
2 Methoden

2.1 Peptidsynthese

2.1.1 Synthese der monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren TAT-Sequenz mittels Peptidsynthesizer (TAT)₁₋₄

Die Peptidsynthese erfolgte nach einem Standardprotokoll mittels Fmoc-Chemie (*FastMocTM*) über Festphasen-Peptidsynthese mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizer (Applied Biosystems 431A) im Labor von Herrn Dr. Plank. Als Schutzgruppe der α -Aminogruppen der Aminosäuren diente Fmoc (9-Fluorenmethoxycarbonyl). Die Fmoc-Schutzgruppe wird im Basischen durch Piperidin abgespalten, und im darauffolgenden Schritt an die nächste, über HOBt/HBTU (Hydroxybenzotriazol/[2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat] aktivierte Aminosäure gekoppelt. Im ersten Schritt ist dieses, die an das Harz gekoppelte Aminosäure. 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. Das Kopplungsschema ist in Abbildung 7 dargestellt.

detaillierter Ablauf der Kopplung

In dem ersten Schritt werden 0,25 mmol der an das Harz gekoppelten Fmoc-Gruppe geschützten α -Aminogruppe des Peptids, mit einer schwachen Base, 20% Piperidin in DMF, in dem Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers entschützt (6 min.). Im Anschluss wird das Harz gründlich mit DMF und NMP (N-Methylpyrrolidon) gewaschen, um restliches Piperidin zu entfernen. Nach entsprechender Quellzeit in NMP ist das Peptidharz fertig vorbereitet für die Kopplung der ersten Aminosäure. Vor der Kopplung muss die Carboxylgruppe der zu koppelnden Aminosäure aktiviert werden. Dieses geschieht mit Hilfe von HOBt/HBTU ((Hydroxybenzotriazol/ [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat] und DIPEA (Disopropylethylamin). 1 mmol der zu koppelnden, amino-terminal Fmoc geschützten Aminosäure, wird in 2ml DMF gelöst und 2 ml einer 0,45 M Lösung aus HBTU und HOBt in DMF hinzu injiziert (7 min.). Diese Lösung wird direkt zum Reaktionsgefäß gegeben in das 1,7 Äquivalente DIPEA zum Starten der Aktivierung pipettiert werden (5 min.).

In dem Kopplungsschritt reagiert die Fmoc geschützte aktivierte Aminosäure unter Schütteln des Reaktionsgefäßes mit der Aminogruppe, des an dem Harz wachsenden Peptids, zu einer Amidbindung (20 min.). Nach dem die Kopplung komplett ist, wird das Harz gewaschen, und der Zyklus beginnt von Neuem.

Operation und Reagenzien	Zeit (min)
Entschützen mit 20% Piperidin in DMF	6
Waschen mit DMF	6
Aktivierung der Aminosäure (HOBt/HBTU)	7
Aktivierung mit DIPEA	5
Kopplung	20
Gesamt	44

Abb. 6 Zeitlicher Ablauf der Peptidsynthese

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

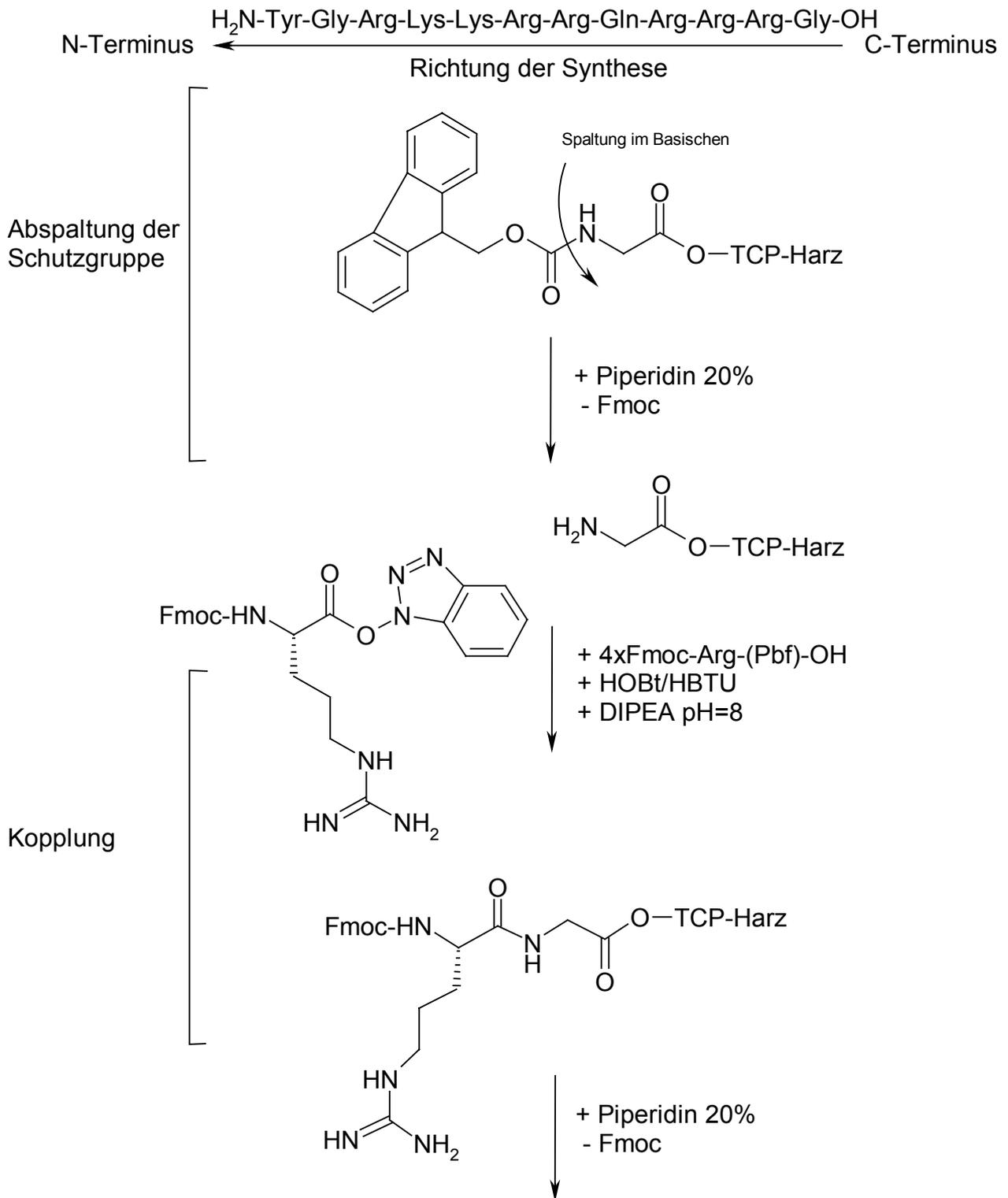


Abb. 7 Schematischer Ablauf der Peptidsynthese

Die Fmoc-Schutzgruppe wird im Basischen durch Piperidin abgespalten, und im darauffolgenden Schritt an die nächste über HOBt/HBTU aktivierte Aminosäure gekoppelt. Im ersten Schritt ist dieses die an das Harz gekoppelte Aminosäure. 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 (nicht dargestellt ist die Pbf-Schutzgruppe).

Nach der Synthese der monomeren TAT-Sequenz bestehend aus folgender Aminosäuresequenz, **YGRKKRRQRRRG** wurde das Peptidharz mit Ether gewaschen und lyophilisiert. 25 % des Peptidharzes wurden entnommen um das Peptid an dem N-Terminus mit einem Cystein zu koppeln. Das restliche Peptidharz wurde in der oben beschriebenen Art und Weise zu dem Dimer der TAT-Sequenz weiter synthetisiert. Das Trimer und Tetramer wurde auf dieselbe Art und Weise vervollständigt.

