
5 Untersuchungen zum Einfluss der Vernebelung auf die Stabilität von PEI/DNA Polyplexen

Für den Gentransfer in die Lunge sind prinzipiell zwei verschiedene topische Applikationsmethoden denkbar. Einerseits können Gentransfervektoren direkt intratracheal via Intubation oder Bronchoskopie appliziert werden, andererseits stellt die Vernebelung eine weit verbreitete Applikationsmethode dar. In Teil 4 konnte gezeigt werden, dass die direkte intratracheale Applikationsmethode für den topischen Gentransfer in die Lunge geeignet ist, bzw. das PEI 25 kDa Genvektorkomplexe auf diese Art und Weise Gentransfer in die Lunge vermitteln. Die Vernebelung von Genvektorkomplexen für die inhalative Therapie erscheint jedoch die für den Patienten schonendste und am meisten akzeptierte Applikationsmethode, die der direkten intratrachealen Applikation vorzuziehen ist. Ein weiterer Grund, der die Vernebelung von Gentransfervektoren unerlässlich macht, ist die Möglichkeit, Genvektoren in stabilen Formulierungen herzustellen, die ansonsten aufgrund der kleinen limitierenden Applikationsvolumina zu Problemen führt (Abschnitt 4.5).

Die Gruppe von Densmore konnte effizienten Gentransfer mittels vernebelten PEI 25 kDa Genvektoren durch die direkte Vernebelung der Genvektorkomplexe in den Käfig, in dem die Mäuse lebten, erzielen. Mit Hilfe dieser einfachen Methode gelang es ihnen, Mäuse so effizient zu immunisieren, wie nach intramuskulärer Injektion von nackter Plasmid DNA (Densmore *et al.*, 2000). Ebenfalls konnte in einem Mauslungentumormodell das Metastasenwachstum inhibiert werden, bzw. die mittlere Überlebenszeit der Mäuse um 50% verlängert werden (Gautam *et al.*, 2000). Die Gentransferkomplexe wurden in diesen Studien in PBS (Phosphate buffered Saline) generiert. In diesem Kontext ist zu berücksichtigen, dass das Solvens einen entscheidenden Einfluss auf Parameter der PEI/DNA Komplexe hat. Die Verwendung von Wasser oder 5% Glucose (mit geringer Ionenstärke) für die Zubereitung der Genvektoren führt zu kleinen 50-60 nm großen Partikeln (Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998), während die Verwendung ionischer Solventien, wie isotonische Kochsalzlösung zu großen und aggregierenden Partikeln führt (Erbacher *et al.*, 1999a; Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998). Darüber hinaus hat das Solvens auch einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Komplexe (Zou *et al.*, 2000). Sowohl aber die Größe der Komplexe, als auch deren Oberflächenladung haben aber einen Einfluss auf die Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo*.

In vitro lässt sich folgender Trend feststellen: Erhöhung der Oberflächenladung der Genvektoren durch Erhöhung des N/P-Verhältnis und Vergrößerung der Genvektorkomplexe durch das Wechseln von einem nicht ionischen auf ein ionisches Solvens, erhöht die Gentransfereffizienz (Erbacher *et al.*, 1999a; Ogris *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu, wurde *in vivo* gezeigt, dass die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen in das Gehirn von Mäusen durch kleine PEI/DNA Partikel, die in 5% Glucose generiert wurden, effizienter war als durch größere Komplexe, die in isotonischer Kochsalzlösung generiert wurden (Goula *et al.*, 1998b). Das gleiche Verhalten beobachtete man nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene von Mäusen. Auch in diesem Fall waren kleine nicht aggregierende in 5% Glucose generierte Komplexe effizienter als große Komplexe, die in ionischen Solventien generiert wurden (Wightman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2000). Es besteht folglich ein bedeutender Einfluss der physikalischen Parameter der Vektorkomplexe auf die Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo*.

Da die prinzipielle Vernebelung von PEI/DNA Komplexen wie oben bereits erwähnt zu erfolgreichem Gentransfer in die Mauslunge führte, das verwendete Solvens aber sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufgrund von Veränderung der Komplexeigenschaften die Gentransfereffizienz stark beeinflusst, sollte der Einfluss des Solvens auf Komplexeigenschaften bei der Vernebelung und die resultierende Gentransfereffizienz *in vitro* untersucht werden.

5.1 Physikalische Stabilität und Integrität der DNA nach Vernebelung

Die physikalische Integrität der vernebelten DNA ist eine entscheidende Voraussetzung um biologische Aktivität, d.h. Transgenexpression zu erzielen. Aus diesem Grund sollte zunächst die Komplexstabilität untersucht werden, ob PEI in der Lage ist, DNA effizient zu komplexieren, um deren Schutz vor Kräften, die bei der Vernebelung auftreten zu gewähren. PEI/DNA Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 in HBS (HEPES buffered Saline, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7,4), 5% Glucose oder destilliertem Wasser (Ampuwa[®]) durch das Pipettieren von gleichen Volumina DNA-Lösung zu PEI-Lösung generiert. Bevor die Komplexe vernebelt wurden, wurde eine nicht vernebelte Fraktion entnommen. Die restliche Lösung wurde für 10 min. mit einem PARI Boy vernebelt. Um den vernebelten Teil der Lösung, der nicht aus dem Vernebler ausgetreten war, zu untersuchen, wurde ein Teil der im Reservoir des Verneblers verbliebenen Lösung entnommen (schematische Darstellung s. Abb. 60). In Abbildung 61 ist der Einfluss der Vernebelung auf die Komplexstabilität gezeigt. Es wurde unabhängig von dem Solvens, das verwendet wurde, bei keiner der Fraktionen DNA auf dem Gel detektiert. Dieses bedeutete, dass die PEI/DNA Polyplexe dem Vernebelungsprozess standhielten, und dass die auftretenden Kräfte die Polyplexe nicht zerstörten, so dass die DNA weiterhin im komplexierten Zustand vorlag. Im Gegensatz dazu wurde nackte Plasmid DNA durch

den Vernebelungsprozess merklich zerstört, welches durch die kleinen entstandenen DNA-Fragmente bei der vernebelten Fraktion zu erkennen war (die kleinen Fragmente laufen oberhalb der Hauptbande, siehe Marker). Interessanterweise nahm die Anzahl kleiner DNA Fragmente mit der Reservoirfraktion hin zu. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in der Reservoirfraktion verbliebene DNA häufiger vernebelt wurde. Während eines Vernebelungszyklus treten nur ca. 1% der vernebelten Lösung tatsächlich aus dem Vernebler aus. Der Rest fällt in das Reservoir zurück und wird erneut vernebelt.

