

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

<u>Gerät (Bezeichnung)</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank, Heraeus B6000	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CCD Kamera Axiocam	Zeiss, Oberkochen
CCD Kamera MIT CCD72	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen
Hochvakuum-Bedampfungsapparatur HBA1	VEB Carl Zeiss Jena, Jena
Homogenisator Ultra-Turrax T8	IKA-Werke, Staufen
Mikrotiterplattenluminometer LB 96V	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Photonenkorrelations-Spektrophotometer N4-Plus-MD	Coulter Electronics GmbH, Krefeld
Plattenphotometer MRX Revelation	Dynex Technologies, Denkendorf
Sterilbox GELAIRE	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
Tischmikroskop Olympus CK2	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf, Köln
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Köln
Transmissionselektronenmikroskop EM 900	Zeiss, Oberkochen
Transmissionselektronenmikroskop EM 910	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Ultraschallbad Transsonic 570	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
UV/VIS-Spektrophotometer JACSO-V550	Jasco Co., Tokio, Japan
UV-Spektrofluorometer SFM 25	Biotek Kontron Instruments, Neufahrn
Vortexer VF-2 Janke&Kunkel	IKA-Laborbedarf, Staufen
Vakuumtrockner DNA SpeedVac DNA110	Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA
Wasserbad, Jolabo F10	Julabo Laboratories GmbH, Seelbach
Zentrifuge CH-J2-HS	Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA
Zentrifuge CH-J2-ME	Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA
ζ-Potentialmessgerät	

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Bakto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bakto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bakto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromophenolblau	Sigma, Deisenhofen
Bovine Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Calbiochem, Bad Soden
1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Epon 812	Fluka Chemie AG, Heidelberg
Epon Accelerator DMP 30	Fluka Chemie AG, Heidelberg
Epon Hardener DDSA	Fluka Chemie AG, Heidelberg
Epon Hardener MNA	Fluka Chemie AG, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
GFP-NLS Fusionsprotein	Dr. U. Vinkemeier, FMP, Berlin-Buch
Hasen- Retikulozytenlysats (RRL)	Promega, Mannheim
HBSS Hank's balancierte Salzlösung	Gibco BRL, Eggenstein
Heparinase III	Sigma, Deisenhofen
Hoechst Farbstoff 33258	Sigma, Deisenhofen
Kupfernetze, FormVar beschichtet	Dr. B. Erdmann, MDC, Berlin-Buch
Mowiol	Hoechst AG, Frankfurt a.M.
Platin/Paladiumdraht (80/20, 0.2 mm)	Bal-Tek, Witten
Polyethylenimin 60 kDa	Sigma, Deisenhofen
Polynatriumstyrensulfonat	Dr. B. Paulke, MPI, Golm
Polyvinylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Saure Phosphatase	Sigma, Deisenhofen
Saure Phosphatase-Farbstoffsubstrat pnPP	Fluka Chemie AG, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Synthetische Peptide

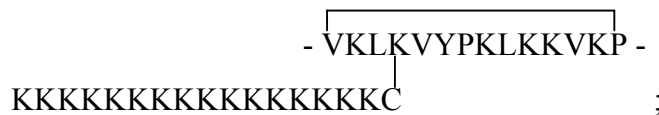
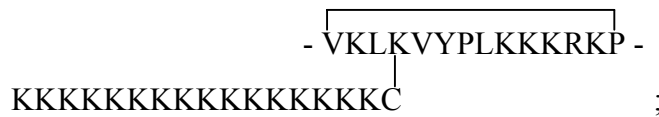
Hersteller: Biosyntan GmbH, Berlin-Buch

Aminosäuresequenzen:

CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGPKKKRKVG;

CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGGVKRKKKP;

KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLELLEELKNEAVRHF;



2.1.4 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller
Anti-HSPG	Monoklonarer Maus-Antikörper gegen humanes HSPG (3G10-Epitop)	Seikagaku USA East Falmouth, USA

2.1.5 Plasmid-DNA

pLUC: Luziferase-Reportergenexpressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor, 6 kb, Ampicillinresistenz; Dr. Priscilla A. Furth, Baltimore (66), USA.

2.1.6 Verwendete Kits

BioRad-Proteinassay	Biorad, München
DAKO LSAB2 System Maus/Peroxidase	DAKO, Hamburg
Luziferase-Assay-System	Promega, Mannheim
QIAGEN Plasmid Maxi Purifikationskit	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.7 Verwendete Puffersysteme

CD:	0.1 M Cacodylat, pH 7.38
Eponmischung:	17.8 g Epon 812, 13.4 g DDSA, 6.8 g MNA, 0.5 g DMP 30
3.7 % Formalin:	3.7 % Formaldehyd in PBS
HP:	20 mM HEPES/HCl, pH 7.4
Kernimportpuffer:	20 mM Hepes/KOH, 110 mM KAcetat, 2 mM MgAcetat, 1 mM EGTA, pH 7.5
10 x PBS:	14 mM KH ₂ PO ₄ , 43 mM Na ₂ HPO ₄ , 27 mM KCl, 1.37 M NaCl, pH 7.4
SP-Puffer :	5 mM pnPP, 0.1 % Triton X-100, 20 mM NaAcetat, pH 5.6
TCN:	10 mM Tris/HCl, 4 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, pH 7.4