2.1.2 N-terminale Kopplung von Cystein an (TAT)₁₋₄-Oligomere

Um die mögliche Konjugation der TAT-Oligomere mit anderen Konstrukten oder Liganden einfach durchführen zu können, sollte ein Cystein am N-Terminus der TAT-Oligomere eingeführt werden. Die freie Thiol-Gruppe in der Seitenkette der Cysteine erlaubt die einfache Kopplung über die Bildung von Disulfid-Bindungen mit anderen Thiol-Gruppen tragenden Reaktionspartnern.

Das Prinzip der Kopplung des Cysteins an die TAT-Oligomere verläuft nach dem selben Muster wie die Peptidsynthese mittels Peptidsynthesizer. Das jeweilige TAT-Harz aus der Synthese mit dem Peptidsynthesizer wurde 20 min. in 10 ml NMP gequollen. 3 Äquivalente HOBt und 2 Äquivalente HBTU wurden in je 1ml NMP gelöst und durch Zugabe der HOBt Lösung zur HBTU-Lösung gemischt. Diese Mischung wurde zu 2 Äquivalenten Fmoc-Cystein-(Trt)-OH, gelöst in 1ml NMP, pipettiert und 10 min. geschüttelt. Anschließend wurde das aktivierte Fmoc geschützte Cystein zu dem (TAT)_n-Harz pipettiert, der pH-Wert auf pH=8 mit DIPEA eingestellt und 1h unter Rühren reagiert. Das Harz wurde mit Vakuum durch eine Fritte filtriert und je zweimal mit 10 ml NMP und dann 10 ml Dichlormethan gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc Gruppe erfolgte durch die Zugabe von 20% Piperidin unter Schütteln für 30 min., nachdem das Harz zuvor 15 min. in 5 ml DMF gequollen hat.

2.1.3 Die Abspaltung der N-terminal Cystein gekoppelten (TAT)₁₋₄-Oligomere vom Harz

In diesem Schritt wurden die Seitenketten-geschützten Peptide von dem Harz abgespalten. Das Peptidharz wurde je mit 15 ml DMF, 15 ml NMP und 15 ml Dichlormethan (DCM) gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml

Essigsäure/Trifluorethanol/DCM (1:1:8) wurde 60 min gut geschüttelt. Die Mischung wurde durch eine Fritte in einen Glaskolben filtriert und zweimal das Harz mit je 5 ml DCM gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Viskosität eingeengt. Anschließend wurde das geschützte Peptid in 50 ml Ether (-20°C) gefällt, 10 min. bei 4°C 4000 rpm zentrifugiert und der Rückstand lyophilisiert.

2.1.4 Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen der TAT-Oligomere

In diesem Schritt wurden die Schutzgruppen aus den Seitenketten der einzelnen Aminosäuren abgespalten (Tyrosin: tert-Bu, Glutamin: Trt, Arginin: Pbf, Lysin: Boc). Zu dem geschützten vom Harz abgespaltenen Peptid wurde eine Lösung aus 0,375g Phenol, 5 ml Trifluoressigsäure (TFA), 250 µl H₂O, 250 µl Thioanisol und 125 µl Ethandithiol pipettiert und 3h gerührt. Dabei wurde die Lösung gelb und es bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Lösung wurde in 50 ml Ether (-20 °C) gefällt, 10 min. bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in 3 ml tert-Butanol aufgenommen und über Nacht lyophilisiert.

2.1.5 Reinigung der TAT-Oligomere mittels HPLC

Die einzelnen Oligomere wurden nach der Abspaltung der Schutzgruppen über präparative RP-HPLC gereinigt. Säule: Vydac C18 2,5cm x 25cm; Flussrate: 25 mlmin⁻¹, Gradient: A= 0,1% TFA, B= Acetonitril 90%/0,1% TFA; 100% A:0% B zu 50% A: 50% B in 20 min.. Die Fraktionen um den Hauptpeak nach ca. 10 min. wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Identität der Peptide wurde mittels Massenspektroskopie bestimmt (TAT 1720,06 [1720,43]; TAT₂ 3318,91 [3320,58]; TAT₃ 4917,79 [4919,65]; TAT₄ n.b.)

2.1.6 Schützen der freien Thiol-Gruppe des Cystein mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTDP)

Um die freie Thiol-Gruppe der Cystein-Seitenkette vor Oxidation zu schützen und um reaktive Intermediate für weitere Modifikationen zu erhalten, wurden die Thiol-

Gruppe der HPLC gereinigten (TAT)₁₋₄-Oligomere mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTDP) umgesetzt.

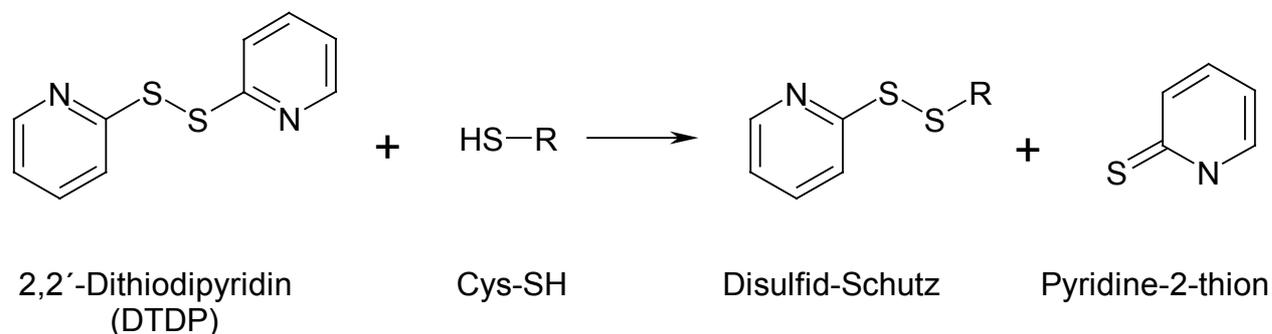


Abb. 8 Schützen der freien Thiol-Gruppe des Cystein mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTDP)

Die freie Thiol-Gruppe der Cysteine wurde durch das Umsetzen mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTDP) zu einem Disulfid vor Oxidation geschützt.

Das von den Schutzgruppen befreite Peptid wurde in He gesättigtem Wasser gelöst (z.B. 20 mg in 300 µl). Ein 20-facher Stoffmengenüberschuss DTDP wurde in EtOH (gleiches Volumen, 300 µl) gelöst (wasserunlöslich). Das Peptid wurde zu der ethanolischen DTDP Lösung pipettiert (es kann sich ein Niederschlag bilden durch das Ausfällen von überschüssigem DTDP). Reaktion unter Schütteln für 1-2 h. Anschließend Zugabe von 1 ml H₂O (weiterer Niederschlag durch das gebildete, wasserunlösliche Pyridin-2-thione). Zentrifugation für 5 min. bei 15000 rpm. Aufreinigung des geschützten Peptids mittels HPLC (0,1% TFA/0-50% Acetonitril 90%/0,1% TFA in 20 min, Flussrate 25 mlmin⁻¹, präparative HPLC). Die Fraktionen um den Hauptpeak wurden vereinigt und lyophilisiert.

2.1.7 Kopplung von TAT an BODIPY gelabeltes BSA

Die Kopplung von TAT an BODIPY FL (Fluoreszenzfarbstoff mit ähnlichem Spektrum, wie Fluoreszein) markiertes BSA erfolgte über den Crosslinker SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat). 50 nmol BODIPY-BSA-SPDP wurden zu 150 nmol TAT (freie Thiol-Gruppe) pipettiert resultierend in einem Gesamtvolumen von 225 µl und unter Schütteln lichtgeschützt über Nacht reagieren lassen. Die Reaktion wurde durch das Vermessen des freigesetzten Thiopyridon ($\epsilon_{342}=8080 \text{ mM}^{-1}$)

überprüft. Das BODIPY-BSA-TAT Konjugat wurde über eine Superdex 75 Säule aufgereinigt. Das Volumen der vereinigten Fraktionen wurde über ein Centricon (MW cut off 30.000) eingengt und die Konzentration mittels Bradford Proteinbestimmung durchgeführt.

