

CHARAKTERISIERUNG NEUARTIGER LIGANDEN FÜR
DEN ZIELGERICHTETEN NICHTVIRALEN GENTRANSFER
POLYETHYLENIMIN-BASIERTER NANOPARTIKEL IN DIE LUNGE
- *IN VITRO* UND *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN -

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

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

vorgelegt von

MARKUS ELFINGER
aus München

März 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller
2. Gutachter: PD Dr. Josef Rosenecker

Disputation am: 17.07.2008

meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	7
1.1. Grundlagen der Gentherapie	7
1.2. Klinische Studien – Hoffnungen und Rückschläge	8
1.3. Vektoren und Transfersysteme in der Gentherapie	11
1.4. Aufnahme und intrazellulärer Transport kationischer Polymer/pDNA-Partikel	22
1.5. Rezeptor-vermittelter Gentransfer	27
1.6. Die Lunge als Zielorgan in der Gentherapie	32
1.7. Zielsetzung dieser Arbeit	34
2. Material und Methoden	36
2.1. Verwendete Reagenzien	36
2.2. Verbrauchsmaterial	37
2.3. Verwendete Geräte	38
2.4. Zellkultur	38
2.5. Plasmide	40
2.6. Synthese Lactoferrin-modifizierter Konjugate	40
2.7. Synthese Clenbuterol-modifizierter Konjugate	42
2.8. Quantitative Nachweisreaktionen	43
2.9. Rezeptorbindungsstudien	44
2.10. Herstellung der Gentransferkomplexe	46
2.11. Charakterisierung der Gentransferkomplexe	50
2.12. <i>In vitro</i> Untersuchungen	52
2.13. <i>In vivo</i> Untersuchungen	54
2.14. Statistische Berechnungen	60

3. Lactoferrin als Ligand für den nichtviralen Gentransfer	61
3.1. Synthese von Lf-FTSC und Lf-PEI	61
3.2. Zelluläre Aufnahme von Lf-FTSC bei Alveolar- und Bronchialepithelzellen	62
3.3. Charakterisierung der Gentransferkomplexe	65
3.4. <i>In vitro</i> Transfektionsstudien	66
3.5. Zellviabilität	70
3.6. <i>In vivo</i> Applikation	71
3.7. Diskussion	75
4. Clenbuterol als Ligand für den nichtviralen Gentransfer	79
4.1. Synthese von PEI- <i>g</i> -Clen und Alexa-BSA-Clen	79
4.2. Inkubation von Alexa-BSA-Clen	80
4.3. Charakterisierung der Gentransferkomplexe	82
4.4. <i>In vitro</i> Transfektionsstudien	84
4.5. Zellviabilität	88
4.6. <i>In vitro</i> Vernebelung	89
4.7. <i>In vivo</i> Applikation	92
4.8. Diskussion	99
5. Insulin als Ligand für den nichtviralen Gentransfer	104
5.1. Untersuchungen zum Insulinrezeptor	104
5.2. Biophysikalische Charakterisierung der Polyplexe	106
5.3. <i>In vitro</i> Transfektionsstudien	110
5.4. Zellviabilität	113
5.5. Diskussion	115

6. Zusammenfassung	118
7. Summary	122
8. Anhang	126
8.1. Abkürzungen	126
8.2. Abbildungsverzeichnis	129
8.3. Tabellenverzeichnis	132
9. Referenzen	133
Danksagung	149
Publikationen	151
Curriculum Vitae	153

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Gentherapie

Bei der Gentherapie handelt es sich um das Einbringen genetischer Informationen in Zellen oder Gewebe eines Individuums. Ziel dabei ist die Heilung, Linderung oder Prophylaxe von Krankheiten. Im Zusammenhang mit einer gentherapeutischen Behandlung ist zwischen dem Eingriff in Körperzellen (somatische Gentherapie) und Keimzellen (Keimbahntherapie) zu unterscheiden. Letzteres ist jedoch durch das deutsche Embryonenschutzgesetz verboten.