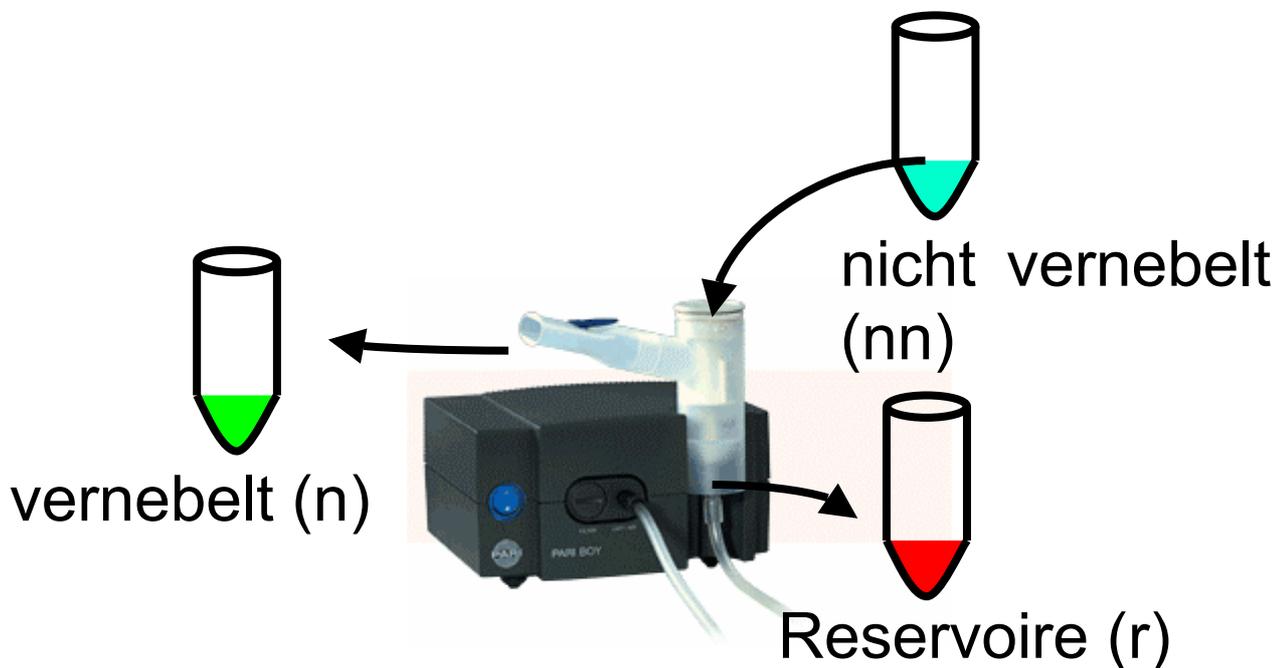


Abb. 59 Schematische Darstellung der untersuchten Fraktionen

Ein kommerziell erhältlicher PARI Boy Vernebler wurde für die Untersuchungen verwendet. Die zu vernebelnde Lösung wurde in das Reservoir des Verneblers eingefüllt. Vor dem Vernebeln wurde eine Teil entnommen, der als nicht vernebelte Fraktion bezeichnet wurde. Während der Vernebelung wurde das austretende Aerosol aufgefangen. Dieser Teil wurde als vernebelte Fraktion bezeichnet. Der im Reservoir nach der Vernebelung zurück gebliebene Teil wurde als Reservoir Fraktion bezeichnet.

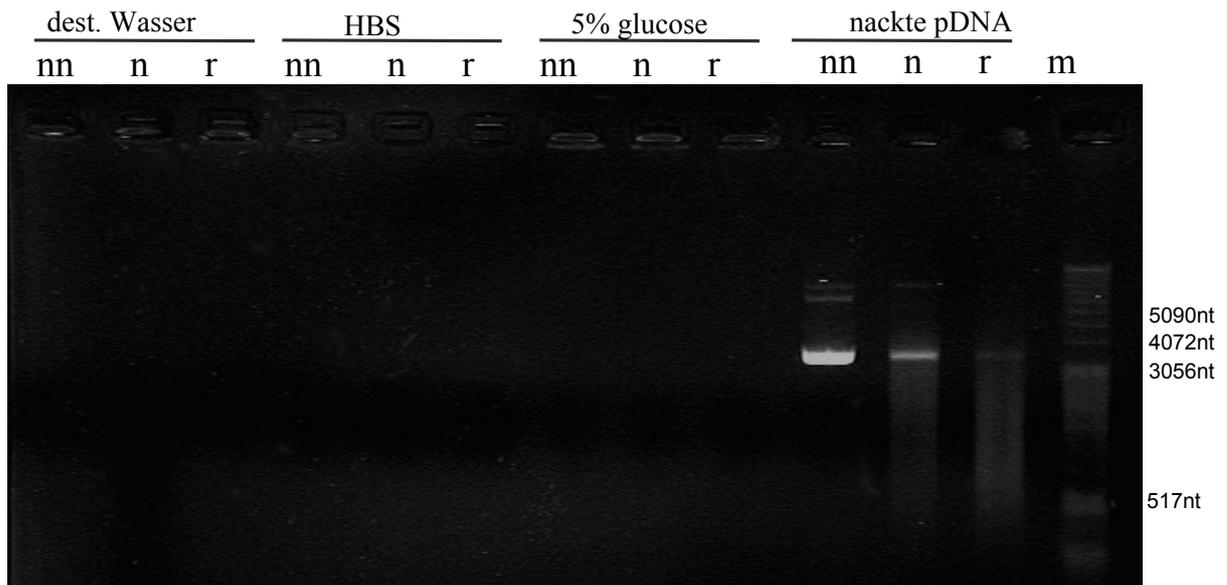


Abb. 60 Komplextabilität von PEI/DNA Polyplexen

Agarose-Gelelektrophorese von PEI/DNA Polyplexen. nn=nicht vernebelt, n=vernebelt, r=Reservoir, m=Marker (1kB). Unabhängig von dem Solvens war keine Zerstörung der PEI/DNA Polyplexe durch die Vernebelung, welches durch die Abwesenheit von kleinen DNA Fragmenten indiziert war, zu beobachten. Im Gegensatz dazu, wurde nackte Plasmid DNA stark zerstört. (nt=Anzahl der Basenpaare)

