

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Hochdruckhomogenisation

Die Herstellung von SLN durch Hochdruckhomogenisation wurde bereits ausführlich beschrieben [Siekmann und Westensen 1992, Schwarz 1995a, zur Mühlen 1996a]. Eine gute Übersicht bietet der Artikel von Mehnert und Mäder [Mehnert und Mäder 2001]. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der Heiß- und der Kalthomogenisation. Die Heißhomogenisation wird bei Temperaturen von etwa 15-20°C oberhalb des Schmelzpunktes des Fettes durchgeführt. Das geschmolzene Fett wird mit der heißen Tensidlösung vereinigt und mit Hilfe eines Ultraturax in eine Präemulsion überführt. Diese wird dann heiß homogenisiert. Bei der Kalthomogenisation wird das Fett nur zur Inkorporation des Arzneistoffes geschmolzen. Das wieder abgekühlte, arzneistoffhaltige Fett wird kalt zu Mikropartikeln vermahlen und anschließend in der Kälte homogenisiert. Dieses Verfahren schützt temperaturempfindliche Arzneistoffe.

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der SLN das Verfahren der Heißhomogenisation angewandt. Hierbei wurden verschiedene Homogenisatoren eingesetzt.

2.1.1.1 LAB 60

Am kontinuierlich arbeitenden, modifizierten LAB 60 (APV Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland) wurden SLN in 1,5 Liter-Chargen produziert [Müller et al. 2000b, Dingler und Gohla 2002]. Alle produktberührenden Teile waren komplett beheizbar. Die Heiztemperatur betrug 85°C und lag somit oberhalb der Schmelzpunkte der verwendeten Fette. Der Druck betrug 500 bar. Am zweiten Homogenisationsventil herrschte ein Druck von 50 bar. Im Produktbehälter wurde nach der Vereinigung des geschmolzenen Fettes und der heißen Tensidlösung mittels eines integrierten Rührwerkes zunächst eine Präemulsion hergestellt. Diese Präemulsion wurde anschließend unter den oben aufgeführten Bedingungen 30 min lang im Umlauf homogenisiert.

2.1.1.2 Micron LAB 40

Am Micron LAB 40 (APV Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland) wurden 40 ml-Chargen produziert. Die Präemulsion wurde mit Hilfe eines Ultraturrax T25 (Jahnke und Kunkel, Staufen, Deutschland) hergestellt (eine Minute mit 8000 U/min) und anschließend bei 85 C und variierenden Druck und Zyklenzahlen homogenisiert. Die genauen Parameter werden im Verlauf des Textes mit den entsprechenden Formulierungen genannt.

2.1.1.3 EmulsiFlex[®]-B3

Wesentlich kleinere SLN-Chargen mit einem Volumen von 3,5 ml wurden mit Hilfe des EmulsiFlex[®]-B3 (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) produziert. Es handelt sich hierbei um einen druckluftbetriebenen Homogenisator, der mit einer Heizschlinge beheizt wird. Nach Vereinigung des geschmolzenen Fettes mit der heißen Tensidlösung wurde mit Hilfe eines Ultraturrax T25 (Jahnke und Kunkel, Staufen, Deutschland) eine Präemulsion hergestellt (eine Minute bei 8000 U/min) und bei 480 bar in vier Zyklen homogenisiert.

2.1.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich [Müller B.W. und Müller R.H. 1983]. Dabei wird die Streuung von Laserlicht an dispergierten Partikeln genutzt, die aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der Dispersionsmittelmoleküle im Dispersionsmedium diffundieren. Infolge der Teilchenbewegung ergeben sich zeitabhängige Intensitätsschwankungen der gemessenen Streulichtintensität. Je kleiner das Partikel, desto größer ist die Diffusionsgeschwindigkeit. Die gemessenen zeitabhängigen Intensitätsschwankungen sind daher bei kleineren Teilchen stärker ausgeprägt als bei größeren. Der Meßbereich liegt bei ca. 5 nm bis 5 µm.

Bei der PCS-Messung wird neben dem mittleren Teilchendurchmesser auch die Breite der Verteilung (Polydispersitätsindex, PI) bestimmt. Der PI schwankt in der Regel zwischen 0,000 und 0,500. Je kleiner der PI desto monodisperser ist die Partikelgrößenverteilung. Bei Werten von $> 0,500$ spricht man von einer breiten Verteilung unbestimmter Form. Das Ergebnis gilt dann als nicht mehr auswertbar [Schuhmann 1995].

Die Messungen wurden an einem Zetaziser 4 (Malvern Instruments, Malvern, UK) durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einem Laser der Wellenlänge 632,8 nm und mißt standardmäßig unter einem Winkel von 90°. Um Mehrfachstreuungen zu reduzieren, wurden die Proben in destilliertem Wasser bis zum Sichtbarwerden einer schwachen Opaleszens verdünnt. Für jede Probe wurde eine Dreifachmessung durchgeführt. Eine dieser drei Messungen dauerte 200 Sekunden und setzte sich aus 10 Einzelbestimmungen zusammen.

2.1.3 Laserdiffraktometrie (LD)

Das Prinzip der Laserdiffraktometrie beruht auf der Lichtbeugung von dispergierten Teilchen. Mittels eines optischen Systems wird ein Laserstrahl aufgeweitet, an dem die Partikel das Licht beugen. Somit werden radialsymmetrische Beugungsspektren erzeugt (Fraunhofer-Beugung) [Müller und Schuhmann 1996c], die durch eine Fourier-Linse unabhängig von der Position der Teilchen immer zentriert auf die gleiche Position eines Multielement-Detektors abgebildet werden. Vereinfacht formuliert führen kleine Partikel aufgrund ihrer stark gekrümmten Oberfläche zu großen Beugungswinkeln, und somit zu einer starken Intensität des gebeugten Laserlichtes auf den äußeren Ringsegmenten des Detektors. Große Partikel verhalten sich genau umgekehrt, d. h. die Intensität ist auf den inneren Ringsegmenten relativ am größten. Aus den Beugungsspektren wird mit Hilfe von Rechenmodellen die Partikelgrößenverteilung berechnet.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Coulter LS 230 (Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland) verwendet. Dieses Gerät besitzt den Vorteil, den gewöhnlichen Meßbereich von 100 nm bis 2000 µm durch Nutzung der „Polarization Intensity Differential Scattering“ (PIDS) Technologie im unteren Detektionsbereich auf 40 nm herabzusetzen. Zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung der SLN-Dispersionen wurde die Mie-Theorie angewandt, da sie auch für Partikel im Submikronbereich anwendbar ist. Hierfür muß der Brechungsindex des Dispersionsmediums und der Partikel und das Adsorptionsvermögen der Partikel berücksichtigt werden.

Die Messungen erfolgten im wäßrigen Dispersionsmedium (Brechungsindex 1,33). Der Brechungsindex der Partikel wurde mit 1,45635 (= Realanteil) und die Lichtabsorption mit 0,01 (= Imaginäranteil) angesetzt. Es ergibt sich eine Volumenverteilung der Teilchenpopulation. Die Volumenverteilung der Messungen wird als Durchmesser angegeben. So be-

deutet z. B. ein LD (50 %) Durchmesser von 200 nm, daß 50 % des gesamten Partikelvolumens auf Teilchen entfällt, die einen Durchmesser von $<$ oder $=$ 200 nm haben. Da es sich hierbei um eine Volumenverteilung handelt, kann es zu einer Überbewertung einzelner großer Partikel kommen, weil nicht deren Anzahl, sondern deren Volumen bewertet wird. Deshalb ist die LD eine sehr empfindliche Methode, um Mikropartikel in einer Probe zu detektieren.