2.1.8 Berechnung der N/P (+/-) -Verhältnisse

Das N/P-Verhältnis gibt das Stoffmengen Verhältnis von protonierbarem Stickstoff in dem kationischen Vektor zu Phosphat in der Plasmid DNA an. Je höher das N/P-Verhältnis ist, desto mehr kationischer Vektor wird für die Komplexierung der Plasmid DNA verwendet.

Die Berechnung der N/P Verhältnisse der (TAT)₂₋₄-Oligomere berechnete sich folgendermaßen:

$$\Rightarrow \frac{N}{P} = \frac{m((TAT)_{2-4})}{MW(TAT)_{2-4} \text{ g mol}^{-1}} \cdot \frac{z \cdot 330 \text{ g mol}^{-1}}{m(DNA)}$$

z = Anzahl positiv geladene Aminosäuren

$$MW(TAT_2) = 3444,1 \text{ g mol}^{-1}, z = 16$$

$$MW(TAT_3) = 5059,0 \text{ g mol}^{-1}, z = 24$$

$$MW(TAT_4) = 6673,9 \text{ g mol}^{-1}, z = 32$$

Die Berechnung der N/P Verhältnisse für PEI berechnete sich folgendermaßen:

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

Die Berechnung der N/P Verhältnisse für Dendrimere berechnete sich folgendermaßen:

$$\Rightarrow \frac{N}{P} = \frac{m(Dendrimer)}{113,14 \text{ g mol}^{-1}} \cdot \frac{330 \text{ g mol}^{-1}}{m(DNA)}$$

2.2 Mikroinjektion von TAT-BSA-BODIPY

24 h vor Mikroinjektion wurden COS 7 Zellen ausgesät, so dass die Zellen beim Versuch ca. 70-80 % konfluent waren. Die Mikroinjektion wurde mit „Femtotips II“ Mikroinjektionsnadeln (Durchmesser der Öffnung: $0,5 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$) und einem „Eppendorf Transjector 5246“, der mit einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verbunden war, durchgeführt. Es wurden ca. 1pl (± 500 fl) BSA-BODIPY oder TAT-BSA-BODIPY durch die gewählten Injektionsparameter, d.h. Injektionsdruck von 120 hPa und Injektionszeit von 0,3 s in das Zytoplasma oder den Zellkern injiziert.

2.3 Fluoreszenz-Quenching-Assay

TOTO-1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner Eigenschaft, in DNA zu bisinterkalieren, für die Beobachtung der Komplexbildung bestehend aus DNA und kationischem Polymer oder Lipid herangezogen werden kann. Die Bisinterkalation von TOTO-1 in DNA resultiert in 1000-fachem Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm verglichen mit freiem Farbstoff. Wird die DNA in distinkte Komplexe kondensiert, so kommt es zur Löschung (Quenching) der Fluoreszenz. Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung kann als Maß für den Grad der DNA-Komplexierung verwendet werden (Ernst et al.). Je stärker die Fluoreszenz gelöscht wird, desto stärker ist die DNA kondensiert. Für die Versuche wurde jedes zwanzigste Basenpaar der DNA mit TOTO-1 markiert. Dazu wurden 660 μl Plasmid DNA-Lösung ($c=20 \mu\text{gml}^{-1}$ entspricht $30,3 \text{ nmolml}^{-1}$ Basenpaare) mit 660 μl TOTO-1 Lösung ($c=1,51 \text{ nmolml}^{-1}$) gemischt, gevortext und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die TOTO-1 markierte DNA Lösung auf 5280 μl verdünnt. 100 μl dieser Lösung (0,25 μg DNA) wurde zu 100 μl vorgelegtem kationischen Peptid in einer 96 well Platte pipettiert und gut gemischt. Die Peptide wurden zuvor zu den entsprechenden N/P-Verhältnissen wie in den Abbildungen dargestellt seriell verdünnt. Nach Inkubation der Komplexe für 20 min. bei Raumtemperatur wurden die Peptid/DNA-Komplexe bei 485 nm Excitation/535 nm Emission in einem Fluoreszenzmultifunktionsreader (SPECTRAFluor Plus, Tecan) vermessen. In den einzelnen Verdünnungsschritten wurde entweder destilliertes Wasser oder isotonische Kochsalzlösung verwendet.

2.4 Agarosegelelektrophorese, Electrophoretic-Mobility- Shift Assay

Durch Agarosegelelektrophorese von Genvektorkomplexen bei unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor zu DNA, lässt sich das Verhältnis bestimmen, bei dem die DNA komplett von dem Vektor komplexiert ist. Je nach dem, wie gut die DNA komplexiert ist, kann unkomplexierte DNA in das Gel hinein wandern und indiziert unvollständige Komplexbildung durch den Vektor. Im Gegensatz dazu wandert keine DNA mehr in das Gel hinein, wenn die DNA vollständig komplexiert ist. Zu diesem Zweck wurde ein 0,5% Agarosegel hergestellt. 0,5 g Agarose wurden in eine Glasflasche eingewogen und mit 100 ml TAE-Puffer aufgefüllt, 3 min. in der Mikrowelle (Micro 750W, Whirpool) aufgekocht und unter Rühren abgekühlt und 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (c=10mg/ml) hinzu pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde gefüllt, die Kämme für die Taschen eingesetzt, und das Gel erstarren gelassen. Die Komplexe wurden folgendermaßen generiert: 11 µl DNA Lösung (0,44 µg) in HBS wird zu 11 µl Verdünnung des kationischen Polymer pipettiert (je nach N/P Verhältnis) in HBS, gut mit der Pipette durch Auf-und Absaugen gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 6 µl Loading-Buffer (50% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau) hinzu pipettiert. 12,7 µl dieser Lösung (0,2 µg DNA) wurden in die Taschen des Gels pipettiert, und das Gel für 1,5 h bei 70 V laufen gelassen. In den Versuchen, bei denen die Genvektoren mit Serum bzw. Plasma inkubiert wurden, wurden die Genvektoren auf die selbe Art und Weise wie oben beschrieben generiert. Es wurde aber nach der Komplexbildung 6,5 µl humanes Citrat-Plasma, bzw. Serum und 6,5 µl Proteininhibitor-Lösung (Endkonzentrationen: Aprotinin 0,4 U/ml; Leupeptin 0,5 µg/ml; PMSF 100 µg/ml) bzw. nur HBS zu den Komplexen pipettiert. Die Komplexe wurden anschließend für 30 min. bzw. 3h bei 37°C inkubiert, 3 µl Loading-Buffer zugegeben und 17, 3 µl (0,2 µg DNA) auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden auf einer Herolab UVT-20 S/M UV Lampe beleuchtet und mit einer Herolab E.A.S.Y. 429k Kamera detektiert.