2.1.8 Medium für die Bakterienzucht und Bakterienstamm

LB (für 1 Liter):	10 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7.0
Agarmedium:	15 g Bakto-Agar, 10 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7.0
<i>E.coli</i> DH5 α :	<i>F/endA1,hsdR17(nK mK), supE44, thi-1, recA1, gyrA(Nal^r), relA1Δ</i> <i>(lacZYA-argF), U169 (m80lacZΔM15)</i>

2.1.9 Verwendete humane Zelllinien

HeLa:	Zervixkarzinomzellen
HCT 15:	Kolonkarzinomzellen
HCT 116:	Kolonkarzinomzellen
MaTu:	Mammakarzinomzellen
MCF 7:	Mammakarzinomzellen
MT 1:	Mammakarzinomzellen
MT 3:	Mammakarzinomzellen
MT19:	Mammakarzinomzellen

2.1.10 Zellkulturmedien

Zelllinie	Kultivierungsmedium
HeLa	DMEM, 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.
HCT 116, HCT 15, MaTu, MCF 7, MT 1, MT 3, MT 19	RPMI, 10 % FKS

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Plasmid-DNA

Prinzip

Für die Herstellung von Plasmid-DNA wurden zunächst *E.coli*-Bakterien mit dem Plasmid durch Hitzeschock transformiert und danach mit einem transformierten Klon eine Flüssigkultur angesetzt. Die in *E.coli* produzierte DNA wurde dann aus den Bakterien extrahiert und über ein Säulenverfahren gereinigt.

Durchführung

Es wurden 50 µl transformationskompetente *E.coli*-Bakterien des Stammes DH5α zunächst 10 Minuten auf Eis gelegt, mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 90 Sekunden in 42 °C eingetaucht und für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Expression des Ampicillin-Resistenzgens wurden 950 µl LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 50-200 µl-Aliquote auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausplattiert und übernacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung von Vorkulturen wurden danach je 5 ml Ampicillin-LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. 5 ml Vorkultur wurden danach in 500 ml Ampicillin-LB-Medium gegeben und übernacht bei 37 °C inkubiert.

Die Extraktion und Reinigung der Plasmid-DNA mittels Ionenaustausch-Chromatographie wurde mit dem Plasmid-Maxi-Purifikationskit von QIAGEN laut Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde schließlich in H₂O resuspendiert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer Plasmid-DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit der DNA wurde durch zusätzliche Messung der

optischen Dichte bei 280 nm und Bildung des Quotienten OD_{280nm}/OD_{260nm} ermittelt. Sie lag zwischen 1.7 und 1.8.

2.2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium (siehe 2.1.10) bei 37 °C mit 5 % CO₂ unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen kultiviert.

2.2.3 Handhabung der synthetischen Peptide

Laut Angaben des Herstellers wurden die lyophilisierten Peptide in H₂O resuspendiert, danach in 10 µl-Fractionen aliquotiert und schließlich im SpeedVac bei mittlerer Temperatur 30 Minuten getrocknet und zur längeren Aufbewahrung bei 4 °C gelagert. Es wurden unterschiedliche Aliquote mit einem Peptidgehalt von 0.2-20 nmol hergestellt. Für den Gebrauch der Peptide wurde eine geeignete Menge in H₂O resuspendiert und 5 Minuten im Ultraschallbad resuspendiert.

2.2.4 *In vitro*-Kernimportassay

Prinzip

Diese Methode basiert auf partiell permeabilisierten HeLa-Zellen, deren Zellmembran mit einem Detergenz aufgelöst wurde. Die Zellkernhüllen bleiben jedoch intakt und die nukleären Porenkomplexe sind zudem funktionsfähig, so daß durch zusätzliche Inkubation von Transportsubstraten und möglichen Faktoren der Kerntransportmaschinerie nukleozytoplasmatische Transportvorgänge von Makromolekülen untersucht werden können.

Die gesamte Reaktion wurde mit auf Deckgläschen gewachsenen Zellen durchgeführt. Dies erlaubt einen schnellen Wechsel der Inkubationsbedingungen während des Importassays. Die Besonderheit dieses Assays ist die Verwendung von Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL), das für den Kernimport notwendige Faktoren enthält und außerdem ATP für den aktiven Transportprozess in ausreichender Konzentration bereitstellt. Untersucht wurde der Kernimport des Fusionsreporterproteins GFP-NLS. In Konkurrenzexperimenten wurde zusätzlich ein Kompetitorpeptid in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben.

Durchführung

Polylysinbeschichtung von Deckgläschen

Um ein homogeneres Wachstum der Zellen zu erreichen, wurden die Deckgläschen vorher mit Polylysin beschichtet. Dazu wurden Deckgläschen in 24-Well-Platten verteilt und 1 mg/ml Polylysin in PBS daraufpipettiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Polylysinlösung abgesaugt, die Deckgläschen mit H₂O gespült und unter der Sterilbox getrocknet.