2.1.4 Zetapotential (Laser Doppler Anemometrie)

Geladene Teilchen wandern in einem von außen angelegten elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Mit Hilfe der Laser Doppler Anemometrie (LDA) wird über die elektrophoretische Beweglichkeit der Partikel im elektrischen Feld das Zetapotential ermittelt. Dazu wird der Meßraum mit einem durchlaufenden Interferenzmuster durchstrahlt, das durch den Schnittpunkt zweier gekreuzter Laserstrahlen gleicher Intensität entsteht. Die beiden Strahlen weisen eine unterschiedliche Frequenz auf, wodurch sich das Interferenzmuster selber in eine Richtung bewegt. Die Partikel bewegen sich im elektrischen Feld mit oder gegen das Interferenzmuster und streuen dabei das auftreffende Laserlicht. Die Mobilität der Partikel wird über den aus der Akustik bekannten "Doppler Effekt" bestimmt. Durch das sich bewegende Teilchen tritt eine Frequenzverschiebung des von ihm gestreuten Laserlichts auf, die von dessen Geschwindigkeit abhängt. Somit kann aus der Frequenz des gestreuten Lichtes auf die Wanderungsgeschwindigkeit geschlossen werden [Müller 1996d]. Die elektrophoretische Mobilität wird nach der Berechnung von Helmholtz-Smoluchowski ins Zetapotential konvertiert. Aus der Wanderungsrichtung der Teilchen im elektrischen Feld wird das Vorzeichen des Zetapotentials bestimmt.

Für die Messungen wurde ein Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Malvern, UK) verwendet. Die Messungen wurden bei einer Feldstärke von 20 V/cm durchgeführt. Zur Ermittlung der Oberflächenladung bzw. von Unterschieden in der Oberflächenladung der SLN wurden die Proben in bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) vermessen, das mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine konstante Leitfähigkeit von 50 μ S/cm eingestellt wurde (sogenanntes Leitfähigkeitswasser nach Müller [Müller 1996d]). Der pH-Wert betrug 7,4 und wurde mit Natriumhydroxid eingestellt.

2.1.5 Dynamische-Differenz-Kalorimetrie

Mit Hilfe der Dynamischen-Differenz-Kalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry, DSC) können Prozesse untersucht werden, die mit einer Wärmeabgabe oder Wärmeaufnahme einhergehen. Man erhält z. B. Aufschluß über die Lage des Schmelz- oder Erstarrungspunktes einer Lipidmatrix. Über den Betrag der Enthalpie eines solchen Vorganges kann man auf das Ausmaß der Kristallinität und die Kristallstruktur sowie auf polymorphe Umwandlungen rückschließen. Die DSC-Analytik von SLN Dispersionen wurde schon intensiv in den Arbeitskreisen Westensen [Siekmann und Westensen 1994] und Müller [zur Mühlen 1996a, Freitas und Müller 1999, Jenning 1999] untersucht.

Bei der DSC wird die Probe und eine Referenz in einem Ofen kontrolliert aufgeheizt und abgekühlt. Tritt während des Aufheizens oder des Abkühlens in der Probe eine wärmefreisetzende oder –verbrauchende Reaktion ein, so gleicht das Gerät den Temperaturunterschied zwischen Probe und Referenz aus. Exotherme Vorgänge sind z. B. Kristallisationen oder polymorphe Umwandlungen. Zu endothermen Reaktionen gehören Schmelzvorgänge, polymorphe Umwandlungen, Dehydratisierungen oder Zersetzungen. Die Wärmestromdifferenz zwischen Probe und Referenz, die auf die Probenmasse bezogen wird, dient der Quantifizierung von exo- oder endothermen Vorgängen. Die Enthalpie wird durch Integration der Peakfläche ermittelt. Man erhält eine Art Summenkurve aus wärmeauf- und abgebenden Prozessen [Müller B.W. 1986].

Bei SLN kann es im Vergleich zum Bulkmaterial aufgrund der hohen Dispersität, der geringen Partikelgröße, der großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen und dem Einfluß von Stabilisatoren zu einer Schmelzpunktdepression von bis zu 10 K kommen [Hunter 1986]. Ebenfalls kann eine verringerte Kristallisationstemperatur auftreten [Siekmann und Westensen 1994]. Bei Lipiden mit Schmelzpunkten, die nicht weit über Raumtemperatur liegen, kann dies zu unterkühlten Schmelzen führen [Bunjés et al. 1998]. Zur Quantifizierung der Kristallinität wird der Kristallinitäts-Index (CI) [Siekmann 1994] herangezogen:

$$CI[\%] = \frac{\text{Enthalpie}_{\text{SLN Dispersion}} [\text{J} * \text{g}^{-1}]}{\text{Enthalpie}_{\text{Bulkmaterial}} [\text{J} * \text{g}^{-1}] * \text{Konzentration}_{\text{Lipidphase}} [\%]} * 100$$

Allerdings können die gefundenen CI-Werte nur als Anhaltspunkte für das Ausmaß der Rekristallisation der SLN-Formulierungen gelten und nicht als Absolutwerte betrachtet

werden. Grund hierfür ist, daß es unter dem Einfluß von Art und Menge des eingesetzten Emulgators und der Lagerungsbedingungen zur Ausbildung von Lipidmodifikationen in den SLN kommen kann, die sich von denen des Bulkmaterials unterscheiden [Siekmann und Westensen 1994, Schwarz 1995a, zur Mühlen 1996a]. Bei der Bestimmung des CI wird leider vernachlässigt, daß sich die Schmelzenthalpien verschiedener Lipidmodifikationen unterscheiden.

Die Messungen wurden an einer Mettler Toledo DSC 821e (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden in 40 µl Aluminiumniederdrucktiegeln eingeschweißt, um einen „Wasserbauch“ durch verdunstendes Wasser zu vermeiden. Es wurden immer 35 µl der 4 %-igen SLN-Dispersionen vermessen, was einer Lipidmasse von 1,4 mg entsprach. Der Ofen wurde von Stickstoffgas mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 ml/min umspült. Die Aufheizrate betrug 5 K/min. Die Proben wurden von 25 auf 85°C erwärmt. Die Analytikparameter wie Onset-Temperatur, Peakmaximum und -minimum und Enthalpie wurden mit Hilfe der Star Software (Mettler, Gießen, Deutschland) ermittelt.

2.1.6 Dampfsterilisation

Die Dampfsterilisation mit gesättigtem gespanntem Wasserdampf bei 121°C über 15 min ist ein Standardsterilisationsverfahren des Arzneibuchs [Ph. Eur. 1997 NT 2001]. Dieses Verfahren wurde auch bei einigen SLN-Formulierungen angewandt. Die Sterilisationen wurden in einem Autoklaven INS-S-A 2000 (Durchreichsterilisator DRS1) (Münchener Medizin Mechanik GmbH, Planegg/München, Deutschland) durchgeführt.

2.1.7 Huhnmodell

Als Modell zum Vergleich der adjuvanten Wirkung und der Gewebeverträglichkeit verschiedener Formulierungen dienten Hennen. Die Hennen wurden mit den zu untersuchenden Formulierungen immunisiert, der Antikörpergehalt der Dotter bestimmt und nach der Schlachtung das Gewebe um die Einstichstelle begutachtet.

Das Verfahren, Antikörper nach Immunisierung von Hennen durch Extraktion der Dotter zu gewinnen, wurde erstmals von Lösch beschrieben [Lösch et al. 1986]. Die Antikörper-

produktion durch Hennen ist eine tierschonende Alternative zur Antikörperproduktion durch Säuger [Schade und Hlinak 1996]. Der Einsatz derart produzierter Antikörper liegt in der immunochemischen Diagnostik.

Der Vorteile dieses Modells ist die nichtinvasive Probennahme, die eine Titerverfolgung zu jedem beliebigen Zeitpunkt zuläßt und die Tiere nicht belastet. Ebenso erzielen Hennen eine größere Ausbeute an Antikörpern in ihren Eidottern als beispielsweise Kaninchen im selben Zeitraum [Schade et al 1994]. Normalerweise werden zur kommerziellen und experimentellen Antikörpergewinnung Säugetiere wie Kaninchen, Ratten, Mäuse, Meer-schweinchen, Pferde oder Schafe verwendet. Besonders bei den Nagetieren ist die Pro-benmenge und die Häufigkeit der Entnahme durch das blutige Verfahren natürlich be-grenzt. Die Verwendung von Hennen ist somit ein Beitrag zum Tierschutz und bietet den Vorteil, zu jedem beliebigen Zeitpunkt Proben gewinnen zu können.

