM) gegenüber PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln (-2.8 ± 4.5 nM) nachgewiesen werden. In A549-Zellen war eine erniedrigte cAMP-Konzentrationen nur nach Zugabe von ungebundenem ILO (-7.2 ± 1.2 nM) im Vergleich zu PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) und PEI (N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln messbar. Desweiteren war durch Zugabe von ungebundenem ILO nur in A549- und BEAS-2B-Zellen eine signifikante ($p<0,01$) Erhöhung oder Abnahme der

cAMP-Konzentration verglichen mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln aufgetreten.

Ebenfalls ist in der Literatur eine Kopplung des IP_1 -Rezeptors über G_q Proteine beschrieben (Bos et al., 2004), was letztendlich zu einer Ca^{2+} -Freisetzung im Zytoplasma führt. Um eine Ca^{2+} -Freisetzung nach Zugabe von PEI (N/P 4) bzw. PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel zu untersuchen, wurden A549-, 16HBE14o- und BEAS-2B Zellen analog dem cAMP-Assay inkubiert (**Abb. 3.16**). Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Ca^{2+} -Messung dienten HEK293 Zellen, die mit Carbachol stimuliert wurden. Keine der Zelllinien zeigte nach Zugabe der Gen-Vektor-Nanopartikel oder ungebundenem ILO in äquimolarer Menge einen Ca^{2+} -Anstieg. Auch ein 1000-facher Überschuss an ungebundenem ILO hatte keine Ca^{2+} -Freisetzung zur Folge. Bei der Stimulation von HEK293 Zellen mit Carbachol ergab sich allerdings ein signifikanter Anstieg der Ca^{2+} -Freisetzung (Fluoreszenzintensität/1sec 5307 ± 2225 auf 14320 ± 1562 ; nicht gezeigt).

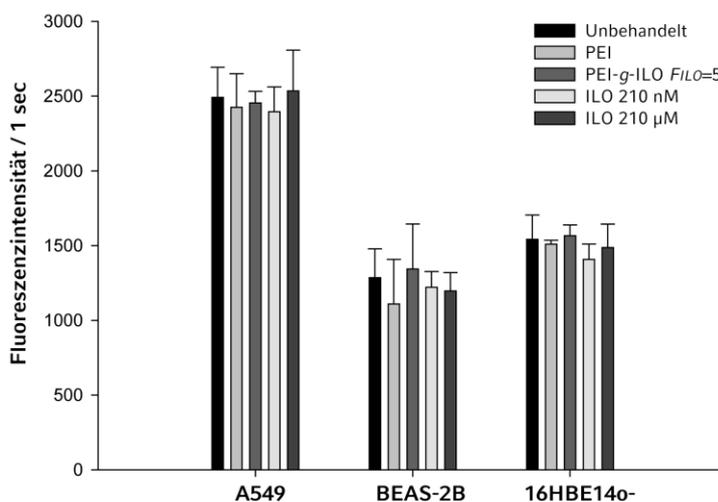


Abb. 3.16: Freisetzung von Ca^{2+} nach Inkubation von Alveolar- (A549) und Bronchial- (16HBE14o-, BEAS-2B) Epithelzellen mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln bei einem N/P-Verhältnis von 4. A549, 16HBE14o- und BEAS-2B Zellen wurden mit PEI-g-ILO ($F_{ILO}=5$) Gen-Vektor Nanopartikeln (N/P-Verhältnis 4) inkubiert. Allerdings konnte in keiner Zelllinie ein Anstieg der Ca^{2+} -Ausschüttung gemessen werden. Auch freies ILO mit einem bis zu 1000-fach molaren Überschuss hatte keinen Effekt.

4.8 Untersuchungen zum *in vivo* Gentransfer mittels Aerosolapplikation

Die physikalische Integrität der vernebelten DNA ist eine entscheidende Voraussetzung um biologische Aktivität, d.h. Transgenexpression zu erzielen. Aus diesem Grund sollte zunächst die Stabilität der PEI Gen-Vektor-Partikel untersucht werden. Überprüft werden sollte, ob PEI in der Lage ist bei einem N/P Verhältnis von 4, DNA effizient vor den Scherkräften, die bei der Verneblung auftreten, zu schützen. Die Integrität wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese Transfektion sowie Partikelgrößenmessung überprüft. PEI Gen-Vektor-Nanopartikel wurden mit einem N/P Verhältnis von 4 in destilliertem Wasser generiert. Bevor die Partikel vernebelt wurden, wurde eine nicht vernebelte Fraktion entnommen. Die restliche Lösung wurde mit einem PARI Boy vernebelt. Die vernebelte Fraktion wurde gesammelt und die DNA-Konzentration mittels UV/VIS bestimmt. Auch von der im Reservoir zurückgebliebenen Fraktion wurde die Konzentration bestimmt. Alle Fraktionen, nicht vernebelt, vernebelt und vernebelt zurückgeblieben, wiesen die gleiche Konzentration an pCpG-luc von circa 125 ng/µl auf. Somit konnte eine Aufkonzentrierung der Polyplexe während des Verneblungsprozesses ausgeschlossen werden. In **Abbildung 3.17** ist der Einfluss der Verneblung auf die Stabilität der Gen-Vektor-Nanopartikel gezeigt. Hier ist deutlich sichtbar, dass die Partikel dem Verneblungsprozess standhielten. Auch eine Freisetzung der DNA mittels Heparansulfat aus den Komplexen war möglich und wies keine Beschädigungen auf. Bei der Partikelgrößenmessung zeigte sich durch die Verneblung nur ein moderater Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers der PEI Gen-Vektor-Nanopartikel von 87 ± 1 nm auf 108 ± 1 nm. Auch die Polydispersität blieb für unvernebelte und vernebelte Partikel nahezu gleich ($0,2 \pm 0,01$ vs. $0,18 \pm 0,01$).

Um den Einfluss der Verneblung der PEI Gen-Vektor-Partikel auf die Transfektionseffizienz zu untersuchen, wurden BEAS-2B-Zellen mit beiden Fraktionen (unvernebelt, vernebelt) transfiziert (**Abb. 3.18**). Auch hier zeigte sich, dass der Verneblungsprozess der PEI Gen-Vektor-Nanopartikel mit einem

N/P- Verhältnis von 4 keinen Einfluss auf die Funktionalität und damit Transfektion hatte.

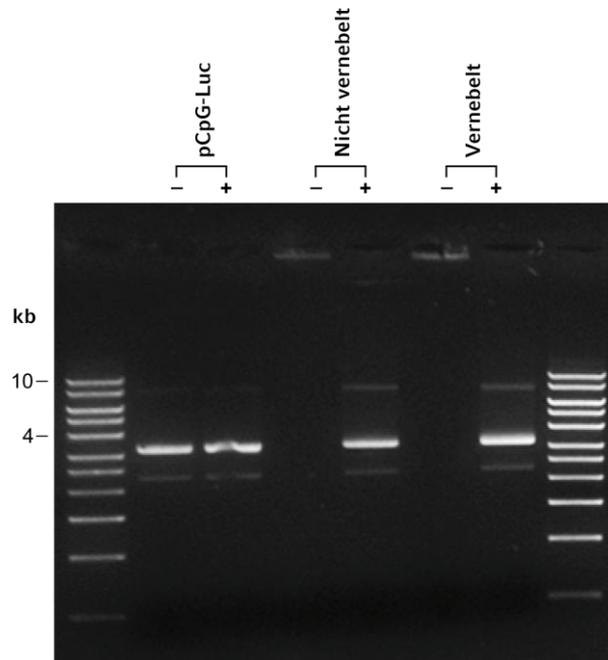


Abb. 3.17: DNA-Freisetzungssassay der PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel nach Verneblung mittels PARI BOY. Für die *in vivo* Verneblung wurden PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel in Wasser für Injektionszwecke in einer Konzentration von 125 ng/ μ l generiert und mittels PARI BOY vernebelt. Der anschließende DNA-Freisetzungssassay mit (+) und ohne (-) Heparansulfat der unvernebelten und vernebelten Fraktionen zeigte keine Veränderung im DNA-Freisetzungverhalten. Zusätzlich wurde ebenfalls reine Plasmid-DNA (pCpG-luc) mit aufgetragen.

Für die *in vivo* Versuche wurden PEI (N/P 4) und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektorkomplexe in destilliertem Wasser generiert und mittels PARI Boy an je 5 BALB/c Mäuse vernebelt. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität in den Lungen der Mäuse unter Narkose und nach intranasaler Gabe von Luciferin *in vivo* mittels IVIS-System gemessen (**Abb. 3.19**). Die Darstellung der Luciferaseaktivität durch *in vivo* Bildgebung zeigte bei den mit PEI-*g*-ILO Genvektoren behandelten Mäusen ein deutliches Luciferase-Signal. Das Signal der mit PEI Genvektoren behandelten Mäuse hingegen zeigte nur ein schwaches Signal am Detektionslimit.

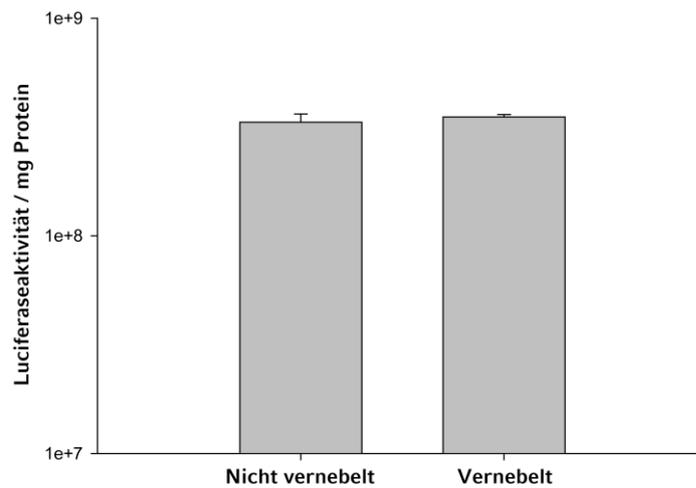


Abb. 3.18: Transfektionseffizienz der PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel nach Verneblung mittels PARI BOY. Für die *in vivo* Verneblung wurden PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel in Wasser für Injektionszwecke in einer Konzentration von 125 ng/ μ l generiert und mittels PARI BOY vernebelt. Anschließend wurden BEAS-2B Zellen mit der unvernebelten und vernebelten Fraktion transfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität 24 Stunden post Transfektion zeigte keinen Unterschied in der Transfektionseffizienz beider Fraktionen.

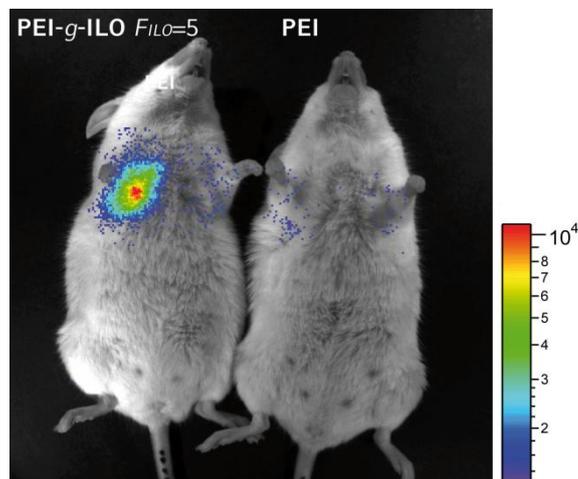


Abb. 3.19: Messung der Luciferaseaktivität nach Verneblung von PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel *in vivo* mittels IVIS Bildgebung. PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel wurden mittels PARI Boy an BALB/c Mäuse vernebelt. 24 Stunden nach Verneblung wurde unter Narkose und nach intranasaler Applikation von

Luciferin die Luciferaseaktivität mittels IVIS *in vivo* Bildgebung gemessen. Die Verneblung von PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel zeigte im Vergleich zu PEI ein deutliches Lumineszenzsignal im Bereich der Lunge.

Um die Expression an Luciferase je mg Lungengewebe quantitativ zu bestimmen, wurden narkotisierten BALB/c Mäuse nach der *in vivo* Bildgebung getötet und beide Lungenflügel isoliert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität im homogenisierten Lungengewebe gemessen und die Menge an Luciferase mittels Standardreihe bestimmt (**Abb. 3.20**). Die ermittelte Menge an Luciferase war bei den mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor-Nanopartikeln behandelten Mäusen signifikant ($p < 0,01$) 14-fach höher als nach Behandlung mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln.

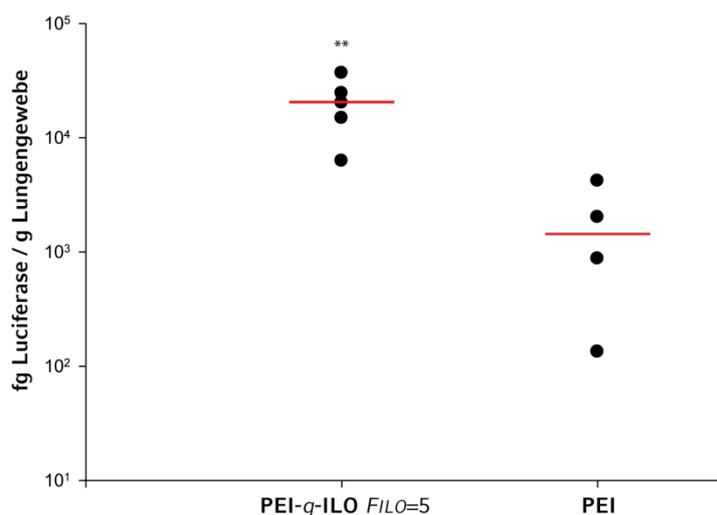


Abb. 3.20: Bestimmung der Menge an Luciferase nach Verneblung von PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel im homogenisierten Lungengewebe. PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel wurden mittels PARI Boy an BALB/c Mäuse vernebelt. 24 Stunden nach Verneblung wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen und homogenisiert. Anschließend wurde durch Messung der Luciferaseaktivität über eine Standardreihe die Menge an Luciferase quantifiziert. Dabei konnte eine signifikant (** $p < 0,01$) 14-fach höhere Menge an Luciferase für die mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel behandelte Gruppe festgestellt werden.

4.9 Untersuchungen zur Toxizität *in vitro* und *in vivo* nach Applikation von PEI-*g*-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel

In **Abbildung 3.21** wurde die metabolische Aktivität von 16HBE14o-Zellen nach Transfektion mit PEI (N/P 4) und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln unter Verwendung eines MTT-Assays gemessen. Im Vergleich zu PEI zeigte sich kein Anstieg der Zytotoxizität. Gemessen wurden $86,0 \pm 10,1\%$ Zelllebensfähigkeit für PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P 4) gegenüber $89,2 \pm 3,2\%$ für PEI (N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel.

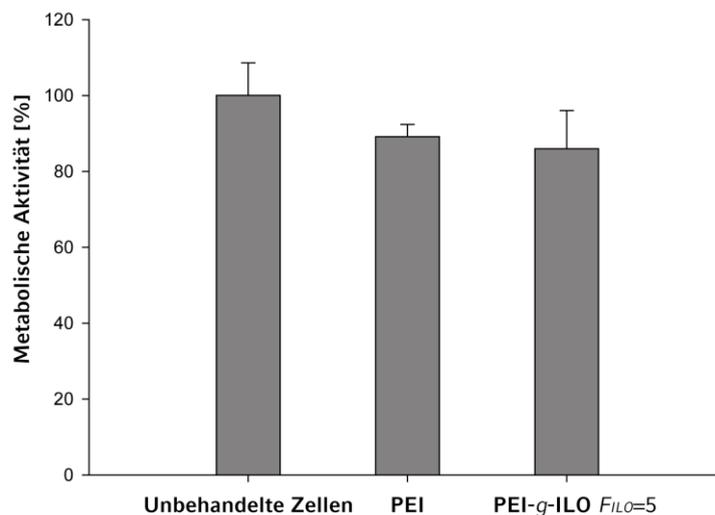


Abb. 3.21: Bestimmung der metabolischen Aktivität in Bronchialepithelzellen (16HBE14o-) nach Transfektion mit PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel. 16HBE14o- Zellen wurden mit PEI und PEI-*g*-ILO ($F_{ILO}=5$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel transfiziert. Anschließend wurde mittels MTT-Assay die Zytotoxizität bestimmt. Verglichen mit PEI Gen-Vektor Nanopartikel war kein signifikanter Unterschied in der metabolischen Aktivität messbar.

Für die Untersuchung der Toxizität *in vivo* nach Verneblung der Gen-Vektor-Nanopartikel wurde zunächst die Anzahl der Leukozyten im Blut der behandelten Mäuse gemessen (**Abb. 3.22**). Die mit PEI und PEI-*g*-ILO behandelten Mäuse zeigten gegenüber der unbehandelten Gruppe im Mittel

einen Anstieg der Leukozyten pro μl Blut um den Faktor 1,5. Dieser Anstieg war allerdings nicht signifikant. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen der PEI und PEI-g-ILO Gruppe festgestellt werden.

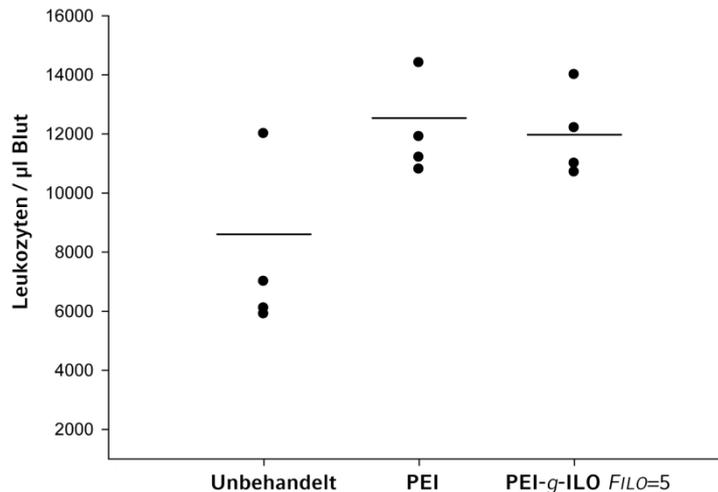


Abb. 3.22: Messung der Leukozytenzahl im Blut der mit PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel behandelten BALB/c Mäuse. 24 Stunden nach Verneblung der PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel an BALB/c Mäuse wurde die Anzahl der Leukozyten pro μl Blut bestimmt. Mit PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel behandelte Mäuse zeigten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe einen circa 1,5-fachen Anstieg der Leukozyten im Blut. Dieser Anstieg war allerdings nicht signifikant. Wichtig ist allerdings, dass bei den Mäusen der PEI-g-ILO Gruppe, verglichen mit der PEI Gruppe, keine Unterschied messbar waren.

Als weitere Entzündungsparameter wurden im Serum die beiden Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (INF- γ) mittels ELISA bestimmt. Ähnlich den *in vitro* Ergebnissen und den Leukozyten-Messungen konnte hier kein signifikanter Anstieg 24 Stunden nach Aerosolapplikation festgestellt werden (**Abb. 3.23**).

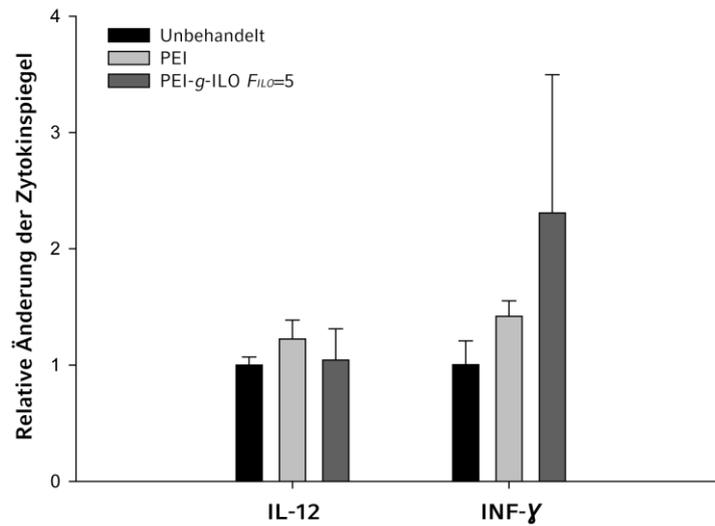


Abb. 3.23: Messung von Zytokinen im Serum der mit PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel behandelten BALB/c Mäuse. 24 Stunden nach Verneblung der PEI und PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel an BALB/c Mäuse wurde Blut entnommen. Im Serum wurden dann die Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (INF- γ) mittels ELISA bestimmt. PEI-g-ILO ($F_{ILO=5}$, N/P4) Gen-Vektor Nanopartikel behandelte Mäuse zeigten verglichen mit der PEI behandelten und unbehandelten Gruppe keinen signifikanten Anstieg der Zytokine IL-12 und INF- γ .

4.10 Zusammenfassende Betrachtung des Potentials von Iloprost als Zielfindungsstruktur für den nichtviralen Gentransfer

In den oben beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das Prostaglandin I₂-Analog ILO, ein IP₁-Rezeptoragonist als potenter Zielfindungsligand eingesetzt werden kann, um den Gentransfer von PEI/DNA-Nanopartikeln in Lungenzellen *in vitro* und *in vivo* zu steigern. So konnte in humanen Alveolar (A549)- und Bronchial (16HBE14o-, BEAS-2B)-Epithelzellen eine signifikante ($p < 0,01$) bis zu 46-fache Steigerung der Transgenexpression nachgewiesen werden. Auch *in vivo* steigerte die Aerosolapplikation von mit ILO modifizierten PEI-Gen-Vektor-Nanopartikeln die Gentransfereffizienz in den Lungen von BALB/c Mäusen um das bis zu 14-fache.

ILO und TRP sind Agonisten am humanen IP₁-Rezeptor (Olschewski et al., 2004). Beides sind wirksame Substanzen zur Pharmakotherapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie und werden in der Klinik mittels Vernebler als Aerosol verabreicht (Strauss and Edelman, 2007, Skoro-Sajer and Lang, 2008, Krug et al., 2009). In der Literatur konnte bereits die Expression von IP₁-Rezeptoren in murinem und humanem Lungengewebe nachgewiesen werden (Namba et al., 1994, Coleman et al., 1994, Boie et al., 1994, Ayer et al., 2008). Desweiteren konnte eine Internalisierung der IP₁-Rezeptor-Ligandkomplexe ins Zytoplasma nachgewiesen werden (Smyth et al., 2000, Giovanazzi et al., 1997).

Mittels Western Blot konnte in Alveolar- und Bronchialepithelzelllinien die Expression des IP₁-Rezeptors nachgewiesen werden. Für eine genauere Charakterisierung des Rezeptors wurde Fluorescein-markiertes BSA mit ILO oder TRP modifiziert. A549- und 16HBE14o- Zellen wurden dann mit beiden Konjugaten inkubiert und die Zelloberflächenbindung bzw. Aufnahme mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wichtig für die Beurteilung der Ergebnisse ist sowohl die Messung der Anzahl an Fluorescein-positiven Zellen, als auch der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die Anzahl der Fluorescein-positiven Zellen gibt Information über die Rezeptorverteilung, wohingegen die MFI die

Rezeptor-Dichte bzw. die Kinetik der Aufnahme beschreibt. Die Ergebnisse zeigten auf beiden Zelllinien eine Bindung bzw. Aufnahme der BSA-Konjugate. Allerdings erwies sich das ILO-Konjugat in beiden Zelllinien dem TRP-Konjugat als überlegen. Die spezifische Rezeptorbindung konnte sowohl durch kompetitive Hemmung mittels eines Überschusses an ungebundenem ILO als auch durch Blockade des IP_1 -Rezeptors mit einem potenten und spezifischen Antagonisten CAY10449 (Clark et al., 2004, Bley et al., 2006, Ayer et al., 2008) bewiesen werden. Mit konfokaler Laserrastermikroskopie konnte eine Zelloberflächenbindung sowie eine Internalisierung der ILO-Konjugate gezeigt werden. Die spezifische Zelloberflächenbindung und Aufnahme von ILO-Konjugaten in Lungenzellen stellte eine essentielle Vorbedingung für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer und die Weiterentwicklung für dieses System dar.