Neben der Komplextabilität ist die Integrität der DNA relevant für deren biologische Aktivität. Um genauer zu untersuchen, ob die in den Komplexen gebundene DNA während des Vernebelungsprozess intakt blieb, wurden die Polyplexe in einem weiteren Versuch erneut vernebelt und anschließend mittels alkalischer Gelelektrophorese untersucht, um die DNA von dem kationischen Polymer abzutrennen und getrennt zu untersuchen. Während bei den Komplexen, die in destilliertem Wasser generiert wurden, die Menge und Integrität der DNA nicht durch den Vernebelungsprozess beeinflusst wurde, welches durch die intakten DNA Banden zu sehen war, zeigten die Komplexe, die in 5% Glucose formuliert wurden, ein anderes Verhalten. In diesem Fall erforderte die Trennung zwischen DNA und PEI den Zusatz von Chondroitinsulfat C. Aber auch in diesem Fall war die Trennung nicht vollständig, welches auf eine starke Bindung zwischen DNA und kationischem Polymer hindeutete. Die Gelelektrophorese von Polyplexen, die in 5% Glucose formuliert wurden, zeigten eine Hauptbande und einen Schmier, der auf die graduelle Freisetzung der DNA aus den Komplexen durch das Chondroitinsulfat C zurück zu

führen war. Wesentlich war, dass keine kleineren DNA Fragmente, die oberhalb der Hauptbande liefen, zu sehen waren. Dieses bestätigte, dass die DNA vor Zerstörung während des Vernebelungsprozess geschützt war.

Interessanterweise konnte keine DNA wiedergefunden werden, wenn die Polyplexe in HBS generiert wurden. Es war nur eine kleine Menge DNA in der Tasche der vernebelten Fraktion zu sehen, während in der Tasche der Reservoirfraktion keine DNA zu sehen war. Da aber keine kleinen DNA-Fragmente bei den vernebelten Fraktionen auf dem Gel zu finden waren, schien eher keine DNA vorhanden zu sein, als dessen Zerstörung. Auch in diesem Fall war die nackte DNA nach der Vernebelung, welches durch die kleinen DNA-Fragmente zu erkennen war, stark zerstört.

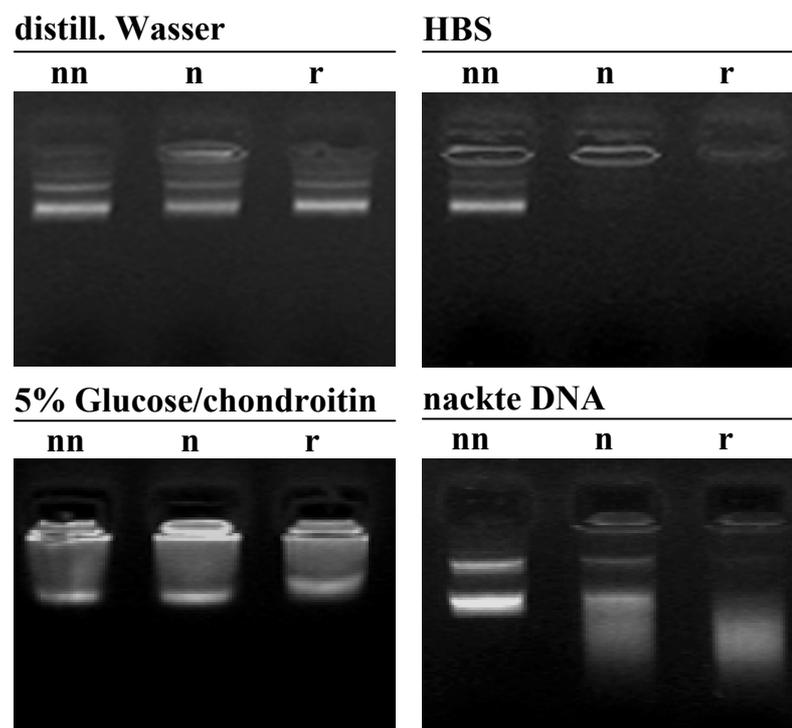


Abb. 61 Integrität der DNA nach Vernebelung der PEI Polyplexe

nn=nicht vernebelt, n=vernebelt, r=Reservoir. Polyplexe wurden mittels alkalischer Gelelektrophorese untersucht, um die DNA von dem kationischen PEI abzutrennen. Wurden die Polyplexe in dest. Wasser generiert, so wurde keine Zerstörung der DNA beobachtet. Wurden die Polyplexe in 5% Glucose generiert, so wurde ebenfalls keine Zerstörung der DNA beobachtet. Allerdings konnte die DNA nur partiell nach der Zugabe von Chondroitinsulfat C abgetrennt werden. Wurden die Polyplexe in HBS generiert, so wurde keine Zerstörung der DNA beobachtet, aber nur eine kleine Menge der DNA konnte detektiert werden. Nackte Plasmid DNA wurde erheblich durch die Vernebelung zerstört. Dieses war an den kleinen detektierten Fragmenten auf dem Gel zu erkennen.