Im Dotter des Huhnes kommt im Gegensatz zum Serum nur eine einzige Immunglobu-linklasse vor. Diese Immunglobulinfraktion wird als IgY bezeichnet. Die Konzentration von IgY im Dotter ist sogar höher als im Serum [Larsson et al. 1993]. Die Höhe des sich nach einer Immunisierung entwickelnden Antikörpertiters hängt sowohl von der Art und Menge des verwendeten Adjuvans und Antigens als auch vom Tier selbst ab [Schade 19924]. Diese Abhängigkeit zeigt sich auch bei Säugern.

Die Legehennen (Lohman selected weiß und Lohman selected braun) wurden im Alter von 22-24 Monaten von einem kommerziellen Züchter (Legehennenvermehrungsbetrieb GmbH, Bestensee, Deutschland) bezogen. Die Haltung erfolgte jeweils zu zweit in einem Käfig (EBECO, Castrop-Rauxel, Germany), der den Tieren eine möglichst artgerechte Haltung bot. Um die Eier der entsprechenden Henne zuordnen zu können, teilten sich je-weils eine weiße und eine braune Henne den Stall. Die Hühner wurden unter klimatisierten Bedingungen und einem Hell-Dunkel-Wechsel im 12 h Rhythmus gehalten. Futter und Wasser stand nach Belieben zur Verfügung. Die Immunisierung der Hennen erfolgte in-tramuskulär in den Musculus pectoralis.

2.1.8 Aufarbeitung der Eidotter

Die Eier wurden aufgeschlagen und das Eiweiß verworfen. Das Eidotter wurde ohne Dot-terhaut in vorgewogene Becher überführt. Nach Hinzufügen der vierfachen Masse gerei-

nigten Wassers (Millipore) wurde die Verdünnung mit dem Ultraturrax verquirlt und eingefroren. Nach 5 bis 7 Tagen bei -20°C wurden die Proben wieder aufgetaut und zentrifugiert (20 min bei 3000 U/min). Der wäßrige Überstand wurde filtriert und nochmals bis zur Vermessung im ELISA-Test tiefgefroren.

2.1.9 Enzymimmunoassay

Unter dem Begriff Enzymimmunoassay (EIA) werden alle Immunoassays zusammengefaßt, bei denen die Konzentration eines Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt wird. Es finden also immer zwei Reaktionstypen statt: eine immunologische, durch Antikörper vermittelte und eine enzymatische. Seit der Einführung dieser Assayform [Engvall and Perlmann 1971, Avrameas und Guilbert 1971] hat sie weltweit Verbreitung gefunden und die Radioimmunoassays zurückgedrängt. Die Bezeichnung Enzymimmunoassay (EIA) wird für Assays zur Bestimmung von Antigenen oder Haptenen verwandt, die Bezeichnung „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für Assays zur Bestimmung von Antikörpern. Unterschieden wird zwischen kompetitiven, nichtkompetitiven, homogenen und heterogenen ELISAs.

Der zur Bestimmung der Antikörpertiter in unseren Versuchen verwendete ELISA-Test ist ein heterogener, nichtkompetitiver Sandwich- oder auch indirekter ELISA [Engvall und Perlmann 1972] (Abbildung 2.1). Das im Überschuß vorliegende Antigen adsorbierte durch Inkubation passiv an die Mikrotiterplatte. Nichtgebundenes Antigen wurde durch Waschen entfernt. Anschließend wurde der zu bestimmende Antikörper zugegeben. Dieser lagerte sich spezifisch an das festphasengebundene Antigen an. Durch anschließendes Waschen wurden in der Probe eventuell vorhandene nichtspezifische, ungebundene Antikörper entfernt. Danach wurde der enzymmarkierte Anti-Huhn-Antikörper hinzugefügt. Dies geschah im Überschuß, so daß ungebundener sekundärer Antikörper durch Waschen entfernt wurde. Letztlich wurde die Enzymaktivität durch Zugabe eines Chromogensubstrates ermittelt. Dieses wurde zu einem farbigen Produkt umgesetzt, welches kolorimetrisch bestimmt wurde.

Für alle Assays wurden 96 well Mikrotiterplatten (Greiner F, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verwendet.

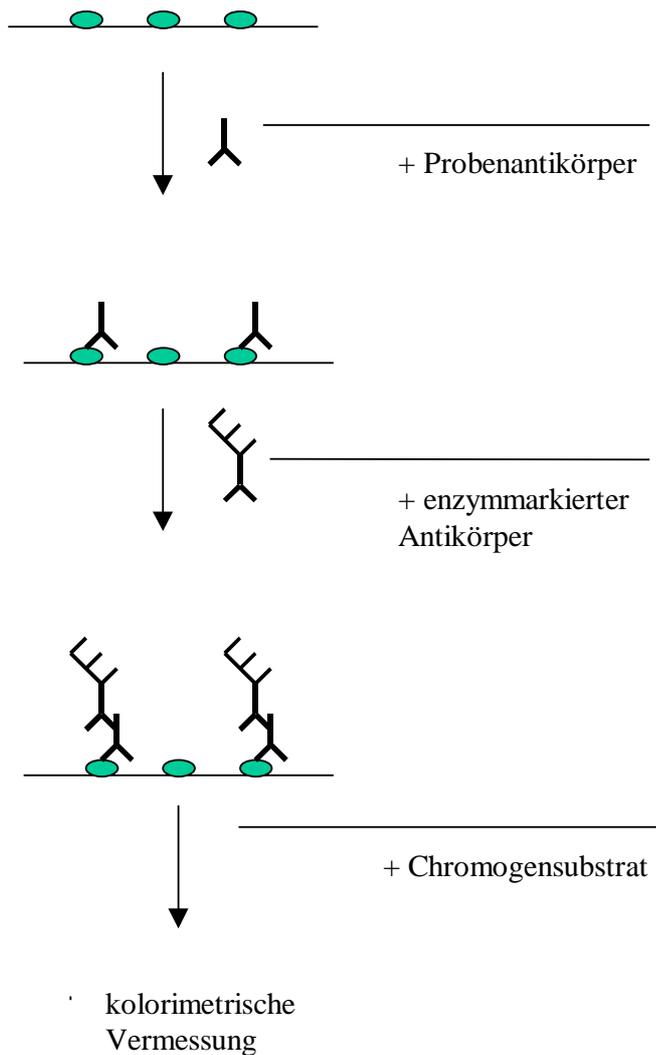


Abbildung 2.1: Verfahren des ELISA-Tests

2.1.10 Kolorimetrie/UV-Vis-Spektroskopie

Das Chromogensubstrat wird durch das Enzym, mit dem der sekundäre Antikörper gekoppelt ist, zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion gestoppt und die Extinktion in den einzelnen Wells mit Hilfe eines Mikrotiterplattenreaders bestimmt (EAR 4000, SLT-Laborinstrumente, Overath, Deutschland). In höheren Konzentrationsbereichen treten Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz auf. Deshalb muß durch die Erstellung von Kalibriergeraden nachgewiesen werden, daß innerhalb des Meßbereichs das Lambert-Beersche Gesetz gilt. Die Proben müssen also so lange verdünnt werden, bis eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration herrscht. In diesem Bereich muß gearbeitet werden und der ELISA muß hinsichtlich dieser Anforderung entwickelt werden.

2.1.11 Gewebeschnitte

Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere euthanasiert. Nach der Häutung wurde das an die Injektionsstelle angrenzende Gewebe makroskopisch nach Gewebsveränderungen oder Nekrosen inspiziert. Zur mikroskopischen Beurteilung des Pektoralmuskels wurde dieser entlang der Injektionsstelle in ca. 5 mm dicke Streifen geschnitten, mit 10 % neutral-gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffinwachs eingebettet. Davon wurden 4 µm dicke Schnitte gefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

2.1.12 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese dient dazu, die Veränderung der Beweglichkeit der Plasmid-DNA im elektrischen Feld zu quantifizieren. Die DNA wird in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner die DNA-Fragmente, desto schneller bewegen sich die Moleküle bei einer gegebenen Feldstärke auf die Anode zu. Die Lage der DNA wird durch Ethidiumbromid visualisiert. Der Farbstoff interkaliert in die DNA-Doppelhelix. Bindet die DNA nun an die positive Partikeloberfläche der SLN, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund des höheren Gewichtes und der teilweisen oder vollständigen Ladungsneutralisation unterbunden. Es erscheint eine Ethidiumbromidfluoreszenz in der Nähe des Startpunktes. Mit zunehmenden Anteilen an SLN ist die DNA so fest an die Partikeloberfläche gebunden, daß sich Ethidiumbromid nicht mehr einlagern kann. Die Ethidiumbromidfluoreszenz verschwindet ganz [Birchall et al. 1999].