In einem Pilotversuch konnte gezeigt werden, dass durch Adsorption bei 100 nM von BSA-ILO Konjugaten an PEI/DNA-Nanopartikel bei einem N/P-Verhältnis von 8 die Transgenexpression im Vergleich zu unmodifiziertem BSA um das 6,5-fache gesteigert werden konnte. Auch die Partikelgröße von 160 nm zeigte keine Aggregation. Dieser Ansatz zeigt, dass ILO auch nach Kopplung an bovines Serumalbumin eine Steigerung des Gentransfers bewirken kann. Gioia et al. (Di Gioia et al., 2008) konnte bereits zeigen, dass *in vivo* durch die intratracheale Applikation von PEI/MSA Komplexen sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Anzahl der transfizierten Bronchialepithelzellen deutlich gesteigert werden konnte. Außerdem war eine wiederholte Applikation ohne Abnahme der Expression möglich. ILO könnte daher durch Konjugation an murines Serumalbumin dazu beitragen den Gentransfer *in vivo* zu verbessern.

Für Transfektionsstudien wurde ILO an verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa kovalent über eine Amid-Bindung konjugiert. Synthetisiert wurden PEI-g-ILO Konjugate mit einem Kopplungsgrad von 2, 5, 8 und 16 Mol ILO pro Mol PEI ($F_{ILO} = 2, 5, 8, 16$). Zur Ermittlung des optimalen Kopplungsgrades und N/P-Verhältnisses wurden 16HBE14o- Zellen mit den PEI-g-ILO ($F_{ILO} = 2, 5, 8, 16$) Konjugaten bei

unterschiedlichen N/P-Verhältnissen transfiziert. Die höchste Transfektionseffizienz konnte bei einem Kopplungsgrad von $F_{ILO}= 5$ und N/P-Verhältnis von 4 ermittelt werden, wohingegen ein höherer Konjugationsgrad von $F_{ILO}= 8$ und 16 zu einer geringeren Transgenexpression führte. Dies könnte auf der fehlenden bzw. nur unvollständigen Freisetzung der DNA bei höheren Kopplungsgraden beruhen, was mit oben gezeigtem DNA-Freisetzungssassay bestätigt werden konnte. Die Freisetzung von Plasmid-DNA aus PEI/DNA-Nanopartikeln wurde bereits als kritischer Parameter für einen erfolgreichen Gentransfer beschrieben (Huth et al., 2006). Es kann spekuliert werden, dass eine zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung von ILO mit Plasmid-DNA die Bindung erhöhen könnte. Die Partikelgrößenmessung der unterschiedlichen PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel mittels PCS zeigte, dass mit zunehmender Menge an ILO auch der hydrodynamische Durchmesser der PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel auf bis zu einem Mikrometer anstieg. Ähnliche Ergebnisse konnte auch Elfinger et al. (Elfinger et al., 2009a) bei mit Clenbuterol modifizierten PEI-Nanopartikeln beobachten. Gen-Vektor-Nanopartikel formuliert mit PEI-g-ILO $F_{ILO}= 5$ zeigten hydrodynamische Durchmesser von weniger als 100 nm, was vermutlich eine effizientere Internalisierung ermöglichte (Rejman et al., 2004).

Die Transfektion von Alveolar- und Bronchialepithelzellen mit optimierten Gen-Vektor-Nanopartikeln (PEI-g-ILO, $F_{ILO}= 5$, N/P 4) führte, verglichen mit unmodifizierten PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln, zu einer signifikanten bis zu 46-fachen Steigerung der Gentransfereffizienz. Die beobachtete verbesserte Transgenexpression führte allerdings nicht zu einem Anstieg der metabolischen Toxizität *in vitro*. Weiterhin konnte in 16HBE14o- Zellen bei einer Reduktion der DNA von 1 μg auf 0,5 μg und damit der PEI-g-ILO ($F_{ILO}= 5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln auf die Hälfte, eine Transgenexpression vergleichbar mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln bei 1 μg erzielt werden. Diese Daten zeigen klar eine mögliche Dosisreduktion, was folglich zu einer Verminderung der DNA und Vektor bedingten Toxizität und Entzündung *in vivo* führen könnte. Ähnliches war ebenfalls bei der Verwendung von EGF gekoppelt an PEI beschrieben worden (Kloeckner et al., 2006).

Die Hypothese des Rezeptor-vermittelten Gentransfers konnte weiterhin durch Inhibierungsversuche auf 16HBE14o- Zellen mittels eines spezifischen Antagonisten CAY10449 gestützt werden. Die Zugabe von CAY10449 verringerte die Transgenexpression auf das mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikel vergleichbare Ausmaß.

Aufgrund der vielfältigen bekannten physiologischen Effekte wie die anti-inflammatorische (Idzko et al., 2007, Aronoff et al., 2007), Plättchen-anti-aggregatorische (Hall and Strange, 1984, Beghetti et al., 2002) oder Gefäßmuskel-relaxierende Wirkung (Tanaka et al., 2004) von ILO nach IP₁-Rezeptorbindung, wurde die Signalantwort nach Applikation von PEI-g-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel untersucht. Als Kontrolle wurde ungebundenes ILO in Mengen äquivalent zu PEI-g-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) verwendet. In allen verwendeten Zelllinien konnte in Bezug auf den Anstieg oder die Abnahme der cAMP Konzentration ein ähnlicher Trend beobachtet werden. Auch zellspezifische Unterschiede wurden beobachtet. Während in 16HBE14o- und BEAS-2B-Zellen sowohl durch freies ILO als auch durch PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikel ein cAMP Anstieg stattfand, konnte auf A549-Zellen nur mit freiem ILO eine Abnahme der cAMP Konzentration gemessen werden. Es deutet folglich darauf hin, dass in 16HBE14o- und BEAS-2B-Zellen eine Kopplung des IP₁ Rezeptor über G_s-Proteine und in A549-Zellen über G_i-Proteine vorliegt. Eine Kopplung über G_q-Proteine lässt sich durch den fehlenden Ca²⁺-Anstieg nach Inkubation von ILO und PEI-g-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikel ausschließen. Weiterhin kann auch das Vorhandensein von EP₁-Rezeptoren auf A549-, 16HBE14o- und BEAS-2B-Zellen, die über G_q-Proteine zu einer Ca²⁺-Antwort führen, nicht bestätigt werden. In der der Literatur ist nämlich ebenso eine Bindung von ILO an EP₁-Rezeptoren beschrieben (Bos et al., 2004). Durch die Signaltransduktionsstudien kann somit gezeigt werden, dass die Modifikation von PEI mit ILO nicht die physiologische Signaltransduktion am IP₁-Rezeptor beeinflusst. Somit vereint ein Gentransfer mit PEI-g-ILO Gen-Vektor-Nanopartikeln die Eigenschaften von PEI mit den Zielfindungs- und physiologischen Eigenschaften von ILO.

Da die Expression von IP_1 -Rezeptoren für Endothelzellen in der Literatur bekannt ist (Coleman et al., 1994) und somit Gentransfer mit PEI-*g*-ILO Nanopartikeln bei systemischer Applikation möglicherweise nur zu einer Transfektion des Endothels führen würde, wurde die topische Applikation in die Lungen von BALB/c Mäusen als Aerosol gewählt. Weitere Gründe für die Aerosolapplikation waren, dass verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 25kDa bereits erfolgreich für den Gentransfer als Aerosol in die Lunge eingesetzt wurde (Rudolph et al., 2005b, Davies et al., 2008) und auch Iloprost als Aerosol für die Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie in der Klinik eingesetzt wird (Olschewski et al., 2002).

Für die Tierversuche wurde ein CpG-freies Plasmid mit Luciferase als Transgen (pCpG-luc) gewählt. Es hat sich erwiesen, dass CpG-freie Plasmide weniger entzündlich wirken als CpG-haltige. Außerdem konnte für diese Plasmide eine höhere und längere Genexpression in der Lunge nachgewiesen werden (Hyde et al., 2008). Um die Stabilität der PEI Gen-Vektor-Nanopartikel mit einem N/P- Verhältnis von 4 zu gewährleisten, wurden diese mittels eines Kompressionsverneblers (PARI Boy) vernebelt. Verschiedene Fraktionen (nicht vernebelt, vernebelt) wurden gesammelt und analysiert. Sowohl der DNA-Freisetzungssassay, als auch die Partikelgrößenmessung zeigten keine Veränderung der Teilchen nach Verneblung im Vergleich zu den unvernebelten Partikeln. Ebenso zeigte sich keine Änderung in den Transfektionseigenschaften. Diese Beobachtungen bestätigen, dass die PEI Gen-Vektor-Nanopartikel mit einem N/P Verhältnis von 4 durch den Verneblungsprozess nicht zerstört wurden und daher noch funktionell sind. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Rudolph et al. (Rudolph et al., 2002) nachgewiesen werden. Nach der Aerosolapplikation in die Lungen von BALB/c Mäusen war die Transgenexpression nach 24 Stunden für die mit PEI-*g*-ILO ($F_{ILO} = 5$, N/P 4) Gen-Vektor-Nanopartikeln behandelte Gruppe signifikant 14-fach höher als für die mit PEI Gen-Vektor-Nanopartikeln behandelte Gruppe. Die Messung von PEI assoziierten Zytokinen wie Interleukin-12 und Interferon- γ im Serum zeigte keinen signifikanten Anstieg. Bestärkt werden diese Beobachtungen durch die von Gautham et al. (Gautam et al., 2001)

veröffentlichten Ergebnisse, die klar zeigen, dass durch die Aerosolapplikation von PEI/DNA-Nanopartikeln keine höhere Zytokinantwort induziert wird. Weiterhin konnte keine Erhöhung der Leukozyten im Blut in der PEI-g-ILO Gruppe verglichen mit der PEI Gruppe festgestellt werden. Allerdings war ein 1,5-facher Anstieg der Leukozyten in der PEI bzw. PEI-g-ILO Gruppe gegenüber unbehandelten Mäusen zu erkennen. Dies spiegelt den Sachverhalt wieder, dass die Applikation von PEI nach wie vor auch eine geringfügige Toxizität aufweist und ein inflammatorisches Potential aufweist.

Im Vergleich zu Liganden wie Lactoferrin und Clenbuterol, die selektiv für den Gentransfer in Alveolar- oder Bronchialzellen eingesetzt werden können (Elfinger et al., 2007, Elfinger et al., 2009a), stellt ILO eine Möglichkeit dar in beiden Zelltypen effektiv den Gentransfer zu steigern und stellt somit einen potenten Zielfindungsliganden für die topische PEI-basierte Aerosolapplikation dar.

5 Stabiler Gentransfer durch Kombination episomaler replizierender Vektoren mit der „*Nuclear Matrix Targeting Signal*“-Peptidsequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors

Durch die Entwicklung eines neuartigen Liganden steht nun eine Möglichkeit zur Verfügung, um den Gentransfer in Zellen effizienter zu gestalten. Ein weiterer großer Nachteil des nichtviralen Gentransfers verglichen mit viralem Gentransfer besteht in der transienten Genexpression. Um stabile Transgenexpression zu erreichen, wurden nichtvirale episomal (=extrachromosomal) replizierende Vektoren entwickelt. Hierzu zählen neben Plasmid-Vektoren mit putativen Replikationsursprüngen und artifizielle Chromosomen (MAC, HAC) auch chromosomale „*Scaffold Matrix Attachment Region*“ (*S/MAR*) Sequenzen, die in die Transkriptionskassette von Plasmid-Vektoren kloniert werden können. Die am besten charakterisierten *S/MAR*-basierenden Vektoren gehören zur pEPI-Familie. Diese Vektoren können *in vitro* und *in vivo* während über hundert von Zellzyklen in Abwesenheit von Selektionsdruck stabil repliziert werden. Nachteil dieser episomalen Vektorsysteme ist allerdings die initial stabile Etablierung dieser *S/MAR*-Vektoren. Hierfür ist in der Regel ein Selektionsdruck über mehrere Wochen nötig. Ziel dieses Projektes war es daher *NMTS-S/MAR* Hybridvektoren zu entwickeln, um nach Transfektion den Transport von *S/MAR*-Vektoren in transkriptionsaktive Bereiche der Nukleären Matrix gezielt zu steuern und damit eine Steigerung der Etablierung replizierender Episomen zu ermöglichen.

In den folgenden Untersuchungen wurde episomal replizierende Plasmid-DNA mit der „*Nuclear Matrix Targeting Signal*“ (*NMTS*)- Peptidsequenz des AML-1B Transkriptionsfaktors modifiziert. Dies wurde sowohl über Peptid-Nukleinsäuren (*PNA*) als auch über eine kovalente Bindung mittels „Aziridine Labeling Reagenz“ (*ALR*) durchgeführt. Anschließend wurden die Konstrukte nach Transfektion hinsichtlich Ihrer Transgenexpression über circa 30 Tage

untersucht. Es wurden ausschließlich Luciferase codierende Vektoren verwendet, da die Messung der Luciferaseaktivität sehr sensitiv und auch bei geringer Transgenexpression gut messbar ist. Die Untersuchungen wurden in Jurkat-Zellen durchgeführt. Wegen der schnellen Teilungsrate dieser Zellen können im Falle von episomaler Replikation weiterhin die normalerweise stattfindende „Ausverdünnung“ des Plasmids und Transgen-*silencing* ausgeschlossen werden. Für den erfolgreichen Gentransfer in Jurkat-Zellen wurden in den folgenden Untersuchungen Nukleofektion und Lipofektion als Transfektionsmethoden verwendet.

Vor allem in teilungsaktiven Zellen, wie hämatopoetischen Zellen, spielt dieser Ansatz eine wesentliche Rolle. Daher ist die Entwicklung von Plasmid-DNA, mit der stabile Transgenexpression erreicht werden kann, von sehr großem Interesse, um effektivere Gentherapeutische Ansätze zu entwickeln.

5.1 Stabile Transgenexpression nach DNA-Bindung der *NMTS*-Peptidsequenz mittels Peptid-Nukleinsäuren (*PNA*s)

Peptid-Nukleinsäuren (*PNA*) stellen eine effiziente Methode dar, Plasmid-DNA zu modifizieren. Hierfür werden in das gewünschte Plasmid Bindungsseiten (*bindingsites*, *Bs*) kloniert. Diese Bindungsseiten stellen DNA-Oligonukleotide in einer Länge von 100 Basen-Paaren (bp) dar, welche repetitive DNA-Sequenzen mit je 10 bp enthalten. Je Bindungsseite können circa acht *PNA*s durch komplementäre Basen-Paarung sowie Tripel-Helix-Bildung (sog. Hoogsteen-Loop) binden (Zelphati et al., 2000). Diese Bindungen sind unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und verfügen über eine höhere Affinität für komplementäre DNA-Sequenzen als analoge DNA-Oligomere. Durch Einführung einer primären Aminogruppe in die *PNA*s wird somit eine chemische Modifikation von Plasmid-DNA mit beispielsweise Peptiden ermöglicht.

5.1.1 Nachweis der *PNA*-Bindung

Um die Funktionalität der *PNA*s zu zeigen, wurden zwei verschiedene Bindungsseiten (*Bs*1 und *Bs*2) in pEGFP-C1 (Clontech, USA) und einen analogen Luciferase-codierenden Vektor pLUC-C1 kloniert. Anschließend wurden beide Plasmide pEGFP-C1*Bs*1,2 und pLUC-C1*Bs*1,2 über die *PNA*s mit Fluorescein markiert. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Kopplungs-Strategien verfolgt: a) Kopplung der *PNA*s mit Fluorescein und nachfolgender Bindung von *PNA*1- bzw. *PNA*2-Fluorescein an Plasmid-DNA oder b) Bindung der *PNA*s an Plasmid-DNA mit anschließender Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes. Die Konjugate wurden nach Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Fluorescein-Detektion untersucht (**Abb. 4.1**).

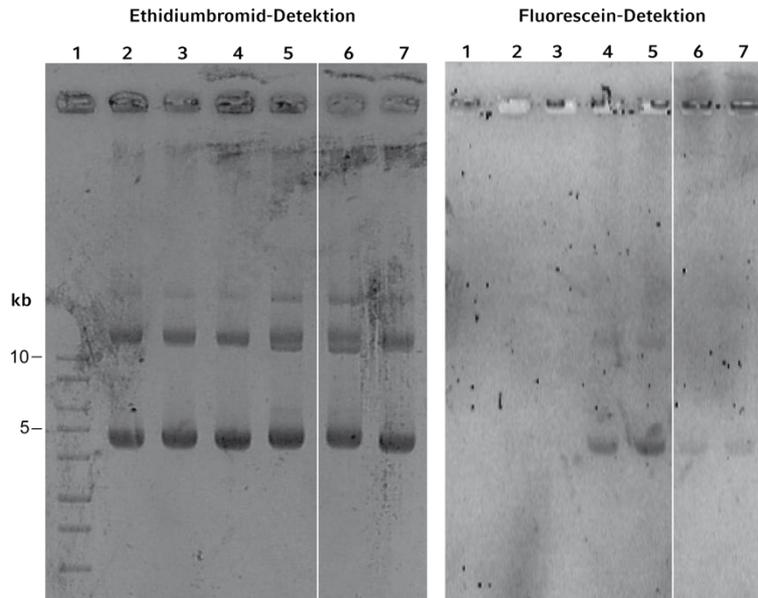


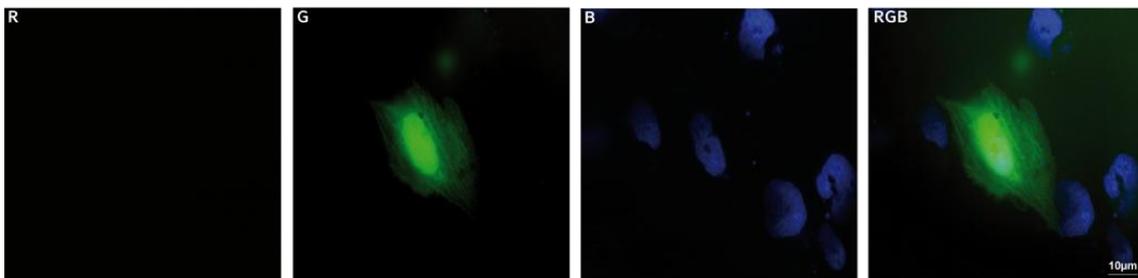
Abb. 4.1: Untersuchung unterschiedlicher Kopplungsmethoden und Nachweis der *PNA*-Bindung an Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese sowie anschließender Fluoreszenzdetektion. Im Folgenden wurden unterschiedliche Kopplungsmethoden untersucht, um effizient sowohl die *PNA* zu modifizieren, als auch an Plasmid-DNA (pDNA) zu binden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Kopplungsmethoden angewandt. Anschließend wurden die Konstrukte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Effizienz der Kopplungsmethoden visuell nach Fluoreszenz-Detektion miteinander verglichen. Als Kontrolle für die Ko-Lokalisation mit pDNA wurde das Gel nach Fluoreszenzdetektion mit Ethidiumbromid angefärbt. Kopplungsmethode a) Kopplung der *PNA*s mit Fluorescein und nachfolgender Bindung von *PNA*1- bzw. *PNA*2-Fluorescein an pDNA (Spur 4, 5); Kopplungsmethode b) Bindung der *PNA*s an pDNA mit anschließender Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes (Spur 6, 7). Als Kontrolle wurden reine pDNA (Spur 2) und pDNA inkubiert mit aktiviertem Fluorescein (Spur 3) aufgetragen. Kopplungsmethode a) konnte somit als effizienter beurteilt werden. In Spur 1 wurde ein 1kb DNA Marker aufgetragen.

In Spur 4 und 5 der Fluorescein-Detektion zeigte sich eine intensive Fluoreszenz der kovalent-geschlossen-zirkulären (*supercoil*)- Form der Plasmid-DNA. In Spur 6 und 7 hingegen war nur eine geringe Fluoreszenz sichtbar. Nach Inkubation von aktiviertem Fluorescein (Fluorescein-*NHS*) mit Plasmid-DNA konnte keinerlei Fluoreszenz detektiert werden (Spur 3), was eine unspezifische Reaktion der Plasmid-DNA mit Fluorescein-*NHS* ausschließt. Die anschließende Ethidiumbromid-Detektion bestätigte die Ko-

Lokalisation von Fluoreszenzsignal und Plasmid-DNA. Deutlich zu erkennen war, dass überwiegend die *supercoil*-Form der Plasmid-DNA modifiziert wurde. Aus diesen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass eine initiale Modifikation der *PNA*s mit anschließender Bindung an Plasmid-DNA die effektivere Kopplungsmethode darstellt. Desweiteren konnte die Funktionalität beider *PNA*s gezeigt werden.

Um zu beweisen, dass beide *PNA*s gleichzeitig mit unterschiedlichen Modifikationen an die Plasmid-DNA gebunden werden können, wurden hierzu pEGFP-C1Bs1,2 und pLUC-C1Bs1,2 mit *PNA*1-Fluorescein und *PNA*2-AlexaFluor[®]568 modifiziert. Anschließend wurden A549- und BEAS-2B-Zellen mit beiden Konstrukten mittels Lipofectamin 2000 transfiziert (**Abb. 4.2, Abb. 4.3**).

pEGFP-C1Bs1,2



pEGFP-C1Bs1,2/*PNA*1-Fluorescein/*PNA*2-AlexaFluor568

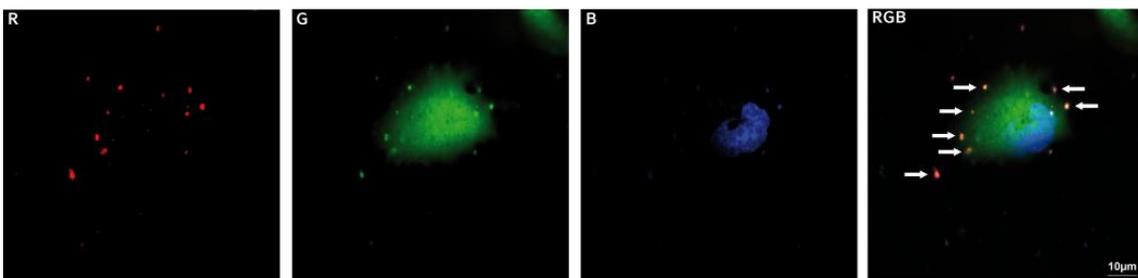
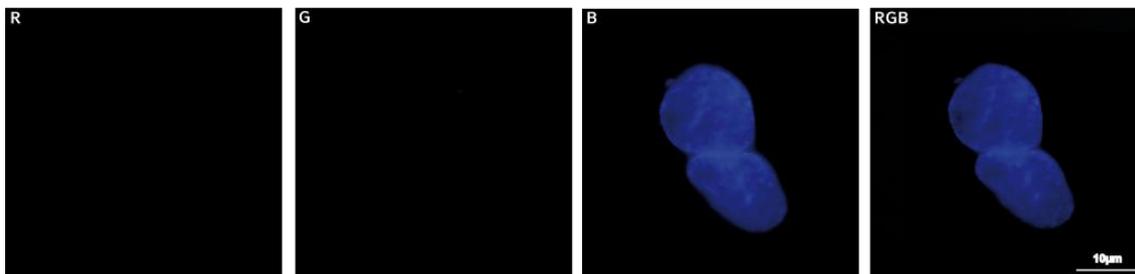


Abb. 4.2: Nachweis der Bindung beider *PNA* nach Transfektion von A549 mit pEGFP-C1Bs1,2/*PNA*1-Fluorescein/*PNA*2-AlexaFluor[®]568 mittels Epifluoreszenzmikroskopie. A549 Zellen wurden mit pEGFP-C1Bs1,2/*PNA*1-Fluorescein/*PNA*2-AlexaFluor[®]568 mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Vier Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Darstellung zeigt drei Kanäle (Rot (R), Grün (G), Blau (B)) sowie die Überlagerung (RGB). Dabei konnte eine deutliche Ko-Lokalisation beider Fluoreszenzfarbstoffe (rot, grün) beobachtet werden

(gelbe Färbung; siehe Pfeile), was somit die Bindung beider *PNA* an Plasmid-DNA bestätigt. Als Kontrolle wurde pEGFP-C1Bs1,2 analog transfiziert.

pLUC-C1Bs1,2



pLUC-C1Bs1,2/PNA1-Fluorescein/PNA2-AlexaFluor568

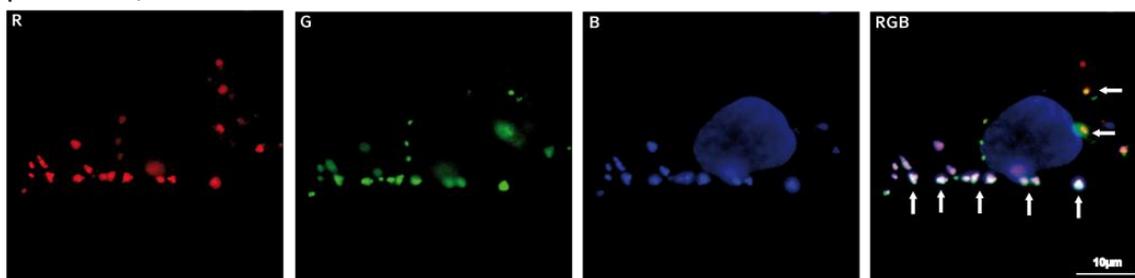


Abb. 4.3: Nachweis der Bindung beider *PNA* nach Transfektion von BEAS-2B mit pLUC-C1Bs1,2/PNA1-Fluorescein/PNA2-AlexaFluor[®]568 mittels Epifluoreszenzmikroskopie. BEAS-2B Zellen wurden mit pEGFP-C1Bs1,2/PNA1-Fluorescein/PNA2-AlexaFluor[®]568 mittels Lipocetamin 2000 transfiziert. Vier Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Darstellung zeigt drei Kanäle (Rot (R), Grün (G), Blau (B)) sowie die Überlagerung (RGB). Dabei konnte eine deutliche Ko-Lokalisation beider Fluoreszenzfarbstoffe (rot, grün = gelbe Färbung), sowie eine Überlagerung mit dem DAPI-Signal (blau = weiß; siehe Pfeile) beobachtet werden. Dies bestätigt somit die Bindung beider *PNA* an Plasmid-DNA. Als Kontrolle wurde pLUC-C1Bs1,2 analog transfiziert.