5.2 DNA Konzentration der Polyplexlösungen vor und nach der Vernebelung

Um die Ergebnisse aus der Agarose-Gelelektrophorese zu bestätigen, wurden die einzelnen Fraktionen der Polyplex-Lösungen photometrisch bei 260 nm vermessen (Abb. 62). Die DNA Konzentration der Polyplexlösung, die in Wasser generiert wurden, veränderte sich nicht durch die Vernebelung. Die DNA Konzentration der Polyplexlösung, die in 5% Glucose generiert wurde, verringerte sich geringfügig mit der Vernebelung. Im Gegensatz dazu, nahm die DNA Konzentration der Polyplexlösung, die in HBS generiert wurden merklich mit 50% für die vernebelte Fraktion und 68% für die Reservoirfraktion ab. Die Konzentration der nackten Plasmid DNA war durch die Vernebelung nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigten die Resultate aus der Agarose Gelelektrophorese, die das Verschwinden der DNA aus den vernebelten Fraktionen der in HBS generierten Polyplexe zeigte.

	DNA Konzentration $\mu\text{g/ml}$		
	nicht vernebelt	vernebelt	Reservoir
HBS	20.2 \pm 0.1	10.5 \pm 0.1	6.5 \pm 0.13
Dest. Wasser	18.2 \pm 0.1	19.9 \pm 0.1	20.9 \pm 0.12
5% Glucose	20.9 \pm 0.17	18.6 \pm 0.1	15.1 \pm 0.1
nackte DNA	21.1 \pm 0.4	21.7 \pm 0.13	23.1 \pm 0.1

Abb. 62 DNA Konzentration von Polyplex-Lösung vor und nach Vernebelung

Die in dest. Wasser, 5% Glucose und HBS generierten PEI Polyplexe wurden vernebelt und die DNA Konzentration der einzelnen Fraktionen photometrisch bestimmt.

5.3 Einfluss der Vernebelung auf die Größe der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens

In Abbildung 63 ist der Einfluss des Vernebelungsprozess und der verschiedenen Solventien auf den Durchmesser der Polyplexe gezeigt. Wurden die Polyplexe in Wasser oder 5% Glucose generiert, so war deren Größe weniger als die Hälfte (58 ± 2 nm and 54 ± 3 nm) verglichen mit Polyplexen in HBS (138 ± 3 nm). In jeder der untersuchten Fraktionen nahm die Partikelgröße durch die Vernebelung zu. Das Wachstum der Partikel war moderat für die Komplexe, die in Wasser (107 ± 5 nm) oder 5% Glucose (76 ± 2 nm) generiert wurden, aber stark für Komplexe, die in HBS (371 ± 46 nm) generiert wurden. Wenn die Polyplexe in Wasser oder 5% Glucose generiert wurden, waren die größten Komplexe in der Reservoirfraktion zu finden (135 ± 8 nm and 112 ± 10 nm), während die Komplexe der Reservoirfraktion von den in HBS formulierten Polyplexen ähnlicher Größe waren, wie die der vernebelten Fraktion.

Die Partikelgrößen der selben Komplexe 1 h später wurde ebenfalls untersucht. Die Partikelgröße von den Polyplexen der in Wasser und 5% Glucose generierten Polyplexe blieb unverändert (nicht vernebelt 61 ± 2 , 52 ± 1 ; vernebelt 99 ± 1 nm, 73 ± 2 nm; Reservoir 124 ± 2 nm, 97 ± 2 nm). Die Partikelgrößen der Polyplexe der HBS Lösung veränderten sich nach einer Stunde. Insbesondere wuchsen die Komplexe der vernebelten und Reservoirfraktion an (nicht vernebelt 163 ± 10 ; vernebelt 534 ± 14 nm, Reservoir 390 ± 19 nm).

Eine detailliertere Analyse der Partikelgrößen zeigte, dass die Größenverteilung der nicht vernebelten Polyplexe, die in Wasser und 5% Glucose formuliert wurden, multimodaler Natur waren (Abb. 64). Die Hauptpopulation bestand aus Partikeln mit einem Durchmesser von 56 ± 14 nm (80.4%) in Wasser und in 66 ± 18 nm in 5% Glucose (80.5%) und zwei kleineren Populationen von 8 nm (2.7% and 7.9%), sowie Aggregaten von 2000 nm (16.9% and 11.6%). Komplexe, die in HBS hergestellt wurden bestanden aus einer Hauptfraktion von 135 ± 41 nm (92.3%) und einer kleinen Population aus Aggregaten (7.7%). In allen Fällen bewirkte der Vernebelungsprozess eine Verschiebung der Hauptpopulationen zu größeren Partikelgrößen. Die Hauptpopulation der in Wasser formulierten Polyplexe verschob sich nach 182 ± 92 nm (64.3%) und die Anzahl an Aggregaten über 2000 nm stieg auf 10.8% an, während die Anzahl kleiner Polyplexe von 40 ± 13 nm auf 24.8% sank. Das selbe Verhalten wurde für Polyplexe, die in 5% Glucose formuliert wurden beobachtet. Die Hauptpopulation von 60 ± 25 nm verringerte sich auf 36.2% und verschob sich zu größeren Komplexen von 250 ± 85 nm (44.1%) und großen Aggregaten (17.9%). Die Polyplexe, die in HBS formuliert wurden, verschoben sich auf 339 ± 149 nm (85.3%) und die Anzahl an

Aggregaten nahm auf 14.7% zu. Unabhängig von dem Solvens, das für die Komplexbildung verwendet wurde, nahm die Anzahl an großen Aggregaten in der Reservoirfraktion zu. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Partikelgröße unabhängig von dem Solvens, das für die Herstellung der Komplexe verwendet wurde durch den Vernebelungsprozess beeinflusst wurde. Nichts desto trotz, war die Veränderung der Partikelgröße bei den in Wasser hergestellten Komplexen am geringsten.