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde in einer Agargel Maxi Kammer (Biometra, blomed Analytik GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die SLN wurden hierfür in Aqua bidest. und das Plasmid in 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,4) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verdünnt (Plasmidkonzentration 20 µg/ml). Jeweils 15 µl der SLN- und DNA-Verdünnungen wurden auf einer Mikrotiterplatte gemischt und zur Komplexbildung 15 min lang inkubiert. Zu den 30 µl dieser Mischungen wurden 6 µl Ladepuffer gegeben (peqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Damit die Proben eine höhere Dichte als der Laufpuffer haben und in die Geltaschen sinken, enthielt der Ladepuffer 30 % Glycerol. 0,25 % Bromphenolblau zur Visualisierung waren ebenfalls enthalten. Pro Geltasche wurden 12 µl aufgetragen. Das Gel bestand aus 1 % (w/v) Agarose (peqGOLD Universalagarose, peq LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) in TAE-Puffer

(40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, 100 ng/ml Ehtidiumbromid, pH 7,4 beides von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland). Die Elektrophorese wurde im selben TAE-Puffer mit 100 ng/ml Ethidiumbromid bei einer Feldstärke von 5 V/cm über 90 min durchgeführt.

Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines Transluminators (GelDoc 2000 System, Bio-Rad, München, Deutschland). In DNA interkaliertes Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht mit 302 nm Wellenlänge. Auf diese Weise wurde die DNA im Gel sichtbar gemacht. Aufgenommene Bilder wurden mit Hilfe der Molecular Analyst Software Version 1.1 (Bio-Rad) quantitativ ausgewertet. Die DNA-Banden wurden integriert und gegen den lokalen Hintergrund korrigiert. Die erhaltenen Werte wurden relativ gegen einen Standard aus unkomplexierter DNA, der auf jedem Gel mitlief, dargestellt.

2.1.13 Zellkultur

Cos-1 Zellen sind eine fibroblastenartige, adhären in Monolayern wachsende, nicht-menschliche Primatenzelllinie. Sie stammt von Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und enthält ins Genom integrierte, replikationsdefekte SV40 Virus-DNA. Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen werden in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium mit hohem Glucoseanteil (4,5 g/l) (DMEM, Promocell, Heidelberg, Deutschland) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Kulturen mittels Trypsin/EDTA passagiert und im Verhältnis von 1:7 gesplittet.

2.1.14 Bestimmung der Zytotoxizität

Am Tage zuvor wurden 10000 Zellen pro Vertiefung (Well) in durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatten (Greiner Cellstar, flacher Boden, Greiner Labortechnik, Solingen, Deutschland) gesät und 24 Stunden ruhen gelassen, damit die Zellen adherieren konnten. Die SLN und die Polyethylenimin-Verdünnungen wurden durch Verdünnung mit Aqua bidest. hergestellt. Kurz vor der Zugabe zu den Zellen wurde mit zweifachkonzentriertem DMEM auf

das doppelte Volumen verdünnt. Jeweils 200 µl dieser Partikelverdünnungen pro Well wurden für 4 Stunden mit den Zellen inkubiert.

2.1.14.1 Laktatdehydrogenaseaktivitätsbestimmung (LDH-Test)

Das Ausmaß der Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in das Kulturmedium ist ein direktes Maß für die Abnahme der Zellmembranintegrität und der Viabilität der Zelle. Nach der vierstündigen Inkubation der Zellen mit den Partikelverdünnungen wurden 25 µl des Mediums aus jedem Well auf eine andere Platte überführt. Anschließend wurden jeweils 100 µl eines Reaktionsreagens (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland), welches Laktat, NAD^+ und ein gelbes Tetrazolium-Salz (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid) enthielt, zugegeben. Die durch die LDH katalysierte Umsetzung des Laktats zum Pyruvat führte über zwei davon abhängige Reaktionen schließlich zur Bildung eines roten Formazans, dessen Absorption bei 492 nm vermessen werden konnte (SLT Spectra, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim). Das Ausmaß der Zytotoxizität wurde durch den Vergleich mit der LDH-Freisetzung durch 100 %-ig letale Zellen quantifiziert. Diese wurden mit Medium unter Zusatz von 2 % TritonX behandelt. Ebenso befand sich auf jeder Platte ein Vergleich mit Zellen, die nur mit Medium behandelt worden sind (0% Toxizität).

2.1.14.2 WST-1 Test

Nach der vierstündigen Inkubation der Zellen mit den Partikeln und der Abnahme von 25 µl des Überstandes für den LDH-Test, wurde das Medium abgesaugt, zwei mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen und jeweils 200 µl DMEM mit 10 % FCS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das WST-1 Reagens (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde mit serumfreien Medium 1:10 verdünnt. Nach Entfernen des alten Mediums wurden 100 µl dieser Reaktionslösung zu den Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert. In den Mitochondrien lebender Zellen wurde das Tetrazolium-Salz WST-1 zu seinem orange gefärbten Formazan reduziert. Dessen Absorption wurde bei 450 nm spektrophotometrisch gemessen. Je mehr lebendige Zellen vorhanden waren, je stärker war die Absorption. Diese wurde mit der Absorption von Zellen verglichen, die nur mit Medium behandelt worden sind und eine 100 %-ige Viabilität zeigten.

2.1.15 Transfektion

2.1.15.1 Cos-1 Zellen

Die Aussaat der Zellen erfolgte analog der Bestimmung der Zytotoxizität. 24 Stunden später wurden die Partikelverdünnungen in Aqua bidest. hergestellt. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Plasmid-Verdünnung (20 µg/ml) in 50 mM Hepes (pH 7,4) zugegeben und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Zugabe zu den Zellen wurden die Komplexe mit zweifachkonzentriertem Medium auf das doppelte Volumen verdünnt. Das „Dulbeccos modifizierte Eagle Medium“ (DMEM) wurde in manchen Fällen pur eingesetzt oder dem Medium wurde je nach Versuchsaufbau 10% fetales Kälberserum (FCS), 200 µM Chloroquinphosphat (CQ) oder beides hinzugefügt. Die schließlich zu den Zellen gegebenen Komplexe zeigten eine DNA Konzentration von 5 µg/ml in einfachkonzentriertem DMEM mit oder ohne 10 % FCS, bzw. 100 µM Chloroquin. Nach Zugabe von 200 µl dieser Komplexverdünnungen pro Well wurde vier Stunden lang im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit, wurde der Überstand entfernt, einmal mit 100 µl PBS gewaschen und neues, 10 % FCS enthaltendes Medium zugegeben. 48 Stunden später wurde der Überstand entfernt und die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 100 µl Lysis-Puffer (Galacto-Star[®] System, Tropix, Bedford, MA, USA) wurden die Platten für 20 Minuten im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden aus jeder Vertiefung jeweils 50 µl auf eine schwarze Platte (Fluotrac 200 Greiner Micro-lon, Flachboden, Greiner Labortechnik, Solingen Deutschland) und 25 µl auf eine durchsichtige Platte (Greiner F) überführt. Letztere diente der Proteinbestimmung.

In den 50 µl des Lysats auf den schwarzen Platten wurde die Enzymaktivität der beta-Galaktosidase mit Hilfe des Galacto-Star[®] Kits bestimmt. Das zur Transfektion eingesetzte Plasmid pCMVbeta enthielt das Gen für dieses Enzym. Das bakterielle beta-Galaktosidase-Gen ist ein oft genutztes Reporter-gen, mit dessen Hilfe das Ausmaß der Transfektion und der Genexpression quantifizierbar gemacht werden kann. Nach Zugabe des Galacto-Star[®] Substrates wurde die Lumineszens des entstehenden Produktes nach 90 Minuten bestimmt (Wallac MicroBeta TriLux 1450-024, liquid scintillation and luminescence counter, Wallac Oy, Turku, Finnland).