Als Kontrolle dienten die jeweils unmodifizierten Plasmide. Sowohl in A549- als auch in BEAS-2B-Zellen konnte eine deutliche Ko-Lokalisation beider Fluoreszenzfarbstoffe (rot, grün) beobachtet werden (gelbe Färbung). Teilweise war auch eine Überlagerung mit dem DAPI-Signal (blau) der Plasmid-DNA zu erkennen (weiß). Nach Transfektion des pEGFP-C1Bs1,2/PNA1-Fluorescein/PNA2-AlexaFluor[®]568 Konjugates war vier Stunden nach Transfektion auch eine EGFP-Expression zu erkennen.

Die *in vitro* Untersuchungen zeigten durch die Ko-Lokalisation der Fluoreszenzfarbstoffe, dass unter physiologischen Bedingungen beide *PNA*-Bindungen stabil waren. Außerdem konnten, simultan verschiedene Modifikationen der Plasmid-DNA vorgenommen werden.

5.1.2 Einfluss der *PNA*-Bindung auf die Transgenexpression

Um nun feststellen zu können, dass die *PNA*-Bindung die Transgenexpression nicht beeinflusst, wurden BEAS-2B-Zellen mit unterschiedlichen pLUC-C1Bs1,2/*PNA*-Konjugaten mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase kodierendes Plasmid ko-transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität gemessen. Durch Bildung des Quotienten aus Luciferase- und β -Galaktosidase Bestimmung konnte kein signifikanter Unterschied in der Transgenexpression nach *PNA* Bindung festgestellt werden (**Abb. 4.4**).

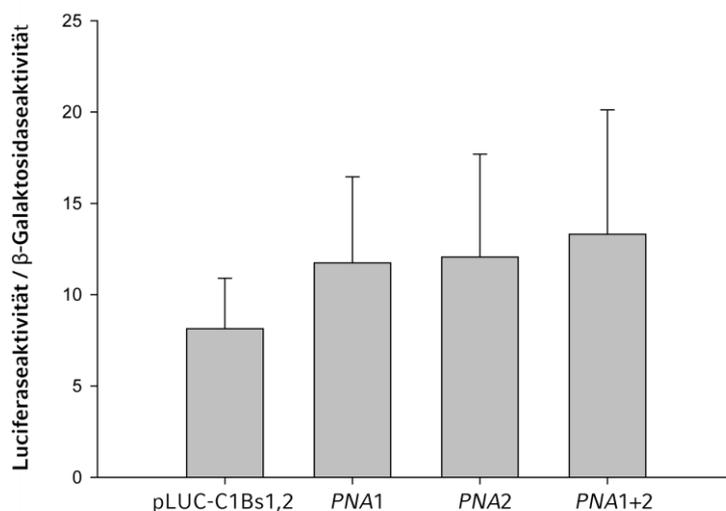


Abb. 4.4: Einfluss der *PNA*-Bindung nach Transfektion von Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) mit pLUC-C1Bs1,2/*PNA*-Konjugaten. BEAS-2B Zellen wurden mit unterschiedlichen pLUC-C1Bs1,2/*PNA*-Konjugaten zusammen mit einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid als Transfektionskontrolle mittels Lipofectamin 2000 ko-transfiziert. 24 Stunden nach

Transfektion wurde die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Dabei wurde die Luciferaseaktivität auf die β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Die Bindung der *PNA*s an Plasmid-DNA zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Transgenexpression.

5.1.3 Nachweis der *NMTS*-Bindung

Die Bindung der selbst synthetisierten *NMTS* (*eNMTS*; Abschnitt 2.2.1) über *PNA*s an Plasmid-DNA sollte mit einem *Gel-Shift-Assay* nachgewiesen werden. Hierzu wurde die *NMTS* mit einem bi-funktionalen Linker (*SMCC*) an die *PNA1* gekoppelt. Das *PNA1-SMCC-eNMTS* Konstrukt wurde dann an pLUC-C1Bs1,2 gebunden und mit dem Restriktionsenzym *Apal* verdaut. Die Proben wurden anschließend mit einem 4%igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA Abschnitte mittels Ethidiumbromid detektiert (**Abb. 4.5**).

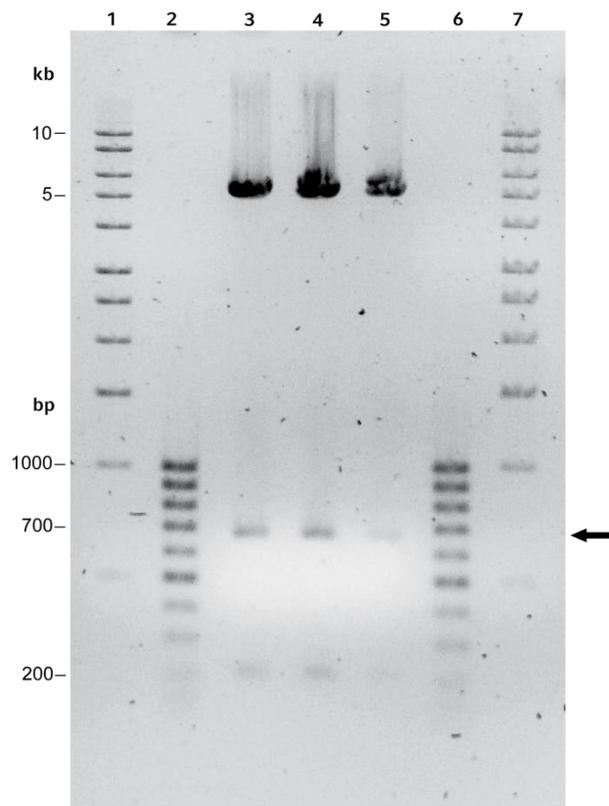


Abb. 4.5: *Gel-Shift-Assay* nach Verdau von pLUC-C1Bs1,2/*PNA1-SMCC-eNMTS* mit *Apal* zum Nachweis der *eNMTS* Bindung. Die pLUC-C1Bs1,2/*PNA1-SMCC-eNMTS* (Spur 3), pLUC-C1Bs1,2/*PNA1* (Spur 4) Konjugate sowie unmodifiziertes pLUC-C1Bs1,2 (Spur 5)

wurden mit *Apal* verdaut. Nach Agarosegelelektrophorese in einem 4% igen Agarosegel zeigten sich in Spur 3, 4 und 5 im Gel drei erwartete Banden bei 5000 bp, 700bp und bei 200bp. Die Bande bei 700bp stellte den Abschnitt der *PNA1-SMCC-eNMTS* Bindung dar. Allerdings konnte in Spur 3 der erwartete Shift von circa 100bp von 700bp zu 800bp im Vergleich zu Spur 5 nicht beobachtet werden (siehe Pfeil). In Spur 1 und 7 ist ein 1kp DNA Marker und in Spur 2 und 6 ein 100bp DNA Marker aufgetragen.

Durch den Verdau ergaben sich drei Banden bei ca. 5000bp, 700bp und 200bp, wobei die Bande bei 700bp den DNA-Abschnitt darstellte, an den die *PNA1-SMCC-eNMTS* Konstrukte gekoppelt worden waren. Da pro Bindungsseite 8 *PNA*-Konstrukte binden können, wurde ein *Shift* von circa 100bp erwartet. Der erwartete *Shift* von 700bp zu 800bp in Spur 3 verglichen mit Spur 4 und 5 konnte nicht beobachtet werden. Der Beweis der *PNA-SMCC-eNMTS* Kopplung konnte somit nicht erbracht werden, was zu einem Wechsel der Kopplungsstrategie führte.

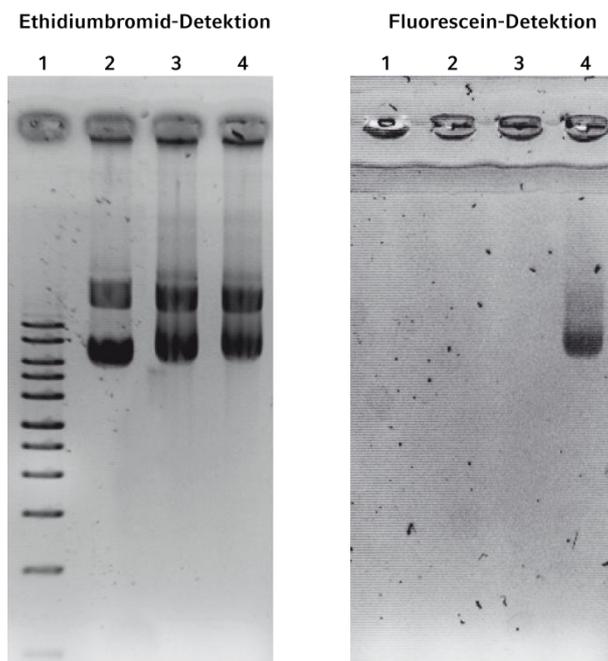


Abb. 4.6: Nachweis der *NMTS*-Bindung über *PNA*s an Plasmid-DNA (pDNA) mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Fluorescein-Detektion. Das Fluorescein markierte *NMTS*-Peptid wurde über *PNA* an pDNA konjugiert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In der anschließenden Fluoreszenz-Detektion konnte für das pDNA/*PNA-SMCC-NMTS* Konjugat (Spur 4) im Vergleich zur unmodifizierten pDNA

(Spur 2) und zum Zwischenprodukt pDNA/PNA-SMCC (Spur 3) eine intensive Fluoreszenzbande nachgewiesen werden. Somit konnte eine effektive Bindung der *NMTS* über *PNA* an Plasmid-DNA nachgewiesen werden. In Spur 1 wurde ein 1kb DNA Marker mit aufgetragen.

Eine weitere Synthese der *NMTS*-Sequenz wurde nun bei Peptide 2.0 Inc. in Auftrag gegeben. Diesmal wurde allerdings am N-Terminus zusätzlich Fluorescein eingebracht. Somit kann bei erfolgreicher Kopplung eine fluoreszierende Bande nach Agarosegelelektrophorese detektiert werden. Die fluoreszenzmarkierte *NMTS* wurde wiederum über *SMCC* kovalent an die *PNA*s gekoppelt. Dieses Konstrukt wurde anschließend an Plasmid-DNA gebunden, die aufgereinigten Konjugate mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und mittels Fluorescein-Detektion die Kopplung überprüft (**Abb. 4.6**). Spur 4 zeigte eine deutliche Fluoreszenz der *supercoil*-Form der Plasmid-DNA, was einen Beweis für eine erfolgreiche Kopplung der *NMTS* an Plasmid-DNA über die *PNA* darstellte. Die unmodifizierte Plasmid-DNA (Spur 2), sowie das Zwischenprodukt der Kopplung (Spur 3) zeigten keinerlei Fluoreszenz. Die anschließende Ethidiumbromid-Detektion bestätigte auch die Übereinstimmung der Plasmid-DNA mit der Fluoreszenz.

5.1.4 Untersuchungen zur stabilen Transgenexpression

Um stabilen Gentransfer ohne die Verwendung von Selektionsdruck zu erreichen wurde ein von Maucksch C. (Maucksch, 2008) als potenter beschriebener Vektor pEPICUBIBLuc verwendet. Dieser Vektor zeigte ohne Selektionsdruck über mehr als 30 Tage, verglichen mit einem Analogon ohne *S/MAR*, stabile Transgenexpression. Der Vektor enthält als Promotor-Elemente eine Kombination von humanem CMV-Verstärker (*enhancer*), Ubiquitin B-Promotor und Ubiquitin-Intron in der angegebenen Reihenfolge mit einer Gesamtgröße von 1,4kb. Die Verwendung von CMV-*enhancer* und Intron Elementen führte zu einer deutlich erhöhten Genexpression (Yew et al., 2002) und ist daher bei der Verwendung des relativ schwachen Ubiquitin B

Promotors von Bedeutung. Zusätzlich befindet sich zwischen dem Luciferase-Transgen und PolyA-Schwanz die *hulNF- β -S/MAR*. In diesen Vektor wurden je zwei Bindungsseiten für *PNA1* und *PNA2* kloniert, wobei ein Oligonukleotid von 300bp zwischen die Bindungsseiten 1 und 2 kloniert wurde. Diese Maßnahme wurde aufgrund der höheren Anzahl an Bindungsseiten vorgenommen. Somit konnte eine Interaktion der unterschiedlichen *PNA* Konstrukte reduziert werden. Nach Konjugation der *NMTS*-Sequenz über beide *PNA*s an pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1 wurden 1×10^6 Jurkat-Zellen jeweils mit 2 μ g pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1/*PNA1-SMCC-NMTS/PNA2-SMCC-NMTS* Konjugat (*PNA1,2-SMCC-NMTS*), sowie dem Zwischenprodukt pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1/*PNA1-SMCC/PNA2-SMCC* (*PNA1,2-SMCC*) und unmodifiziertem Plasmid transfiziert. Die Luciferase-Expression wurde über mehrere Wochen verfolgt, wobei sich für pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1/*PNA1-SMCC-NMTS/PNA2-SMCC-NMTS* verglichen mit pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1 keine signifikant höheren Expressionswerte ergaben. Auch das Zwischenprodukt zeigte keine höhere Expression (**Abb. 4.7**).

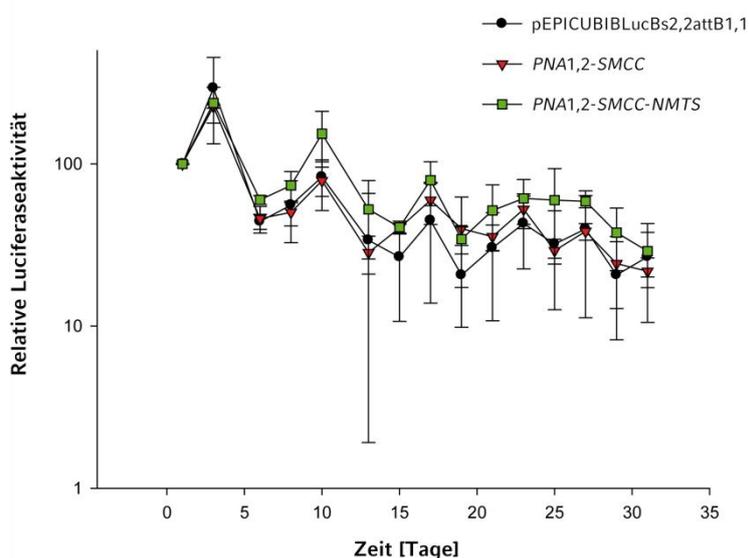


Abb. 4.7: Transgenexpression nach Nukleofektion von Jurkat-Zellen mit dem über *PNA* modifiziertem *S/MAR-NMTS* Hybridvektor. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 μ g pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1, pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1/*PNA1-SMCC/PNA2-SMCC* (*PNA1,2-SMCC*) und pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1/*PNA1-SMCC-NMTS/PNA2-SMCC-NMTS* (*PNA1,2-*

SMCC-NMTS) mittels Nukleofektion transfiziert und die Luciferaseexpression über 30 Tage gemessen. Die relative Luciferaseaktivität, (bezogen auf Tag 1 nach Transfektion), des *PNA1,2-SMCC-NMTS* Konjugates war zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die *pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1* und *PNA1,2-SMCC* Kontrolle.

Die Luciferase-Expression aller Konjugate sank innerhalb von 14 Tagen auf 30 Prozent der initialen Expression und blieb hier für weitere 14 Tage stabil. Da nach 30 Tagen kein Unterschied in der Luciferase-Expression zu verzeichnen war, wurde die Gesamt-DNA aus den Jurkat-Zellen isoliert. Mittels Quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde anschließend die Menge an Luciferasegen mittels Luciferase-spezifischer Primer quantifiziert (**Abb. 4.8**). Auch hier war kein signifikanter Unterschied unter den Konjugaten feststellbar.

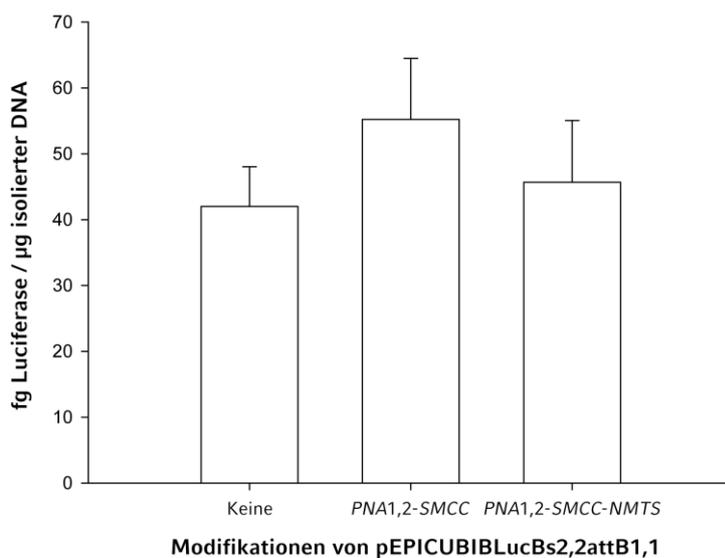


Abb. 4.8: Quantifizierung des Luciferase-Reportergens 30 Tage nach Nukleofektion von Jurkat-Zellen mit über *PNA* modifiziertem *S/MAR-NMTS* Hybridvektor. Nach DNA-Isolierung der Jurkat-Zellen der Langzeit-Luciferasemessung (vgl. Abb. 4.7) wurde die Menge an Luciferase-Reportergen mittels Luciferase spezifischer Primer über qRT-PCR quantifiziert. Auch in der qRT-PCR konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *PNA1,2-SMCC-NMTS* und den Kontrollen *pEPICUBIBLucBs2,2attB1,1* und *PNA1,2-SMCC* festgestellt werden.

Sowohl die Luciferase-Expression, als auch die qRT-PCR zeigten keinen Effekt der *NMTS*. Desweiteren fand auch nach 30 Tagen kein weiterer Abfall der Luciferase-Expression statt, um mögliche Unterschiede bzw. Effekte der *NMTS* zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigten, dass der pEPICUBIBLuc Vektor aufgrund der langanhaltenden stabilen Expression nicht für den Versuchsaufbau geeignet war. Zusätzlich konnten Diviacco *et al.* (Diviacco *et al.*, 2001) und Liebling *et al.* (Liebling *et al.*, 2003) zeigen, dass durch *PNA* Bindung die Replikation von Plasmid-DNA signifikant gehemmt wird. Aus diesen Gründen wurde für die weiteren Untersuchungen sowohl ein anderer Vektor, als auch eine andere Kopplungsmethode gewählt.

5.2 Stabile Transgenexpression nach DNA-Bindung der *NMTS*-Peptidsequenz mittels *Aziridine Labeling Reagenz (ALR)*

Als neuer Ansatz wurde der pEPI-luc Vektor für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Der pEPI-luc Vektor umfasst neben der huINF β -S/MAR, Luciferase als Reporter gen unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Desweiteren besitzt er eine Neomycin-Resistenz, was die Anwendung von Selektionsdruck mit G418 ermöglicht. Für die Modifikation der Plasmid-DNA wurde *labelIT* Amin (Mirus Bio LLC, USA) verwendet. *labelIT* Amin ist ein Alkylierungsreagenz „Aziridine Labeling Reagenz“ (ALR) womit es möglich ist, Plasmid-DNA kovalent mit einer primären Aminogruppe zu modifizieren. Die Alkylierung findet dabei überwiegend an Position N⁷ der Guanin-Basen statt. Es konnte gezeigt werden, dass geringe Kopplungsgrade von ALR an Plasmid-DNA nur einen geringen Einfluss auf die Expression haben (Slattum et al., 2003). Vermutet wird, dass die Transkriptions-Maschinerie fähig ist, ebenso die modifizierten Basen mit zu erfassen oder sogar die modifizierten Basen ausgetauscht werden.

Diese Modifikation könnte somit nach *NMTS* Konjugation die episomale Replikation der Plasmid-DNA ermöglichen. In den weiteren Versuchen wurde daher, pEPI-luc über ALR mit der *NMTS* modifiziert und hinsichtlich Transgenexpression und episomalem Status *in vitro* untersucht.

5.2.1 Nachweis der *NMTS*-Bindung

Für die weiteren Untersuchungen wurden unterschiedliche pEPI-luc-ALR-SMCC-*NMTS* Konjugate mit unterschiedlichen Konjugationsgraden synthetisiert (**Abschnitt 2.2.4.3**). Konjugationsgrade von 3, 7, 10 und 24 Mol *NMTS* pro Mol pEPI-luc ($F_{NMTS} = 3, 7, 10, 24$) konnten durch Messung der Plasmid-DNA Konzentration und der Fluoreszenz ermittelt werden. Anschließend wurde jeweils 1 μ g Konjugat mittels Agarosegelelektrophorese

und anschließender Fluoreszenz- und Ethidiumbromid-Detektion überprüft (Abb. 4.9).

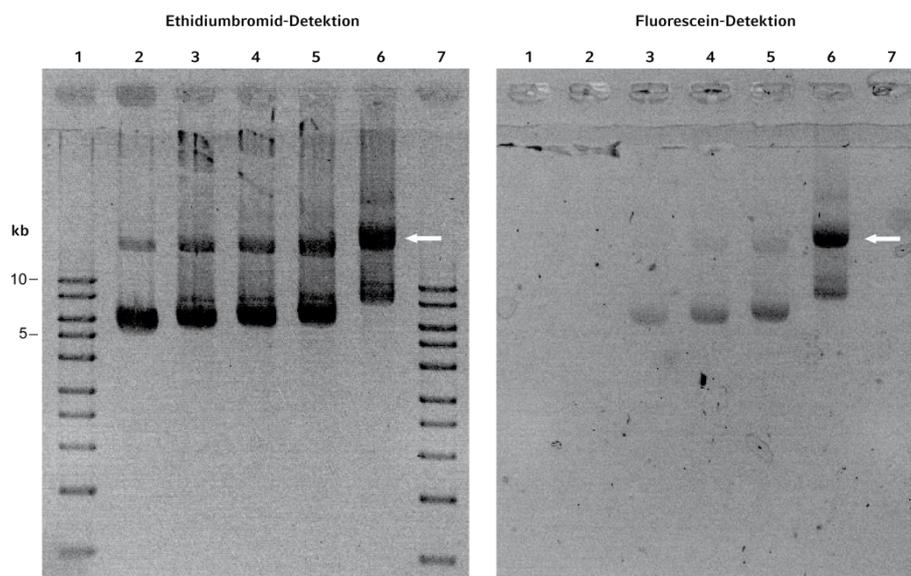


Abb. 4.9: Überprüfung der Herstellung von pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugaten mit unterschiedlichen Konjugationsgraden durch Modifikation von pEPI-luc mit der NMTS-Peptidsequenz über ALR. Unterschiedliche Konjugationsgrade $F_{NMTS} = 3, 7, 10, 24$ der pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugate wurden mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Fluorescein- und Ethidiumbromid-Detektion überprüft. Mit zunehmendem Konjugationsgrad $F_{NMTS} = 3, 7, 10, 24$ (Spur 3-6) konnte in der Fluorescein-Detektion eine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Außerdem war mit steigendem Konjugationsgrad eine Abnahme der *supercoil*-Form und eine Zunahme der offenkettig-zirkulären Form zu beobachten (siehe Pfeil). Als Kontrolle diente unmodifiziertes pEPI-luc Plasmid (Spur 2).