Kernimportassay

Für den Versuch wurden am Vortag 10⁵ HeLa-Zellen auf beschichtete Deckgläschen eingesät. Sämtliche Waschschritte wurden, wenn nicht anders spezifiziert, in kaltem Kernimportpuffer durchgeführt. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen und mit 40 µg/ml Digitonin in Kernimportpuffer 6 Minuten auf Eis permeabilisiert. Die Reaktionsansätze von 20 µl Gesamtvolumen enthielten 12 µl RRL, 2 mM DTT und 1.5 µM GFP-NLS in Kernimportpuffer. Die Ansätze wurden 2 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert und auf eine mit Parafilm bedeckten Oberfläche pipettiert. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen, vorsichtig und blasenfrei über die Reaktionsansätze gelegt und 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal gewaschen, in 3.7 % Formaldehyd in PBS 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und nochmals zwei Mal gewaschen. Schließlich wurden die Kerne mit 1 µg/ml Hoechst 33258 bei Raumtemperatur für 3 Minuten gefärbt, die Zellen nochmals gespült und in Mowiol eingebettet.

Variationen des Assays

Um die Intaktheit der Zellkerne zu überprüfen wurde zur Kontrolle anstatt RRL 10 mg/ml BSA verwendet. Für eine WGA-Behandlung der Kerne wurden die Zellen nach der Permeabilisierung zusätzlich 8 Minuten mit 0.25 mg/ml WGA inkubiert und danach 2 Mal gewaschen.

2.2.5 Herstellung von Peptid/DNA-Komplexen

Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß für eine Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse ein genaues und standardisiertes Arbeiten bei dieser Methode Voraussetzung war. Dies betraf insbesondere die verwendeten Konzentrationen und Volumina, die Art der Durchmischung und die Inkubationszeit, die sekundengenau erfolgte. Bei größeren Ansätzen wurde

das Protokoll so organisiert, daß alle 30 Sekunden ein neuer Ansatz bearbeitet wurde. Sämtliche Agenzien und Pufferlösungen lagen zu Beginn des Protokolls bei Raumtemperatur vor. Die eingesetzte Peptidmenge wurde ausgehend von dem gewünschten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis folgendermaßen berechnet:

$$N = (R \times m_{\text{DNA}} \times 3.03) / n_p$$

mit N = einzusetzende Peptidmenge (nmol), R = Peptid/DNA-Ladungsverhältnis, m_{DNA} = DNA-Menge (μg), n_p = Ladung des Peptids (siehe Tabelle 4).

Das Peptid wurde in 10 μl H_2O resuspendiert. 2 μg Plasmid-DNA wurden in 90 μl TCN-Puffer zu dem Peptid gegeben, 10 Mal mit der Pipette vermischt, das Reaktionsgefäß verschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.6 Herstellung von Polyelektrolyten-Nanopartikeln

Prinzip

Nanopartikel werden hier als unter physiologischen Salzbedingungen kolloidal stabile Partikel definiert, die in der Regel einen Durchmesser von etwa 50-200 nm besitzen. Durch diese Größe ist im Prinzip eine Rezeptor-vermittelte Endozytose der Partikel möglich. Die kolloidale Stabilität beruht auf einer elektrostatischen Abstoßung der Partikel untereinander, vornehmlich aufgrund einer negativ geladenen Partikeloberfläche. Es wurde ein Verfahren adaptiert, das ursprünglich von Trubetsky und anderen Autoren beschrieben wurde (89). Dabei wird die DNA zunächst unter salzfreien Bedingungen mit einem Polykation vorkondensiert und anschließend mit einem Polyanion inkubiert. Durch die Bindung des Polyanions soll eine Umkehr der Oberflächenladung bewirkt werden. Erst danach wird die Mischung auf 150 mM NaCl gebracht.

Es wurden Nanopartikel mit Polyethylenimin (PEI) als Polykation und Polyvinylsulfat (PVS) bzw. Polystyrensulfonat (PSS) als Polyanionen hergestellt. Das PEI wurde bei einem PEI/DNA-Gewichtsverhältnis von 1.05 verwendet, was einem Stickstoff/Phosphat-Ladungsverhältnis von $N/P = 8$ entspricht. Dieses Verhältnis wurde in früheren Untersuchungen für Transfektionsexperimente als optimal befunden. In anderen Versuchen wurden synthetische Peptide anstatt des PEI verwendet. Die Polyanionen wurden bei verschiedenen Polyanion/DNA-Gewichtsverhältnissen eingesetzt.

Durchführung

Nanopartikel für den in vitro-Gentransfer

Für *in vitro*-Transfektionsversuche wurden 2 µg Plasmid-DNA und entsprechende Mengen an Polyelektrolyten jeweils in 66.66 µl HP vorbereitet. Das PEI wurde zur DNA gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Polyanion versetzt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 mM NaCl zugegeben und die Partikel für weitere 5 Minuten inkubiert.