2.1.15.2 16HBE14o Zellen

Die Abweichungen vom Transfektionsprotokoll mit Cos-1 Zellen werden im folgenden beschrieben. Humane Bronchialepithelzellen (16HBE14o) wurden in Minimal Essential Medium (MEM) kultiviert und mit einer Dichte von 25000 Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät. Die Transfektionsversuche wurden bei 60-70 %-iger Konfluenz durchgeführt. Nach der Transfektion und dem Mediumwechsel wurde nur für 24 Stunden inkubiert und dann ausgewertet. Zur Herstellung der ternären Transfektionskomplexe wurde die DNA mit TAT₂ im Massenverhältnis von 1:0,65 oder mit poly-L-Arginin (pLA) im Massenverhältnis von 1:0,475 10 Minuten lang bei Raumtemperatur vorinkubiert. Das anschließende Verfahren unterschied sich nicht vom Vorgehen bei den sekundären Komplexen.

2.1.16 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt im Lysat korreliert mit der Anzahl lebendiger Zellen im jeweiligen Well. Er dient einerseits dazu, die bei der Lumineszenzmessung erhaltenen relativen Light-Units (RLU) auf eine Anzahl von Zellen zu beziehen und somit vergleichbar zu machen. Andererseits ist der Proteingehalt auch ein Marker für die Toxizität der Komplexe, denn tote Zellen werden beim mehrmaligen Waschen entfernt.

Die Bestimmung erfolgte durch Zugabe von jeweils 100 µl Bicinchoninsäure-Reagens (BCA) (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Nach 0, 30 und 60 Minuten wurde die Absorption des entstandenen Kupfer-(I)-Komplexes bei 550 nm spektrophotometrisch gemessen (SLT Spectra, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim). Durch mehrere Verdünnungsreihen von bovinem Serumalbumin wurde eine Eichgerade berechnet, mit deren Hilfe der Proteingehalt in jedem einzelnen Well ermittelt wurde.

2.1.17 Eichung des Luminometers

Die Darstellungsweise von Transfektionsergebnissen ist in der Literatur uneinheitlich. In manchen Veröffentlichungen wird die Transfektionseffizienz in relativen Light Units (RLU)/mg Protein angegeben. Die RLU hängen aber vom Fabrikat und den Einstellungen des Luminometers ab. Deshalb geben andere Veröffentlichungen die Transfektionseffizienz als mg Enzym/mg Protein oder Units Enzym (U)/mg Protein an. Allerdings sind auch solche Ergebnisse nicht nur von der Effizienz des Transfektionsvektors abhängig, sondern

z. B. auch der Qualität der verwendeten DNA-Charge. Wirklich vergleichbar sind nur Ergebnisse, die auf der gleichen Platte und mit den gleichen Reagenzien erzielt worden sind. Um die Ergebnisse wahlweise in allen drei Einheiten darstellen zu können, wurde eine Eichung des Luminometers mit einer Verdünnungsreihe des Enzyms beta-Galaktosidase (G5635, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) angefertigt. Die Enzymverdünnungen wurden wie unter 2.1.15 beschrieben mit Reagens versetzt und nach 0, 60 und 90 Minuten vermessen (Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3).

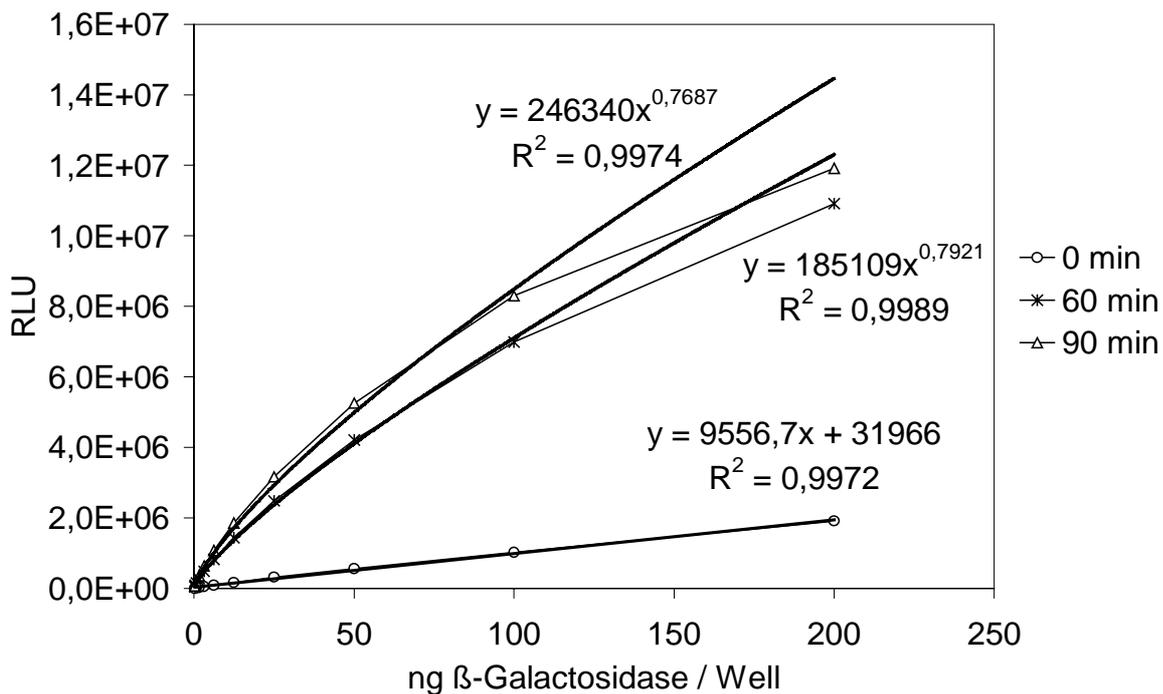


Abbildung 2.2: Eichgeraden des Luminometers mit einer Verdünnungsreihe des Enzyms beta-Galaktosidase nach 0, 30 und 60 Minuten. Die Menge beta-Galaktosidase wird als Enzymmasse pro Mikortiterplattenwell (ng/well) dargestellt. Die Eichgerade nach 0 min läßt sich als lineare Trendlinie und die nach 30 und 60 min als potentielle Trendlinie (allg. Gleichung $y = ax^b$) abbilden.