2.5 DNase I Protektions Assay

Eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Applikation von Genvektorkomplexen ist der effiziente Schutz der verabreichten DNA vor enzymatischem Abbau. Um dieses zu testen, wurden die Genvektorkomplexe mit rekombinanter DNase I inkubiert, und die DNA anschließend auf ihre Integrität untersucht. 50 µl DNA-Lösung (1 µg DNA) wurden zu 50 µl Vektor-Lösung pipettiert (unterschiedliche N/P, siehe Abbildungen), durch Auf-und Absaugen gut gemischt, und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 U DNase I in 15 µl 5x Aktivitätspuffer (100 mM Natrium Acetat pH=5, 5 mM MgCl₂) zu den Komplexen pipettiert und die Lösung mit 10 µl

destilliertem Wasser auf 75 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl einer 10% igen SDS Lösung zugegeben, die Lösung gut gevortext und 10 min. stehen gelassen. 40 µl 4 M-NaCl Lösung und 60 µl destilliertes Wasser wurden zugegeben und gevortext. Die Lösung wurde je zweimal mit 400 µl Phenol/Chloroform und einmal 400 µl Chloroform extrahiert, und anschließend 800 µl Ethanol absolut zu der wässrigen Phase hinzugegeben und gevortext. Die Lösung wurde über Nacht bei -20°C gelagert und anschließend bei 4°C, 14000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das übriggebliebene DNA-Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen, 3 µl Loading-Buffer hinzu pipettiert und 22 µl auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen (1,5h, 70V). Die Gele wurden auf einer Herolab UVT-20 S/M UV Lampe beleuchtet und mit einer Herolab E.A.S.Y. 429k Kamera detektiert.

2.6 *In vitro*-Transfektionen und Luziferase-Aktivitäts Messungen

COS 7 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10% Fötalem Kälber Serum (FCS) und 16HBE14o-Zellen in Minimal Essential Medium (MEM) supplementiert mit 10% FCS bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage mit Trypsin EDTA trypsinisiert und passagiert. Zellen aus den Passagen 3-25 wurden für die Transfektionen benutzt. Transfektionen wurden durchgeführt in 24-Well Platten (TPP, Peske). Einen Tag vor der Transfektion wurden 30000 COS 7 Zellen bzw. 100000 16HBE14o- Zellen pro Well ausgesät. Dieses resultierte in ca. 60-70% Konfluenz für die Transfektion. Die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS (Phosphate buffered Saline) gewaschen und anschließend 850 µl FCS freies Medium in jedes Well pipettiert. 75 µl Plasmid DNA-Lösung (1µg) wurde zu 75 µl Vektor-Lösung pipettiert, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl dieser Genvektorelösung auf die vorgelegten 850 µl Medium pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und 4h bei 37°C, 5% CO₂ und 100 % Luftfeuchte inkubiert. Die Transfektionen wurden als Vierfach-Bestimmung durchgeführt (die Komplexe wurden durch die entsprechenden vierfachen Volumina generiert). Nach 4h wurden bei den 24-well Platten die Komplexe abgesaugt und durch FCS haltiges und Antibiotika haltiges (Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)) Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24h wurde das Medium abgesaugt, 1-malig mit ca. 1ml PBS gewaschen und 200 µl

Lysepuffer (250 mM Tris , 0,1% Triton, pH=7,8) in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Folie zugeklebt und bei -80°C tiefgefroren bis zur Messung der Luziferase Aktivität. Wurden Transfektionen in Abhängigkeit der Zeit durchgeführt, so wurde die Inkubationszeit auf die angegebenen Zeiten angepasst. Die Versuche, bei denen die Abhängigkeit von der DNA-Dosis untersucht wurde, wurden die Komplexe in der oben beschriebenen Art und Weise generiert, aber anschließend in den entsprechenden Schritten seriell verdünnt. Ebenso wurden die Versuche bei der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Transfektion durchgeführt, nur dass in diesem Fall die Zellen eine Stunde vor der Transfektion bei 4° inkubiert wurden, und dass die Inkubation der Zellen mit den Komplexen bei 4°C erfolgte, sowie die Zellen im Anschluss mit 4°C warmen PBS gewaschen wurden, bevor FCS haltiges Medium auf die Zellen gegeben wurde. Wurden Transfektionen in Anwesenheit von Chloroquin durchgeführt, so wurde mit Hilfe einer frisch hergestellten Chloroquin-Stocklösung die entsprechende Chloroquin-Konzentration des verwendeten Mediums eingestellt ($300\ \mu\text{M}$), und dieses Medium für die Transfektion verwendet (nach der Inkubation mit den Komplexen, wurde chloroquin-freies Medium verwendet). Für die Transfektionen, bei denen ternäre Komplexe, bestehend aus TAT-Oligomer, Plasmid DNA und kationischem Polymer oder Lipid generiert wurden, galt folgendes Prozedere: die drei Komponenten wurden jeweils zu $50\ \mu\text{l}$ in HBS verdünnt und anschließend, je nach gewählter Reihenfolge, zuerst die $50\ \mu\text{l}$ des TAT-Oligomer oder kationischen Vektor zu den $50\ \mu\text{l}$ Plasmid DNA pipettiert, durch mehrmaliges Auf-und Absaugen mit der Pipette gut gemischt. Nach 10 min. wurde die dritte Komponente d.h. entweder der kationische Vektor oder das TAT-Oligomer hinzu pipettiert, wiederum gut gemischt und 10 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen bevor die ternären Komplexe auf $850\ \mu\text{l}$ die Zellen abdeckendes Medium (ohne FCS) pipettiert wurden (auch in diesem Fall wurden die entsprechenden Vielfache der Lösungen verwendet, da die Transfektion als Vierfach-Bestimmung durchgeführt wurde).

Die Transfektionen nach der Vernebelung von Genvektorkomplexen wurden wie die oben beschriebenen Standardtransfektionen durchgeführt, mit der Veränderung, dass nicht $150\ \mu\text{l}$ Komplexlösung auf $850\ \mu\text{l}$ Medium pipettiert wurden, sondern $100\ \mu\text{l}$ (entspricht $1\ \mu\text{g}$ DNA) der einzelnen Fraktionen auf $900\ \mu\text{l}$ Medium pipettiert wurden. Alle Transfektionen wurden mindestens zweimal durchgeführt, und ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

Die über 10 s emittierten Photonen nach Injektion von $100\ \mu\text{l}$ Luziferin-Substrat-Puffer (Promega) zu $10\ \mu\text{l}$ des Zellüberstandes wurden in einem Lumat LB9507 (Berthold, Bad Wildbach) vermessen, und jeweils der zuvor gemessene Hintergrund des Messröhrchens abgezogen. 1×10^6 RLU/10s entsprechen $1,25\ \text{ng}$ Luziferase.