Nanopartikel für den in vivo-Gentransfer

Für *in vivo*-Transfektionsversuche wurde die DNA-Konzentration insgesamt erhöht. PVS-enthaltende Partikel wurden mit 6.6 µg DNA und gemäß dem Protokoll für den *in vitro*-Gentransfer hergestellt. Mit dem PSS hingegen wurden 4-8 µg DNA und das PEI jeweils in 5 µl HP vorbereitet und wie oben angegeben vermischt. Das PSS befand sich in 40 µl HP, so daß das Endvolumen dieser Partikel nach Salzzugabe 58 µl betrug.

Herstellung von Peptid-enthaltenden Nanopartikeln unter salzfreien Bedingungen

Es wurden Partikel mit 2 µg DNA und PVS als Polyanion hergestellt. Für die Peptide NLS^T, SLN, CYC und mCYC wurde ein Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 3.0 gewählt, beim VN-Peptid betrug es 1.5. DNA, Peptid und Polyanion wurden in 33.33 µl HP vorbereitet. Die Herstellungsweise der Partikel wurde gemäß dem Protokoll für den *in vitro*-Gentransfer durchgeführt, mit dem Unterschied, daß das PEI durch das Peptid ersetzt wurde.

Herstellung von Peptid-enthaltenden Nanopartikeln unter physiologischen Salzbedingungen

Alle Komponenten wurden in HP plus 150 mM NaCl vorbereitet. Verwendet wurde das mCYC-Peptid. Zur Optimierung der Peptid/DNA-Komplexe wurden Peptid/DNA-Ladungsverhältnisse von 3 bis 50 getestet. Ein Verhältnis von 20 wurde schließlich als optimal befunden. Zur Optimierung der Nanopartikel wurden Polyanionen/DNA-Gewichtsverhältnisse von 0.2 bis 90 getestet.

2 µg DNA in einem Volumen von 5 µl wurden zu 15 µl Peptidlösung rasch gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peptid/DNA-Komplexe wurden anschließend langsam zu 80 µl Polyanionenlösung gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert.

2.2.7 Transfektionsversuche mit humanen Tumorzelllinien *in vitro*

2.2.7.1 Peptid- und Nanopartikel- vermittelter Gentransfer

Transfektion mit Peptid/DNA-Komplexen

Diese Methode basiert auf einem von Haberland und anderen Autoren (80) entwickeltem Verfahren, das die Transfektion von humanen Zelllinien mit Peptid/DNA-Komplexen erlaubt. CaCl_2 und Chloroquin werden dabei dem Transfektionsmedium zugegeben und dienen als verstärkende Faktoren, die vermutlich den Austritt der Komplexe aus den Endosomen verbessern.

24 Stunden vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen in 24-Well-Platten eingesät. Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz transfiziert. Dazu wurden Komplexe mit 2 μg Plasmid-DNA hergestellt, danach mit 900 μl Transfektionsmedium bestehend aus RPMI, 10 % FKS, 4 mM CaCl_2 und 100 μM Chloroquin vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt, mit frischem RPMI plus 10 % FKS ersetzt und die Zellen weiterhin bei 37 °C inkubiert. Die Luziferase-Reportergenaktivität wurde nach 24 Stunden untersucht. Jeder Versuch wurde insgesamt fünf Mal durchgeführt.

Transfektion mit Nanopartikeln

Für den Nanopartikel-vermittelten Gentransfer wurde während der Herstellung der Partikel das Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Die hergestellten Partikel wurden dann gedrittelt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Bei Partikeln, die PEI als DNA-kondensierendem Agens enthielten, wurde dem Transfektionsmedium kein zusätzliches CaCl_2 oder Chloroquin hinzugegeben. Jeder Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

Transfektion zur Bestimmung der Zelltoxizität

Zur Bestimmung der Zelltoxizität des Transfektionssystems wurden die Transfektionsversuche in 96-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden am Vortag 10^4 -Zellen eingesät. Für die Transfektionsversuche wurden 5-fach geringere Mengen verwendet, also Komplexe mit 0.4 μg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μl , zu denen 180 μl Transfektionsmedium gegeben wurden. Diese Versuche wurden drei Mal durchgeführt.

Desulfurylierung von GAGs in den Zellen

Es wurden Transfektionsversuche zur Untersuchung der Wirkung von Proteoglykanen auf den Gentransfermechanismus durchgeführt. Proteoglykane enthalten Glykosaminoglykane mit Sulfatgruppen, deren Synthese in den Zellen durch Zusatz von Natriumchlorat inhibiert werden kann (82). Dazu wurden den Zellen 12 Stunden nach dem Einsäen 35 mM Natriumchlorat zugegeben und die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert.