Die Fluorescein-Detektion zeigte mit steigendem Konjugationsgrad sowohl für die *supercoil*-Form als auch für die offenkettig-zirkuläre Form der Plasmid-DNA eine Zunahme der Fluoreszenzintensität (Spur 3 bis 6). Desweiteren konnte sowohl in der Fluoreszenz-Detektion als auch in der Ethidiumbromid-Detektion in Spur 6 ein deutlicher *Shift* der Plasmid-DNA von der *supercoil*-Form zur offenkettig-zirkulären Form beobachtet werden (siehe Pfeil), was darauf hindeutet, dass durch eine Modifikation mit ALR die Struktur der Plasmid-DNA verändert wurde. Durch die Ethidiumbromid-Detektion konnte

die Ko-Lokalisation von Plasmid-DNA und Fluoreszenz nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente unmodifizierte Plasmid-DNA (Spur 2). Diese zeigte keinerlei Fluoreszenz.

5.2.2 Einfluss des Konjugationsgrades auf die stabile Transgenexpression mit und ohne Selektionsdruck

Im Folgenden wurde untersucht, welches der Konjugate geeignet ist, stabile Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln. Hierfür wurden Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugaten ($F_{NM\text{TS}} = 3, 7, 10, 24$) transfiziert. Für die Nukleofektion wurden jeweils 1×10^6 Jurkat-Zellen und $2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA verwendet. Anschließend wurden die Zellen sowohl mit, als auch ohne Selektionsdruck für 30 Tage kultiviert, wobei in Abhängigkeit vom Zellwachstum die Luciferase-Transgenexpression bestimmt wurde.

In **Abbildung 4.10** ist die Luciferaseaktivität der Nukleofektion von Jurkat-Zellen nach 24 Stunden dargestellt.

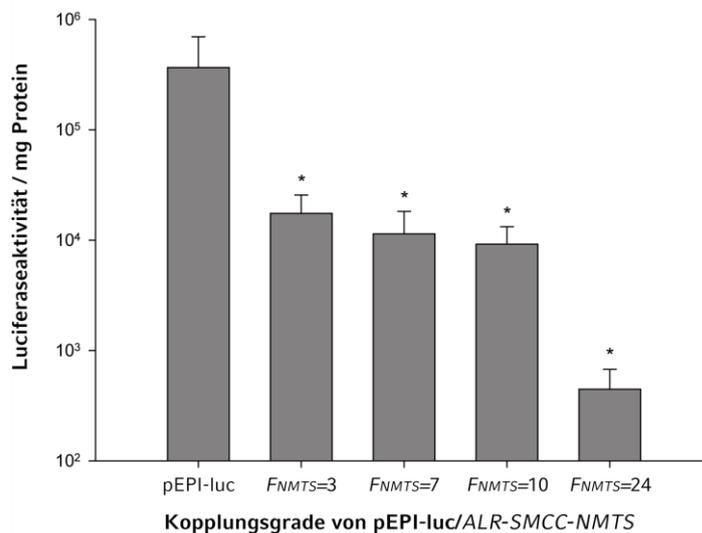


Abb. 4.10: Einfluss der *ALR*-Bindung auf die Luciferaseaktivität 24 Stunden nach Nukleofektion in Jurkat-Zellen. 24 Stunden nach Nukleofektion von Jurkat-Zellen mit je $2 \mu\text{g}$ pEPI-luc/*ALR*-SMCC-NMTS Konjugat verschiedener Konjugationsgrade ($F_{NM\text{TS}} = 3, 7, 10, 24$)

wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Für die Konjugate mit den Konjugationsgraden $F_{NM\text{TS}}=3, 7$ und 10 ergab sich eine signifikante ($*p<0,05$), um das 10-fache und für $F_{NM\text{TS}}=24$ eine signifikante ($*p<0,05$), um das circa 100-fache geringere Luciferaseaktivität, im Vergleich zu unmodifiziertem pEPI-luc.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Konjugate mit den Konjugationsgraden $F_{NM\text{TS}}=3, 7$ und 10 eine signifikante ($p<0,05$), um das 10-fache geringere Luciferase-Expression aufwiesen. Bei einem Konjugationsgrad von $F_{NM\text{TS}}=24$ war die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden im Vergleich zu unmodifiziertem pEPI-luc Vektor sogar signifikant ($p<0,05$) um das circa 100-fache reduziert. Die Modifikationen von pEPI-luc mit der *NM\text{TS}* über *ALR* zeigten, dass die Transgenexpression nach 24 Stunden mit ansteigendem Kopplungsgrad signifikant abnahm. Eine initial hohe Expression ist zwar wichtig, kann aber durch eine Steigerung der Dosis an Plasmid-DNA erreicht werden. Entscheidend ist jedoch die Langzeit-Transgenexpression.

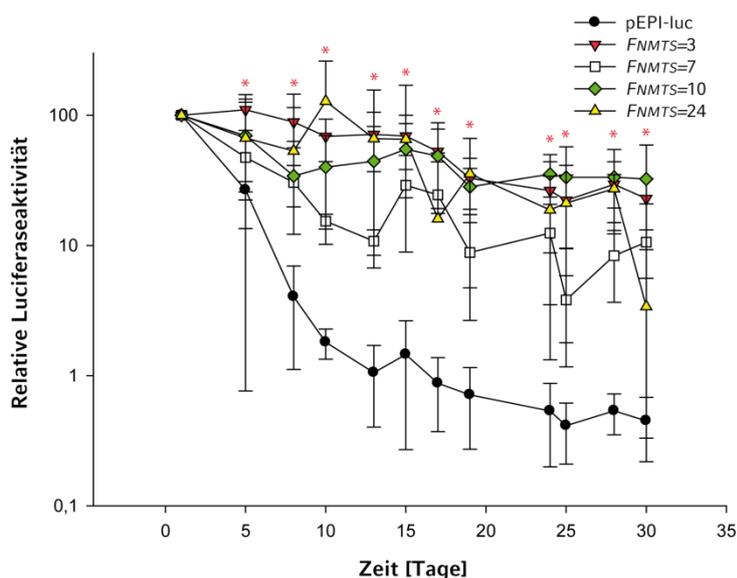


Abb. 4.11: Langzeitexpression unterschiedlicher pEPI-luc-*ALR-SMCC-NM\text{TS}* Konjugate ohne Selektionsdruck. Jurkat-Zellen wurden mit jeweils 2 μg pEPI-luc-*ALR-SMCC-NM\text{TS}* Konjugat $F_{NM\text{TS}}=3, 7, 10, 24$ mittels Nukleofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Hierbei ergab sich für das pEPI-luc-*ALR-*

SMCC-NMTS Konjugat mit dem geringsten Kopplungsgrad $F_{NM\text{TS}}=3$ über 30 Tage eine zu allen Zeitpunkten signifikant (* $p<0,05$) stabile Transgenexpression gegenüber pEPI-luc.

Im Gegensatz dazu lieferten die Modifizierten pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS ($F_{NM\text{TS}}=3, 7, 10, 24$) Konjugate über einen Zeitraum von 30 Tagen Luciferase-Expressionen von 10 bis 60 Prozent der initialen Expression. Das pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugat mit dem geringsten Kopplungsgrad $F_{NM\text{TS}}=3$ zeigte über 30 Tage eine zu allen Zeitpunkten signifikant ($p<0,05$) stabile Transgenexpression von $110\pm 33\%$ (Tag 5) bis $22\pm 9\%$ (Tag 30) der initialen Expression gegenüber pEPI-luc mit $26\pm 4\%$ (Tag 5) bis $0,4\pm 0,2\%$ (Tag 30).

Bei Messung der Langzeit-Transgenexpression in Jurkat-Zellen mit vierzehntägigen initialem Selektionsdruck (**Abb. 4.12**) zeigte der unmodifizierte pEPI-luc Vektor zunächst einen Abfall der Luciferaseexpression auf fünf Prozent der initialen Expression (Maucksch, 2008).

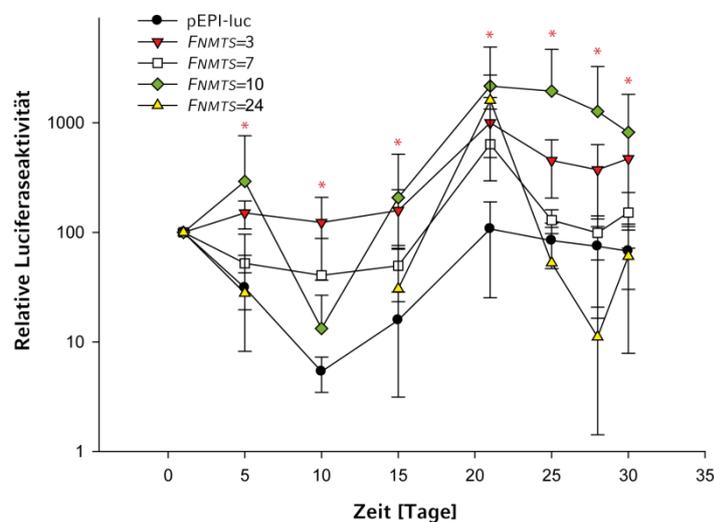


Abb. 4.12: Langzeitexpression unterschiedlicher pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugate mit Selektionsdruck. Jurkat-Zellen wurden mit jeweils $2\ \mu\text{g}$ pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugat $F_{NM\text{TS}}=3, 7, 10, 24$ mittels Nukleofektion transfiziert und 14 Tage mit Selektionsdruck (G418) kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Hierbei ergab sich für das pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugat mit dem geringsten Kopplungsgrad $F_{NM\text{TS}}=3$ nach 14-tägigem Selektionsdruck, verglichen mit pEPI-luc, eine um

das 450-fache höhere Luciferaseaktivität. Weiterhin zeigte das pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS ($F_{NM\text{TS}}=3$) Konjugat als einzigstes Konjugat nach Selektion, verglichen mit pEPI-luc, eine zu allen Zeitpunkten signifikante ($*p<0,05$) Luciferaseaktivität.

Die Expression des pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS $F_{NM\text{TS}}=3$ Konjugats stieg während des Selektionsdrucks auf circa 140 Prozent der initialen Expression an und blieb bis zur Entfernung des Selektionsdrucks an Tag 14 stabil. Danach stieg die Luciferaseexpression des pEPI-luc Vektors auf 100 Prozent der initialen Expression wieder an, wohingegen das pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS $F_{NM\text{TS}}=3$ Konjugat auf 450 Prozent der ursprünglichen Expression anstieg. Weiterhin war sowohl bei pEPI-luc, als auch bei dem pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS $F_{NM\text{TS}}=3$ Konjugat nach dem anfänglich vierzehn-tägigen Selektionsdruck keinerlei Selektion mehr nötig, um die Zellen auf dem hohen Expressionsniveau zu halten. Alle anderen pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS Konjugate zeigten keinerlei signifikant höhere und stabile Expressionswerte nach Selektion. Diese Ergebnisse zeigen, dass das pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS $F_{NM\text{TS}}=3$ Konjugat fähig war, sowohl mit, als auch ohne Selektionsdruck stabile Transgenexpression über einen Zeitraum von 30 Tagen zu erreichen. Ob allerdings ein Effekt der NM\text{TS} für diese Steigerung verantwortlich war, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

5.2.3 Untersuchungen zur stabilen Transgenexpression

Um in einem weiteren Versuchsaufbau den Einfluss der NM\text{TS} auf die stabile Transgenexpression untersuchen zu können, wurden sowohl eine randomisierte als auch mutierte Peptid-Sequenz als Kontrolle verwendet. Die randomisierte Peptid-Sequenz enthielt die gleichen Aminosäuren wie die NM\text{TS}, allerdings wurden diese in zufälliger Anordnung „randomisiert“ zu einem Peptid synthetisiert (*Scrambled*). Bei der mutierten Peptid-Sequenz wurde die Aminosäure Tyrosin innerhalb der NM\text{TS} des AML-1B Transkriptionsfaktors an Stelle 380 gegen Alanin ersetzt (Y380A). Mit dieser Mutation konnte bereits in vorherigen Studien von Vradii *et al.* gezeigt

werden, dass bei Austausch von Tyrosin 380 gegen Alanin keine Assoziation von AML-1B mit der Nukleären Matrix mehr nachzuweisen war (Vradii et al., 2005).

Für die Durchführung wurden *NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Peptid mit einem Konjugationsgrad von $F_{NMTS}=3$, $F_{Y380A}=3$ und $F_{Scrambled}=3$ über *ALR* an pEPI-luc kovalent gebunden. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 Jurkat-Zellen mit 2 µg Konjugat mittels Nukleofektion transfiziert. Als Kontrolle wurde auch hier unmodifiziertes pEPI-luc verwendet. Die Luciferase-Expression wurde über 30 Tage verfolgt, wobei sich für alle Konjugate verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc ab Tag 10 signifikant ($p < 0,05$) höhere Expressionsniveaus ergaben (**Abb. 4.13**). Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konjugaten festgestellt werden.

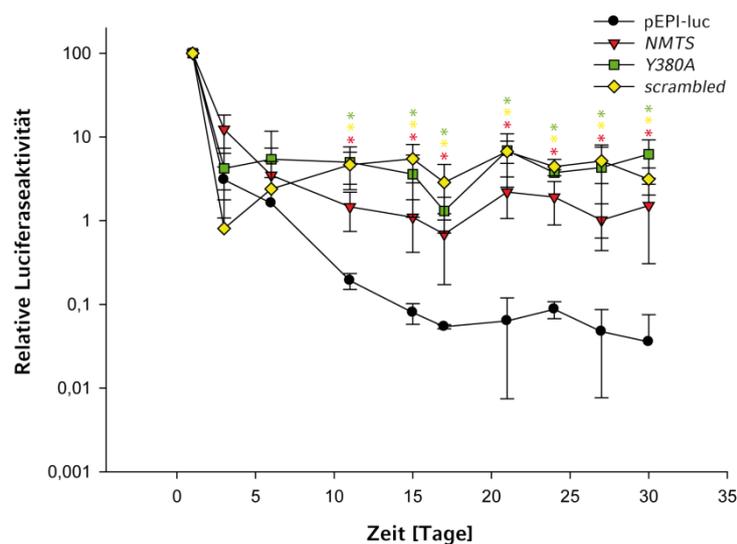


Abb. 4.13: Langzeitexpression des über *ALR* konstruierten *S/MAR-NMTS* Hybridvektors nach Nukleofektion. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 µg pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Konjugaten ($F_{NMTS}=3$, $F_{Y380A}=3$ und $F_{Scrambled}=3$) mittels Nukleofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde über 30 Tage die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Alle Konjugate zeigten ab Tag 10, verglichen mit pEPI-luc, eine signifikante ($*p < 0,05$) um das 10-fache höhere Luciferaseaktivität. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS* Konjugat (*NMTS*) und den Kontrollen pEPI-luc-*ALR-SMCC-Y380A*, pEPI-luc-*ALR-SMCC-Scrambled* (*Scrambled*) festgestellt werden.

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die um das 10-fache erhöhte Luciferase-Expression der *NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Peptide nicht auf die Funktion der *NMTS* zurückzuführen war. Da als Transfektionsmethode Nukleofektion, eine an die Zellen angelegte kurze, gepulste, hohe Spannung zur Einschleusung der DNA in den Kern verwendet wurde, konnte auch teilweise Integration von DNA ins Genom der Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Durch die Isolierung der Gesamt-DNA aus den Zellen und dem darauffolgenden Verdau mittels Plasmid-Safe DNase (**siehe Abschnitt 2.2.9**) konnte mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) ausschließlich episomale Plasmid-DNA quantifiziert werden. Daher wurde am Tag 30 nach Transfektion aus jeweils 1×10^7 Jurkat-Zellen Gesamt-DNA isoliert. Bei der qRT-PCR wurde anschließend in 500 µg unverdauter und verdauter Gesamt-DNA mittels Luciferase-spezifischer Primer die Menge an Luciferase quantifiziert (**Abb. 4.14**). Bei der qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Menge an integriertem Luciferasegen in den *NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Konjugaten um circa zehn bis zwanzig Prozent (93,9 %, 90,0%, 97,3%) höher war, im Vergleich zu unmodifiziertem pEPI-luc (81,7 %).

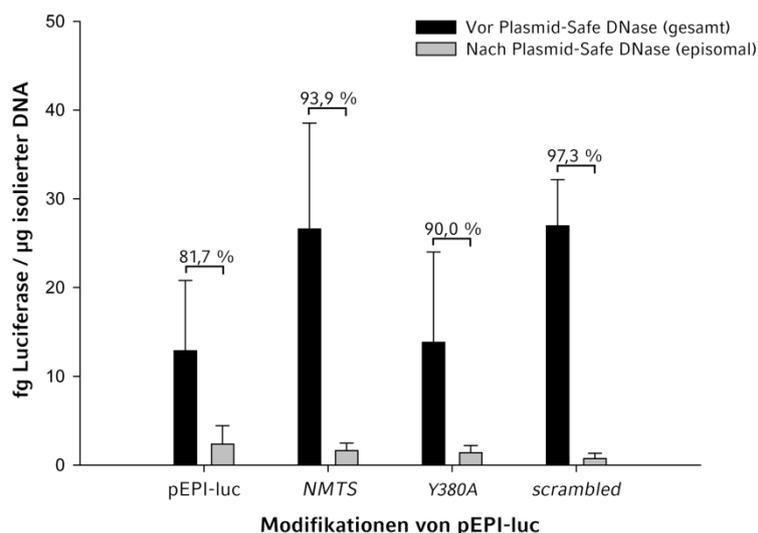


Abb. 4.14: Quantifizierung von integriertem Luciferase-Reporter gen mittels qRT-PCR. Gesamt-DNA wurde 30 Tage nach Nukleofektion mit pEPI-luc und pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Konjugaten ($F_{NMTS} = 3$, $F_{Y380A} = 3$ und $F_{Scrambled} = 3$) aus Jurkat-

Zellen isoliert. Mittels qRT-PCR wurde sowohl vor, als auch nach Verdau mittels Plasmid-Safe DNase die Menge an Luciferase-Reportergen quantifiziert. Hierbei ergab sich bei den Modifikationen ein circa 10 bis 20 Prozent höherer Anteil an integriertem Luciferase-Reportergen, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc.

Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass die Methode der DNA Isolierung nicht die Integrität der Plasmid-DNA beeinflusste, was zu einem Verdau der Plasmid-DNA durch Plasmid-Safe DNase geführt hätte. Daher wurde bei der Isolierung von DNA aus 1×10^7 untransfizierten Jurkat-Zellen eine definierte Menge an Plasmid-DNA von 500 ng pEPI-luc zugesetzt. Danach wurde in 500 ng unverdauter und Plasmid-Safe DNase verdauter DNA die Menge an Luciferasegen mittels qRT-PCR bestimmt (**Abb. 4.15**). Sowohl vor, als auch nach Plasmid-Safe DNase Verdau konnte die gleiche Menge an pEPI-luc nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass durch die DNA-Isolierung nicht die Integrität der Plasmid-DNA beeinflusst wurde und somit dieses Verfahren für die Bestimmung episomaler Plasmid-DNA verwendet werden konnte.

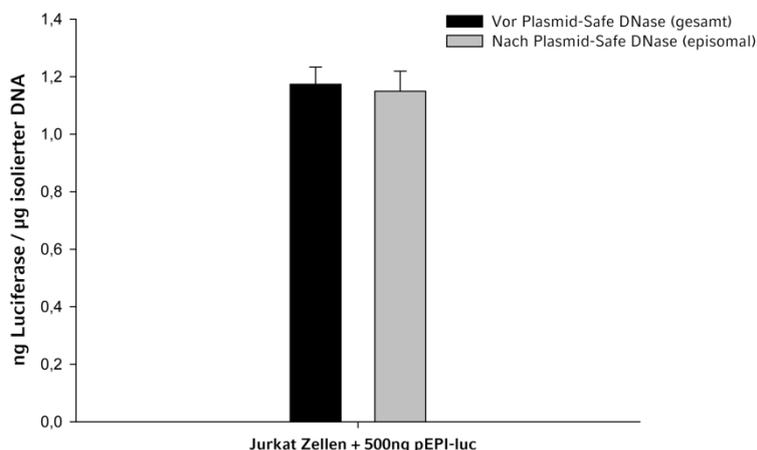


Abb. 4.15: Überprüfung der Integrität von Plasmid-DNA nach DNA-Isolation und Plasmid-Safe DNase Verdau mittels qRT-PCR. Untransfizierten Jurkat-Zellen wurde eine definierte Menge an Plasmid-DNA von 500 ng pEPI-luc zugesetzt und anschließend die Gesamt-DNA isoliert. Danach wurde in 500 ng unverdauter und Plasmid-Safe DNase verdauter Gesamt-DNA

die Menge an Luciferase-Reportergen mittels qRT-PCR bestimmt. Hierbei konnte kein Verlust an Plasmid-DNA festgestellt werden.

Aufgrund der relativ hohen Integration wurde Lipofektion als alternative Transfektionsmethode gewählt, um einen möglichen Einfluss der Nukleofektion zu untersuchen. In diesem Experiment wurden jeweils 375.000 Jurkat-Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. Hierbei wurden die pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Konjugate ($F_{NMTS}=3$, $F_{Y380A}=3$ und $F_{Scrambled}=3$) mit Lipofectamin 2000 komplexiert. Als Kontrolle wurde unmodifiziertes pEPI-luc verwendet. Die Zellen wurden ohne Selektionsdruck kultiviert und die Luciferase-Expression über 30 Tage verfolgt (**Abb. 4.16**).

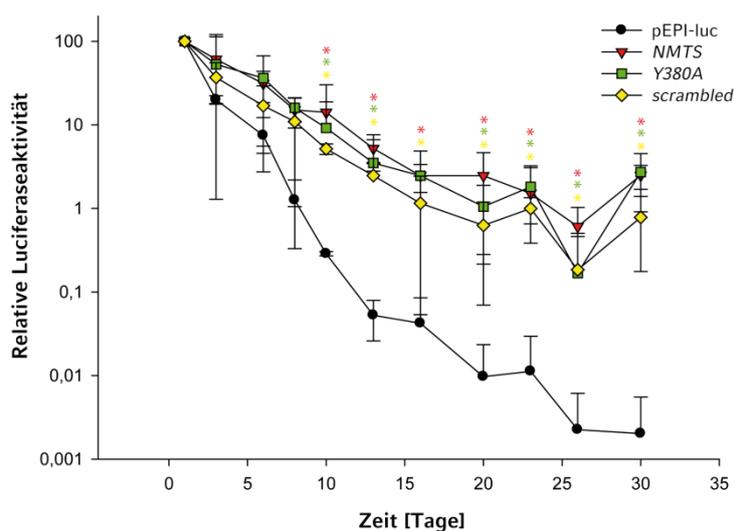


Abb. 4.16: Langzeitexpression des über *ALR* konstruierten *SMAR-NMTS* Hybridvektors nach Lipofektion. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 µg pEPI-luc/*ALR-SMCC-NMTS*-, *Y380A*- und *Scrambled*-Konjugaten ($F_{NMTS}=3$, $F_{Y380A}=3$ und $F_{Scrambled}=3$) mittels Lipofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde über 30 Tage die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Alle Konjugate zeigten ab Tag 10, verglichen mit pEPI-luc, eine um das 10-100-fache signifikant (* $p<0,05$) höhere Luciferaseaktivität. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS* Konjugat und den Kontrollen pEPI-luc-*ALR-SMCC-Y380A*, pEPI-luc-*ALR-SMCC-Scrambled* festgestellt werden.