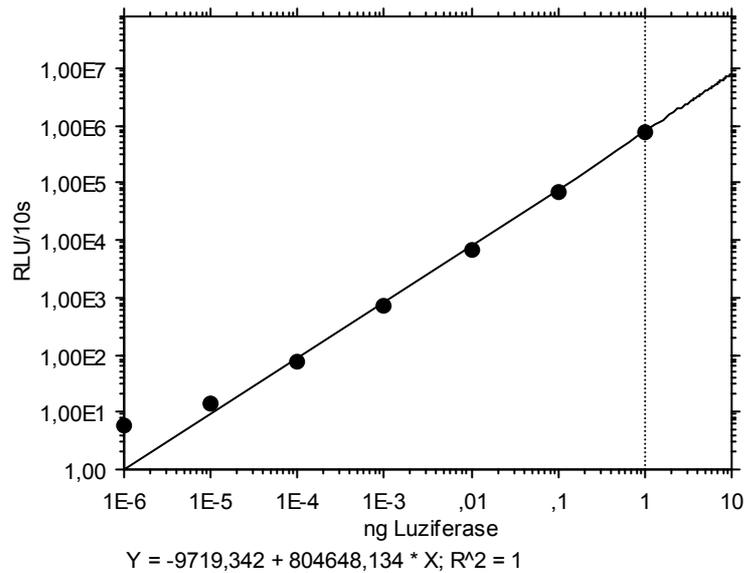


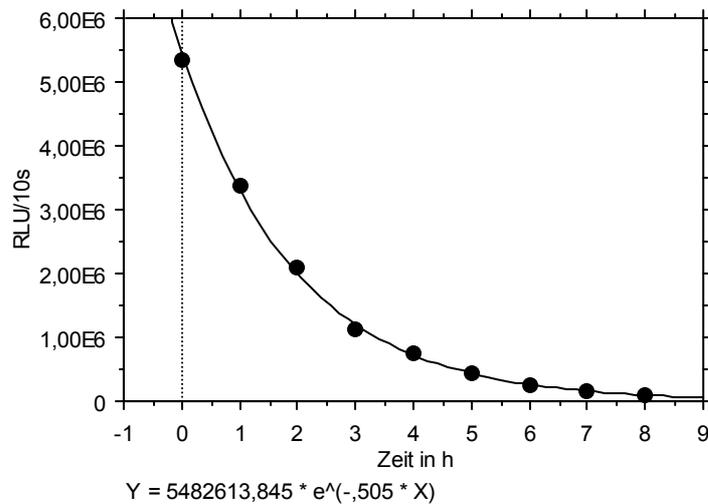
Abb. 9 Standardkurve Luziferasemessung

Rekombinante Luziferase (rLuciferase, Quantilum, Promega) wurde mit einer BSA-Lösung ($c=0,8 \text{ mgml}^{-1}$) seriell verdünnt und 20 μl Probe nach Injektion von 100 μl Luziferin-Substrat Puffer über 10 s vermessen (10s Verzögerungszeit nach Injektion) Die Luziferase-Aktivität ist über 6-7 Größenordnungen linear.

Die Luziferase-Werte wurden auf das Gesamtprotein der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde mittels eines BioRad Protein Assays (Bradford) bestimmt.

Es ist zu beachten, dass die Proben während der Aufbereitung kühl zu halten waren und dass zügig gearbeitet wurde. In Abbildung 10 ist die zeitliche Abnahme der Aktivität rekombinanter Luziferase in Lysepuffer, in Abhängigkeit der Temperatur, dargestellt. Werden die Proben bei Raumtemperatur gelagert, so beträgt die Halbwertszeit 1h 20 min. Auf Eis dagegen verlängert sich die Halbwertszeit auf 2h 05 min.

20°C



4°C

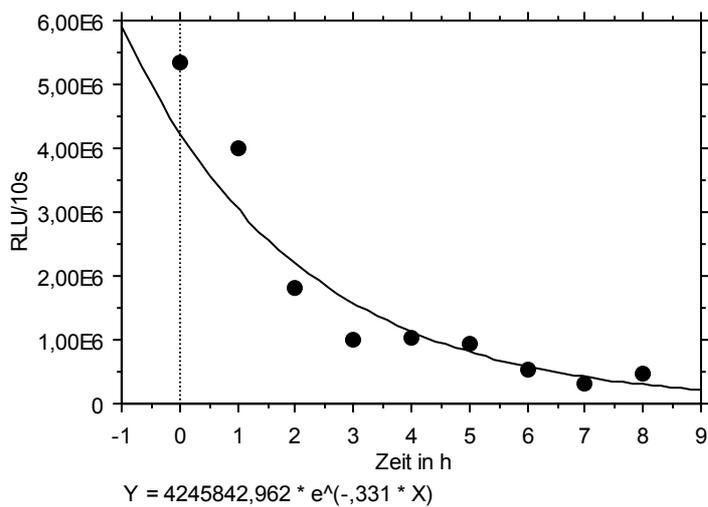


Abb. 10 Temperaturabhängige zeitliche Abnahme der Luziferase-Aktivität in Lysepuffer

Rekombinante Luziferase wurde mit Lysepuffer verdünnt und zu den angegebenen Zeitpunkten die Luziferase-Aktivität gemessen. Das obere Diagramm zeigt die zeitliche Abnahme der Luziferase-Aktivität bei Raumtemperatur, das untere Diagramm die Abnahme der Luziferase-Aktivität von Proben, die auf Eis gelagert wurden.

2.7 MTT-Assay

30000 16HBE-Zellen wurden in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert (MEM mit 10% FCS) und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) belassen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl MEM±FCS in jedes Well

pipettiert. 25 µl der Plasmid DNA-Lösung (0,25µg DNA) wurde zu 25µl Vektor-Lösung pipettiert und durch mehrmaliges Auf-und Absaugen der Lösungen mit der Pipette in den Eppendorfcups gut gemischt. Die Komplexe wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 50 µl der Komplexlösungen wurden auf die Zellen bedeckenden 200 µl MEM±FCS (in 96 Well Platten) pipettiert, und die Platten leicht geschwenkt. Die 96 Well Platten wurden 4 h inkubiert (Brutschrank, 37 °C, 5% CO₂) und das Medium abgesaugt und durch 200µl MEM+FCS Medium (Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)) ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 24 h (Brutschrank, 37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Nach 24h wurden 20 µl sterile MTT-Lösung (5mg/ml in PBS, sterilfiltriert) in jedes Well pipettiert, vorsichtig auf-und abpipettiert zum Mischen. Die Zellen wurden weitere 2 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert und der Überstand abgesaugt. 100 µl einer Lösung, bestehend aus 99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100%), 10 g SDS wurde auf die Zellen pipettiert, und die Platten 5 min stehen gelassen und danach 5 min. geschüttelt. Jedes Well wurde bei 590 nm, Referenzwellenlänge 630 nm vermessen (SPECTRAFluor Plus, Tecan). Als Kontrolle wurden Zellen, die nicht behandelt wurden, verwendet und, als 100% der Überlebensfähigkeit gesetzt. Die Bestimmung wurde in Vierfachwerten durchgeführt.

$$\text{Überlebensrate(\%)} = \frac{(A_{590\text{nm,Probe}} - A_{630\text{nm,Probe}})}{(A_{590\text{nm,Kontrolle}} - A_{630\text{nm,Kontrolle}})} \cdot 100$$

2.8 Epifluoreszenzmikroskopie

Für epifluoreszenzmikroskopische Beobachtungen wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) verwendet. Für die Anregung und Emission von EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein, 488 nm/507 nm) wurden ein Anregungsfilter 450-490 nm und ein Emmissionsfilter 515-565 nm verwendet. Für die Anregung und Emission von 5-Carboxy-X-Rhodamine (576 nm/597 nm) wurden ein Anregungsfilter 530-585 nm und ein Emmissionsfilter 615 nm verwendet. Die Anregung und Emission von DAPI (359 nm/461 nm) erfolgte über einen Anregungsfilter bei 365 nm und einen Emmissionsfilter bei 420 nm. Für die Aufnahme von Bildern wurde eine CellCam Color CCD-Kamera (PHASE GmbH, Lübeck) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 10x und 63x Objektiv durchgeführt.