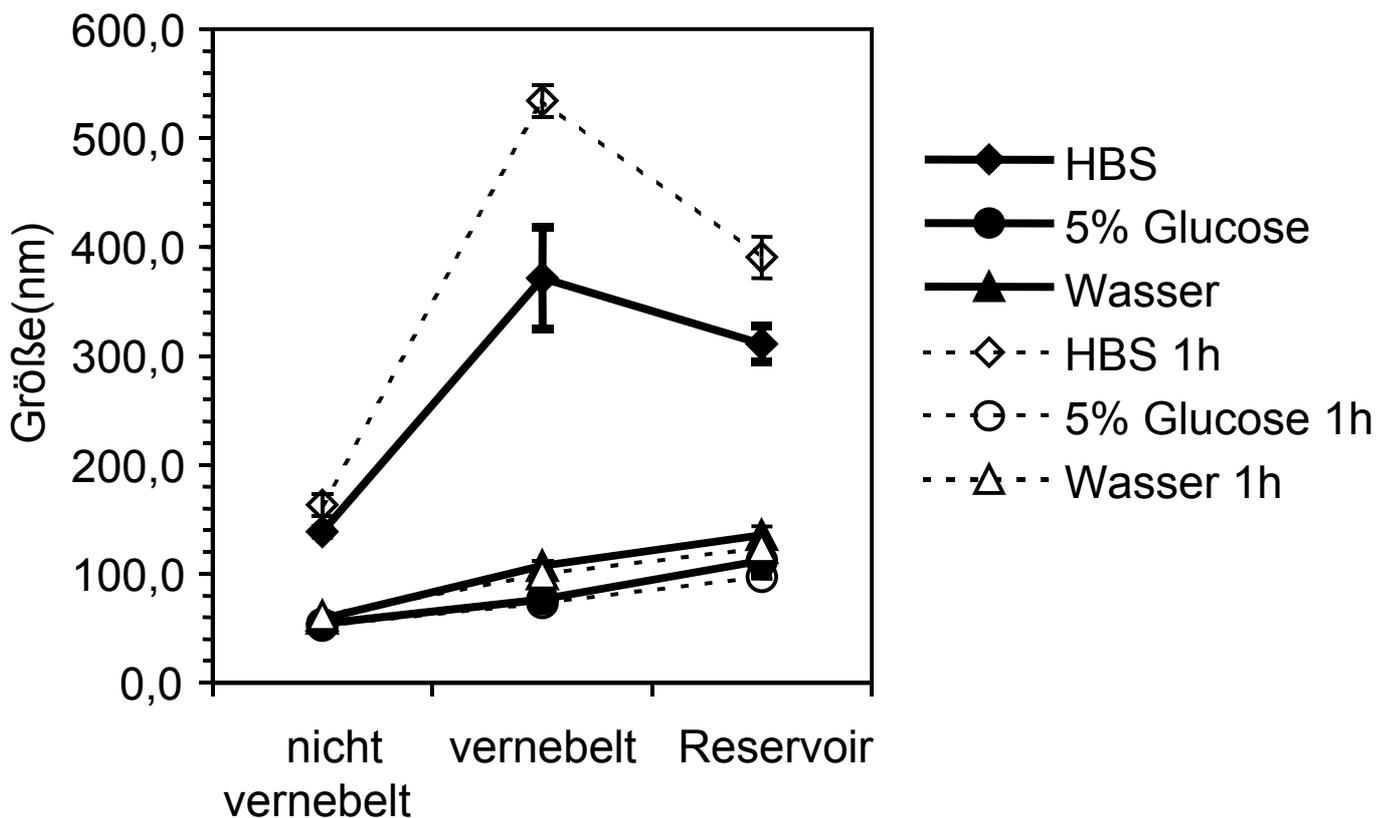


Abb. 63 Größenmessung von PEI/DNA Polyplexen vor und nach Vernebelung in verschiedenen Solventien

Der Vernebelungsprozess beeinflusste die Partikelgröße. Bei jeder der Formulierungen nahm die Partikelgröße mit dem Verneblungsprozess zu. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, $n=10$, \pm S.D. Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen und Solventien waren signifikant, $p<0,01$.