Da beobachtet wurde, daß das CaCl_2 im Transfektionsmedium zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen führte, wurde in diesen Transfektionsversuchen kein CaCl_2 zugesetzt. In manchen Versuchen wurden PEI/DNA-Komplexe zur Transfektion eingesetzt. In diesem Fall wurden die Komplexe wie unter Kapitel 2.2.6, Absatz „Nanopartikel für den *in vitro*-Gentransfer“, jedoch ohne Polyanion, hergestellt und zur Transfektion ohne CaCl_2 und Chloroquin eingesetzt. Insgesamt wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

2.2.7.2 Lipofektion

Die Lipofektion diente als Vergleichssystem zum Peptid-vermittelten Gentransfer. Dazu wurde Lipofektin verwendet. Transfiziert wurden mit 2 µg Plasmid-DNA nach der Vorschrift des Herstellers. Diese Versuche wurden 5 Mal durchgeführt.

2.2.7.3 Proteinkonzentration aus Lysaten transfizierter Zellen

Zur Bestimmung der Proteingesamtkonzentration wurde die Bradford-Methode mit dem Bio-rad Protein-Assay-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Luziferase-Assay hergestelltes Zelllysat wurde 5 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. 1 µl Überstand wurde mit 150 µl Bradford-Lösung in einer Mikrotiterplatte gemischt und im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

2.2.7.4 Luziferase-Reportergenaktivität

Zur Bestimmung der Luziferase-Reportergenaktivität transfizierter Zellen wurde das Luziferase-Assay-System von Promega laut Angaben des Herstellers verwendet. 180 µl Lysispuffer wurde auf die Zellen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend mit einer Pipettenspitze kurz homogenisiert. Für den Assay wurden jeweils 20 µl Lysat in eine Luminometer-Mikrotiterplatte pipettiert und im Mikrotiterplat-

ten-Luminometer gemessen. Injiziert wurden dabei 50 µl Luziferin und die Messzeit betrug eine Minute.

2.2.7.5 Zelltoxizität des Transfektionssystems

Zur Bestimmung der Zelltoxizität wurde die Aktivität der sauren Phosphatase in den Zellen gemessen. Zunächst wurden die Zellen mit HBSS gewaschen. Danach wurden 80 µl SP-Puffer, das Triton X-100 zur Zellyse und außerdem das chromophore saure Phosphatase-Substrat p-Nitrophenylphosphat enthält, hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0.5 M Tris/HCl gestoppt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Referenz wurde ein Konzentrationsgradient mit kommerziell erhältlicher sauren Phosphatase verwendet. Diese Versuche wurden insgesamt drei Mal durchgeführt.

2.2.8 Immunzytochemie

Prinzip

Immunozytochemie wurde verwendet, um die HSPG-Expression an der Zelloberfläche zu untersuchen. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes HSPG. Das Epitop liegt dabei in dem Proteinanteil des Moleküls und kann erst nach enzymatischer Abspaltung des Heparansulfats durch Heparinase III vom Antikörper erkannt werden. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde das DAKO-LSAB2-System benutzt. Der darin enthaltene sekundäre Antikörper ist biotinyliert und wurde in einem weiteren Schritt durch Peroxidase-markiertem Streptavidin nachgewiesen. Die enzymatische Reaktion erfolgte durch das Peroxidase-Substrat DAB, das einen lokalen roten Farbausschlag bewirkt.

Durchführung

Die Waschvorgänge wurden mit PBS bei Raumtemperatur durchgeführt. 2×10^5 Zellen wurden am Vortag eingesät, in PBS gewaschen und zur Abspaltung des Heparansulfats 60 Minuten mit 1 U/ml Heparinase III bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal gewaschen, in 3.7 % Formalin 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut drei Mal gewaschen. Schließlich wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 3 % H₂O₂ 4 Minuten lang gequentscht. Die weitere Detektion bis zum Nachweis der Peroxidase durch DAB wurde

laut Herstellerangaben durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde 100-fach verdünnt angewendet.

Als Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden zum Vergleich Zellen ohne vorherigen Heparinase III-Verdau gefärbt.

2.2.9 Physikochemische Charakterisierung von DNA-Komplexen

2.2.9.1 Komplexierungsgrad der DNA

Zur Ermittlung des Komplexierungsgrades der DNA in DNA-Komplexen wurde der nicht-gebundene Anteil der DNA in Lösung bestimmt. Dazu wurden die Komplexe nach ihrer Herstellung 5 Minuten bei 2000 g herunterzentrifugiert und der Überstand im Photometer bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Als Kontrolle für den linearen Verlauf der optischen Dichte in Abhängigkeit der DNA-Konzentration unter den experimentellen Bedingungen wurde nackte DNA bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen.