Ähnlich der Nukleofektion (**Abb. 4.13**), konnte ab Tag 10 eine meist signifikant ($p < 0,05$), bis zu 100-fach höhere Luciferase-Expression der Konjugate, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc, festgestellt werden. Kein Unterschied war dagegen in der Expression der Konjugate untereinander zu erkennen. Nach Isolierung der Gesamt-DNA und anschließendem Plasmid-Safe DNase Verdau, konnte in der qRT-PCR auch nach Transfektion mittels Lipofektion, ähnlich der qRT-PCR nach Nukleofektion (**Abb. 4.14**), ein hoher Anteil an integrierter Luciferase von über 90 Prozent für die Konjugate nachgewiesen werden (**Abb. 4.17**).

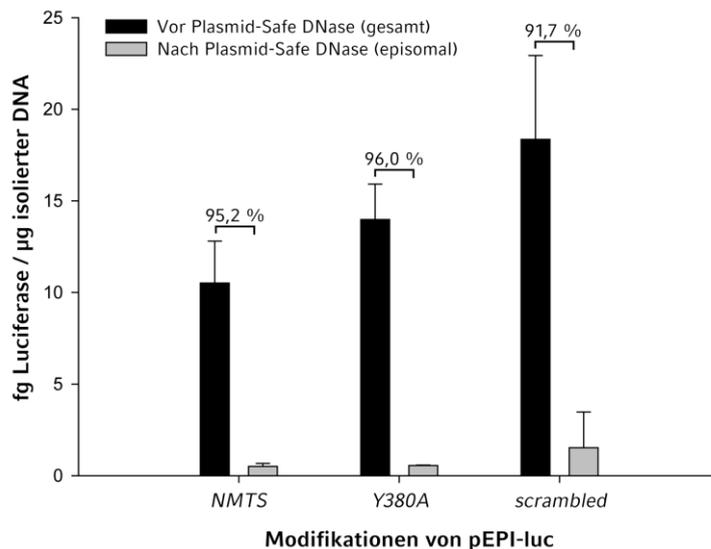


Abb. 4.17: Quantifizierung von integriertem Luciferase-Reportergen mittels qRT-PCR. Gesamt-DNA wurde 30 Tage nach Lipofektion mit pEPI-luc und pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS-, Y380A- und Scrambled-Konjugaten ($F_{NMTS} = 3$, $F_{Y380A} = 3$ und $F_{Scrambled} = 3$) aus Jurkat-Zellen isoliert. Mittels qRT-PCR wurde sowohl vor, als auch nach Verdau mittels Plasmid-Safe DNase die Menge an Luciferase-Reportergen quantifiziert. Hierbei ergab sich bei den Modifikationen ein circa 10 bis 20 Prozent höherer Anteil an integriertem Luciferase-Reportergen, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc (pEPI-luc Kontrolle siehe Abb. 4.14).

5.2.4 Einfluss unterschiedlicher Crosslinker auf die stabile Transgenexpression

Aufgrund der unveränderten 10 bis 20 Prozent höheren Integration der Konjugate trotz unterschiedlicher Transfektionsmethoden wurden der Einfluss verschiedener unterschiedlich lipophiler Crosslinker, sowie der intermediären Kopplungsprodukte als auch der *S/MAR* auf die Integration untersucht.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass durch Modifikation von Rinderserumalbumin (BSA) mit hydrophoben Aminosäuren die Aufnahme in den Zellkern gesteigert werden konnte (Naim et al., 2009). Übertragen auf die pEPI-luc-*ALR-SMCC Peptid*-Konjugate wurde daher angenommen, dass durch die Modifikationen von pEPI-luc mit den *ALR*, *SMCC* sowie den Peptiden *NMTS*, *Y380A* und *Scrambled* die Hydrophobizität und damit die Aufnahme in den Zellkern gesteigert wird. Dadurch würde eine größere Menge an Plasmid-DNA im Zellkern zu mehr Integration führen. Um den Einfluss der Hydrophobizität zu untersuchen wurde in dem folgenden Experiment über unterschiedliche Crosslinker *AMAS*, *SMCC*, *KMUS* das *NMTS* Peptid mittels *ALR* an pEPI-luc mit einem Kopplungsgrad von $F_{NMTS}=3$ kovalent gekoppelt. Die Lipophilie der Crosslinker wurde über die n-Oktanol / Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) folgender Strukturen ermittelt: *AMAS* (Ethan; $\log P$ 1,81), *SMCC* (Hexan; $\log P$ 4,11), *KMUS* (Undecan; $\log P$ 5,74). Somit nimmt diese in folgender Reihenfolge $AMAS < SMCC < KMUS$ zu. Anschließend wurden Jurkat-Zellen mit je 2 μg Konjugat (pEPI-luc-*ALR-AMAS*, *SMCC*, *KMUS-NMTS* $F_{NMTS}=3$) mittels Nukleofektion transfiziert und die Luciferase-Expression über 30 Tage verfolgt (**Abb. 4.18**).

Die Expression der Konjugate fiel zunächst bis Tag 5 auf 10 Prozent der initialen Luciferase-Expression ab, blieb aber bis Tag 30 auf einem konstanten Niveau. Als Kontrolle diente pEPI-luc, welches bis Tag 30 auf 0,1 Prozent der initialen Luciferase-Expression abgefallen war. Ab Tag 15 wiesen alle Konjugate, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc, eine signifikante ($p < 0,05$) circa 10 bis 100-fach höhere Expression auf. Die Konjugate wiesen hingegen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede untereinander auf. Somit kann

sowohl ein Einfluss der Hydrophobie der Crosslinker, als auch der Art des Crosslinkers auf die Langzeit-Luciferaseexpression ausgeschlossen werden.

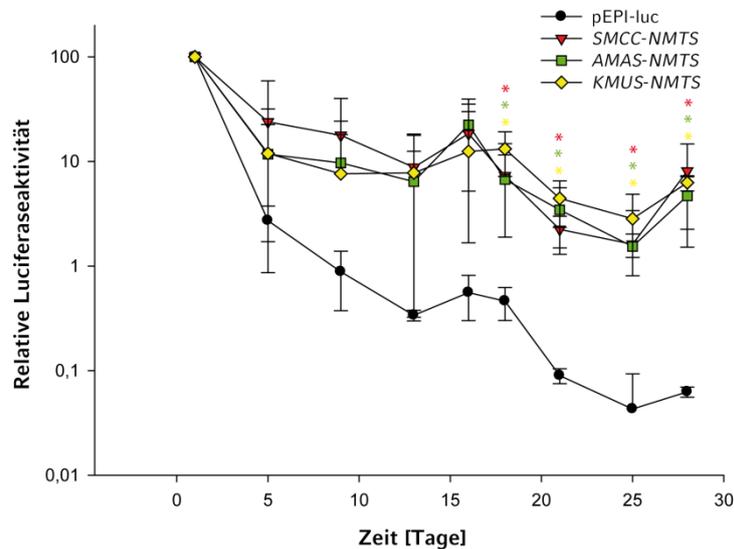


Abb. 4.18: Einfluss der unterschiedlich hydrophober Crosslinker auf die stabile Langzeit-Expression. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 μg pEPI-luc-ALR-SMCC/AMAS/KMUS-NMTS Konjugaten ($F_{NM\text{TS}} = 3$) mittels Nukleofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde über 30 Tage die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Hierbei stieg die Hydrophobizität der Konjugate in der Reihenfolge AMAS < SMCC < KMUS an. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen den Konjugaten beobachtet werden. Verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc wiesen alle Konjugate ab Tag 15 eine signifikante ($*p < 0,05$) 10 bis 100-fach höhere Expression auf.

5.2.5 Einfluss der intermediären Kopplungsprodukte auf die stabile Transgenexpression

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der intermediären Kopplungsprodukte untersucht, um möglicherweise hier eine Antwort auf die stabile Transgenexpression zu finden. Während der Modifikation von pEPI-luc mit der NMTS wurde nach jedem erfolgten Kopplungsschritt und Aufreinigung ein Aliquot entnommen. Die Kopplungsprodukte pEPI-luc-ALR, pEPI-luc/ALR-

SMCC und pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS wurden anschließend in Jurkat-Zellen mittels Nukleofektion transfiziert. Auch hier wurden 2 µg Plasmid-DNA je 1 x 10⁶ Zellen verwendet. Die Luciferase-Expression wurde wiederum über circa 30 Tage verfolgt (**Abb. 4.19**). Für pEPI-luc als Kontroll-Plasmid ergab sich erneut bis Tag 10 ein Abfall der Expression auf ein Prozent der initialen Luciferase-Expression. Die Kopplungsprodukte hatten allerdings nur einen Abfall bis auf 10 Prozent der initialen Luciferase-Expression zu verzeichnen, blieben aber anschließend auf einem stabilen Niveau. Zwischen den Kopplungsprodukten waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Somit konnte auch kein Effekt der Intermediärprodukte pEPI-luc-ALR und pEPI-luc-ALR-SMCC auf die stabile Luciferase-Expression nachgewiesen werden.

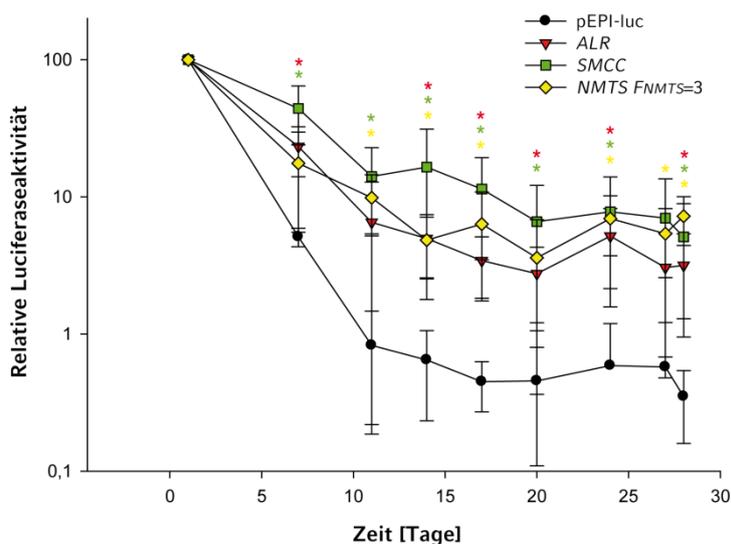


Abb. 4.19: Einfluss der intermediären Kopplungsprodukte auf die stabile Langzeit-Expression. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 µg pEPI-luc-ALR (ALR), pEPI-luc-ALR-SMCC (SMCC), pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS (NMTS) ($F_{ALR} = 3$, $F_{SMCC} = 3$ und $F_{NMTS} = 3$) mittels Nukleofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde über 30 Tage die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den intermediären Kopplungsprodukten beobachtet werden. Allerdings zeigten alle Konjugate, verglichen mit pEPI-luc, eine zu nahezu allen Zeitpunkten signifikante (* $p < 0,05$) 10-fach höhere Transgenexpression.

In einem weiteren Experiment wurden alle verwendeten Konjugate pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*, *Y380A*, *Scrambled*, einschließlich der Intermediärprodukte pEPI-luc-*ALR* und pEPI-luc-*ALR-SMCC* mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Zusätzlich wurde unbehandeltes und im Kopplungsprozess mit behandeltes pEPI-luc aufgetragen. Für die Transfektionen wurde stets auch nur behandeltes Plasmid als Kontrolle verwendet, um Effekte, die durch den Reinigungsprozess auftreten könnte zu vermeiden. Für die Agarosegelelektrophorese wurde je Spur 1 µg Plasmid-DNA aufgetragen. Die Detektion der Plasmid-DNA erfolgte mittels GelRedTM (**Abb. 4.20a, b**). Die modifizierten Konjugate pEPI-luc-*ALR*, pEPI-luc-*ALR-SMCC* und pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*, *Y380A*, *Scrambled* zeigten einen hohen, deutlich sichtbaren Anteil an offenkettig-zirkulärer Form der Plasmid-DNA (**Abb. 4.20a** Spur 4 bis 6; **4.20b** Spur 2 bis 4; **siehe Pfeil**). Die unbehandelte (pEPI-luc) und im Kopplungsprozess mit behandelte Plasmid-DNA (pEPI-luc behandelt) zeigten hingegen keine im Gel sichtbare Erhöhung der offenkettig-zirkulären Form (**Abb. 4.20a** Spur 2, 3). Weiterhin konnte auch bei der Fluorescein-Detektion eine Fluoreszenz der DNA-Bande der offenkettig-zirkulären Form gezeigt werden (**Abb. 4.20; siehe Pfeil**).

Um die Ergebnisse genauer beurteilen zu können, wurden die Banden der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA mit dem Softwareprogramm ImageJ 1.41n (National Institutes of Health, USA) quantifiziert (**Abb. 4.20c, d**). Die dabei erhaltenen Werte wurden auf unbehandeltes, unmodifiziertes pEPI-luc bezogen. Die Auswertung ergab, dass die Menge an offenkettig-zirkulärer Form der Plasmid-DNA in den Konjugaten pEPI-luc-*ALR*, pEPI-luc-*ALR-SMCC* und pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS*, *Y380A*, *Scrambled* im Vergleich zu unbehandelter, unmodifizierter Plasmid-DNA um 150 bis 200 Prozent höher war. Die behandelte, unmodifizierte Plasmid-DNA (im Prozess) zeigte hingegen nur eine Erhöhung der offenkettig-zirkulären Form um 16 Prozent. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass durch eine Modifikation der Plasmid-DNA die offenkettig-zirkuläre Form der DNA erhöht wurde. Die Kopplung von *ALR* an die DNA war hierfür maßgeblich verantwortlich.

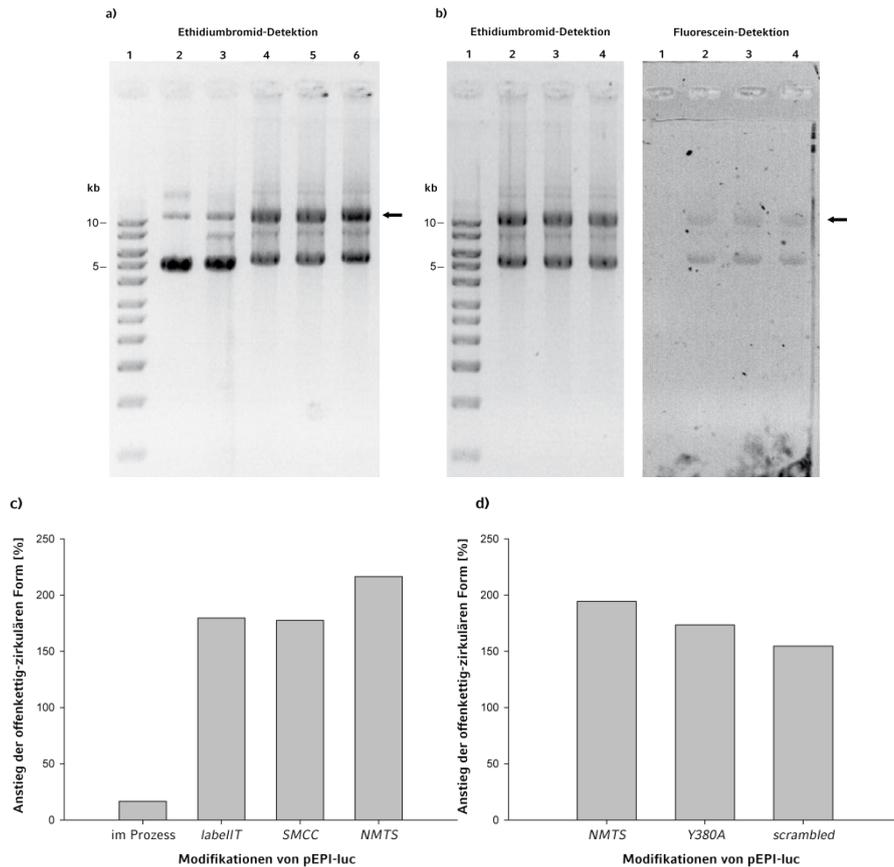


Abb. 4.20a-d: Agarosegelelektrophorese der Peptidkonjugate. Fluorescein- und Ethidiumbromid-Detektion, sowie semiquantitative Bestimmung der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA. Agarosegelelektrophorese und Fluorescein- und Ethidiumbromid-Detektion folgender Konjugate: **a)** pEPI-luc (Spur 2), pEPI-luc behandelt (Spur 3), pEPI-luc-ALR (Spur 4), pEPI-luc-ALR-SMCC (Spur 5), pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS ($F_{NMTS}=3$), 1kb DNA Marker (Spur 1); **b)** pEPI-luc-ALR-SMCC-NMTS ($F_{NMTS}=3$) (Spur 2), pEPI-luc-ALR-SMCC-Y380A ($F_{Y380A}=3$) (Spur 3), pEPI-luc-ALR-SMCC-Scrambled ($F_{Scrambled}=3$) (Spur 4), 1kb DNA Marker (Spur 1). Je Spur wurde 1 μ g Plasmid-DNA aufgetragen. Visuelle Zunahme der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA durch die Modifikation mit ALR in der Ethidiumbromid-Detektion (Grafik a); siehe Pfeil). Auch in der Fluorescein-Detektion kann eine Modifikation der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA beobachtet werden (Grafik b) Fluorescein-Detektion; siehe Pfeil).

Die Banden der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA von Grafik a) und b) wurden semiquantitativ mittels ImageJ 1.41n ausgewertet (Grafik c) und d)). Die Werte wurden auf unmodifizierte nicht behandelte Plasmid-DNA bezogen. Hierbei zeigte sich für alle Konjugate ein Anstieg der offenkettigen-zirkulären Form der Plasmid-DNA um 150 bis 200 Prozent. Die mitbehandelte Plasmid-DNA (im Prozess) zeigte lediglich eine Erhöhung um 16 Prozent.

5.2.6 Einfluss der *S/MAR* in Kombination mit *ALR* auf die stabile Transgenexpression

Um weiterhin zu untersuchen, ob Effekte der *S/MAR* in Kombination mit der *ALR*-Modifikation eine Rolle in der stabilen Transgenexpression spielen, wurde pCLUC mittels *ALR* und *NMTS* mit einem Kopplungsgrad von $F_{NMTS}=3$ modifiziert. Das Plasmid pCLUC besitzt wie pEPI-luc, Luciferase als Transgen unter der Kontrolle des CMV Promotors, mit dem Unterschied, dass eine *S/MAR* fehlt. Eine Millionen Jurkat-Zellen wurden mit je 2 μg modifiziertem pCLUC-*ALR-SMCC-NMTS* und unmodifiziertem aber behandeltem pCLUC mittels Nukleofektion transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne Selektionsdruck über 25 Tage kultiviert (**Abb. 4.21**).

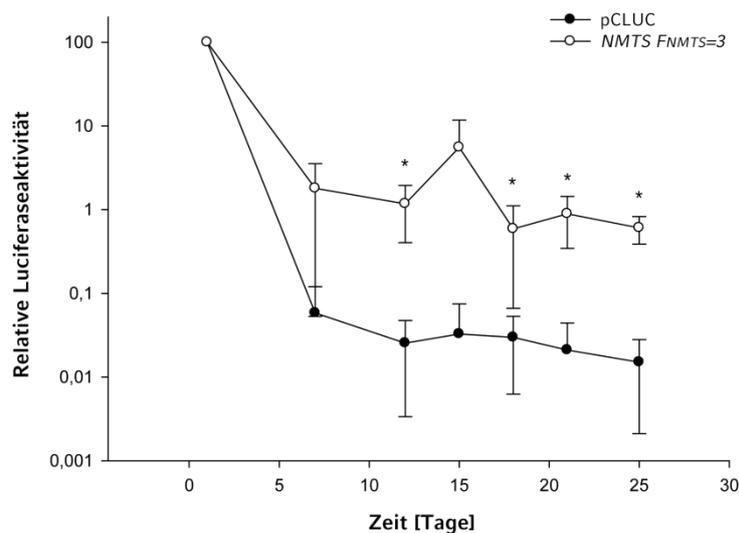


Abb. 4.21: Ausschluss der *S/MAR*-Effekte auf die Langzeit-Transgenexpression. Jurkat-Zellen wurden mit je 2 μg pCLUC und pCLUC-*ALR-SMCC-NMTS* (*NMTS*, $F_{NMTS}=3$) mittels Nukleofektion transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurde über 25 Tage die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden relativ auf Tag 1 nach Transfektion bezogen. Hierbei konnte für pCLUC-*ALR-SMCC-NMTS*, verglichen mit unmodifiziertem pCLUC, ab Tag 12 eine signifikante (* $p<0,05$) um das 10 bis 100-fach höhere Luciferaseexpression gemessen werden.

Die Messungen der Luciferase-Expression zeigten für pCLUC-ALR-SMCC-NMTS innerhalb von sieben Tagen einen initialen Abfall der Luciferase-Expression auf circa ein Prozent der initialen Expression, blieben danach aber über weitere 18 Tage bis zum Ende des Versuches stabil. Die Expression von unmodifiziertem, behandeltem pCLUC sank bis Tag 10 tiefer auf 0,02 Prozent der initialen Luciferase-Expression ab. Die Ergebnisse zeigte somit ab Tag 12 einen signifikanten ($p < 0,05$) bis zu 60-fach höhere Luciferase-Expression für pCLUC-ALR-SMCC-NMTS $F_{NMTS} = 3$. Da auch ohne S/MAR eine stabile Luciferase-Expression durch Modifikation mit ALR erreicht werden kann, können Effekte der S/MAR in Kombination mit ALR ausgeschlossen werden.

5.3 Zusammenfassende Betrachtung zum stabilen Gentransfer durch Kombination episomale replizierender Vektoren mit der *NMTS*-Peptidsequenz

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von *huINF* β -*Scaffold Matrix Attachment Region (S/MAR)*- *Nuklear Matrix Attachment Region (NMTS)*-Hybridvektoren in hämatopoetischen Zellen keine Steigerung der Etablierung episomaler Vektoren *in vitro* möglich war. Über unterschiedliche Modifikationsmethoden wie *PNA* oder kovalenter *ALR* Bindung konnten *S/MAR* Vektoren mit der *NMTS* des AML-1B Transkriptionsfaktor modifiziert werden. Diese Konjugate mit unterschiedlichen Promotoren und transkriptionsverstärkenden Elementen in Kombination mit der *S/MAR* und *NMTS* wurden auf deren Potential getestet Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln. Weiterhin wurde ebenfalls der Anteil an integrierter und episomal vorliegender Plasmid-DNA nach Transfektion untersucht.

Zur Untersuchung der *PNA* Bindung an Plasmid-DNA wurden zwei unterschiedliche Bindungsseiten in unterschiedliche Plasmid-Vektoren kloniert. Hier erwies sich eine initiale Modifikation der *PNAs* und anschließende Hybridisierung mit Plasmid-DNA im Gegensatz zu einer initialen Hybridisierung mit anschließender Modifikation als effektiver. Nach Bindung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe über unterschiedliche *PNAs* konnte nach Transfektion und Fluoreszenzmikroskopie durch Ko-Lokalisation gezeigt werden, dass beide *PNAs* unter physiologischen Bedingungen stabil waren. Ebenfalls konnte bereits nach vier Stunden eine EGFP-Expression beobachtet werden, was für die Funktionalität der Expression nach *PNA* Bindung sprach. Um den Einfluss der *PNA* Bindung auf die Expression noch genauer zu untersuchen, wurde Plasmid-DNA mit beiden *PNAs* modifiziert und in Zellen transfiziert. Die anschließende Luciferase-Messung nach 24 Stunden bestätigte die EGFP-Expression der Fluoreszenzmikroskopie. Die Ko-Transfektion von einem β -Galaktosidase codierenden Vektor stellte eine Transfektionskontrolle dar, um einen möglichen Einfluss der unterschiedlichen

Komplexbildungseigenschaften der *PNA*-Konstrukte zu kompensieren. Ähnliche Ergebnisse über die Eigenschaften der *PNA*s wurden bereits in der Literatur beschrieben (Zelphati et al., 2000, Zelphati et al., 1999, Dean, 2000). In einem weiteren Schritt wurde die eigens synthetisierte *NMTS* (*eNMTS*) über einen bi-funktionalen Crosslinker an die *PNA*s gekoppelt. Plasmid-DNA mit zwei Bindungsseiten und der Möglichkeit pro Bindungsstelle acht *PNA*s zu binden (Zelphati et al., 2000) wurde mit den *PNA-SMCC-eNMTS* Konstrukten modifiziert. In der anschließenden Agarosegelelektrophorese sollte nun die Bindung nachgewiesen werden können. Dabei wurde nach anschließender Konjugation der *PNA* Konjugate an Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau der modifizierte Bereich der Plasmid-DNA herausgeschnitten. Dieser sollte nun im Vergleich zur unmodifizierten, aber verdauten Plasmid-DNA einen *Shift* von 100 Basenpaaren aufweisen. Aufgrund des nicht erkennbaren *Shifts* wurde die *NMTS* mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Somit konnte nach erneuter Modifikation der *PNA*s und Bindung an Plasmid-DNA das Konjugat mittels Fluoreszenz-Detektion dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass überwiegend die *supercoil*-Form der Plasmid-DNA mit der *NMTS* modifiziert wurde. Von Bentin et al. (Bentin and Nielsen, 1996) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei einer Hybridisierungstemperatur von 37°C mit *PNA*s überwiegend die *supercoil*-Form modifiziert war.