Im Rahmen der somatischen Gentherapie werden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten unterschieden. Anfänglich stand zunächst die Behandlung vererbter, monogenetischer Erkrankungen im Vordergrund. Diese sind auf den Defekt eines einzelnen Gens zurückzuführen, wie beispielsweise verschiedene schwere Immundefekte (SCID) oder die Zystische Fibrose (Mukoviszidose). Durch die Reparatur des beschädigten Gens (sog. „Genkorrektur“) soll hierbei eine vollständige Heilung des Patienten erzielt werden. Als weitere Möglichkeiten umfasst die Gentherapie die „Genaddition“, bei der eine funktionell intakte Gen-Kopie in die erkrankte Zelle eingebracht wird und die „Antisense-Therapie“, welche als Ziel eine Inaktivierung überexprimierter pathogener Gene besitzt. Somit geht der Einsatz therapeutischer Nukleinsäuren (z.B. DNA, siRNA, mRNA), die hierbei im Sinne eines Arzneimittels fungieren, weit über die ausschließliche Behandlung monogenetischer Erkrankungen hinaus. Fortschritte erhofft man sich auch für die Therapie erworbener Erkrankungen, beispielsweise in den Bereichen Kardiologie, Onkologie oder Neurologie. Zusätzlich befindet sich im Fokus der Forschung die Entwicklung gentherapeutischer Impfstoffe.

Die Verabreichung therapeutischer Gene kann entweder *in vivo* oder *ex vivo* durchgeführt werden. Zur *in vivo* Behandlung wird das Gen direkt in den Patienten appliziert. Im Gegensatz dazu beinhaltet die *ex vivo* Gentherapie zuerst die Entnahme von Zellen (z.B. Blutzellen) des Patienten als Primärmaterial. Nachdem diese im Labor kultiviert wurden, wird das gewünschte Gen *in vitro* in die Zellen eingebracht. Als abschließender Schritt erfolgt die kontrollierte Rückführung der veränderten Zellen in den Organismus des Patienten.

Aufgrund des enormen Potentials, welches sich für die moderne molekulare Medizin ergeben könnte, erfährt die Gentherapie sowohl in der Grundlagenforschung wie auch im Bereich der klinischen Anwendung derzeit viel Aufmerksamkeit. Ein momentan limitierender Faktor im Hinblick auf eine erfolgreiche therapeutische Behandlung ist jedoch der effiziente Transfer von Nukleinsäuren nach erfolgter Applikation. Sowohl DNA als auch RNA müssen für deren Wirksamkeit in das

Zytoplasma der Zielzelle transportiert werden, für die Transkription der DNA ist zusätzlich das Erreichen des Zellkernes notwendig. Eine große Herausforderung besteht somit in der technologischen Entwicklung geeigneter Gentransfervektoren. Neben der kontrollierten Expression des therapeutischen Gens im gewünschten Zielgewebe muss dabei ebenfalls auf die Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen wie z.B. Zelltoxizität oder karzinogenen Veränderungen des Gewebeverbandes geachtet werden. Im Moment ist jedoch noch keine Methode verfügbar, die alle diese Kriterien vollständig erfüllt und somit einen sicheren und effizienten Gentransfer liefert.

1.2. Klinische Studien – Hoffnungen und Rückschläge

Obwohl die Gentherapie derzeit noch nicht als Standard zur Behandlung von Krankheiten etabliert ist, werden pro Jahr ca. 100 neue klinische Studien gestartet. Von den bisher weltweit insgesamt etwa 1300 laufenden oder abgeschlossenen Untersuchungen in 28 Ländern wurden gut zwei Drittel in den USA durchgeführt. Die restlichen Studien fanden fast ausschließlich in europäischen Staaten statt, Asien spielte mit weniger als 3% bislang noch eine untergeordnete Rolle. Deutschland befindet sich hinter England auf Platz 3 der Statistik. Die meisten Untersuchungen befinden sich noch in Phase I oder I/II der klinischen Entwicklung, Phase III macht bislang lediglich einen Anteil von 3,4% aus. Hier ist jedoch ein positiver Trend im Vergleich zu zurückliegenden Jahren zu beobachten (Edelstein *et al.*, 2007).