Außerdem wurde in Kontrollversuchen ohne Zentrifugation der Komplexe überprüft, daß die Komplexierung der DNA bei den verwendeten Peptid/DNA-Verhältnissen die Absorption bei 260 nm nicht beeinflusst. Somit ist nach Zentrifugation der Komplexe eine Verringerung der optischen Dichte im Überstand auf eine Sedimentation der DNA zurückzuführen. Insgesamt wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

2.2.9.2 ζ -Potentialmessung

Prinzip

Das ζ -Potential ist ein Maß für die Oberflächenladung von Partikeln und kann durch Messung der elektroforetischen Mobilität in Lösung bestimmt werden. Der Messvorgang ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden und wird hier nur kurz skizziert (90). Geladene Partikel sind in einer Salzlösung von einer ladungskompensierenden diffusen Schicht von Gegenionen umgeben. Somit nimmt das elektrische Potential innerhalb der diffusen Schicht mit zunehmendem Abstand von der Partikeloberfläche exponentiell ab. Die räumliche Ausdehnung der diffusen Schicht hängt u.a. von der Oberflächenladung und von der Salzkonzentration der Lösung ab. Wird ein elektrisches Feld angebracht, so bewegen sich die Partikel und ihre Gegenionen jeweils in entgegengesetzte Richtungen. Die von den Partikeln getrennten Gegenionen werden aufgrund von Reibungskräften nur zum Teil an der Partikeloberfläche

ersetzt, so daß sich eine wirksame Potentialdifferenz zwischen der „abgestreiften“ Gegenionenschicht und dem Medium ergibt. Diese wird als das ζ -Potential definiert und ist bei maximaler Abstreifung der diffusen Schicht gleich dem Sternpotential. Bei einer gegebenen Salzkonzentration und einem definierten angelegten elektrischen Feld ist das ζ -Potential proportional zur elektroforetischen Mobilität der Partikel. Die Bewegungsrichtung- und Geschwindigkeit der Partikel werden in einem ζ -Potentialmessgerät durch Lichtstreuverfahren gemessen.

Durchführung

Verwendet wurde in dieser Arbeit das Gerät Delsa-440-SX von Coulter. Aufgrund der relativ geringen Lichtstreuintensitäten der Partikel wurden 300 μl Partikellösung, entsprechend 6 μg Plasmid-DNA, hergestellt, mit 400 μl TCN verdünnt in die Messzelle injiziert und 2 Minuten lang equilibriert. Die Taktfrequenz wurde auf 500 Hz gesetzt und der Messstrom laut Herstellerangaben entsprechend auf den halben angezeigten Impedanzwert der Lösung eingestellt. Die Messzeit betrug eine Minute. Zur Überprüfung der Partikelstabilität während der Messung wurde jede Mischung drei Mal gemessen. Jedes Experiment wurde außerdem zwei Mal wiederholt.

2.2.9.3 Photonenkorrelationsspektroskopie

Prinzip

Zur Untersuchung des hydrodynamischen Durchmessers von DNA-Komplexen wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch dynamische Lichtstreuung genannt, verwendet. Die PCS ist eine nicht-invasive Messmethode und bietet die Möglichkeit, Partikel in ihrem Herstellungsmedium zu messen. Das zugrunde liegende Messprinzip und die Berechnung der Größe aufgrund der Messdaten wurden in der Literatur ausführlich beschrieben (91, 92). Daher wird hier nur das physikalische Prinzip kurz zusammengefasst.

Trifft monochromatisches Licht auf ein Atom, so orientieren sich seine Elektronen im elektrischen Feld und es entsteht ein induzierter, schwingender Dipol, der selbst zur Emissionsquelle elektromagnetischer Strahlung wird. Befinden sich viele Streuzentren nahe bei einander, wie es z. B. in einem Nano- oder Mikrometer-großen Partikel der Fall ist, strahlen die Zentren phasenverschoben und es kommt zu destruktiven und konstruktiven Interferenzen, deren Umfang vom Abstand der Zentren zueinander sowie vom Beobachtungswinkel des gestreuten Lichts abhängt. In einer reinen Lösung oder in einem perfekten Kristall ist für jedes Streuzen-

trum ein equivalentes Zentrum mit umgekehrter Phase vorhanden, so daß in diesen Fällen insgesamt kein Licht gestreut wird. In einer Partikellösung jedoch gibt es Fluktuationen in der Streuzentrendichte, einerseits in der räumlichen Verteilung der Zentren und andererseits bedingt durch die zeitliche Entwicklung der Lösung aufgrund der thermischen Bewegung der Partikel. Durch diese Fluktuationen sind die destruktiven Interferenzen niemals vollständig und als Resultat wird aus dem System Licht gestreut.

Größere Partikel sind träger als kleinere und resultieren deshalb in geringeren Fluktuationen. Zur Messung von Partikelgrößen werden also Fluktuationen der Lichtstreuintensität der Partikellösung um einen Durchschnittswert über die Zeit erfasst. Statistisch betrachtet ist eine geschlossene und stabile Partikellösung ein ergonisches System, so daß Fluktuationen durch Berechnung der Autokorrelationsfunktion quantifiziert werden können. Diese gibt an, in wiefern der momentane Zustand des Systems, also hier gemessen an der Lichtstreuintensität, in Abhängigkeit der Zeit mit sich selbst korreliert. Daher ist die Autokorrelation zum Zeitpunkt Null maximal. Mit zunehmender Zeit nimmt die Autokorrelationsfunktion einen exponentiell negativen Verlauf an und verschwindet schließlich nach einer bestimmten Zeitspanne. Dies bedeutet, daß ab einem gewissen Zeitpunkt der erfasste Messwert der Streulichtintensität vom Zeitpunkt Null, also vom Anfangszustand, nicht mehr abhängt. Bei größeren Partikeln verschwindet die Autokorrelation langsamer als bei kleineren.