Um nun die Möglichkeit zu untersuchen, durch Einsatz von *S/MAR-NMTS* Hybridvektoren ohne Selektionsdruck die Etablierung und damit eine hohe stabile Transgen-Expression zu erreichen, wurde pEPICUBIBLuc als Plasmid-Vektor verwendet. Dieser Vektor enthält die *huINF β-S/MAR* in Kombination mit den Promotorelementen humanem CMV Enhancer, Ubiquitin B Promotor, sowie dem Ubiquitin B Intron. Der Vektor wurde bereits von Maucksch et al. (Maucksch, 2008) beschrieben und zeigte im Vergleich zu dem Analogon ohne *S/MAR* und ohne initialen Selektionsdruck eine signifikant höhere relative Luciferaseaktivität. In diesen Vektor wurden nun vier *PNA* Bindungsseiten kloniert. Anschließend wurde die *NMTS* über *PNA* an den Vektor konjugiert und in Jurkat-Zellen mittels Nukleofektion transfiziert. Hierbei konnte kein

Unterschied in der Genexpression des pEPICUBIBLuc *S/MAR-NMTS* Hybridvektors zum pEPICUBIBLuc *S/MAR* Vektor festgestellt werden. Allerdings blieb die relative Luciferaseaktivität über 30 Tage auf einem stabilen Niveau. Auch nach Quantifizierung der Menge an Luciferase-Reportergen an Tag 30 mittels qRT-PCR konnte kein Unterschied festgestellt werden. Der pEPICUBIBLuc Vektor schien also aufgrund der langanhaltenden stabilen Expression für den Beweis der Funktionalität der *NMTS* bei Experimenten über 30 Tage der falsche Vektor zu sein. Zusätzlich konnten Diviacco *et al.* (Diviacco *et al.*, 2001) und Liebling *et al.* (Liebling *et al.*, 2003) zeigen, dass durch *PNA* Bindung die Replikation von Plasmid-DNA *in vitro* signifikant gehemmt wurde. Aus diesen Gründen wurde für die weiteren Untersuchungen als Vektor pEPI-luc und als Kopplungsmethode *ALR* verwendet. Der pEPI-luc Vektor (Argyros *et al.*, 2008) umfasst neben der *huINF β-S/MAR* das Reportergen Luciferase unter der Kontrolle des CMV Promotors. Somit könnte im Vergleich zum Ubiquitin B Promotor ein schnellerer Abfall der Transgenexpression erwartet und ein Effekt der *NMTS* besser detektiert werden. Slattum *et al.* (Slattum *et al.*, 2003) konnte zeigen, dass durch die kovalente Bindung von *ALR* mit geringen Kopplungsgraden die Plasmid-DNA expressionskompetent blieb. Da sich die Modifikationen auch innerhalb der Expressionskassette befanden, dürfte somit auch eine Replikation der Plasmid-DNA möglich sein. In einem weiteren Versuchsaufbau wurde nun zunächst pEPI-luc mit der *NMTS* über *ALR* in verschiedenen Konjugationsgraden von durchschnittlich 3 Mol *NMTS* bis 24 Mol *NMTS* pro Mol pEPI-luc ($F_{NM\text{TS}} = 3$ bis 24) modifiziert und in Jurkat-Zellen mittels Nukleofektion transfiziert. Sowohl mit, als auch ohne Selektionsdruck zeigte der pEPI-luc *S/MAR-NMTS* Hybridvektor mit einem Konjugationsgrad von $F_{NM\text{TS}}=3$ eine relative 10-100 fach signifikant höhere Transgenexpression, verglichen mit dem pEPI-luc *S/MAR* Vektor. Somit schien es auch möglich, ohne Selektionsdruck eine stabile Transgenexpression auf hohem Niveau zu bewirken. Um nun zu zeigen, dass dieser Effekt auf die Kombination von *S/MAR* und *NMTS* zurückzuführen war, wurde pEPI-luc mit einer randomisierten Aminosäure-Sequenz (*Scrambled*) und einer mutierten

Sequenz (Y380A) mit einem Konjugationsgrad von $F_{Scrambled}=3$ und $F_{Y380A}=3$ gekoppelt. Durch diese Mutation konnte bereits Vradii *et al.* (Vradii *et al.*, 2005) einen Verlust der Nuklear Matrix Assoziation des AML-1B Transkriptionsfaktors zeigen. Nach Nukleofektion in Jurkat-Zellen wurde wiederum die Transgenexpression ohne Selektionsdruck über 30 Tage gemessen. Hierbei zeigten alle Konjugate, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc, signifikante relative circa 10 bis 100-fach höhere Transgen-Expression. Allerdings war zwischen den Konjugaten kein Unterschied messbar. Interessant war allerdings, dass alle pEPI-luc Peptid-Konstrukte *NMTS*, *Y380A* und *Scrambled* bei der Untersuchung des episomalen Status mit qRT-PCR eine, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc, 10 bis 20 Prozent höhere Integration von Luciferase aufwiesen. Somit konnte zunächst ein möglicher Grund für die 10 bis 100-fache Steigerung in der Transgen-Expression aufgezeigt werden. Da als Transfektionsmethode Nukleofektion verwendet wurde und diese Methode eine hohe, gepulste Spannung verwendet, die zu DNA linearisierung und dadurch Integration führt, war auch eine vermehrte Integration der modifizierten Konjugate nicht auszuschließen. Aufgrund dessen wurde der gleiche Versuchsaufbau mit Lipofektion als Transfektionsmethode wiederholt. Bei der Messung der Transgen-Expression über 30 Tage zeigte sich das gleiche Ergebnis analog zur Nukleofektion. Auch in der qRT-PCR konnte für die Peptid-Konjugate eine vermehrte Integration von Luciferase nachgewiesen werden. Die Art der Transfektionsmethode hatte folglich keinen Einfluss auf die erhöhte stabile Transgen-Expression der Peptid-Konjugate. Naim *et al.* (Naim *et al.*, 2009) konjugierte hydrophobe Aminosäuren an Bovines Serum Albumin und konnte beobachten, dass die Aufnahme über den *Nuclear Pore Complex* dadurch signifikant gesteigert werden konnte. Er führte diesen Effekt auf eine Steigerung der Hydrophobie des BSA zurück. Übertragen auf die pEPI-luc Peptid-Konjugate *NMTS*, *Y380A* und *Scrambled*, würden die Modifikationen zu hydrophoberen Konstrukten führen. Dies hätte nach Transfektion eine erhöhte Aufnahme der Konjugate und folglich eine höhere Integration zur Folge. Um diese Hypothese zu untersuchen, da alle pEPI-luc Peptid-Konjugate gleiche Expressionsniveaus

aufwiesen, wurde die *NMTS* Peptidsequenz über unterschiedliche Crosslinker über *ALR* mit gleichem Kopplungsgrad $F_{NMTS}=3$ an pEPI-luc gekoppelt. Diese Crosslinker wiesen unterschiedliche aliphatische Kohlenstoffketten von C2 bis C12 auf, wodurch sich unterschiedlich hydrophobe Konjugate ergaben. Die Luciferase-Expression der Konjugate über 30 Tage zeigte keinen Unterschied zwischen den unterschiedlich hydrophoben Peptid-Konjugaten. Ein möglicher Einfluss hydrophober Effekte auf die stabile Transgenexpression der pEPI-luc Peptid-Konjugate *NMTS*, *Y380A* und *Scrambled* ließ sich somit nicht nachweisen.

Die Werte der Luciferaseexpression über 30 Tage der Intermediärprodukte pEPI-luc-*ALR* und pEPI-luc-*ALR-SMCC* zeigten erstaunlicherweise ebenfalls ähnlich stabile Expressionswerte wie das pEPI-luc-*ALR-SMCC-NMTS* Peptid-Konjugat. Somit führte schon eine Modifikation von pEPI-luc mit *ALR* nach Transfektion, verglichen mit unmodifiziertem pEPI-luc zu einer circa 10-fachen Steigerung der stabilen Genexpression. Interessanterweise konnte mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender semiquantitativer Auswertung gezeigt werden, dass durch die kovalente Modifikation von pEPI-luc mit *ALR* es zu einer Abnahme der *supercoil*-Form und Zunahme der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA kam. Durch weitere Modifikationen konnte keine weitere Zunahme gemessen werden. Chancham *et al.* (Chancham and Hughes, 2001) konnte zeigen, dass die offenkettig-zirkuläre Form von Plasmid DNA transkriptionsaktiv ist und eine wesentlich höhere Stabilität, verglichen mit der *supercoil*-Form, im Zytoplasma aufweist. Die höhere Menge an offenkettig-zirkulärer Form der Plasmid-DNA Konjugate könnte somit nach Transfektion zu einer längeren Verweildauer der Plasmid-DNA in den Zellen und somit zu höherer Integration führen. Es kann auch spekuliert werden, dass offenkettig-zirkuläre Plasmid-DNA, verglichen mit *supercoil* Plasmid-DNA, in der Zelle zu einem größeren Anteil in lineare Plasmid-DNA überführt wird. Dadurch könnte in größerem Ausmaß nicht homologe Rekombination stattfinden. Die Daten der qRT-PCR über höhere Integration der pEPI-luc Peptid-Konjugate, sowie der hohe Anteil an offenkettig-zirkulärer Form der

Plasmid-DNA in der Agarosegelelektrophorese bestätigten somit die stabile Transgenexpression.

In einem letzten Experiment wurde pCLUC, ebenfalls ein Luciferase kodierender Vektor mit einem CMV Promotor, aber ohne *S/MAR*, mit der *NMTS* über *ALR* modifiziert. Nach Nukleofektion und Messung der Luciferase-Expression zeigte sich auch hier eine höhere Genexpression des modifizierten Konjugates im Vergleich zum unmodifiziertem pCLUC. Somit konnte auch ein inhibitorischer Effekt der huIN β -*S/MAR* auf ein *Silencing* nach Integration ausgeschlossen werden. Während in der Literatur für die *NMTS* Peptidsequenz in einem Fusionsprotein eine Assoziation mit der Nukleären Matrix in transkriptionsaktiven Bereichen gezeigt werden konnte, zeigte die *NMTS* in Kombination mit *S/MAR* Vektoren keine Effekte hinsichtlich der stabilen Langzeit-Transgenexpression. Zu Beobachten war allerdings eine stabile Transgenexpression über 30 Tage, sowohl der Peptid-Konjugate, als auch der intermediären Kopplungsprodukte. Weitere Untersuchungen *in vitro* konnten belegen, dass einzig und allein die Modifikation von Plasmid-DNA mit *ALR* zu einer Erhöhung der offenkettig-zirkulären Form der DNA und somit sowohl nach Nukleofektion, als auch nach Lipofektion zu einer 10 bis 100-fachen relativen Steigerung der Transgenexpression über 30 Tage führte. Dies ist möglicherweise auf eine teilweise Integration durch Modifizierung der Plasmid-DNA im Euchromatin zurückzuführen, denn eine Integration ins Heterochromatin hätte ein Silencing des Transgens zur Folge. Mit *S/MAR* Elementen, welche auch Funktion als „Insulatoren“ besitzen wäre theoretisch auch nach Integration im Heterochromatin Expression möglich gewesen. Da allerdings auch ein Vektor ohne *S/MAR* nach Modifikation der Plasmid-DNA ebenfalls stabile Werte lieferte, konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Ein effizienter Gentransfer und langanhaltende Genexpression stellen im Rahmen der Gentherapie eine wichtige Voraussetzung für die Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen wie beispielsweise der Zystischen Fibrose oder X-SCID (Severe Combined Immunodeficiency) dar. Nach wie vor ist der nichtvirale Gentransfer, verglichen mit dem viralen Gentransfer, für viele Anwendungen zu ineffizient und lediglich transient.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher zwei wesentliche Ziele auf dem Gebiet des Gentransfers mittels nichtviraler Vektoren untersucht. Zum einen sollte durch „*Zelluläres Targeting*“ der Gentransfer in die Zielzelle und damit die Gentransfereffizienz gesteigert werden. Zum anderen sollte durch „*Intranukleäres Targeting*“ längere Transgenexpression auf hohem Niveau erreicht werden.

Durch die Charakterisierung hoch affiner Liganden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer sollte die Gentransfereffizienz und damit die Transgenexpression in den Zielzellen gesteigert werden. Als mögliches Target wurde die Expression des Prostacyclin (IP₁) Rezeptors auf pulmonalen Epithelzelllinien mittels Western Blot untersucht. Hierbei konnte ein positiver Rezeptorstatus sowohl auf Alveolar- als auch auf Bronchialepithelzellen bestätigt werden, was einen Einsatz von Liganden für die Ansteuerung dieses Rezeptors ermöglichte.

Iloprost (ILO) und Treprostinil (TRP), zwei Prostaglandin I₂ Analoga und stabile Agonisten am IP₁ Rezeptor, wurden an Fluorescein markiertes Rinderserumalbumin (BSA) als Modellvehikel kovalent gebunden und hinsichtlich ihrer Zellbindung bzw. Aufnahme in Alveolar- und Brochialepithelzellen untersucht. Hierbei zeigte das ILO Konjugat eine 2 bis 4-fach höhere Bindung bzw. Aufnahme, verglichen mit dem TRP Konjugat. Durch Ko-Inkubation von freiem ILO sowie eines selektiven IP₁-Rezeptorantagonisten war eine Inhibierung der Bindung bzw. Aufnahme möglich. Da für einen effizienten Gentransfer die Rezeptor-vermittelte

Aufnahme ins Zytoplasma essentiell ist, wurde dies mittels konfokaler Laserrastermikroskopie nach Inkubation der BSA-ILO Konjugate untersucht. Hierbei war eine deutliche Bindung und Internalisierung der Konjugate verglichen mit unkonjugiertem BSA nachweisbar. Um nun die Gentransfereffizienz zu überprüfen wurde ILO kovalent an verzweigtes Polyethylenimin 25 kDa (PEI) konjugiert. Dabei resultierten PEI-g-ILO Konjugate mit unterschiedlichen Kopplungsgraden (F_{ILO} (ILO:PEI)= 2, 5, 8, 16). Diese wurden hinsichtlich DNA-Bindung, Partikelgröße und Transfektionseffizienz untersucht. Unter optimierten Bedingungen (N/P 4, $F_{ILO}=5$) zeigten die PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikel nach Zugabe von Heparansulfat eine vollständige Freisetzung der Plasmid-DNA aus dem Gen-Vektor Komplex. Auch die Partikelgröße war mit etwa 80 nm vergleichbar mit unmodifizierten PEI Gen-Vektor Nanopartikeln.

Die Transfektion von Alveolar- und Bronchialzelllinien mit PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikeln unter optimierten Bedingungen (N/P 4, $F_{ILO}=5$) zeigte eine 46-fach signifikante Steigerung des Gentransfers. Dieser Effekt konnte wie schon bei den BSA-Konjugaten mit einem selektiven IP₁-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden. Aufgrund der hohen Transfektionseffizienz war eine Dosisreduktion *in vitro* von PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikeln um 50 Prozent im Vergleich zu PEI möglich. Dabei konnte das gleiche Expressionsniveau erreicht werden.

Interessant war, dass bei der Untersuchung der Signaltransduktion nach Inkubation von PEI-g-ILO Gen-Vektor Nanopartikeln sich ein Anstieg der cAMP Konzentration zeigte. Dieser machte deutlich, dass ILO auch nach kovalenter Bindung an PEI fähig war eine physiologische Antwort nach Rezeptorbindung zu vermitteln. Positive Effekte von Prostaglandin I₂ Analoga wie beispielsweise eine antiinflammatorische Wirkung könnten hier einen zusätzlichen Nutzen bei der Applikation vor allem in pathologischem Gewebe bringen.

In vivo konnte die Genexpression in den Lungen von BALB/c Mäusen nach Aerosolapplikation mittels Kompressionsvernebler in einer Ganzkörpervernebelungskammer mit PEI-g-ILO Gen-Vektor Partikeln im

Vergleich mit PEI um das 14-fache gesteigert werden. Desweiteren zeigten toxikologische Untersuchungen, verglichen mit PEI Gen-Vektor Nanopartikeln, keine erhöhte Zelltoxizität nach Transfektion *in vitro* sowie keinen signifikanten Anstieg an inflammatorischen Zytokinen im Serum.

Um durch „*Intranukleäres Targeting*“ längere Transgenexpression zu erreichen, wurde versucht gezielt episomal (=extrachromosomal) replizierende Plasmid-DNA in transkriptionsaktive Bereiche der Nukleären Matrix mittels einer „*Nuclear Matrix Targeting Signal*“ (*NMTS*) Peptidsequenz zu steuern.

Bekannt war, dass durch Einführung der hNF β -*Scaffold Matrix Attachment Region* (*S/MAR*) in Plasmid-DNA die episomale Replikation in hämatopoetischen Zellen vermittelt werden konnte. Allerdings musste nach Transfektion dieser *S/MAR* Vektoren ein mehrwöchiger initialer Selektionsdruck angewendet werden, um episomale Replikation und damit Langzeitexpression in Zellen zu erreichen.

Mit der Entwicklung von *S/MAR-NMTS* Hybridvektoren sollte daher eine einzigartige Möglichkeit geschaffen werden, stabile Langzeittransgenexpression ohne Selektionsdruck auf hohem Niveau zu vermitteln. Die Peptidsequenz sollte helfen, diese *S/MAR* Vektoren in die transkriptionsaktiven Bereiche des Zellkerns zu transportieren und daher in Kombination mit der *S/MAR* die episomale Replikation zu begünstigen.

Die *NMTS* Peptidsequenz des hämatopoetischen AML-1B Transkriptionsfaktors wurde sowohl über Peptid-Nukleinsäuren (*PNA*s) als auch über chemische Kopplung mittels „*Aziridine Labeling Reagenz*“ (*ALR*) an *S/MAR* Vektoren gebunden.

Die über *PNA*s gekoppelte *NMTS* war jedoch nicht in der Lage nach Transfektion in Jurkat Zellen Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln. Dies lag mit großer Wahrscheinlichkeit an der Tatsache, dass nach *PNA* Bindung an Plasmid-DNA deren Replikation gestört war.

Die chemisch-kovalente Bindung der *NMTS* über *ALR* an *S/MAR* Vektoren führte ohne Selektionsdruck mit einem Konjugationsgrad von F_{NMTS} (*NMTS:S/MAR Vektor*)= 3 verglichen mit unmodifiziertem *S/MAR* Vektor nach

Nukleofektion zu einer signifikanten bis zu 100-fach höheren relativen Expression des Reportergens über 30 Tage hinweg. Dieser Effekt schien allerdings nicht auf die *NMTS* zurückzuführen zu sein, da sowohl eine mutierte als auch randomisierte *NMTS* Peptidsequenz bei gleichem Konjugationsgrad ähnlich hohe Expressionswerte aufwiesen.

Interessant war jedoch, dass nach quantitativer *real-time* PCR nach 30 Tagen eine 10 bis 20 Prozent höhere Integration der mit den Peptiden (*NMTS*, *Mutante*, *Randomisiert*) modifizierten *S/MAR* Vektoren nachweisbar war. Dies war unabhängig von der Transfektionsmethode. In weiteren Untersuchungen konnten hydrophobe Effekte sowie Effekte integrierter *S/MAR* Konjugate auf die Langzeitexpression ausgeschlossen werden.

Als mögliche Ursache für die höhere Integration nach Transfektion und damit Langzeitexpression zeigte sich ein sichtbar hoher Anteil an offenkettig-zirkulärer Plasmid-DNA der *S/MAR* Konjugate in der Agarosegelelektrophorese. Nach semiquantitativer Auswertung konnte gezeigt werden, dass alleine die Konjugation mit *ALR* zu einem 150 bis 200-prozentigen Anstieg der offenkettig-zirkulären Form der Plasmid-DNA führte.

Zusammenfassend zeigten Prostaglandin I₂ Analoga, konjugiert an PEI in den Untersuchungen ein großes Potential Alveolar- und Bronchialepithelzellen *in vitro* und die Lungen von Mäusen *in vivo* effizient zu transfizieren.

Durch die Entwicklung von *S/MAR-NMTS* Hybridvektoren konnten allerdings keine Erfolge hinsichtlich stabiler und langanhaltender episomaler Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen erzielt werden.

7 Summary

Treatment of genetic diseases such as cystic fibrosis or X-SCID (Severe Combined Immunodeficiency) by gene therapy requires efficient and sustained gene transfer. Although some therapeutic effects have been observed in some clinical trials using viral vectors, the undesired side effects observed with this class of vectors have made scientists search for alternatives among the non viral group. However, till date, non viral gene transfer, compared with viral gene transfer, remains inefficient and only transient.

Therefore, this work aimed at addressing two main objectives in the field of non viral gene transfer. Firstly, by "*Cellular Targeting*", enhanced gene transfer into the target cell was attempted. Secondly, "*Intranuclear Targeting*" was investigated as a means to achieve sustained transgene expression at high levels.

Cellular Targeting primarily comprised characterizing high affinity ligands for receptor-mediated gene transfer thereby increasing the gene transfer efficiency and transgene expression in target cells. As a possible target, the expression of prostacyclin (IP₁) receptor was investigated in pulmonary epithelial cell lines by western blot analysis. A positive receptor status in both, alveolar- and bronchial epithelial cells could be confirmed. These results formed the basis for using a ligand for targeting this receptor.

Iloprost (ILO) and treprostinil (TRP), two prostaglandin I₂ analogues and stable receptor agonists of the IP₁ receptor were bound covalently to fluorescein labeled bovine serum albumin (BSA) as a model vehicle. The resulting molecular conjugates were analyzed for their cell binding or uptake into alveolar- and bronchial epithelial cells. The ILO conjugate showed a 2 to 4 times higher binding or uptake, compared with the TRP conjugate. In competitive binding experiments, incubation of free ILO and/or excess of a specific IP₁ receptor antagonist resulted in inhibition of the binding or uptake. As uptake into the cytoplasm is essential for efficient gene transfer, cytoplasmic uptake was investigated by confocal laser scanning microscopy

after incubation of the BSA-ILO conjugates on cells. A distinct internalization of the conjugates compared to unconjugated BSA was detectable. In order to verify the gene transfer efficiency, ILO was covalently conjugated to branched polyethylenimine 25 kDa (PEI). This PEI-*g*-ILO conjugates resulted in different degrees of coupling (F_{ILO} (ILO: PEI) = 2, 5, 8, 16). These were analyzed for DNA binding, particle size and transfection efficiency. Under optimized conditions (N/P 4, $F_{ILO}= 5$) PEI-*g*-ILO gene vector particles after the addition of heparan sulfate showed a complete release of the plasmid DNA from the gene-vector complex. In addition the particle size was approximately 80 nm comparable to gene vector nanoparticles with unmodified PEI.