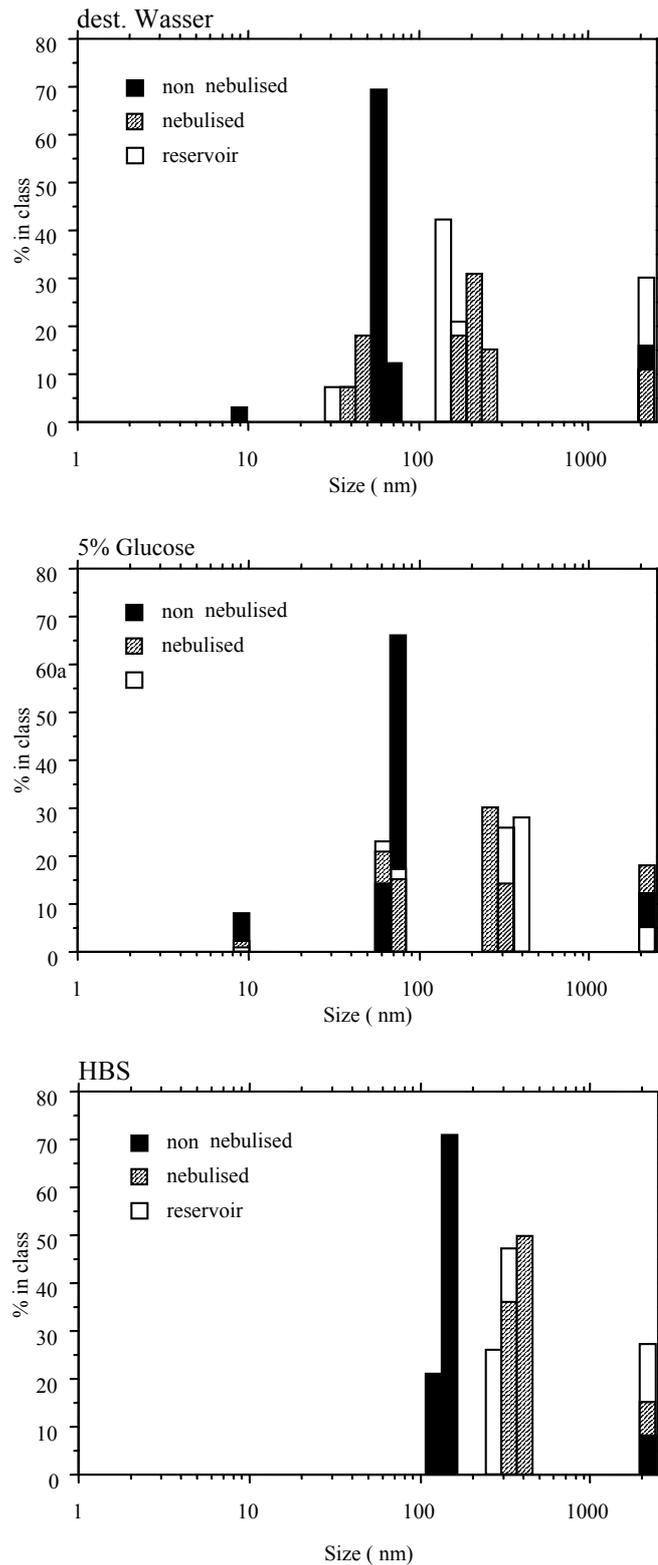


Abb. 64 Detaillierte Analyse der Partikeldurchmesser vor und nach der Vernebelung (PCS)

Der Vernebelungsprozess beeinflusste die Partikelgröße. Bei jeder der Formulierungen nahm die Partikelgröße mit dem Vernebelungsprozess zu. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, n=10. Die Daten wurden im NNLS Modus des Instrumentes analysiert.

5.4 Einfluss der Vernebelung auf das Zetapotenzial der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens

Das Zetapotenzial ist ein Maß für die Oberflächenladung der kationischen Polymer/DNA Partikel. Die Zetapotenziale der Polyplexe der nicht vernebelten, vernebelten und Reservoirfraktion sind in Abb. 65 dargestellt. Während die Zetapotenziale der einzelnen Fraktionen der in Wasser formulierten Komplexe recht konstant blieb (40-45 mV), stiegen die Zetapotenziale der in 5% Glucose generierten Komplexe (48.7±2.3 mV) sowohl für die vernebelte Fraktion (58.8±7.3 mV) als auch für die Reservoirfraktion (60.1±1.8 mV) an. Im Gegensatz dazu, verringerte sich das Zetapotenzial für Polyplexe, die in HBS generiert wurden von 47.0±3.5 mV für die nicht vernebelte Fraktion auf 37.8±2.0 mV für die vernebelte Fraktion und 32±1.8 mV für die Reservoirfraktion.

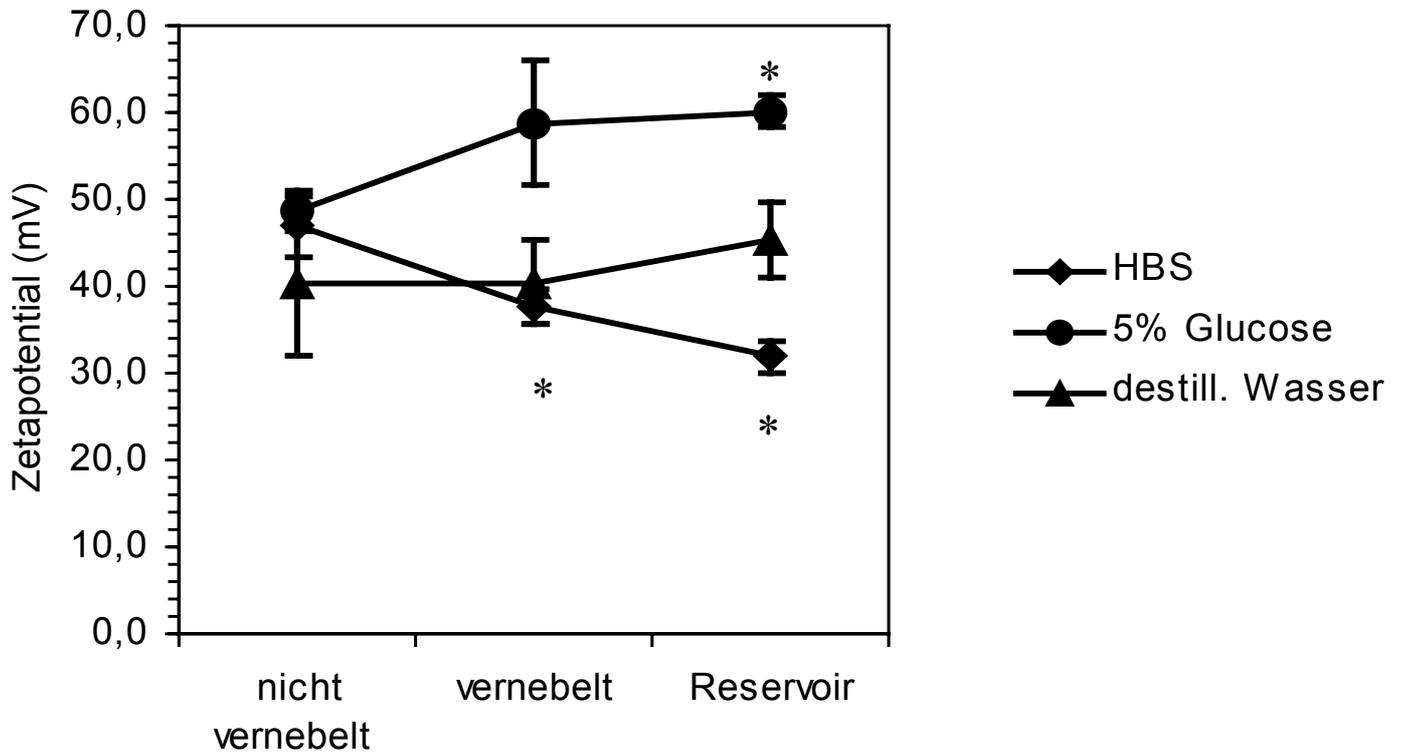


Abb. 65 Zetapotenzial-Messungen von PEI/DNA Polyplexen vor und nach Vernebelung in verschiedenen Solventien

Der Vernebelungsprozess beeinflusst das Zetapotenzial. Das Zetapotenzial der in dest. Wasser generierten Polyplexe blieb recht konstant für die einzelnen Fraktionen. Das Zetapotenzial der in 5% Glucose generierten Polyplexe stieg an. Im Gegensatz dazu fiel das Zetapotenzial der in HBS generierten Polyplexe während des Vernebelungsprozesses ab. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, $n=10$, \pm S.D. Zetapotenziale der vernebelten Fraktionen, die statistisch signifikant unterschiedlich von den nicht vernebelten Fraktionen sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet $p<0,01$ (HBS als Solvens). Als Meßmedium wurde das für die Herstellung verwendete Solvens verwendet.