Die weltweit erste Studie, bei der das erfolgreiche Einbringen eines fremden Gens in einen Menschen demonstriert werden konnte, fand im Jahre 1989 in den USA statt. Ein Forscherteam um Steven A. Rosenberg schleuste mittels eines Retrovirus *ex vivo* ein Neomycin-Resistenzgen in Tumor-infiltrierende Lymphozyten ein. Die transduzierten Zellen wurden in fünf Patienten mit fortgeschrittenem metastasierendem Melanom injiziert, von denen im Anschluss vier als resistent gegen ein Neomycin-Analogon getestet werden konnten (Rosenberg *et al.*, 1990). Diese Untersuchung zeigte somit die prinzipielle Realisierbarkeit der Gentherapie und setzte einen wichtigen Grundstein für weitere klinische Studien.

Kurze Zeit später erfolgte ein erster therapeutischer Ansatz der Gentherapie. 1990 wurde eine Studie an zwei Mädchen durchgeführt, welche an einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) aufgrund von Adenosindeaminase (ADA)-Mangel litten (Blaese *et al.*, 1995). Bei dieser Art von Erkrankung ist das Immunsystem derart geschwächt, dass bereits einfache Infektionen zum Tod führen können, weshalb sich die Patienten stets in einer abgeschlossenen sterilen Umgebung

aufhalten müssen. Für die Behandlung wurde das ADA-Gen *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor in patienteneigene T-Lymphozyten eingebracht, welche anschließend retransfundiert wurden. Die Prozedur wurde gut vertragen und nachdem die Therapie erfolgreich war stieg ab diesem Zeitpunkt die Anzahl der begonnenen Studien rasant an.

Die anfängliche Begeisterung wurde am 17. September 1999 abrupt durch den ersten Todesfall im Zusammenhang mit einer Gentherapie getrübt. Dem 18-jährigen Jesse Gelsinger wurde zur Behandlung seiner Insuffizienz an Ornithin Transcarbamylase (OTC) die für OTC codierende cDNA mittels eines Adenovirus als Genvektor verabreicht. 4 Tage nach der Applikation verstarb er durch eine unerwartete und verheerende Immunreaktion (Marshall, 1999; Raper *et al.*, 2003). Als Konsequenz daraus wurden diese und andere Studien im Januar 2000 von der FDA gestoppt. Im Jahr 2005 erklärte der oberste Gerichtshof der USA die durchführende Universität von Pennsylvania und das Children's Medical Center in Washington D.C. für den Tod des Patienten verantwortlich. Beiden Institutionen wurde eine Geldstrafe von jeweils mehr als 500.000 USD und Restriktionen für die verantwortlichen Ärzte auferlegt.