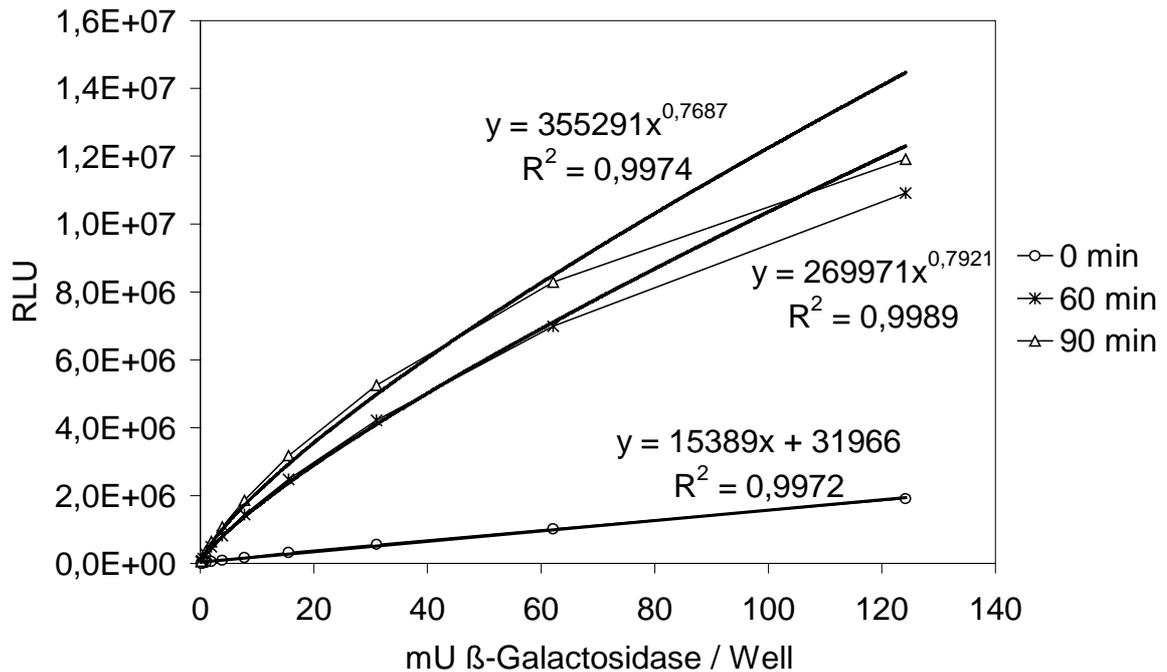


Abbildung 2.3: Eichgerade des Luminometers mit einer Verdünnungsreihe des Enzyms beta-Galaktosidase nach 0, 30 und 60 Minuten. Die Menge beta-Galaktosidase wird als Enzym Units pro Mikrotiterplattenwell (mU/well) dargestellt. Die Eichgerade nach 0 min läßt sich als lineare Trendlinie und die nach 30 und 60 min als potentielle (allg. Gleichung $y = ax^b$) Trendlinie abbilden.

Die RLU nehmen vom Zeitpunkt 0 Minuten zum Zeitpunkt 90 Minuten hin zu. Kurz nach der Zugabe des Enzyms zeigte die Abhängigkeit der RLU von der Menge des Enzyms noch ein lineares Verhältnis. Nach 60 und 90 Minuten, ließ sich diese nur noch durch eine potentielle Funktion beschreiben. Nach den Angaben des Herstellers sollte die Lumineszenz nach 90 Minuten gemessen werden, da sie dann ein plateauförmiges Maximum erreicht hat.

2.1.18 Statistische Analyse

Sofern die zu vergleichenden Datensätze normalverteilt waren und Varianzhomogenität zeigten, wurde für die statistische Auswertung der ungepaarte, zweiseitige t-Test nach Student verwendet. War keine Varianzhomogenität aber trotzdem eine Normalverteilung der Daten gegeben, so wurde mit Hilfe des t-Tests nach Welch ausgewertet. War keine dieser beiden Voraussetzungen erfüllt, so wurde der verteilungsunabhängige und nicht parametrische Mann-Whitney U-Test herangezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle statistischen Auswertungen auf $p=0,05$ festgelegt.

2.2 Materialien

2.2.1 Lipide

2.2.1.1 Compritol ATO 888

Compritol 888 ATO (Gattefossé, Weil am Rhein, Deutschland) ist ein Ester des Glycerols und der Behensäure (C₂₂). Dieser Ester stellt ein Gemisch aus Mono- (12–18 %), Di- (52 %) und Triglyceriden (28–32 %) dar. Neben der Behensäure (> 85 %) ist noch ein Anteil an C₁₆-C₂₀ Fettsäuren vorhanden. Aufgrund des Gehalts an Partialestern zeigt die Substanz schwach amphiphile Eigenschaften (HLB 2). Der Schmelzbereich liegt bei 69 bis 74°C. Compritol entspricht der USP XXII-Monographie „Glyceryl behenate“. Das Lipid genießt ebenfalls den GRAS-Status [Food Additive Database der FDA 1999]. Verwendung findet Compritol als Kompaktiermittel in Pudern, als Konsistenzgeber in Emulsionen und als Verdicker in wasserfreien Produkten [Fiedler 1996].

2.2.1.2 Hartparaffin

Hartparaffin (Schumann Sasol GmbH, Hamburg, Deutschland) entspricht der Monographie "Paraffinum solidum" des EAB 1997. Hartparaffin ist ein Gemisch fester, gereinigter und gesättigter Kohlenwasserstoffe. Das Ausgangsmaterial ist der bei der Herstellung von Schmierölen anfallende Rückstand. Der Schmelzbereich liegt bei 50 bis 57°C. Hartparaffin findet Verwendung als konsistenz erhöhender Salbenbestandteil.

2.2.1.3 Cetylpalmitat

Cetylpalmitat (Cutina CP, Henkel, Düsseldorf) (künstlicher Walrat) ist ein Wachs aus Cetylalkohol verestert mit Palmitinsäure und wird im DAB 2001 mit der Monographie „Cetylpalmitat" aufgeführt. Neben der Hauptfettsäurekomponenten Palmitinsäure kommen auch noch Myristin- und Stearinsäure vor. Der Schmelzbereich wird im DAB mit 43°C bis 49°C angegeben. Eingesetzt wird der Rohstoff als Konsistenzgeber in Salben, Cremes und flüssigen Emulsionen [Fiedler 1996]. Die Einzelbestandteile von Cetylpalmitat besitzen GRAS-Status, jedoch ist die Substanz Cetylpalmitat an sich in der Lebensmittelzusatzstoffliste der FDA nicht registriert [Food Additive Database der FDA 1999].

2.2.1.4 Dynasan 112 und Dynasan 114 (D112, D112)

Dynasan 112 und Dynasan 114 (Condea, Witten, Deutschland) sind hochreine Triglyceride der physiologischen Fettsäuren Laurin- bzw. Myristinsäure. Dynasane finden als Gleitmittel bei der Tablettierung, als Konsistenzregulator und fettende Komponente in Pudern Anwendung [Fiedler 1996]. Aufgrund des hohen Anteils an Triglyceriden (> 90 %) zeigen Dynasane eine hohe Kristallinität und ausgeprägte Unterkühlungstendenzen [Westensen und Bunjes 1995].

2.2.1.5 Miglyol 812 (Neutralöl)

Miglyol 812 (Cäsar & Lorentz, Hilden, Deutschland) ist ein halbsynthetisches Öl. Es ist ein Triglyceridgemisch der Capryl-, Caprin- und Laurinsäure (d. h. von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge). Es ist niedrigviskos, fast farblos, geruchlos und nicht oxidationsempfindlich. Neutralöl wird in oralen Arzneiformen als Vehikel für Suspensionen, Lösungen und Weichgelatine kapseln und als spreitungs- und penetrationsfördernder Zusatz in Salben, Cremes, Emulsionen und Suspensionen eingesetzt.

2.2.1.6 Lipofundin[®] MCT 10 %

Lipofundin[®] (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) ist ein Fertigarzneimittel zur parenteralen Ernährung. Es dient sowohl der Kaloriensubstitution als auch der Zufuhr von essentiellen Fettsäuren und Flüssigkeit. In 1000 ml sind 50 g Sojabohnenöl, 50 g mittelkettige Triglyceride, 8 g Eilecithin, 25 g Glycerol, Natirumoleat, Tocopherol und Wasser für Injektionszwecke enthalten [Rote Liste[®] 2002]. Die Partikelgröße der Emulsionströpfchen liegt im Nanometerbereich, d. h. sie zeigen einen mittleren PCS-Durchmesser von ca. 200-400 nm.

2.2.2 Tenside

2.2.2.1 Tween 80

Tween 80 (Polysorbat 80, Polyethylen(20)sorbitanmonooleat) (ICI, Eversberg, Belgien) ist ein nichtionischer sterischer Emulgator und Lösungsvermittler mit einem HLB-Wert von 15. Die Toxizität ist gering [Fiedler 1996]. Tween 80 ist als Hilfsstoff in zahlreichen oralen (z. B. Adalat[®]), parenteralen (z. B. Actihaemyl[®], Coradex[®]), pulmonalen (z. B. Aerosol

Spitzer[®] N) und ophtalen (z. B. Efflumidex[®], Livocab[®]) Arzneimitteln zugelassen [Rote Liste[®] 2002].