2.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die 3D Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurde von Herrn James Lausier mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Solvei (Solovei, I., Cremer, M., Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Methods in Molecular Biology*. In press.) durchgeführt. Herstellung der Sonde: Die DNA Sonde wurde, basierend auf dem pEGFP-N1 Plasmid (Clontech, Palo Alto, CA. USA), über nick translation hergestellt. Ein Digoxigenin Hapten wurde mittels dem Dig Nick Translation Mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) in eine Sonde aus einer mittleren Länge von 300 bp integriert. Das resultierende Gemisch wurde über den Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) von kleinen Fragmenten und Nukleotiden gereinigt. Ein Mikrogramm der Sonde wurde mit 50 µg Lachssamen DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamide wieder aufgenommen, für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei – 20°C bis zum Gebrauch gelagert. Die Sonde wurde auf 37°C gebracht und 1:1 mit „Fish Mix“ (4xSSC, 40% dextran sulfate; 1xSSC 100mM NaCl, 15mM Na Citrate, pH 7.0) gemischt. Dieses resultierte in einer Hybridisierungslösung bestehend aus 25 ng/µl Sonde in 2xSSC, 20% Dextransulfat und 50% Formamide. Die Hybridisierungslösung wurde für 5 min bei 75°C denaturiert und bei 37°C bis zur Applikation gelagert. Die Lagerungsflüssigkeit wurde von den zu untersuchenden Objektträgern abgesaugt, 50 µl der Hybridisierungslösung auf jeden Objektträger aufgetragen, und die Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen wurden mit rubber cement fixiert und gut an den Rändern verschlossen. Die gut verschlossenen Objektträger wurden für 3 min. auf 75°C erhitzt, um die zelluläre DNA zu denaturieren, und die Sonden DNA weiter zu denaturieren. Anschließend wurden die Objektträger in einem Brutschrank für 2-3 Tage bei 37°C für die Hybridisierung belassen. Danach wurde das rubber cement entfernt, die Deckgläschen wieder vorsichtig abgenommen, und die Objektträger zunächst zweimal in 42°C warmem und dann dreimal in 60°C warmem 4xSSC gewaschen. Die Objektträger wurden mit einer 3% BSA Lösung geblockt und anschließend mit einer 1:200 Verdünnung eines Rhodamine konjugierten antidigoxigenin Antikörper (Schaf) für 45 min. bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Objektträger wurden danach dreimal für 5 min. in 4xSSC bei 42°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox 16 angefärbt und mit einem Deckgläschen verschlossen. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ebenfalls von Herrn James Lausier durchgeführt. Optische Schnitte durch die Zellkerne wurden mit einem Dreikanal konfokalen Mikroskop (TCS 4D; Leica Inc., Deerfield ,IL), das mit einem Plan Apo 63x/1.32 Öbobjektiv ausgestattet war, gescannt. Mit einem Argon/Krypton Laser bei den

Wellenlängen 488 nm und 567 nm wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Sytox Green und Rhodamine jeweils angeregt und 256x256 8 bit Bilder mit einem axialen Abstand von 250 nm, Pixelgröße 1nm, generiert. Jede Bildserie bestand aus ca. 20-25 Bildern. Die beiden Fluochrome wurden sequentiell in der gleichen Kernebene abgebildet. Die Laserstärke und -spannung für den Rhodaminekanal wurde konstant gehalten, während die Spannung des Sytox Green Kanals den unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen der Zellkernfärbung angepasst wurde.

2.10 Intratracheale Applikation von Genvektorkomplexen

2.10.1 Zubereitung von Genvektorkomplexen für die intratracheale Applikation

Die Plasmid DNA (160 µg pCMVLuc, je 20 µg pro Maus), und die unterschiedlichen Mengen Polyethylenimine (PEI) 25 kDa, die sich nach dem zu untersuchenden N/P-Verhältnis (Stoffmengenverhältnis von Stickstoff aus dem PEI zu Phosphat aus der DNA) richteten, wurden jeweils mit 200 µl pyrogenfreien Wasser (Ampuwa[®]) oder 25 mM HEPES, pH=7,4 verdünnt, gemischt und 10 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein N/P-Verhältnis von 8 entspricht 20,9 µg PEI auf 20,0 µg DNA. 100 µl der PEI-Lösung wurden vorsichtig zu 100 µl der DNA Lösung pipettiert und gründlich durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die resultierenden PEI/DNA Komplexe wurden 20 min. bei Raumtemperatur vor Applikation stehen gelassen. Um mögliche Unterschiede in Komplexeigenschaften zu vermeiden, wurden nach jeder dritten intubierten Maus, die Komplexe für die nächsten Mäuse neu zubereitet. In den Experimenten, bei denen nur nackte Plasmid DNA appliziert wurde, wurde diese jeweils nur in destilliertem Wasser oder 25 mM HEPES verdünnt. Die Komplexe, bestehend aus abgebauten Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimern und DNA, wurden auf die gleiche Art und Weise wie die PEI/DNA-Komplexe generiert. Das N/P-Verhältnis wurde nach den protonierbaren Stickstoffatomen der Dendrimere im Verhältnis zu Phosphaten der DNA berechnet. Ein N/P=4,7 entspricht 32,1 µg Dendrimer auf 20 µg DNA. Wurden Dendrimer/DNA Komplexe bei N/P=6 generiert, konnte man recht schnell Präzipitation beobachten. Aus diesem Grund wurden diese Komplexe unmittelbar nach Herstellung den Mäusen appliziert.

In den Experimenten bei denen der Einfluss von Surfactant auf die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen untersucht wurde, wurde im Anschluss an die 20 minütige Komplexbildung 10 µl einer Surfactant-Zubereitung (Alveofact[®]) zu den 50 µl Komplexlösung zugegeben und die Lösung gut gemischt.

Das kationische Lipid GL67:DOPE:DMPE-PEG(5000) (1:2:0,05) (eine freundliche Spende von S. Cheng, Genzyme) wurde nach der Anleitung des Herstellers zubereitet. Das kationische Lipid wurde mit 4°C warmen Wasser (Ampuwa®) rehydratisiert und 30 s gevortext und für weitere 10 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das kationische Lipid 2 min. bei höchster Stufe gevortext. Die DNA und das kationische Lipid wurden bei 4°C bis zur Verwendung gelagert und vor dem Mixen mit DNA für 5 min. bei 30°C äquilibriert. Die Komplexe wurden durch das Pipettieren der Lipid-Lösung zu der DNA Lösung generiert mit anschließender Inkubation bei 30°C für 15 min. Das molare Verhältnis von GL-67 zu DNA (Phosphat) betrug 1:4. Transferrin-PEI Genvektoren wurden folgendermaßen generiert: PEI (0,9 µg/µg DNA und Transferrin-PEI (0,15 µg Tf-PEI/µg DNA, 2 Transferrin pro PEI Molekül) wurden gemischt, und DNA wurde hinzupipettiert, um die Komplexe zu generieren. Die Komplexe wurden 20 min. bei Raumtemperatur vor Applikation inkubiert.

In den Fällen, bei denen die PEI/DNA Komplexe mit PEG Kopolymeren geschützt wurden, wurden nach 20 min. Inkubation der PEI/DNA Komplexe (N/P=8) 2 negative Äquivalente (bezogen auf die DNA Stoffmenge) PEG Kopolymere hinzupipettiert (Finsinger *et al.*, 2000).

2.10.2 Ablauf der intratrachealen Applikation von Genvektorkomplexen mittels Intubation

Um die Effizienz nicht-viraler Gentransfervektoren, *in vivo* in die Mauslunge untersuchen zu können, musste zunächst eine Methode für deren gezielte Applikation etabliert werden.

In anfänglichen Versuchen wurden die Transgenpräparationen direkt in die vorher freipräparierte Trachea narkotisierter BALB/c Mäuse instilliert. Diese Applikationsmethode erwies sich jedoch als relativ unsanfte Applikationsmethode, die Verluste mit sich brachte. Die direkte intratracheale Instillation erforderte einen operativen Eingriff an den Versuchstieren und damit eine tiefe Narkose. Sowohl die tiefe Narkose, als auch der operative Eingriff, führten zu großer Belastung der Tiere mit Verlusten und folglich zu nicht auswertbaren Versuchsergebnissen. Infolgedessen musste die Applikationsmethode umgestellt werden und es wurde eine sehr schonende nichtinvasive intratracheale Intubationsmethode etabliert, die nur eine flache Narkose erforderte und die Verluste minimierte.