5.5 Einfluss der Vernebelung auf die Transfektionseffizienz der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens

Jede der gesammelten Fraktionen (nicht vernebelt, vernebelt und Reservoir) der in den jeweiligen Solventien generierten Polyplexe wurde auf COS 7 Zellen gegeben um die funktionelle Integrität der DNA nach der Vernebelung in Form der Gentransfereffizienz zu bewerten (Abb. 66).

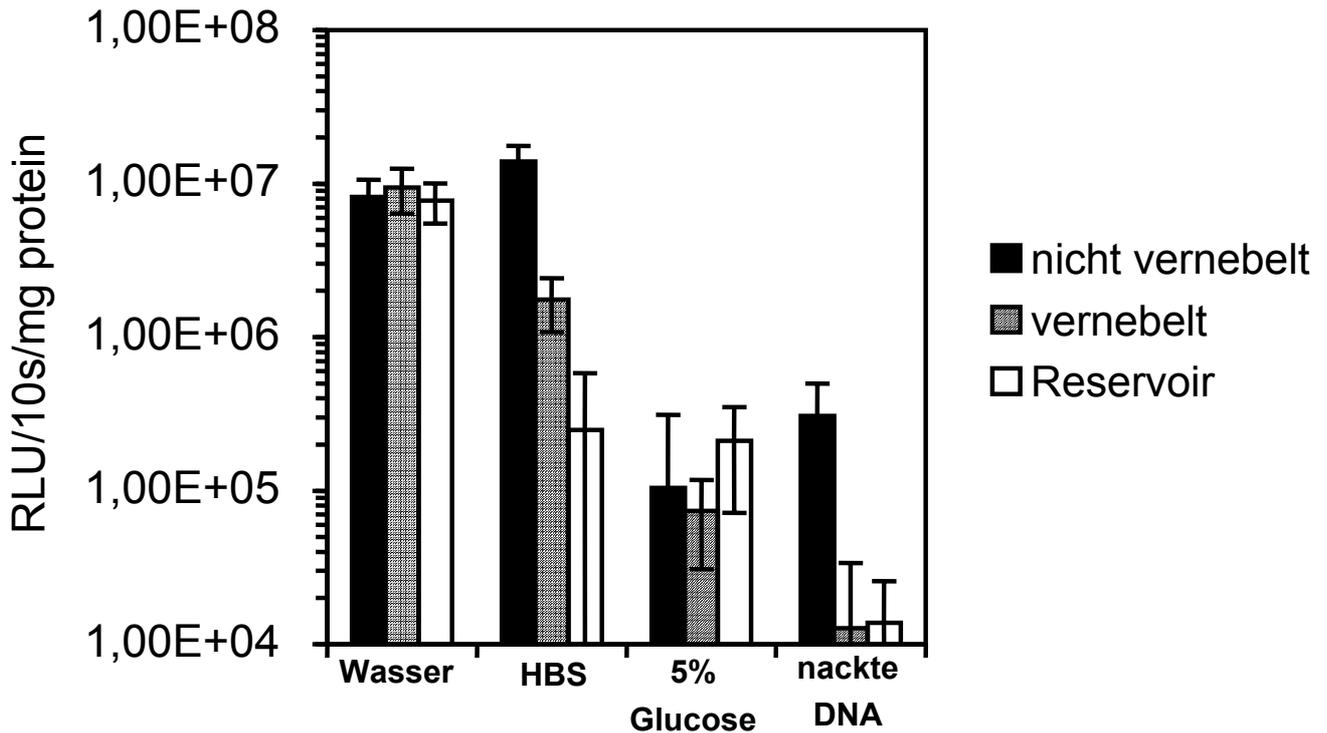


Abb. 66 Transfektionseffizienz von PEI/DNA Polyplexen vor und nach Vernebelung in unterschiedlichen Solventien

PEI/DNA Polyplexe, die in dest. Wasser, 5% Glucose und HBS generiert wurden, wurden vernebelt und anschließend COS 7 Zellen mit den einzelnen Fraktionen transfiziert. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, $n=4$, \pm S.D. Nur im Falle von HBS waren die Unterschiede zwischen vernebelter Fraktion und nicht vernebelter Fraktion signifikant ($p<0,01$).

PEI/DNA Polyplexe, die in Wasser generiert wurden, zeigten das beständigste Transfektionsverhalten nach der Vernebelung. Die Transgenexpression verblieb auf einem konstanten Niveau für jede der Fraktionen. Im Gegensatz dazu, beeinflusste der Vernebelungsprozess die Transfektionseffizienz der Polyplexe, die in HBS generiert wurden, beträchtlich. Die nicht vernebelte Fraktion der Komplexe in HBS zeigte die beste Transfektionseffizienz, die aber nach der Vernebelung dramatisch sank. Die Gentransfereffizienz für Polyplexe, die in 5% Glucose hergestellt wurden vermittelten

nur geringe Transfektion (zwei Größenordnungen niedriger als Komplexe in HBS) unabhängig von der Vernebelung. Die Gentransfereffizienz stieg leicht von der nicht vernebelten zu der Reservoirfraktion an. Die Gentransfereffizienz, die von nackter Plasmid DNA vermittelt wurde, war sehr niedrig und sank mit zunehmender Vernebelung.