Neue Hoffnung entflammte im Jahr 2000, als aus Frankreich die erfolgreiche Behandlung von Kindern mit einer seltenen Form des X-chromosomalen schweren kombinierten Immundefektes (X-SCID) berichtet wurde (Cavazzano-Calvo *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um eine fehlerhafte Differenzierung der T- und natürlichen Killer (NK)-Lymphozyten, hervorgerufen als Folge einer Mutation des Genes, welches für die γ_c -Zytokin-Rezeptor-Untereinheiten der IL-2, -4, -7, -9 und -15 Rezeptoren codiert. Als Konsequenz müssen sich die Patienten ähnlich wie beim ADA-Mangel konsequent in einer sterilen Umgebung aufhalten. Ein unerwarteter Rückschlag erfolgte im Jahr 2002, als 2 der 10 behandelten Kinder an Leukämie erkrankten (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003a). Die Studie wurde freiwillig unterbrochen und bei der Ermittlung der Ursache stellte sich heraus, dass diese schwerwiegende Nebenwirkung auf die Integration des verwendeten Retrovirus nahe dem LMO2 Proto-Onkogen-Promotor zurückzuführen war (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b). An parallel durchgeführten Studien in Großbritannien und Australien konnten jedoch in der Zwischenzeit weitere Erfolge verzeichnet werden (Gaspar *et al.*, 2004; Ginn *et al.*, 2005). Die französische Studie wurde daraufhin mit einem überarbeiteten Protokoll wieder gestartet. Im Jahr 2005 kam es dabei bei einem dritten Kind zu einer unkontrollierten Proliferation von Blutzellen (Check, 2005). Die eingeleitete Chemotherapie der Leukämie gelang bei zwei der drei Patienten, eines der Kinder der ersten Behandlungsrunde verstarb jedoch im Oktober 2004. Seit Jahresbeginn 2007 wurden ein vierter Leukämiefall aus Frankreich und ein erster Fall aus England gemeldet. Somit verstärkt sich der Verdacht, dass deren Auftreten unabhängig vom verwendeten Protokoll zu

sein scheint. Obwohl die restlichen Patienten eindeutig aus der Behandlung ihrer Immundefizienz profitiert haben und seitdem am normalen Leben teilnehmen können, besteht auch bei ihnen die Gefahr von langfristig unkontrollierbaren Nebenwirkungen.

Das Auftreten der Leukämieerkrankungen führte weltweit zu einer Einschränkung der bis daher ungebremsten Euphorie, einer aufflammenden Debatte über die Möglichkeiten sowie Risiken der Gentherapie und zu einer Verlangsamung der klinischen Entwicklung, nachdem die Zulassungsbehörden größere Hürden für neue Studien auferlegten. Glücklicherweise konnten in den letzten Jahren jedoch auch Erfolg versprechende Resultate der gentherapeutischen Behandlung von Patienten mit chronischer Granulomatose (Ott *et al.*, 2006), metastasierendem Melanom (Morgan *et al.*, 2006) und mit Parkinson (Edelstein *et al.*, 2007) publiziert werden.

Inzwischen befindet sich auch das erste Arzneimittel für die gentherapeutische Behandlung auf dem Markt. Das Produkt der chinesischen Firma SiBiono GeneTech mit dem Handelsnamen Gendicine® besteht aus einem Adenovirus, welcher ein Gen für das Apoptose-induzierende Tumorsuppressorprotein p53 trägt und ist für die Behandlung von Krebserkrankungen vorgesehen. Im Frühjahr 2004 erfolgte die Zulassung zur Produktion von der chinesischen Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln (SFDA). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist das Produkt jedoch umstritten. Forscher aus aller Welt beklagen sich über das Fehlen umfangreicher Daten zur klinischen Phase III. Die Zulassung in China erfolgte im Gegensatz zu Verfahren in Europa oder den USA lediglich auf Grundlage des Nachweises von Sicherheit und prinzipieller Wirksamkeit in Phase I- und Phase II-Studien. Des Weiteren liegt ein Großteil der Publikationen ausschließlich in chinesischer Sprache vor. Trotz aller Bedenken berichtete die Firma im Oktober 2007, bereits mehr als 10.000 Menschen mit Gendicine® behandelt zu haben (Peng, 2007).

Trotz einiger Rückschläge besitzt die Gentherapie nach wie vor das Potential, zu einem völlig neuartigen Ansatz für die Behandlung schwerwiegender Erkrankungen zu werden. Bei den derzeitigen Untersuchungen orientieren sich mehr als 66% der Studien an der Behandlung von Tumoren, doch auch kardiovaskuläre und vererbare monogenetische Erkrankungen befinden sich im Fokus der Wissenschaft (Edelstein *et al.*, 2007). Am häufigsten verwendete Vektoren für die bisherigen Studien waren bislang mit einem Anteil von mehr als zwei Dritteln virale Systeme. Nachdem jedoch ernsthafte Bedenken bezüglich ihrer Sicherheit bestehen, werden zunehmend auch nichtvirale Systeme eingesetzt. Eine genaue Verteilung der bislang verwendeten Vektoren in klinischen Studien gibt ABBILDUNG 1.1.