Bei dieser Applikationsmethode wurden die Mäuse mit 140 µl einer Pentobarbital-Lösung (Narcoren®), entsprechend 85 mg Pentobarbital pro Kg Körpergewicht, intraperitoneal narkotisiert. Im Anschluss wurden die Mäuse senkrecht positioniert, so

dass deren Hals überstreckt war und in einer für die Intubation zugänglichen Lage resultierte. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurde das Maul geöffnet, und die Zunge zur Seite gezogen. 50 µl der Genvektoralösung wurde über einen Venenverweilkatheter, der direkt in die Trachea eingeführt wurde, (25 mm, 0,9 mm OD, 0,6 mm ID, Baxter) in die Lunge appliziert. Um eventuelle Fehlintubation zu vermeiden, wurde die Trachea mit Hilfe eines Otoskops, das senkrecht zum Hals der Maus gehalten wurde, beleuchtet. Die so gut beleuchtete Trachea konnte problemlos intubiert werden. Die Intubationsmethode wurde durch makroskopische Betrachtung der Mauslunge nach der Applikation einer blau gefärbten Lösung (Toluidin Blau) überprüft. Die gleichmäßige Blaufärbung der Mauslunge bestätigte die korrekte Intubation und die Anwendbarkeit als Applikationsmethode. 50 µl Applikationsvolumen stellte sich als am besten von den Mäusen toleriertes Volumen heraus mit der geringsten Mortalität.

2.10.3 Organentnahme und Luziferase Aktivitäts Messung

24 h nach der Genvektorapplikation wurden die Mäuse mit 200 µl einer Pentobarbital-Lösung (Narcoren[®]) entsprechend 120 mg Pentobarbital pro Kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Nach medianem Hautschnitt am Bauch wurde die Haut stumpf vom Bauchmuskel abpräpariert. Anschließend wurde der Bauchmuskel median durchtrennt, und damit das Peritoneum eröffnet. Im Anschluss wurde die Vena cava inferior durch einen Schnitt komplett durchtrennt und 1 ml einer isotonischen Kochsalzlösung direkt in den rechten Ventrikel injiziert, um die Lungen von Blut zu reinigen. Dieses war wichtig, da die Luziferase-Aktivität durch Blutbestandteile, vor allem Hämoglobin (Colin *et al.*, 2000), beeinflusst wird und folglich die Ergebnisse verändert. Herz, Leber, linke und rechte Lunge, Trachea und Ösophagus wurden entnommen, sofort in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C bis zur Messung gelagert. Für die Luziferase-Messung wurden die Organe auf Eis aufgetaut und 500 µl Lysepuffer (25 mM Glycylglycine; 15 mM Magnesium Sulfat; 4 mM EDTA; 0.1 % Triton X-100 (m/V); 1 mM PMSF; 0.15 U/ml Aprotinin) hinzu pipettiert. Im Falle von Trachea und Ösophagus 300 µl. Die Organe wurden anschließend 20s in einem Polytron Pt 2100-Homogenizer (Stufe 5 entsprechend 26,000 rpm, Kinematica, Litau/Luzern, Schweiz) homogenisiert und mit 10000 g bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Die über 10 s emittierten Photonen nach Injektion von 100 µl Luziferin-Substrat-Puffer (Promega) (10s Verzögerungszeit) zu 40 µl des Überstandes wurden in einem Lumat LB9507 (Berthold, Bad Wildbach) vermessen und jeweils der Hintergrund abgezogen. Es war zu beachten, dass die Proben während der Aufbereitung kühl zu halten waren, und dass zügig gearbeitet wurde. In Abbildung 11

ist die zeitliche Abnahme der Aktivität rekombinanter Luziferase in Lungenhomogenisat nicht behandelter Mäuse in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert, so betrug die Halbwertszeit 6h 40 min. Auf Eis dagegen verlängerte sich die Halbwertszeit auf 11h 20 min.

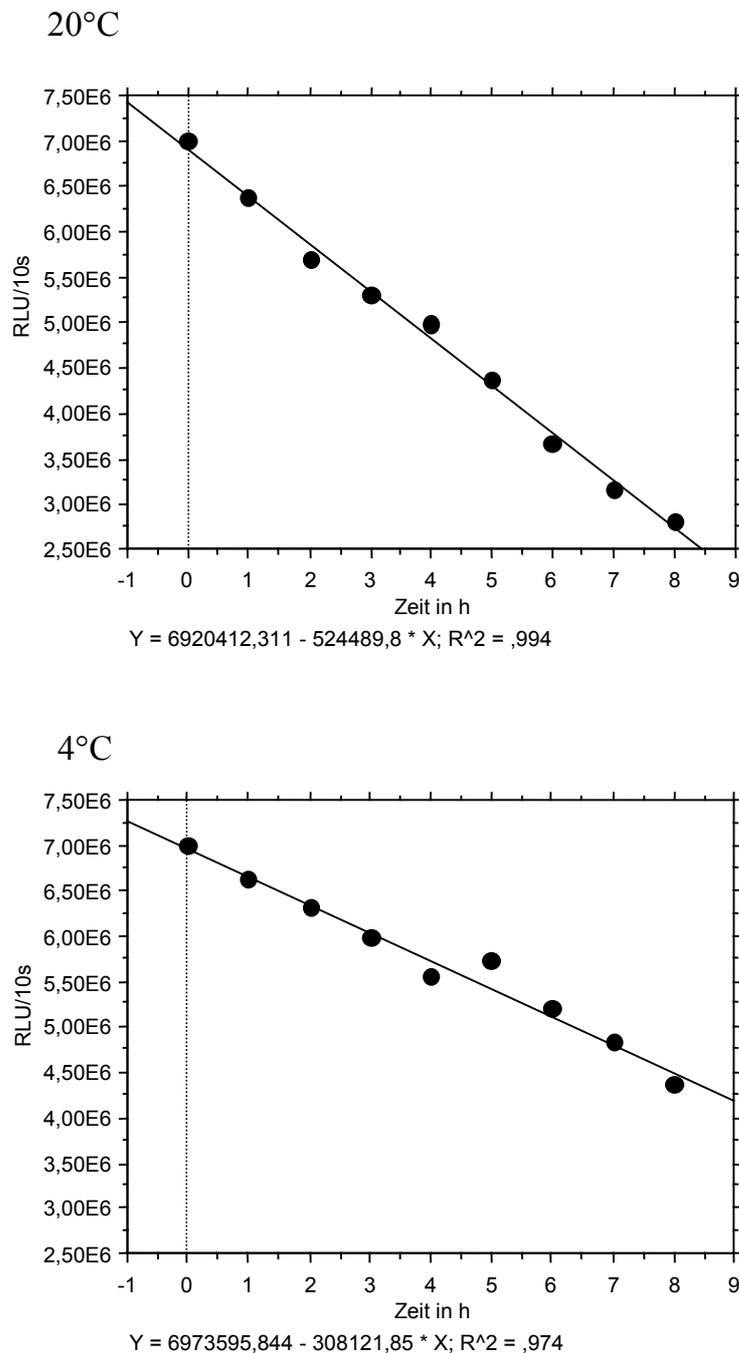


Abb. 11 Temperaturabhängige zeitliche Abnahme der Luziferase-Aktivität in Lungenhomogenisat

Rekombinante Luziferase wurde mit dem Überstand homogenisierter nicht behandelter Mauslungen verdünnt und zu den angegebenen Zeitpunkten die Luziferase-Aktivität gemessen. Das obere Diagramm zeigt die zeitliche Abnahme der Luziferase-Aktivität bei Raumtemperatur, das untere Diagramm die Abnahme der Luziferase-Aktivität von Proben, die auf Eis gelagert wurden.

2.10.4 Histologie

Die Mäuse wurden mit isotonischer Kochsalzlösung durch den rechten Ventrikel perfundiert, und die Lungen anschließend mittels einer Perfusion einer 4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) fixiert. Die Lungen wurden entnommen und nach weiterer zwei stündiger Inkubation in 4% Paraformaldehyd-Lösung über Nacht in einer 30% Saccharose-Lösung aufbewahrt. Den nächsten Tag wurden die Lungen in O.C.T. Compound (optimal cutting temperature compound, Tissue Tek, Sakura Finetek) auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gefrierschnitte der Dicke $6\ \mu\text{m}$ wurden von James Lausier angefertigt und die Schnitte kurz mit Hämatoxylin (Gill no.3, Sigma) angefärbt, bevor sie mit einem Deckglas abgedeckt wurden. Die Histologie der Lunge wurde auf inflammatorische Zellen und Gewebeinflammation und -schäden hin doppelblind mikroskopisch beurteilt.