5.6 Zusammenfassende Betrachtung der Vernebelung von PEI Polyplexen

In den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vernebelte PEI/DNA Polyplexe unabhängig von dem Solvens, das für deren Formulierung verwendet wurde, intakt blieben und nicht durch den Vernebelungsprozess zerstört wurden. Nicht nur die Komplexe als solches überstanden die bei dem Vernebelungsprozess auftretenden Scherkräfte, sondern was viel wichtiger war, auch die als Komplex vernebelte DNA. Wenn die DNA mit PEI komplexiert wurde, konnte keine Zerstörung der DNA nach der Vernebelung beobachtet werden. Dieses war nicht der Fall, wenn die DNA unkomplexiert vernebelt wurde. In diesem Fall wurde die DNA stark durch den Vernebelungsprozess zerstört.

Die Gentransfereffizienz der in HBS generierten Polyplexe nahm nach der Vernebelung drastisch ab. Ein möglicher Grund hierfür könnte die verringerte Dosis, die auf die Zellen zur Transfektion gegeben wurde, sein. So nahm die Konzentration der Polyplexe in der vernebelten Fraktion um 50% und in der Reservoir Fraktion um 68% ab. Eine solche Reduktion der Konzentration der Polyplexe konnte für die in 5% Glucose bzw. dest. Wasser formulierten Polyplexe nicht beobachtet werden. Die Analyse der Größe und der Oberflächenladung der Polyplexe konnte den Unterschied der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit des Solvens bzw. der Fraktionen nicht erklären. Zwar wurde ein deutlicher Einfluss der Vernebelung auf die Partikelgröße und das Zetapotential der Komplexe beobachtet, jedoch korrelierten diese Veränderungen nicht mit der Gentransfereffizienz. *In vitro* lässt sich prinzipiell folgender Trend bezüglich der Transfektionseffizienz feststellen: Erhöhung der Oberflächenladung der Genvektoren, z.B. durch Erhöhung des N/P-Verhältnis und Vergrößerung der Genvektorkomplexe durch das Wechseln von einem nicht ionischen auf ein ionisches Solvens, erhöhte die Gentransfereffizienz (Erbacher *et al.*, 1999a; Ogris *et al.*, 1998). Dieses würde bedeuten, dass die vernebelten Fraktionen jeweils höhere Gentransfereffizienz zeigen müssten, als die nicht vernebelten Fraktion, da unabhängig von dem verwendeten Solvens die Größe der Polyplexe nach der Vernebelung zunahm. Dieses wurde allerdings nicht beobachtet. Die Gentransfereffizienz der in dest. Wasser generierten Polyplexe blieb nach der Vernebelung konstant, obwohl die Größe der Komplexe zunahm. Das selbe konnte für

Polyplexe, die in 5% Glucose generiert wurden beobachtet werden. Die Polyplexe, die in HBS generiert wurden zeigten sogar einen gegenteiligen Effekt. Die Gentransfereffizienz nahm nach der Vernebelung drastisch ab, wobei dieses wohl hauptsächlich auf die Reduktion der applizierten DNA Dosis zurück zu führen war. Allerdings konnte in diesem Fall auch eine Reduktion des Zetapotentials beobachtet werden, welches zu einer verminderten Interaktion mit der Zelloberfläche führen konnte und folglich die Reduktion der Gentransfereffizienz bewirkte.

Die Betrachtung des Zetapotenzials hätte zur Folge haben müssen, dass die Gentransfereffizienz der in 5% Glucose formulierten Polyplexe nach der Vernebelung anstieg. In der Tat konnte dieses zumindest für die Reservoir Fraktion beobachtet werden. Für Komplexe, die in dest. Wasser generiert wurden, korrelierte die Gentransfereffizienz recht gut mit dem Zetapotenzial. Das Zetapotenzial genauso wie die Transfektionseffizienz blieben nach der Vernebelung fast unverändert. Interessant erschien jedoch, dass die großen Unterschiede in der Transfektionseffizienz (bis zu zwei Größenordnungen) zwischen Polyplexen, die in dest. Wasser bzw. 5% Glucose generiert wurden, in keinem Zusammenhang mit den physikalischen Parametern, Größe und Zetapotenzial, standen. Der einzige Unterschied, der diesbezüglich auffiel, war das unterschiedliche Verhalten der Polyplexe in der alkalischen Gelelektrophorese. Die DNA konnte bei den in 5% Glucose generierten Polyplexen nur unter Zusatz von Chondroitinsulfat C partiell von dem PEI abgetrennt werden. Chondroitinsulfat C ist ein anionisches Biopolymer, das kompetitiv die DNA aus der Bindung mit PEI verdrängte (dieses erklärt den Schmier in dem Gel). Diese Beobachtung könnte daraufhin deuten, dass die Bindung zwischen DNA und PEI für Polyplexe, die in 5%Glucose generiert, wurden stärker war als im Falle von dest. Wasser oder HBS. Folglich könnten die Unterschiede in der Transfektionseffizienz eher auf unterschiedlich starke Bindung der Polyelektrolyte und weniger auf partikuläre Eigenschaften wie die Größe oder Oberflächenladung zurück zu führen sein. Insbesondere könnte das „Auspacken“, d.h. die Trennung der DNA von dem PEI, die für die Transkription erforderlich ist, im Zytoplasma bzw. Zellkern der limitierende Schritt für in 5% Glucose generierte Polyplexe sein (Schaffer et al).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PEI in der Lage war, physikalische Stabilität und biologische Aktivität von DNA, die mittels eines kommerziell erhältlichen Standardverneblers vernebelt wurde, zu gewähren. Obwohl große Unterschiede bezüglich der Transfektionseffizienz je nach dem verwendeten Solvens gefunden wurden, konnten diese Unterschiede nicht klar mit Partikelparametern korreliert werden. Es wurden zwar die Partikelparameter durch den Vernebelungsprozess beeinflusst, jedoch erschienen andere Faktoren, wie z.B. die Adhäsion an der Wand des Vernebler Reservoirs oder Komplexstabilität die Transfektionseffizienz eher zu beeinflussen. Trotzdem blieben die Komplexparameter

während der Vernebelung für Polyplexe, die in dest. Wasser generiert wurden nahezu konstant, und auch die Gentransfereffizienz veränderte sich nur geringfügig. Es erscheint daher, dass dest. Wasser als Solvens für die Formulierung von PEI Polyplexen für die Vernebelung am besten geeignet ist.