2.2.2.2 Span 85

Span 85 (ICI, Eversberg, Belgien) ist ein Sorbitantrioleat mit einem HLB-Wert von 1,8 [Fiedler 1996]. Span 85 gilt als wenig toxischer Emulgator und Lösungsvermittler. In Kombination mit hydrophilen Emulgatoren (z. B. Tween) werden Spans auch zur Stabilisation von O/W-Emulsionen eingesetzt. Span 85 ist für die orale (Orelox[®] und Podomexef[®]), die parenterale (Fluad[®] und ADDIGRip[™], zwei Influenzavakzinen) und die pulmonale Applikation (als Hilfsstoff in zahlreichen Budesonid- und Chromoglicinsäure-Dosieraerosolen oder Pulverinhalatoren, z.B. Auxiloson[®], Diffusyl[®] und Pulmicort[®]) in Deutschland zugelassen [Rote Liste[®] 2002].

2.2.3 Kationische Lipide

2.2.3.1 Benzalkoniumchlorid (BA)

Benzalkoniumchlorid (BA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) ist ein Gemisch von N-Alkyl-N-benzyl-N,N-dimethyl-ammoniumchloriden, denen Alkylteil aus C₈-C₁₈-Ketten besteht. Benzalkoniumchlorid wird als Monographie im Nachtrag 2001 des Europäischen Arzneibuches 1997 geführt. BA wird als Konservierungsmittel (0,001-0,01 %) und als Desinfiziens (0,01-0,1 %) mit grenzflächenaktiven Eigenschaften verwendet [Burger und Wachter 1993]. Besonders beim Einsatz als Konservierungsmittel ist die Neigung zur Einlagerung in Grenzflächen und die daraus resultierende Inaktivierung als Konservierungsmittel zu beachten.

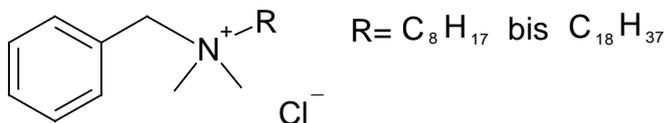


Abbildung 2.4: Strukturformel von BA

2.2.3.2 Cetylpyridiniumchlorid (CPC)

Cetylpyridiniumchlorid (CPC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) wird als Monographie im Nachtrag 2001 zum Europäischen Arzneibuch 1997 geführt. 1-Hexadecylpyridiniumchlorid findet Verwendung als grenzflächenaktives Konservierungsmittel (0,001-0,01 %) und als Desinfiziens (0,1 % zur Wundspülung und 0,01 % zur Schleimhautspülung) [Burger und Wachter 1993]. Der antimikrobielle Effekt basiert auf der Wechselwirkung des kationischen Tensides mit der bakteriellen Zellmembranfunktion [Roberts und Addy 1981].

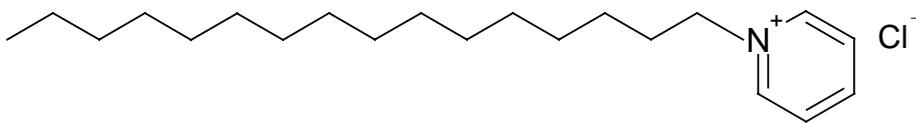


Abbildung 2.5: Strukturformel von CPC

2.2.3.3 Cetrimid (CTAB)

Cetrimid (CTAB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) besteht aus Trimethyltetradecylammoniumbromid, das in geringen Mengen Dodecyl- und Hexadecyltrimethylammoniumbromid enthalten kann. CTAB ist im Europäischen Arzneibuch 1997 unter der Monographie "Cetrimid" geführt. Verwendung findet CTAB als Antiseptikum (0,005-0,1 %), als Netzmittel und als kationischer Emulgator für O/W-Emulsionen [Burger und Wachter 1993]. CTAB wird seit Mitte der Neunziger als Komponente von kationischen Liposomen zur Transfektion verwendet [Gustafsson et al. 1995, Holmen et al. 1995]. CTAB wurde ebenfalls in Form von kationischen Mikropartikeln [Briones et al. 2001] als Adjuvans für DNA-Vakzinen eingesetzt.

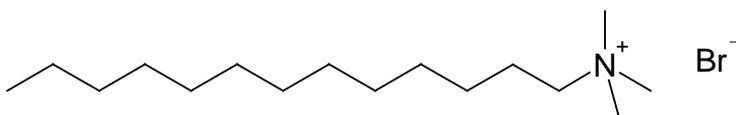


Abbildung 2.6: Strukturformel von CTAB

2.2.3.4 Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB)

Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB) (Clairant GmbH, Frankfurt a. Main, Deutschland) ist ein mizellen- und liposomenbildendes kationisches Lipid, welches seit 1991 als Bestandteil kationischer Liposomen zur Transfektion verwendet wird [Rose et al. 1991]. DDAB ist im kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz "LipofectaseTM reagent" (Life Technologies) enthalten.

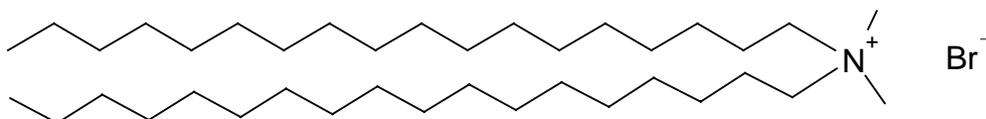


Abbildung 2.7: Strukturformel von DDAB

2.2.3.5 1,2-Dioleyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP)

1,2-Dioleyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) ist ein kationisches Lipid, welches zur Herstellung von kationischen Liposomen zur Transfektion verwendet wird. DOTAP wurde 1988 als Bestandteil von kationischen Liposomen zur Transfektion eingeführt [Stamatatos et al. 1988, Patent: Felgner et al. 1993] und ist heute Bestandteil von verschiedenen kommerziell erhältlichen in-vitro-Transfektionsagenzien z. B. EscortTM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und "Dotap liposomales Transfektionsreagenz" (Roche).

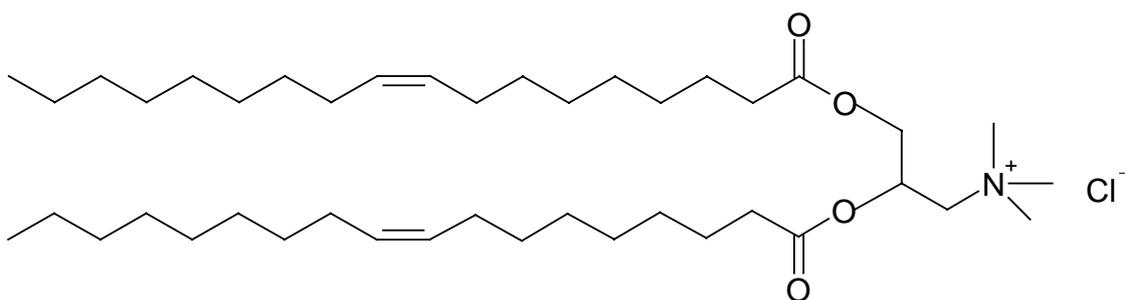


Abbildung 2.8: Strukturformel von DOTAP

2.2.3.6 Esterquat (EQ1)

N,N-Di-(β -stearoylethyl)-N,N-dimethyl-ammoniumchlorid, INCI-Bezeichnung: Distearoylethyl dimonium chlorid (syn.: Esterquat 1, EQ1) (Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland) ist ein positiv geladenes Lipid mit einer quartären Ammoniumgruppe. Der

Hersteller empfiehlt für die biologische Anwendung die zweifache Umkristallisation mit Ethylacetat, die mit der verwendeten Substanz auch durchgeführt worden ist.