Transfection of alveolar- and bronchial epithelial cells with PEI-*g*-ILO gene vector nanoparticles under optimized conditions (N/P 4, $F_{ILO}= 5$) showed a 46-fold significant increase in gene transfer. This effect could be inhibited with a specific IP₁ receptor antagonist. Due to the high transfection efficiency *in vitro*, it was possible to achieve gene expression levels comparable to PEI with only half the amount of PEI-*g*-ILO gene vector nanoparticles.

Investigations into the physiological activity of ILO after coupling to PEI via cAMP measurements provided evidence for the functionality of the ligand post conjugation. Incubation of cells with PEI-*g*-ILO gene vector nanoparticles resulted in an increase in cAMP indicating that ILO, covalently bound to PEI, was also able to give a physiological response to receptor binding. Positive effects of prostaglandin I₂ analogues, such as an anti-inflammatory effect could add further value to the application of PEI-*g*-ILO conjugated *in vivo* especially in pathological tissue.

In vivo gene expression in lungs of BALB/c mice after aerosol application of PEI-*g*-ILO gene vector particles in a whole body nebulization chamber could be increased to 14-fold, compared with PEI. Furthermore, toxicological studies showed, compared with PEI gene vector nanoparticles, no increased cytotoxicity after transfection *in vitro* and no significant increase in inflammatory cytokines in the serum.

To achieve sustained transgene expression by “*Intranuclear Targeting*”, an attempt was made to target episomal (=extrachromosomal) replicating plasmid DNA into transcriptionally active areas of the nuclear matrix by means of a “*Nuclear Matrix Targeting Signal*” (*NMTS*) peptide sequence.

It has been previously shown that introduction of the huINF β -*Scaffold Matrix Attachment Region* (*S/MAR*) in plasmid DNA could mediate episomal replication in hematopoietic cells. However, after transfection of these *S/MAR* vectors, an initial selection pressure of several weeks was necessary to achieve episomal replication and thus long term expression.

Development of *S/MAR-NMTS* hybrid vectors offer a unique opportunity to mediate long-term stable transgene expression without selection pressure. In principle the peptide sequence should help to transport these *S/MAR* vectors into transcriptionally active areas of the nucleus and therefore favor episomal replication in combination with the *S/MAR* sequences.

The *NMTS* peptide sequence of the hematopoietic transcription factor AML-1B was bound to *S/MAR* vectors by *Peptide Nucleic Acids* (*PNAs*) and via chemical coupling using *Aziridine Labeling Reagent* (*ALR*).

The *NMTS* peptide coupled via *PNAs* was not able to achieve long-term transgene expression after transfection into Jurkat cells. This was most likely due to lack of DNA replication after binding of the *PNA* to plasmid DNA.

The chemical-covalent binding of the *NMTS* via *ALR* to *S/MAR* vectors with a coupling degree of F_{NMTS} (*NMTS:S/MAR Vector*) = 3 led to a significant up to 100-fold higher relative expression of the reporter gene about 30 days post nucleofection without any selection pressure, compared with unmodified *S/MAR* vectors. This effect could not be attributed to the *NMTS* function of the peptide as both a mutated and scrambled *NMTS* peptides, at the same coupling degree showed similar high expression ratios.

Quantification of the transgene by real time PCR, at the end of the long-term expression experiments, revealed 10 to 20 percent higher integration of the peptide (*NMTS*, *Mutant*, *Scrambled*) modified *S/MAR* vectors. The amount of integration was independent of the transfection method. In further

investigations, hydrophobic effects and effects of integrated *S/MAR* sequences on the long-term expression could be excluded.

A possible reason for the higher integration and long-term expression after transfection, could be the high proportion of open-circular plasmid DNA of the *S/MAR* conjugates visible in the agarose gel electrophoresis. Semiquantitative image analysis showed that the conjugation with *ALR* alone led to a 150 to 200 percent increase in open-circular form of plasmid DNA.

In summary, prostaglandin I₂ analogues conjugated to PEI demonstrated promising potential to transfect alveolar- and bronchial epithelial cells *in vitro* and the lungs of mice efficiently *in vivo*. The development of *S/MAR-NMTS* hybrid vectors, however, was not successful with respect to sustained episomal replication and stable transgene expression in hematopoietic cells.

8 Literaturverzeichnis

- AMATI, B. & GASSER, S. M. (1990) *Drosophila* scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol Cell Biol*, 10, 5442-54.
- ARGYROS, O., WONG, S. P., NICETA, M., WADDINGTON, S. N., HOWE, S. J., COUTELLE, C., MILLER, A. D. & HARBOTTLE, R. P. (2008) Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther*, 15, 1593-605.
- ARONOFF, D. M., PERES, C. M., SEREZANI, C. H., BALLINGER, M. N., CARSTENS, J. K., COLEMAN, N., MOORE, B. B., PEEBLES, R. S., FACCIOLI, L. H. & PETERS-GOLDEN, M. (2007) Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol*, 178, 1628-34.
- AYER, L. M., WILSON, S. M., TRAVES, S. L., PROUD, D. & GIEMBYCZ, M. A. (2008) 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-[4-(4-isopropoxy-benzyl)-phenyl]-amine (RO1138452) is a selective, pseudo-irreversible orthosteric antagonist at the prostacyclin (IP)-receptor expressed by human airway epithelial cells: IP-receptor-mediated inhibition of CXCL9 and CXCL10 release. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 815-26.
- BAIKER, A., MAERCKER, C., PIECHACZEK, C., SCHMIDT, S. B., BODE, J., BENHAM, C. & LIPPS, H. J. (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol*, 2, 182-4.
- BARRON, L. G., MEYER, K. B. & SZOKA, F. C., JR. (1998) Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther*, 9, 315-23.
- BEGHETTI, M., REBER, G., DE, M. P., VADAS, L., CHIAPPE, A., SPAHR-SCHOPFER, I. & RIMENSBERGER, P. C. (2002) Aerosolized iloprost induces a mild but sustained inhibition of platelet aggregation. *Eur Respir J*, 19, 518-24.
- BEHR, J. P. (1994) Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem*, 5, 382-9.
- BELIKOVA, A. M., ZARYTOVA, V. F. & GRINEVA, N. I. (1967) Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett*, 37, 3557-62.
- BENTIN, T. & NIELSEN, P. E. (1996) Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "breathing" dynamics. *Biochemistry*, 35, 8863-9.
- BEREZNEY, R. & COFFEY, D. S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 60, 1410-7.
- 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. & ANDERSON, W. F. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270, 475-80.
- BLENCOWE, B. J., NICKERSON, J. A., ISSNER, R., PENMAN, S. & SHARP, P. A. (1994) Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J Cell Biol*, 127, 593-607.
- BLEY, K. R., BHATTACHARYA, A., DANIELS, D. V., GEVER, J., JAHANGIR, A., O'YANG, C., SMITH, S., SRINIVASAN, D., FORD, A. P. & JETT, M. F. (2006) RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP (prostacyclin) receptor antagonists. *Br J Pharmacol*, 147, 335-45.

- BODE, J. & MAASS, K. (1988) Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry*, 27, 4706-11.
- BODE, J., SCHLAKE, T., RIOS-RAMIREZ, M., MIELKE, C., STENGERT, M., KAY, V. & KLEHR-WIRTH, D. (1995) Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol*, 162A, 389-454.
- BOIE, Y., RUSHMORE, T. H., DARMON-GOODWIN, A., GRYGORCZYK, R., SLIPETZ, D. M., METTERS, K. M. & ABRAMOVITZ, M. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem*, 269, 12173-8.
- BOLETTA, A., BENIGNI, A., LUTZ, J., REMUZZI, G., SORIA, M. R. & MONACO, L. (1997) Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther*, 8, 1243-51.
- BOS, C. L., RICHEL, D. J., RITSEMA, T., PEPPELENBOSCH, M. P. & VERSTEEG, H. H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1187-205.
- BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B. & 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, 7297-301.
- BREEZE, R. G. & WHEELDON, E. B. (1977) The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis*, 116, 705-77.
- BUCKLEY, S. M., HOWE, S. J., RAHIM, A. A., BUNING, H., MCINTOSH, J., WONG, S. P., BAKER, A. H., NATHWANI, A., THRASHER, A. J., COUTELLE, C., MCKAY, T. R. & WADDINGTON, S. N. (2008) Luciferin detection after intranasal vector delivery is improved by intranasal rather than intraperitoneal luciferin administration. *Hum Gene Ther*, 19, 1050-6.
- CAPECCHI, M. R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22, 479-88.
- 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. & FISCHER, A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 669-72.
- CHANCHAM, P. & HUGHES, J. A. (2001) Relationship between plasmid DNA topological forms and in vitro transfection. *J Liposome Res*, 11, 139-52.
- CHECK, E. (2002) A tragic setback. *Nature*, 420, 116-8.
- CHEN, L. F., ITO, K., MURAKAMI, Y. & ITO, Y. (1998) The capacity of polyomavirus enhancer binding protein 2alphaB (AML1/Cbfa2) to stimulate polyomavirus DNA replication is related to its affinity for the nuclear matrix. *Mol Cell Biol*, 18, 4165-76.
- CHOLLET, P., FAVROT, M. C., HURBIN, A. & COLL, J. L. (2002) Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med*, 4, 84-91.
- CHOOSAKOONKRIANG, S., LOBO, B. A., KOE, G. S., KOE, J. G. & MIDDAUGH, C. R. (2003) Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci*, 92, 1710-22.
- CLARK, R. B., KNOLL, B. J. & BARBER, R. (1999) Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 279-86.
- CLARK, R. D., JAHANGIR, A., SEVERANCE, D., SALAZAR, R., CHANG, T., CHANG, D., JETT, M. F., SMITH, S. & BLEY, K. (2004) Discovery and SAR development of 2-(phenylamino) imidazolines as prostacyclin receptor antagonists [corrected]. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 1053-6.
- COLE, A. (2008) Child in gene therapy programme develops leukaemia. *Bmj*, 336, 13.
- COLEMAN, R. A., SMITH, W. L. & NARUMIYA, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 46, 205-29.
- CRAPO, J. D., BARRY, B. E., GEHR, P., BACHOFEN, M. & WEIBEL, E. R. (1982) Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*, 126, 332-7.

- DAMES, P., ORTIZ, A., SCHILLINGER, U., LESINA, E., PLANK, C., ROSENECKER, J. & RUDOLPH, C. (2007) Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent. *J Mol Med*, 85, 371-8.
- DASS, C. R. (2004) Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med*, 82, 579-91.
- DAVIES, L. A., MCLACHLAN, G., SUMNER-JONES, S. G., FERGUSON, D., BAKER, A., TENNANT, P., GORDON, C., VRETTOU, C., BAKER, E., ZHU, J., ALTON, E. W., COLLIE, D. D., PORTEOUS, D. J., HYDE, S. C. & GILL, D. R. (2008) Enhanced lung gene expression after aerosol delivery of concentrated pDNA/PEI complexes. *Mol Ther*, 16, 1283-90.
- DAVIS, P. B. & COOPER, M. J. (2007) Vectors for airway gene delivery. *Aaps J*, 9, E11-7.
- DEAN, D. A. (2000) Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 44, 81-95.
- DEAN, D. A., MACHADO-ARANDA, D., BLAIR-PARKS, K., YELDANDI, A. V. & YOUNG, J. L. (2003) Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther*, 10, 1608-15.
- DFG (2006) Entwicklung der Gentherapie. Stellungnahme der Senatskommission für Grundsatz der Genforschung
- DI GIOIA, S., REJMAN, J., CARRABINO, S., DE FINO, I., RUDOLPH, C., DOHERTY, A., HYNDMAN, L., DI CICCO, M., COPRENI, E., BRAGONZI, A., COLOMBO, C., BOYD, A. C. & CONESE, M. (2008) Role of biophysical parameters on ex vivo and in vivo gene transfer to the airway epithelium by polyethylenimine/albumin complexes. *Biomacromolecules*, 9, 859-66.
- DIVIACCO, S., RAPOZZI, V., XODO, L., HELENE, C., QUADRIFOGLIO, F. & GIOVANNANGELI, C. (2001) Site-directed inhibition of DNA replication by triple helix formation. *Faseb J*, 15, 2660-8.
- DOKKA, S., TOLEDO, D., SHI, X., CASTRANOVA, V. & ROJANASAKUL, Y. (2000) Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm Res*, 17, 521-5.
- EBERSOLE, T. A., ROSS, A., CLARK, E., MCGILL, N., SCHINDELHAUER, D., COOKE, H. & GRIMES, B. (2000) Mammalian artificial chromosome formation from circular aliphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum Mol Genet*, 9, 1623-31.
- ELFINGER, M., GEIGER, J., HASENPUSCH, G., UZGUN, S., SIEVERLING, N., ANEJA, M. K., MAUCKSCH, C. & RUDOLPH, C. (2009a) Targeting of the beta(2)-adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells in vitro and lungs in vivo. *J Control Release*, 135, 234-41.
- ELFINGER, M., MAUCKSCH, C. & RUDOLPH, C. (2007) Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials*, 28, 3448-55.
- ELFINGER, M., PFEIFER, C., UEZGUEN, S., GOLAS, M. M., SANDER, B., MAUCKSCH, C., STARK, H., ANEJA, M. K. & RUDOLPH, C. (2009b) Self-assembly of ternary insulin-polyethylenimine (PEI)-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery and expression in alveolar epithelial cells. *Biomacromolecules*, 10, 2912-20.
- FEISTER, H. A., TORRUNGRUANG, K., THUNYAKITPISAL, P., PARKER, G. E., RHODES, S. J. & BIDWELL, J. P. (2000) NP/NMP4 transcription factors have distinct osteoblast nuclear matrix subdomains. *J Cell Biochem*, 79, 506-17.
- FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M. & DANIELSEN, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7413-7.

- FERGUSON, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53, 1-24.
- FERRARI, S., MORO, E., PETTENAZZO, A., BEHR, J. P., ZACCHELLO, F. & SCARPA, M. (1997) ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 4, 1100-6.
- FISCHER, D., LI, Y., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J. & KISSEL, T. (2003) In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24, 1121-31.
- FREIMARK, B. D., BLEZINGER, H. P., FLORACK, V. J., NORDSTROM, J. L., LONG, S. D., DESHPANDE, D. S., NOCHUMSON, S. & PETRAK, K. L. (1998) Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid: cationic lipid complexes. *J Immunol*, 160, 4580-6.
- FURUKAWA, K., PANTE, N., AEBI, U. & GERACE, L. (1995) Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *Embo J*, 14, 1626-36.
- GASPAR, H. B., PARSLEY, K. L., HOWE, S., KING, D., GILMOUR, K. C., SINCLAIR, J., BROUNS, G., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., BARINGTON, T., JAKOBSEN, M. A., CHRISTENSEN, H. O., AL GHONAIUM, A., WHITE, H. N., SMITH, J. L., LEVINSKY, R. J., ALI, R. R., KINNON, C. & THRASHER, A. J. (2004) Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*, 364, 2181-7.
- GASSER, S. M. & LAEMMLI, U. K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*, 46, 521-30.
- GASSER SM, L. U. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet*, 3, 16-22.
- GAUTAM, A., DENSMORE, C. L. & WALDREP, J. C. (2001) Pulmonary cytokine responses associated with PEI-DNA aerosol gene therapy. *Gene Ther*, 8, 254-7.
- GILL, D. R., DAVIES, L. A., PRINGLE, I. A. & HYDE, S. C. (2004) The development of gene therapy for diseases of the lung. *Cell Mol Life Sci*, 61, 355-68.
- GIOVANAZZI, S., ACCOMAZZO, M. R., LETARI, O., OLIVA, D. & NICOSIA, S. (1997) Internalization and down-regulation of the prostacyclin receptor in human platelets. *Biochem J*, 325 (Pt 1), 71-7.
- GLOVER, D. J., LIPPS, H. J. & JANS, D. A. (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*, 6, 299-310.
- GODBEY, W. T., WU, K. K. & MIKOS, A. G. (1999) Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res*, 45, 268-75.
- GOETZE, S., BAER, A., WINKELMANN, S., NEHLSSEN, K., SEIBLER, J., MAASS, K. & BODE, J. (2005) Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol Cell Biol*, 25, 2260-72.
- GOETZE, S., GLUCH, A., BENHAM, C. & BODE, J. (2003) Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains. *Biochemistry*, 42, 154-66.
- GOHRING, F., SCHWAB, B. L., NICOTERA, P., LEIST, M. & FACKELMAYER, F. O. (1997) The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *Embo J*, 16, 7361-71.
- GOLZIO, M., ROLS, M. P. & TEISSIE, J. (2004) In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods*, 33, 126-35.
- GRESCH, O., ENGEL, F. B., NESIC, D., TRAN, T. T., ENGLAND, H. M., HICKMAN, E. S., KORNER, I., GAN, L., CHEN, S., CASTRO-OBREGON, S., HAMMERMANN, R., WOLF, J., MULLER-

- HARTMANN, H., NIX, M., SIEBENKOTTEN, G., KRAUS, G. & LUN, K. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 33, 151-63.
- GRIESENBACH, U., FERRARI, S., GEDDES, D. M. & ALTON, E. W. (2002) Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther*, 9, 1344-50.
- GUO, B., ODGREN, P. R., VAN WIJNEN, A. J., LAST, T. J., NICKERSON, J., PENMAN, S., LIAN, J. B., STEIN, J. L. & STEIN, G. S. (1995) The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10526-30.
- GUO, Z. S., WANG, L. H., EISENSMITH, R. C. & WOO, S. L. (1996) Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 3, 802-10.
- 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. & FISCHER, A. (2003a) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348, 255-6.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., MCCORMACK, M. P., WULFFRAAT, N., LEBOULCH, P., LIM, A., OSBORNE, C. S., PAWLIUK, R., MORILLON, E., SORENSEN, R., FORSTER, A., FRASER, P., COHEN, J. I., DE SAINT BASILE, G., ALEXANDER, I., WINTERGERST, U., FREBOURG, T., AURIAS, A., STOPPA-LYONNET, D., ROMANA, S., RADFORD-WEISS, I., GROSS, F., VALENSI, F., DELABESSE, E., MACINTYRE, E., SIGAUX, F., SOULIER, J., LEIVA, L. E., WISSLER, M., PRINZ, C., RABBITS, T. H., LE DEIST, F., FISCHER, A. & CAVAZZANA-CALVO, M. (2003b) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-9.
- HALL, J. M. & STRANGE, P. G. (1984) The use of a prostacyclin analogue, [3H]iloprost, for studying prostacyclin-binding sites on human platelets and neuronal hybrid cells. *Biosci Rep*, 4, 941-8.
- HARRINGTON, J. J., VAN BOKKELEN, G., MAYS, R. W., GUSTASHAW, K. & WILLARD, H. F. (1997) Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet*, 15, 345-55.
- HERWEIJER, H. & WOLFF, J. A. (2003) Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther*, 10, 453-8.
- HERWEIJER, H., ZHANG, G., SUBBOTIN, V. M., BUDKER, V., WILLIAMS, P. & WOLFF, J. A. (2001) Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med*, 3, 280-91.
- HUTH, S., HOFFMANN, F., VON GERSDORFF, K., LANER, A., REINHARDT, D., ROSENECKER, J. & RUDOLPH, C. (2006) Interaction of polyamine gene vectors with RNA leads to the dissociation of plasmid DNA-carrier complexes. *J Gene Med*, 8, 1416-24.
- HYDE, S. C., PRINGLE, I. A., ABDULLAH, S., LAWTON, A. E., DAVIES, L. A., VARATHALINGAM, A., NUNEZ-ALONSO, G., GREEN, A. M., BAZZANI, R. P., SUMNER-JONES, S. G., CHAN, M., LI, H., YEW, N. S., CHENG, S. H., BOYD, A. C., DAVIES, J. C., GRIESENBACH, U., PORTEOUS, D. J., SHEPPARD, D. N., MUNKONGE, F. M., ALTON, E. W. & GILL, D. R. (2008) CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol*, 26, 549-51.
- IDZKO, M., HAMMAD, H., VAN NIMWEGEN, M., KOOL, M., VOS, N., HOOGSTEDEN, H. C. & LAMBRECHT, B. N. (2007) Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J Clin Invest*, 117, 464-72.
- JACKSON, D. A., JURANEK, S. & LIPPS, H. J. (2006) Designing nonviral vectors for efficient gene transfer and long-term gene expression. *Mol Ther*, 14, 613-26.
- JENKE, A. C., EISENBERGER, T., BAIKER, A., STEHLE, I. M., WIRTH, S. & LIPPS, H. J. (2005) The nonviral episomal replicating vector pEPI-1 allows long-term inhibition of bcr-abl expression by shRNA. *Hum Gene Ther*, 16, 533-9.

- JENKE, A. C., SCINTEIE, M. F., STEHLE, I. M. & LIPPS, H. J. (2004a) Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Mol Biol Rep*, 31, 85-90.
- JENKE, A. C., STEHLE, I. M., HERRMANN, F., EISENBERGER, T., BAIKER, A., BODE, J., FACKELMAYER, F. O. & LIPPS, H. J. (2004b) Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11322-7.
- JENKE, B. H., FETZER, C. P., STEHLE, I. M., JONSSON, F., FACKELMAYER, F. O., CONRADT, H., BODE, J. & LIPPS, H. J. (2002) An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep*, 3, 349-54.
- KAISER, J. (2003) Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science*, 299, 495.
- KAY, M. A. & WOO, S. L. (1994) Gene therapy for metabolic disorders. *Trends Genet*, 10, 253-7.
- KHORSANDI, S. E., BACHELLIER, P., WEBER, J. C., GREGET, M., JAECK, D., ZACHAROULIS, D., ROUNTAS, C., HELMY, S., HELMY, A., AL-WARACKY, M., SALAMA, H., JIAO, L., NICHOLLS, J., DAVIES, A. J., LEVICAR, N., JENSEN, S. & HABIB, N. (2008) Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther*, 15, 225-30.
- KIKUCHI, A., AOKI, Y., SUGAYA, S., SERIKAWA, T., TAKAKUWA, K., TANAKA, K., SUZUKI, N. & KIKUCHI, H. (1999) Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Hum Gene Ther*, 10, 947-55.
- KIM, J. M., KIM, J. S., PARK, D. H., KANG, H. S., YOON, J., BAEK, K. & YOON, Y. (2004) Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol*, 107, 95-105.
- KIRCHEIS, R., WIGHTMAN, L. & WAGNER, E. (2001) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*, 53, 341-58.
- KLEHR, D., SCHLAKE, T., MAASS, K. & BODE, J. (1992) Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry*, 31, 3222-9.
- KLOECKNER, J., BOECKLE, S., PERSSON, D., ROEDL, W., OGRIS, M., BERG, K. & WAGNER, E. (2006) DNA polyplexes based on degradable oligoethylenimine-derivatives: combination with EGF receptor targeting and endosomal release functions. *J Control Release*, 116, 115-22.
- KNEUER, C., EHRHARDT, C., BAKOWSKY, H., KUMAR, M. N., OBERLE, V., LEHR, C. M., HOEKSTRA, D. & BAKOWSKY, U. (2006) The influence of physicochemical parameters on the efficacy of non-viral DNA transfection complexes: a comparative study. *J Nanosci Nanotechnol*, 6, 2776-82.
- KOSHKINA, N. V., AGOULNIK, I. Y., MELTON, S. L., DENSMORE, C. L. & KNIGHT, V. (2003) Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered DNA-polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and retention. *Mol Ther*, 8, 249-54.
- KRUG, S., SABLITZKI, A., HAMMERSCHMIDT, S., WIRTZ, H. & SEYFARTH, H. J. (2009) Inhaled iloprost for the control of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*, 5, 465-74.
- KURIYAMA, S., MITORO, A., TSUJINOUE, H., NAKATANI, T., YOSHIJI, H., TSUJIMOTO, T., YAMAZAKI, M. & FUKUI, H. (2000) Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther*, 7, 1132-6.
- LIEBLING, M. R., JOU, N. T., FANG, W. & LOUIE, J. S. (2003) Blockade of plasmid replication mediated by peptide nucleic acids. *Mol Biotechnol*, 25, 229-40.
- LIPPS, H. J., JENKE, A. C., NEHLSSEN, K., SCINTEIE, M. F., STEHLE, I. M. & BODE, J. (2003) Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene*, 304, 23-33.