2.10.5 Plasmid DNA

Das Plasmid pCMVLuc, das für das Protein Luziferase der Feuerfliege kodiert und über einen CMV Promoter reguliert wird, wurde von Herrn Dr. E. Wagner (Boehringer Ingelheim, Wien) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pEGFP-N1, das für das Enhanced Green Fluorescent Protein kodiert und über einen CMV Promoter reguliert wird, wurde von der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) bezogen. Die Plasmid DNA wurde in DH5 α high copy *Escherichia coli* amplifiziert und extrahiert und gereinigt über Säulenchromatographie nach Anweisung des Herstellers (Mega Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland). Die Identität und Reinheit der Plasmid DNA wurde durch Messung des Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm, sowie durch Agarose Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau bestimmt (EcoRI, EcoRV and Sac I, Boehringer Mannheim, Deutschland)

2.10.6 Filtrations Assay

Das Filtrations Assay wurde modifiziert nach Ogris et al (Ogris *et al.*, 1999) von Petra Nicklaus durchgeführt. Die Membran der Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf, 220 nm Porengröße) wurde mit 500 μl BSA (1mg/ml) abgesättigt (Reduktion der unspezifischen Interaktion der Bronchoalveolären Lavage (BALF) Proteine mit der Membran) und anschließend 3x mit 500 μl HBS gewaschen (Zentrifugation der jeweiligen Lösungen durch die Membran für 2 min. bei 10000g). 12,8 μg DNA

wurden mit Ampuwa[®] auf 20 µl verdünnt und 20 µl PEI Lösung hinzu pipettiert (N/P=8, 13,36 µg) und durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit der Pipette gut gemischt. Die Lösung wurde 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert; die resultierenden Komplexe hatten ein N/P-Verhältnis von 8. Bei Untersuchung des Effektes von PEG, wurde nach der PEI/DNA Inkubation der Komplexlösung 2 negative Ladungsäquivalente (bezogen auf Stoffmenge DNA) P6YE5C verdünnt in 20 µl Ampuwa[®] zugesetzt und für weitere 15 min. inkubiert. Den Genvektoren wurden 150 µl BALF (Proteinkonzentration 2,2 mg/ml) zugesetzt und 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend bei 10000g zentrifugiert. Die nicht adsorbierten BALF Bestandteile befanden sich im Filtrat, während die Genvektoren mit adsorbierten Proteinen auf der Filtermembran verblieben. Die adsorbierten Proteine wurden mittels einer SDS Lösung resolubilisiert und mit einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der Glykoproteine erfolgte mittels dem ECL Glykoprotein Detektions System (Amersham Pharmacia, #RPN 2190).

2.11 Vernebelung der Genvektoren

PEI/DNA Polyplexe wurden folgendermaßen generiert: DNA und PEI 25 kDa wurden in HEPES gepufferter Kochsalzlösung (HBS, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH=7,4; steril filtriert durch einen 0,2 µm Filter), 5% Glucose (w/v, Braun Melsungen) oder destilliertem Wasser (Ampuwa[®]) zu 1,5 ml verdünnt. Die Konzentrationen der Lösungen resultierten in 20 µg/ml DNA und 26,1 µg/ml PEI. Dieses entsprach einem N/P=10. Die DNA Lösung wurde zu der PEI-Lösung pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt, resultierend in einer DNA Konzentration von 10 µg/ml. Anschließend wurden die Polyplexe für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Vernebelung der PEI/DNA Polyplexe wurde ein im Handel erhältlicher Venturi-Düsenvernebler PARI BOY[®] verwendet. 2,4 ml (bei der Bestimmung des Zetapotenzial 4,0 ml) der oben beschriebenen Polyplexe wurden für 10 min. vernebelt. Mit Hilfe der Fixierung einer Spritze an der Austrittsöffnung des Verneblers wurde das Aerosol in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.12 Zetapotenzial- und Größenmessung mittels PCS

Die Partikelgrößen wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und die Zetapotenziale elektrophoretisch mit einem Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments,

Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Für die Größenbestimmung wurden jeweils 600 μl der einzelnen Fraktionen in eine Küvette pipettiert und vermessen. Für die Zetapotenzialmessung wurde jeweils 1 ml in die Elektrophoresekammer mit Hilfe einer Spritze injiziert.

Die folgenden Einstellungen wurden benutzt: 10 Messungen pro Probe; Viskosität von Wasser 0,89 cP, Viskosität von 150 mM NaCl 1,14 cP, Viskosität von 5% Glucose 1,02 cP, Dielektrizitätskonstante 80,8, Temperatur 25°C, beam mode F(Ka)=1,50 (Smoluchowsky, für die Berechnung des Zetapotentials).

2.13 Photometrische DNA Quantifizierung von PEI/DNA Komplexlösungen

Um die Konzentration der DNA, die in jeder Fraktion nach Vernebelung verbleibt zu bestimmen, wurden die PEI/DNA Komplexe wie oben beschrieben vernebelt, aber mit einer DNA Konzentration von 20 μgml^{-1} . Eine Standardreihe durch seriell Verdünnen von PEI/DNA Komplexen in destilliertem Wasser (Ampuwa[®]), 5% Glucose und HBS wurde bei 260 nm vermessen und die Konzentration der einzelnen Fraktionen nach der Vernebelung an Hand dieser Standardkurve berechnet. Es ist eine Standardkurve exemplarisch für PEI/DNA Polyplexe in HBS gezeigt. Im Vergleich zu nackter DNA, die eine Absorption von 1 bei einer Konzentration von 50 μgml^{-1} zeigt, steigt die Absorption, wenn die DNA in den PEI Komplexen gebunden ist (A=1 bei 44 μgml^{-1} in HBS) an.

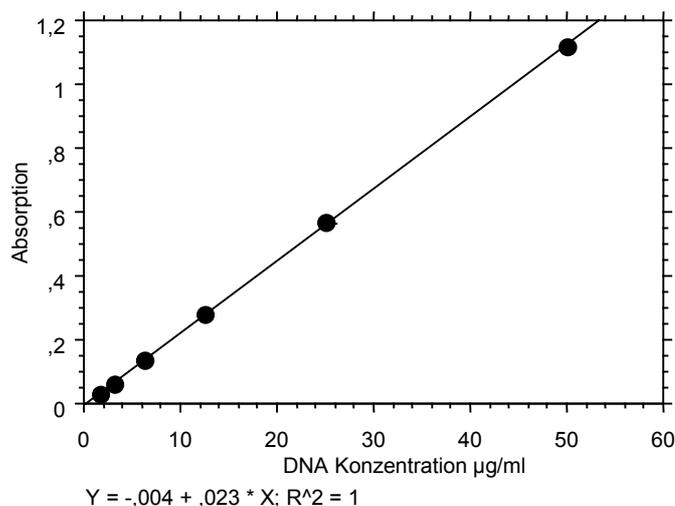


Abb. 12 Verdünnungsreihe von PEI/DNA Polyplexen generiert in HBS

2.14 Statistische Auswertung

In den Tierversuchen wurden die Daten mit einem nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Für den statistischen Vergleich zwischen der rechten und linken Lunge einer Gruppe wurde ein nicht parametrischer gepaarter Wilcoxon Test verwendet. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn $p \leq 0,05$ war.

Für die statistische Analyse von *in vitro* Daten wurde ein nicht gepaarter t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm StatView 5.0 durchgeführt.