Durch das zweite Fick'sche Diffusionsgesetz kann gezeigt werden, daß aus der Autokorrelationsfunktion der lokalen Konzentrationsänderungen diffundierender Partikel der Diffusionskoeffizient ermittelt werden kann. Die Einstein-Stokes-Relation gibt schließlich den hydrodynamischen Durchmesser eines sphärischen Partikels in Abhängigkeit seines Diffusionskoeffizienten wieder. Durch Analyse der Autokorrelationsfunktion mittels geeigneter Logarithmen kann außerdem eine komplexe Partikelmischung in ihrer Zusammensetzung berechnet werden.

Grenzen der Messapparatur

Nach dieser Beschreibung ergeben sich folgende Gesichtspunkte, die für die Interpretation der mittels PCS ermittelten Werte berücksichtigt werden müssen:

(1) Die Berechnung der Partikelgröße setzt gleichförmige, insbesondere sphärische Partikel voraus. Ungleichmäßige Strukturen, wie die Aggregate, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, führen zu einer errechneten Größe, die jedoch nicht unbedingt realen Partikeln innerhalb dieser Lösung entspricht.

Folglich wurden Analysealgorithmen zur genaueren Ermittlung der Größenverteilung nicht verwendet. Es wurde lediglich der berechnete Durchschnittswert berücksichtigt. Dieser gibt an, daß sich die Komplexe wie eine homogene Mischung sphärischer Partikel eines bestimmten hydrodynamischen Durchmessers verhalten. Ein Vergleich zwischen Partikelmischungen zur Ermittlung ihrer relativen scheinbaren Durchschnittsgrößen ist also mittels PCS trotzdem sinnvoll.

(2) Größere Partikel streuen mit einer viel höheren Intensität als kleinere, so daß im Falle einer heterogenen Größenverteilung kleinere Partikel zumindest ein sehr geringes Gewicht in der Gesamtlichtstreuung haben und ggf. nicht erfasst werden. Dies bedeutet für die vorliegende Arbeit auch, daß im Falle der Nanopartikelmessungen eine scheinbare Erhöhung des Durchmessers durch das Vorhandensein einiger Partikeloligomere verursacht werden kann, und nicht durch eine tatsächliche Vergrößerung der Partikel aufgrund zusätzlich adsorbierten Materials während der Partikelbildung.

Zur exakteren Bestimmung der Partikelgröße wurde deshalb die Elektronenmikroskopie verwendet.

Durchführung

Zur Untersuchung der Peptid/DNA-Komplexe wurde die Mischung 10-fach in TCN-Puffer verdünnt und in eine 1 ml-Küvette pipettiert. Die Nanopartikel hingegen wurden unverdünnt in eine 100 µl-Messküvette injiziert. Zur Messung wurden die Komplexe zunächst für 5 Minuten in dem Messgerät equilibriert und danach bei einem Messwinkel von 90° eine Minute lang gemessen. Die Streulichtintensität lag zwischen 5×10^4 und 10^6 counts/sec. Die Partikel wurden zur Überprüfung ihrer Stabilität drei Mal hintereinander gemessen. Jede Versuchsreihe wurde zwei Mal wiederholt.

2.2.9.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Untersuchung mittels Uranylacetatfärbung

50 µl der hergestellten Komplexe wurden auf Formvar-beschichtete Kupfernetze pipettiert und 5 Minuten lang adsorbiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Partikel anschließend 30 Sekunden in 1 % (w/v) Uranylacetat getaucht, die übrige Farblösung schließlich vorsichtig abgesaugt und die Kupfernetze getrocknet. Die Beobachtung erfolgte bei einer Beschleunigungsvoltzahl von 80 kV entweder mit dem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM 900 oder EM 910.

Untersuchung mittels Schrägbedampfung

Zur genaueren Untersuchung der Partikelmorphologie wurde in manchen Fällen der Kontrast durch Schrägbedampfung der Partikel mit Platin/Palladium erhöht. Nach Aufbringen der Partikel auf den Kupfernetzen und Uranylacetatfärbung (s.o.) wurden die Netze 10 Sekunden in H₂O gewaschen. Das übrige Wasser wurde abgesaugt und die Netze luftgetrocknet. Zur Bedampfung wurde ein 7 cm-langer Metalldraht V-förmig gebogen, mit 3.5 cm Platin/Palladiumdraht an der Spitze umwickelt und die Enden des Metalldrahtes in der Hochvakuumsbedampfungsapparatur eingespannt. Die Bedampfung der Netze erfolgte bei einem Winkel von 7° laut Angaben des Herstellers. Die Beobachtung wurde mit dem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM 910 durchgeführt (s.o).