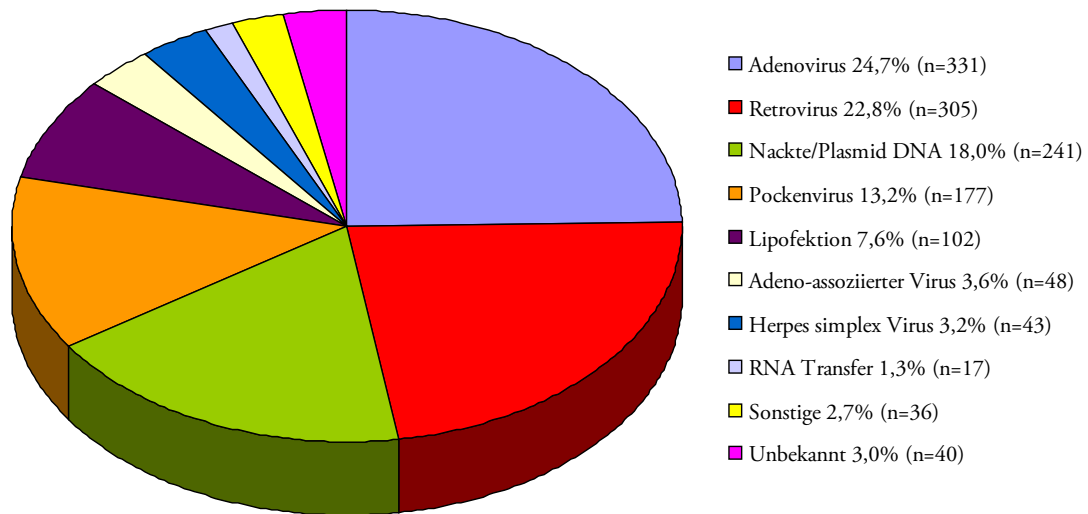


ABBILDUNG 1.1: Verwendete Gentransfersysteme in klinischen Studien bis 2007 (Quelle: Edelstein *et al.*, 2007)

1.3. Vektoren und Transfersysteme in der Gentherapie

Ein Vektor für den Gentransfer kann als System beschrieben werden, welches verschiedene Anforderungen erfüllen muss (Gardlik *et al.*, 2005):

- (1) effizienter Transport des therapeutischen Gens in die Zielzelle und ihren Zellkern
- (2) Schutz des Gens vor dessen Zerstörung
- (3) kontrollierte Genexpression am Zielort

Ein optimales Gentransfersystem sollte zusätzlich für klinische Anwendungen geeignet, preiswert und relativ einfach in großen Mengen herstellbar sein. Zwei verschiedene Transportsysteme wurden für die Applikation von DNA entwickelt. Diese können grundsätzlich in virale und nichtvirale Methoden unterteilt werden. (TABELLE 1.1). Jede Klasse besitzt individuelle Stärken und Schwächen, welche teilweise gegensätzlich zueinander ausfallen. Leider konnte bislang noch kein ideales Vektorsystem entwickelt werden, welches allen Ansprüchen bezüglich eines sicheren und effizienten Gentransports gerecht wird.