- LOMBRY, C., EDWARDS, D. A., PREAT, V. & VANBEVER, R. (2004) Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, L1002-8.
- LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T. & GOPFERICH, A. (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 60, 247-66.
- MANZINI, S., VARGIOLU, A., STEHLE, I. M., BACCI, M. L., CERRITO, M. G., GIOVANNONI, R., ZANNONI, A., BIANCO, M. R., FORNI, M., DONINI, P., PAPA, M., LIPPS, H. J. & LAVITRANO, M. (2006) Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17672-7.
- MARTINET, W., SCHRIJVERS, D. M. & KOCKX, M. M. (2003) Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett*, 25, 1025-9.
- MAUCKSCH, C. (2008) Untersuchungen zum nichtviralen Gentransfer mittels integrierender und extrachromosomal-replikationskompetenter Plasmid-DNA in hämatopoetische Zellen. *Dissertation 00000005326, FU Berlin, Department of Biology, Chemistry and Pharmacy*.
- MAZDA, O. (2002) Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr Gene Ther*, 2, 379-92.
- MCKEON, F. D., KIRSCHNER, M. W. & CAPUT, D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, 319, 463-8.
- MEHIER-HUMBERT, S. & GUY, R. H. (2005) Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 733-53.
- MIKKELSEN, J. G., YANT, S. R., MEUSE, L., HUANG, Z., XU, H. & KAY, M. A. (2003) Helper-Independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther*, 8, 654-65.
- MONACO, A. P. & LARIN, Z. (1994) YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol*, 12, 280-6.
- MONTINI, E., HELD, P. K., NOLL, M., MORCINEK, N., AL-DHALIMY, M., FINEGOLD, M., YANT, S. R., KAY, M. A. & GROMPE, M. (2002) In vivo correction of murine tyrosinemia type I by DNA-mediated transposition. *Mol Ther*, 6, 759-69.
- MOREADITH, R. W. & RADFORD, N. B. (1997) Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J Mol Med*, 75, 208-16.
- MÜLLER, R. H. A. S., R. (1996) Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, Band 38, ed. APVPaperback.
- NAIM, B., ZBAIDA, D., DAGAN, S., KAPON, R. & REICH, Z. (2009) Cargo surface hydrophobicity is sufficient to overcome the nuclear pore complex selectivity barrier. *Embo J*, 28, 2697-705.
- NAM, C. H. & RABBITTS, T. H. (2006) The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther*, 13, 15-25.
- NAMBA, T., OIDA, H., SUGIMOTO, Y., KAKIZUKA, A., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A. & NARUMIYA, S. (1994) cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem*, 269, 9986-92.
- NAMCIU, S. J., BLOCHLINGER, K. B. & FOURNIER, R. E. (1998) Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 18, 2382-91.
- NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y. & USHIKUBI, F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, 79, 1193-226.
- NICKERSON, J. A., KROCKMALNIC, G., WAN, K. M. & PENMAN, S. (1997) The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4446-50.

- NIENHUIS, A. W., DUNBAR, C. E. & SORRENTINO, B. P. (2006) Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther*, 13, 1031-49.
- O'BRIEN, S., MOORE, J. O., BOYD, T. E., LARRATT, L. M., SKOTNICKI, A., KOZINER, B., CHANANKHAN, A. A., SEYMOUR, J. F., BOCIEK, R. G., PAVLETIC, S. & RAI, K. R. (2007) Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 25, 1114-20.
- OLSCHEWSKI, H., ROSE, F., SCHERMULY, R., GHOFRANI, H. A., ENKE, B., OLSCHEWSKI, A. & SEEGER, W. (2004) Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*, 102, 139-53.
- OLSCHEWSKI, H., SIMONNEAU, G., GALIE, N., HIGENBOTTAM, T., NAEIJE, R., RUBIN, L. J., NIKKHO, S., SPEICH, R., HOEPER, M. M., BEHR, J., WINKLER, J., SITBON, O., POPOV, W., GHOFRANI, H. A., MANES, A., KIELY, D. G., EWERT, R., MEYER, A., CORRIS, P. A., DELCROIX, M., GOMEZ-SANCHEZ, M., SIEDENTOP, H. & SEEGER, W. (2002) Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 347, 322-9.
- ORTIZ-URDA, S., THYAGARAJAN, B., KEENE, D. R., LIN, Q., CALOS, M. P. & KHAVARI, P. A. (2003) PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther*, 14, 923-8.
- ORTIZ-URDA, S., THYAGARAJAN, B., KEENE, D. R., LIN, Q., FANG, M., CALOS, M. P. & KHAVARI, P. A. (2002) Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med*, 8, 1166-70.
- PAPAPETROU, E. P., ZIROS, P. G., MICHEVA, I. D., ZOUMBOS, N. C. & ATHANASSIADOU, A. (2006) Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther*, 13, 40-51.
- PARKER, A. L., NEWMAN, C., BRIGGS, S., SEYMOUR, L. & SHERIDAN, P. J. (2003) Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-15.
- PARKER, G. E., SANDOVAL, R. M., FEISTER, H. A., BIDWELL, J. P. & RHODES, S. J. (2000) The homeodomain coordinates nuclear entry of the Lhx3 neuroendocrine transcription factor and association with the nuclear matrix. *J Biol Chem*, 275, 23891-8.
- PASTORE, L., MORRAL, N., ZHOU, H., GARCIA, R., PARKS, R. J., KOCHANNEK, S., GRAHAM, F. L., LEE, B. & BEAUDET, A. L. (1999) Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 10, 1773-81.
- PENMAN, S. (1995) Rethinking cell structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5251-7.
- PHEZ, E., FAURIE, C., GOLZIO, M., TEISSIE, J. & ROLS, M. P. (2005) New insights in the visualization of membrane permeabilization and DNA/membrane interaction of cells submitted to electric pulses. *Biochim Biophys Acta*, 1724, 248-54.
- PIECHACZEK, C., FETZER, C., BAIKER, A., BODE, J. & LIPPS, H. J. (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*, 27, 426-8.
- PIKE-OVERZET, K., DE RIDDER, D., WEERKAMP, F., BAERT, M. R., VERSTEGEN, M. M., BRUGMAN, M. H., HOWE, S. J., REINDERS, M. J., THRASHER, A. J., WAGEMAKER, G., VAN DONGEN, J. J. & STAAL, F. J. (2006) Gene therapy: is IL2RG oncogenic in T-cell development? *Nature*, 443, E5; discussion E6-7.
- PRINGLE, I. A., MCLACHLAN, G., COLLIE, D. D., SUMNER-JONES, S. G., LAWTON, A. E., TENNANT, P., BAKER, A., GORDON, C., BLUNDELL, R., VARATHALINGAM, A., DAVIES, L. A., SCHMID, R. A., CHENG, S. H., PORTEOUS, D. J., GILL, D. R. & HYDE, S. C. (2007) Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung. *J Gene Med*, 9, 369-80.

- REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I. S. & HOEKSTRA, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 377, 159-69.
- RENZ, A. & FACKELMAYER, F. O. (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res*, 24, 843-9.
- RUDOLPH, C., MULLER, R. H. & ROSENECKER, J. (2002) Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med*, 4, 66-74.
- RUDOLPH, C., ORTIZ, A., SCHILLINGER, U., JAUERNIG, J., PLANK, C. & ROSENECKER, J. (2005a) Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application. *J Gene Med*, 7, 59-66.
- RUDOLPH, C., SCHILLINGER, U., ORTIZ, A., PLANK, C., GOLAS, M. M., SANDER, B., STARK, H. & ROSENECKER, J. (2005b) Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol Ther*, 12, 493-501.
- SCHATZLEIN, A. G. (2003) Targeting of Synthetic Gene Delivery Systems. *J Biomed Biotechnol*, 2003, 149-158.
- SHIN, J. Y., SUH, D., KIM, J. M., CHOI, H. G., KIM, J. A., KO, J. J., LEE, Y. B., KIM, J. S. & OH, Y. K. (2005) Low molecular weight polyethylenimine for efficient transfection of human hematopoietic and umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Biochim Biophys Acta*, 1725, 377-84.
- SIDI, A. A., OHANA, P., BENJAMIN, S., SHALEV, M., RANSOM, J. H., LAMM, D., HOCHBERG, A. & LEIBOVITCH, I. (2008) Phase I/II marker lesion study of intravesical BC-819 DNA plasmid in H19 over expressing superficial bladder cancer refractory to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*, 180, 2379-83.
- SKORO-SAJER, N. & LANG, I. (2008) Treprostinil for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opin Pharmacother*, 9, 1415-20.
- SLATTUM, P. S., LOOMIS, A. G., MACHNIK, K. J., WATT, M. A., DUZESKI, J. L., BUDKER, V. G., WOLFF, J. A. & HAGSTROM, J. E. (2003) Efficient in vitro and in vivo expression of covalently modified plasmid DNA. *Mol Ther*, 8, 255-63.
- SMYTH, E. M., AUSTIN, S. C., REILLY, M. P. & FITZGERALD, G. A. (2000) Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem*, 275, 32037-45.
- SNYDER, S. L. & SOBOCINSKI, P. Z. (1975) An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem*, 64, 284-8.
- SONAWANE, N. D., SZOKA, F. C., JR. & VERKMAN, A. S. (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 278, 44826-31.
- STEHLE, I. M., POSTBERG, J., RUPPRECHT, S., CREMER, T., JACKSON, D. A. & LIPPS, H. J. (2007) Establishment and mitotic stability of an extra-chromosomal mammalian replicon. *BMC Cell Biol*, 8, 33.
- STEHLE, I. M., SCINTEIE, M. F., BAIKER, A., JENKE, A. C. & LIPPS, H. J. (2003) Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Res*, 11, 413-21.
- STITHAM, J., AREHART, E. J., GLEIM, S. R., DOUVILLE, K. L. & HWA, J. (2007) Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 82, 95-108.
- STRAUSS, W. L. & EDELMAN, J. D. (2007) Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med*, 28, 127-42; ix.
- SUROVOY, A., FLECHSLER, I., GAUNITZ, F., PAPKE, M. & JUNG, G. (1998) Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol*, 451, 457-60.

- TAN, J., YANG, N. S., TURNER, J. G., NIU, G. L., MAASSAB, H. F., SUN, J., HERLOCHER, M. L., CHANG, A. E. & YU, H. (1999) Interleukin-12 cDNA skin transfection potentiates human papillomavirus E6 DNA vaccine-induced antitumor immune response. *Cancer Gene Ther*, 6, 331-9.
- TANAKA, Y., YAMAKI, F., KOIKE, K. & TORO, L. (2004) New insights into the intracellular mechanisms by which PGI2 analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2, 257-65.
- TANG, L., GUO, B., JAVED, A., CHOI, J. Y., HIEBERT, S., LIAN, J. B., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L., STEIN, G. S. & ZHOU, G. W. (1999) Crystal structure of the nuclear matrix targeting signal of the transcription factor acute myelogenous leukemia-1/polyoma enhancer-binding protein 2alphaB/core binding factor alpha2. *J Biol Chem*, 274, 33580-6.
- UNGARO, F., DE ROSA, G., MIRO, A. & 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, 143-9.
- VAN WIJNEN, A. J., BIDWELL, J. P., FEY, E. G., PENMAN, S., LIAN, J. B., STEIN, J. L. & STEIN, G. S. (1993) Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1. *Biochemistry*, 32, 8397-402.
- VERHEIJEN, R., VAN VENROOIJ, W. & RAMAEKERS, F. (1988) The nuclear matrix: structure and composition. *J Cell Sci*, 90 (Pt 1), 11-36.
- VON KRIES, J. P., BUHRMESTER, H. & STRATLING, W. H. (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell*, 64, 123-35.
- VRADII, D., ZAIDI, S. K., LIAN, J. B., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L. & STEIN, G. S. (2005) Point mutation in AML1 disrupts subnuclear targeting, prevents myeloid differentiation, and effects a transformation-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7174-9.
- WAN, K. M., NICKERSON, J. A., KROCKMALNIC, G. & PENMAN, S. (1999) The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 933-8.
- WANG, R., EPSTEIN, J., CHAROENVIT, Y., BARACEROS, F. M., RAHARDJO, N., GAY, T., BANANIA, J. G., CHATTOPADHYAY, R., DE LA VEGA, P., RICHIE, T. L., TORNIEPORTH, N., DOOLAN, D. L., KESTER, K. E., HEPPNER, D. G., NORMAN, J., CARUCCI, D. J., COHEN, J. D. & HOFFMAN, S. L. (2004) Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *J Immunol*, 172, 5561-9.
- WATTIAUX, R., JADOT, M., WARNIER-PIROTTE, M. T. & WATTIAUX-DE CONINCK, S. (1997) Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett*, 417, 199-202.
- WEI, X., SOMANATHAN, S., SAMARABANDU, J. & BEREZNEY, R. (1999) Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J Cell Biol*, 146, 543-58.
- WEISS, S. I., SIEVERLING, N., NICLASSEN, M., MAUCKSCH, C., THUNEMANN, A. F., MOHWALD, H., REINHARDT, D., ROSENECKER, J. & RUDOLPH, C. (2006) Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethyleneglycol (PEG)-graft-copolymers as novel synthetic gene carriers. *Biomaterials*, 27, 2302-12.
- WIGHTMAN, L., KIRCHEIS, R., ROSSLER, V., CAROTTA, S., RUZICKA, R., KURSA, M. & WAGNER, E. (2001) Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med*, 3, 362-72.
- WILSON, K. L. (2000) The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol*, 10, 125-9.

- WISEMAN, J. W., GODDARD, C. A., MCLELLAND, D. & COLLEDGE, W. H. (2003) A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 10, 1654-62.
- WOLFF, J. A. & BUDKER, V. (2005) The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet*, 54, 3-20.
- WOLFF, J. A., WILLIAMS, P., ACSADI, G., JIAO, S., JANI, A. & CHONG, W. (1991) Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques*, 11, 474-85.
- WOODS, N. B., BOTTERO, V., SCHMIDT, M., VON KALLE, C. & VERMA, I. M. (2006) Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*, 440, 1123.
- XU, Z. L., MIZUGUCHI, H., ISHII-WATABE, A., UCHIDA, E., MAYUMI, T. & HAYAKAWA, T. (2001) Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272, 149-56.
- YANG, Y., LI, Q., ERTL, H. C. & WILSON, J. M. (1995) Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol*, 69, 2004-15.
- YEW, N. S., ZHAO, H., PRZYBYLSKA, M., WU, I. H., TOUSIGNANT, J. D., SCHEULE, R. K. & CHENG, S. H. (2002) CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther*, 5, 731-8.
- YOSHINO, H., HASHIZUME, K. & KOBAYASHI, E. (2006) Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther*, 13, 1696-702.
- ZELPHATI, O., LIANG, X., HOBART, P. & FELGNER, P. L. (1999) Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 10, 15-24.
- ZELPHATI, O., LIANG, X., NGUYEN, C., BARLOW, S., SHENG, S., SHAO, Z. & FELGNER, P. L. (2000) PNA-dependent gene chemistry: stable coupling of peptides and oligonucleotides to plasmid DNA. *Biotechniques*, 28, 304-10, 312-4, 316.
- ZENG, C., MCNEIL, S., POCKWINSE, S., NICKERSON, J., SHOPLAND, L., LAWRENCE, J. B., PENMAN, S., HIEBERT, S., LIAN, J. B., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L. & STEIN, G. S. (1998) Intranuclear targeting of AML/CBFalpha regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1585-9.
- ZENG, C., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L., MEYERS, S., SUN, W., SHOPLAND, L., LAWRENCE, J. B., PENMAN, S., LIAN, J. B., STEIN, G. S. & HIEBERT, S. W. (1997) Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6746-51.
- ZHANG, G., BUDKER, V. & WOLFF, J. A. (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 10, 1735-7.
- ZHANG, S., XU, Y., WANG, B., QIAO, W., LIU, D. & LI, Z. (2004) Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*, 100, 165-80.
- ZHANG, Z., AUSTIN, S. C. & SMYTH, E. M. (2001) Glycosylation of the human prostacyclin receptor: role in ligand binding and signal transduction. *Mol Pharmacol*, 60, 480-7.
- ZHOU, X. & HUANG, L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, 1189, 195-203.
- ZHU, N., LIGGITT, D., LIU, Y. & DEBS, R. (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*, 261, 209-11.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| AAV | Adeno-assoziiertes Virus |
| Ahx | Aminohexansäure |
| ALR | Aziridine Labeling Reagenz (N-[N'-(4-[(2-chloroethyl)-methylamino]-benzylamine)-3-aminopropyl]-N,N-dimethylaminopropylamine) |
| AMAS | N-(α -Maleimidoacetoxy) succinimide ester |
| AML | Acute Myeloid Leukemia |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAC | Bacterial Artificial Chromosome |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CAY10449 | 4,5-dihydro-N-[4-[[4-(1-methylethoxy)phenyl]carbonyl]phenyl]-1H-imidazol-2-amine |
| ccc | covalently closed circular (supercoil) |
| CMV | Cytomegalie Virus |
| DAPI | 4,6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC-chol | 3-[N-(N1,N-Dimethylethylendiamin)-carbamoyl]cholesterol |
| DCM | Dichlormethan |
| DIPEA | N,N-Diisopropylethylendiamin |

| | |
|---------------|---|
| D-MEM | Dulbecco's Modified Eagle MEdium |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOCS | Di-Octadecylamidoglycilspermin |
| DOPE | Dioleoylphosphatidylethanolamin |
| DOSPA | 2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(Spermincarbox-amido)ethyl]-N,N-Dimethyl-1-propanaminium |
| DOTAP | 1,2-Dioleyl-3-Trimethylammoniumpropan |
| DOTMA | N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid |
| D-PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DTT | Dithiothreitol |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EF-1 α | Elongation Factor 1 α |
| EGFP | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| eNMTS | eigene Synthese Nuclear Matrix Targeting Signal |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie) |

| | |
|------------------------------|--|
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| <i>F_{ILO}</i> | Konjugationsgrad Mol Iloprost pro Mol PEI |
| <i>F_{NMTS}</i> | Konjugationsgrad Mol NMTS pro Mol Plasmid-DNA |
| <i>F_{Scrambled}</i> | Konjugationsgrad Mol NMTS pro Mol Plasmid-DNA |
| <i>F_{Y380A}</i> | Konjugationsgrad Mol NMTS pro Mol Plasmid-DNA |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FLUO | Fluorescein |
| FP | Forward Primer |
| FSC | Forward Angle Light Scatter |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| G418 | Geneticin |
| HAC | Human Artificial Chromosome |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure |
| hEF1 | human Elongation Factor 1 |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazolhydrat |
| HRP | Horse Radish Peroxidase |
| HSC | Hämatopoetische Stammzellen |
| IL-12 | Interleukin-12 |
| ILO | Iloprost |
| INF- γ | Interferon- γ |
| i.p. | intraperitoneal |

| | |
|------------------|--|
| IP ₁ | I Prostanoid ₁ |
| i.v. | intravenös |
| kb | Kilobasen |
| kDA | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| <i>KMUS</i> | <i>N</i> -[<i>k</i> -Maleimidoundecanoyloxy]succinimide ester |
| <i>labellT</i> | siehe ALR |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight |
| MEM | Minimum Essential Media |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| mg | Milligram |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | messenger RNA |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid |
| μF | Microfarad |
| μg | Microgram |
| μl | Microliter |
| Neo ^R | Neomycin-Geneticin-Resistenzkassette |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimidylester |

| | |
|--------------------|---|
| NMP | N-Methylpyrrolidon |
| Nm | Nanometer |
| NMTS | Nuclear Matrix Targeting Signal |
| N/P | Stickstoff zu Phosphat-Verhältnis |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PCS | Photonenkorrelationspektroskopie |
| pDNA | Plasmid-DNA |
| PEI | Polyethylenimin |
| PEI- <i>g</i> -ILO | PEI- <i>graft</i> -ILO |
| PGI ₂ | Prostaglandin I ₂ |
| pH | potentia Hydrogenii |
| <i>PNA</i> | Peptide-Nucleic-Acids (Peptid-Nukleinsäuren) |
| qRT-PCR | Quantitative Real-Time PCR |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RP | Reverse Primer |
| RP-HPLC | Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| RT | Raumtemperatur |
| SAF-A | Scaffold Attachment Factor-A |
| <i>SAP</i> | Shrimp Alkaline Phosphatase |
| SCID | Severe Combined Immunodeficiency Disease |

| | |
|-------------------|---|
| <i>Scrambled</i> | randomisierte NMTS Sequenz |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| shRNA | short hairpin RNA |
| <i>SMCC</i> | succinimidyl-4-[<i>N</i> -maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate |
| SSC | Forward Angle Light Scatter |
| <i>Sulfo-NHS</i> | N-Hydroxysulfosuccinimid |
| <i>Sulfo-SMCC</i> | Sulfosuccinimidyl-4-[<i>N</i> -maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate |
| siRNA | small interfering RNA |
| <i>S/MAR</i> | Scaffold Matrix Attachment Region |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| TAE | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TRP | Treprostinil |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| X-SCID | X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease |
| YAC | Yeast Artificial Chromosome |
| γ c | Common Gamma C Chain |
| <i>Y380A</i> | Mutierte NMTS Sequenz, Tyrosin an Position 380 (NMTS in AML-1B) wurde gegen Alanin ausgetauscht |

10 Verzeichnis der Publikationen

PATENTE

Geiger J and Rudolph C. Konjugat mit Zielfindungsligand und dessen Verwendung. Europäisches Patentamt, Patent Nr. 09015812.2-1216

ZEITSCHRIFTENARTIKEL

Geiger J, Aneja MK, Hasenpusch G, Yüksesdag G, Kummerlöwe G, Luy B, Romer T, Rothbauer U, Rudolph C. Targeting of the prostacyclin specific IP1 receptor in lungs with molecular conjugates comprising prostaglandin I2 analogues. *Biomaterials*. 2010 Apr;31(10):2903-11.

Aneja MK, **Geiger J**, Imker R, Üzgün S, Kormann M, Hasenpusch G, Maucksch C, Rudolph C. Optimization of Streptomyces bacteriophage phi C31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type II cells. *Exp Mol Med*. 2009 Dec 31;41(12):919-34.

Elfinger M, **Geiger J**, Hasenpusch G, Üzgün S, Sieverling N, Aneja MK, Maucksch C, Rudolph C. *J Control Release*. 2009 May 5;135(3):234-41.

REVIEWS

Geiger J, Aneja MK, Rudolph C. Vectors for pulmonary gene therapy. *Int J Pharm*. 2009 Oct 13.

Aneja MK, **Geiger JP**, Himmel A, Rudolph C. Targeted gene delivery to the lung. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009 Jun;6(6):567-83.

Pfeifer C, Himmel A, **Geiger J**, Aneja MK, and Rudolph C. Efficient, specific and targeted delivery of genes to the lung. *Therapeutic Delivery*.2010 1(1), akzeptiert

BUCHKAPITEL

Geiger J, Pfeifer C, Rudolph C. Inhalatives Insulin. In „Moderne Pharmazeutische Technologie“ 2009; Herausgeber: Keck CM, Müller RH, akzeptiert

KONGRESSVORTRÄGE

Elfinger M, Uezgeun S, Sieverling N, Aneja M, Maucksch C, **Geiger J**, Carsten Rudolph. Targeting of the β_2 -Adrenoceptor Increases Nonviral Gene Delivery to Pulmonary Epithelial Cells *in Vitro* and Lungs *in Vivo*, *European Workshop on Particulate Systems, Berlin, Germany, May 30-31, 2008, #57*

POSTERPRÄSENTATIONEN

Uezguen S, **Geiger JP**, Aneja MK, Rudolph C. Development of Non Viral Gene Vectors for Gene Delivery to the Lungs and Blood Cells, Ehrlich II-2nd World Conference on Magic Bullets, Nürnberg, Germany, October 3-5, 2008, #A-103

Geiger JP, Aneja MK, Kummerlöwe G, Luy B, Romer T, Rothbauer U, Rudolph C. A novel ligand for enhanced and targeted non-viral gene delivery to pulmonary epithelial cells, San Diego, USA, May 27-30, 2009, #166

Geiger J, Aneja MK, Kummerlöwe G, Luy B, Romer T, Rothbauer U, Rudolph C. Targeting of a G protein-coupled receptor with novel molecular conjugates leads to enhanced pulmonary gene delivery, Hannover, Germany, November 21-25, 2009