2.2.9.5 Ethidiumbromid-Interkalationsassay

Prinzip

Diese Methode diente der Evaluierung des Kondensierungsgrades der DNA in DNA-Komplexen in Lösung. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids kann nach Interkalation in der DNA bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm gemessen werden. Kondensierte DNA nimmt jedoch weniger Ethidiumbromid auf, so daß die Intensität des Fluoreszenzsignals als Maß für den Kondensierungsgrad der DNA verwendet werden kann.

Durchführung

100 µl Partikellösung entsprechend 2 µg DNA wurden mit 100 µl Partikelherstellungsmedium verdünnt und anschließend mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Messung erfolgte im UV-Spektrofluorometer nach Angaben des Herstellers.

Als Kontrolle für den linearen Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der DNA-Konzentration unter den experimentellen Bedingungen wurde nackte DNA bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen.

2.2.10 Transmissionselektronenmikroskopie von transfizierten Zellen

Die folgende Methode basiert auf eine von Russel und Burguet etablierte Technik und erlaubt eine Untersuchung der Zellaufnahme und des intrazellulären Werdegangs von DNA-Komplexen, ohne für eine anschließende Detektion markierte DNA verwenden zu müssen.

Transfizierte Zellen wurden in 2 % Glutaraldehyd in CD bei 4 °C 2 Stunden fixiert, danach in CD gewaschen und übernacht in CD belassen. Zur Postfixierung wurden die Zellen nochmals in CD gewaschen und in 1 % OsO₄ und 1.5 % K₄Fe(CN)₆ in CD eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrinen in H₂O wurden die Zellen heruntergeschabt, bei 1500 rpm 5 Minuten pelletiert und anschließend graduell in Ethanol dehydriert. Die Dehydratation betrug 10 Minuten in jeweils 50, 70, 90 % Ethanol und drei Mal 40 Minuten in 100 % Ethanol. Zum maximalen Erhalt der Lipidanteile wurde der 70 %-Ethanol Schritt in 1 % p-Phenylendiamin durchgeführt. Die darauffolgende Einbettung der Zellen erfolgte zunächst in drei Schritten von jeweils drei Stunden mit höher werdendem Epon-Anteil der Mischung. Dazu wurde das Pellet in 33.33 % Epon 812 plus 66.66 % Ethanol, dann in 50 % Epon 812 plus 50 % Ethanol und schließlich in 66.66 % Epon 812 plus 33.33 % Ethanol gebracht. Schließlich erfolgte eine Übernachtinkubation von weiteren 12 Stunden in 100 % Epon 812. Zur Polymerisierung der Resine wurde das Pellet erneut mit 100 % Epon 812 beschichtet und 48 Stunden lang bei 60 °C inkubiert. Nach dem Einbetten wurden 70 nm Dünnschnitte mit dem Ultramikrotom hergestellt, diese auf Kupfernetze gebracht und schließlich zur Kontrastierung gefärbt. Dazu wurden die Netze 30 Minuten in 5 % Uranylacetat getaucht, drei Mal in H₂O gewaschen, 20 Sekunden in 0.1 % Bleicitrat getaucht, nochmals 3 Mal in H₂O gewaschen und 10 Minuten luftgetrocknet. Die Beobachtung der Schnitte erfolgte mit dem EM 900 Transmissionselektronenmikroskop bei 60 oder 80 Beschleunigungsvoltzahl.

2.2.11 *In vivo*-Gentransfer in Transplantationstumore von Nude-Mäusen

Der Nanopartikel-vermittelte *in vivo*-Gentransfer wurde in humanen Transplantationstumoren von Nude-Mäusen untersucht. Die Herstellung der Tumormäuse, die Verabreichung der Partikel, die Tötung der Mäuse und die Extraktion der Tumore und weiterer Organe (Leber, Milz, Herz, Niere, Gehirn, Lunge) wurde von der Firma EPO GmbH Berlin-Buch durchgeführt.

Zur Herstellung der Tumore wurden 10⁷ HCT 116-Zellen Nude-Mäusen dorsal subkutan injiziert. Nach 2-3 Wochen waren etwa 5 mm-große Tumore herangewachsen. Zur Transfektion wurden 58 µl Nanopartikellösung innerhalb von 30 Minuten nach ihrer Herstellung durch

direkte Nadelinjektion in die Tumore injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere geopfert, die Tumore sowie weitere Organe (s.o.) extrahiert und auf Trockeneis eingefroren. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurde das Luziferase-Assay-System von Promega verwendet. Dazu wurden die Organe nach Zugabe von 700 μ l Lysispuffer homogenisiert. Danach wurde das Homogenat 5 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert und 20 μ l des Überstands zur Messung der Luziferase-Aktivität, wie unter 2.2.7.4 beschrieben, eingesetzt.

Zur Untersuchung einer möglichen Toxizität der Nanopartikel wurden 100, 200 bzw. 400 μ l Partikellösung in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Danach wurden die Tiere 2 Wochen lang in ihrem Verhalten beobachtet sowie 2 Mal pro Woche gewogen.