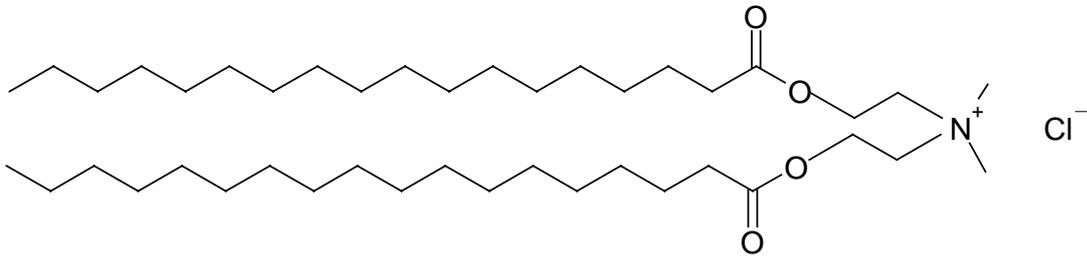


Abbildung 2.9: Strukturformel von EQ1

2.2.3.7 Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE)

Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) [Gao und Huang 1991, Felgner et al. 1994] ist ein zwitterionisches d. h. nach außen hin ungeladenes Lipid (Abbildung 2.10). DOPE wurde von Northern Lipids, Kanada bezogen. Es ist in vielen kommerziell erhältlichen liposomalen Transfektionsagenzien als Colipid enthalten z. B. Escort[™] (Sigma), CellFECTIN[®] und LipofectAMINE (beide Invitrogen Life Technologies). Der transfektionsfördernde Mechanismus soll darauf beruhen, daß im Anschluß an die Endozytose die Fusion der Liposomen mit der Endosomenmembran eingeleitet wird [Zhou und Huang 1994, Farhood et al. 1995]. Dadurch wird die DNA vor dem endosomalen Abbau geschützt und in das Zytosol entlassen.

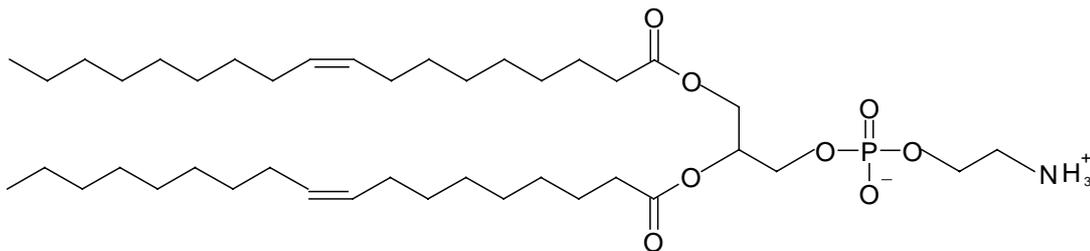


Abbildung 2.10: Strukturformel von DOPE

2.2.4 Adjuvantien

2.2.4.1 Freund's unvollständiges Adjuvans (FIA)

Freund's unvollständiges Adjuvans (engl. Freund's incomplete adjuvant, FIA) (Difco, Detroit, USA) ist eine W/O-Emulsion der wäßrigen Antigenlösung in Paraffinöl (85 %) mit Mannitmonooleat (Arlacel[®] A) (15 %) als Emulgator. Die Emulsion muß vor jeder Vakzination frisch hergestellt werden.

2.2.4.2 Freund's vollständiges Adjuvans (FCA)

Freund's komplettes Adjuvans (engl. Freund's complete adjuvant, FCA) (Difco, Detroit, USA) enthält zusätzlich zu den Komponenten aus FIA noch inaktivierte *Mycobacterium tuberculosis* (500 µl/ml).

2.2.5 Antigene

2.2.5.1 *Mycoplasma bovis*

Das Antigen wurde von *Mycoplasma bovis* PG 45 R9 gewonnen. Die Bakterien wurden dazu unter mikroaerophilen Bedingungen in Hayflick-Medium über 72 Stunden inkubiert und anschließend mittels Propiolakton inaktiviert. Die Bakterien wurden isoliert, mit PBS gewaschen und auf einen Gehalt von 1×10^{10} CFU/ml titriert (koloniebildende Einheiten, CFU). Die Sterilität der Zubereitung wurde nach der im Arzneibuch beschriebenen Methode nachgewiesen.

2.2.5.2 Murines Immunglobulin G

Murines Immunglobulin G (IgG) (INC Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) wird aus Mäuserum durch chromatographische Verfahren gewonnen.

2.2.6 Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper ist ein peroxidase-konjugiertes und affinitätsgereinigtes Anti-Huhn Immunglobulin G (Dianova, Hamburg, Deutschland). Der Antikörper wurde in Ka-

ninchen gewonnen, die gegen Hühner-Immunglobulin Y (IgY) immunisiert worden sind. Anschließend wurde der Antikörper mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase ist ein aus dem Meerrettich stammendes Enzym. Der polyklonale Antikörper wurde affinitätsgereinigt.

2.2.7 Peroxidasesubstrate

2.2.7.1 o-Phenylendiamin (OPD)

O-Phenylendiamin (OPD) wurde in Form von 1 mg Tabletten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) eingesetzt. Die Enzym Peroxidase, mit dem der sekundäre Antikörper gekoppelt ist, katalysiert die Reaktion von OPD mit Wasserstoffperoxid. Das farblose OPD wird dabei zu einem orangen Chinonimin oxidiert. Nach Abstoppen der Reaktion konnte die Absorption bei 492 nm kolorimetrisch vermessen werden. Da OPD stark mutagene Eigenschaften hat, mußte mit größter Sorgfalt gearbeitet werden. In der Substratlösung kommt auf 1 mg OPD 3,7 ml Phosphat-Citrat-Puffer und 1,85 µl 30 %-iges Wasserstoffperoxid.

2.2.7.2 Tetramethylbenzidin (TMB)

Tetramethylbenzidin (TMB) wurde in Form von 1 mg Tabletten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) verwendet. Für TMB sind bisher noch keine mutagenen oder kanzerogenen Eigenschaften [Mc Kimm-Breschkin 1990] beschrieben worden. Die Peroxidase katalysiert die Reaktion von TMB mit Wasserstoffperoxid. Das farblose TMB wird dabei zu einer blauen mesomeriestabilisierten Verbindung oxidiert. Durch das Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure schlägt die Farbe nach Gelb um und kann bei 450 nm kolorimetrisch vermessen werden.

Die Substratlösung mußte immer frisch hergestellt werden. 1 mg TMB wurde dabei in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst und mit 9 ml Citrat-Phosphat-Puffer und 2 µl 30 %-igen Wasserstoffperoxid versetzt.

2.2.8 Blocker der unspezifischen Bindungen

Gelatine entspricht der Monographie "Gelatina" im EAB 1997. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde eine 0,5 %-ige wäßrige Lösung verwendet. Durch diese Maßnahme wurden unspezifische Bindungen an der Mikrotiterplatte abgesättigt. Dies verringerte den Einfluß von Störfaktoren auf den Test.

2.2.9 Plasmid-DNA

Das pCMVbeta Plasmid (ATCC, Manassas, VA, USA) trägt das von E. coli stammende beta-Galaktosidase Gen. Das Plasmid hat ein Ampicillinresistenz Gen und wird in E. coli DH5alpha transformiert. Die Transformation wurde freundlicher Weise von Heike Stumpf (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) durchgeführt. Die Expression des beta-Galaktosidase Gens wird durch den Cytomegalievirus IE-Promoter kontrolliert. Das Plasmid hat eine Größe von 7164 Basenpaaren. Für weitere Informationen zu pCMVbeta verweise ich auf die Homepage von ATCC (www.atcc.org).

2.2.10 Polyethylenimin (pEI)

Polyethylenimin (pEI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) ist ein verzweigt-kettiges Polymer mit einem Rückrad aus $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})_x$. Die Abzweige sind an jedem 3. bis 3,5. N-Atom lokalisiert. Aufgrund der primären, sekundären und tertiären Amine ist die positive Ladung des Polymers stark pH-abhängig. Das in Wasser gelöste Polymer fällt durch die Komplexbildung mit DNA zu kolloidalen Partikeln aus. pEI wird seit 1995 häufig zur in-vitro-Transfektion eingesetzt [Boussif et al. 1995].

2.2.11 Escort™

Escort™ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) ist ein kommerziell erhältliches liposomales Transfektionsagens. Escort™ setzt sich aus einer wäßrigen Mischung von DOTAP (1 mg/ml) und DOPE (1 mg/ml) zusammen und wurde zur Sterilisation sterilfiltriert.

2.2.12 Dotap liposomales Transfektionsreagenz

Dotap liposomales Transfektionsreagenz (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) ist ebenfalls ein kommerziell erhältliches liposomales Transfektionsagens. Das Transfektionsreagenz besteht aus reinen DOTAP-Liposomen (1 mg /ml). Zur Sterilisation wurde das Produkt ebenfalls sterilfiltriert.