Virale Systeme	Nichtvirale Systeme
Retroviren	Nackte DNA
Lentiviren	Elektroporation
	„Gene gun“
Adenoviren	Ultraschall
	Hydroporation
Adeno-assoziierte Viren	
	Einschluss/Adsorption der DNA
Herpesviren	Neutrale/Anionische Lipide
	Microbubbles
	Komplexbildung
	Kationische Lipide
	Kationische Polymere
	Magnetofektion

TABELLE 1.1: Aktuelle Gentransfervektoren

1.3.1. Virale Gentransfervektoren

Nachdem es in der Natur eines Virus liegt, dessen Gene in die Wirtszelle einzubringen, repräsentiert dieser auf den ersten Blick einen geeigneten Kandidaten für den Gentransfer. In der Gentherapie verwendete Viren werden durch rekombinante Techniken so verändert, dass sie ihre Replikationseigenschaften und Pathogenität verloren haben. Hierbei wird ein Teil des viralen Genoms entfernt und durch ein therapeutisches Gen ersetzt. Alle für die Bindung an die Wirtszelle und Einschleusung der DNA benötigten Bestandteile bleiben jedoch erhalten. Virale Systeme zeichnen sich insbesondere durch ihre hohe Effizienz aus. Es konnte gezeigt werden, dass bereits die Bindung eines einzigen Viruspartikels in der Lage ist, die Zelle zu infizieren (Seisenberger *et al.*, 2001). Das Einbringen von fremden Genen in Zellen mittels viraler Systeme wird als „Transduktion“ bezeichnet. Verschiedene virale Vektoren werden derzeit in der Gentherapie eingesetzt (TABELLE 1.1)

1.3.1.1. Retroviren

Retroviren waren eine der ersten viralen Vertreter, welche für die klinische Gentherapie verwendet worden sind. Bei ihnen handelt es sich um membranumhüllte RNA-Viren mit einem Genom von ca. 10 kB. Für den Gentransfer kann dieses mit Fremd-DNA von bis zu einer maximalen Größe von 8 kB ersetzt werden. Nach der Infektion der Zelle wird die einzelsträngige RNA mittels Reverser Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche im Anschluss in das Chromosom des

Wirtes fest eingebaut wird. Durch die stabile Integration wird die virale Information auch während der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben, was in der langfristig orientierten Gentherapie von chronischen Erkrankungen einen Vorteil darstellt. Hierin besteht jedoch auch ein hohes Risiko, da durch den scheinbar zufälligen Einbau in das Genom Mutationen hervorgerufen werden können, welche sich z.B. in der Entstehung von Tumoren oder Leukämie äußern (siehe KAPITEL 1.2). Da Retroviren nur Zellen infizieren können, welche sich in der Teilungsphase befinden, sind sie nicht unbedingt für die *in vivo* Anwendung ausgelegt. Ihr Schwerpunkt liegt in der *ex vivo* Therapie, bei der sie insbesondere Erfolge in der Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen erlangen konnten (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002). Lentiviren, welche eine Untergruppe der Retroviren mit erweiterten Proteingensequenzen darstellen, sind in der Lage, auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Delenda, 2004). Prominentester Vertreter dieser Gruppe ist das HI-Virus (HIV).

1.3.1.2. Adenoviren

Um den Schwächen und Risiken der Retroviren entgegenzuwirken, wurden Adenoviren für die Gentherapie entwickelt. Diese normalerweise oft für die Entstehung grippaler Infekte und gutartiger Atemwegserkrankungen verantwortlichen Viren besitzen eine ikosaedrische Form und ein doppelsträngiges DNA-Genom von 30-40 kB, in welchem sich fremde DNA mit einer Größe von bis zu 8,5 kB transportieren lässt (Gardlik *et al.*, 2005). Derzeit sind mehr als 50 Serotypen bekannt, von denen gentherapeutisch hauptsächlich die Typen 2 und 5 eingesetzt werden. Da durch Adenoviren eine Transduktion von sowohl sich teilenden wie auch bereits ausdifferenzierten Zellen erfolgen kann, ist eine hohe Gentransfereffizienz in verschiedensten Geweben möglich (Volpers und Kochanek, 2004). Adenoviren replizieren sich episomal, werden daher nicht in das Wirtsgenom integriert und bergen somit keine Gefahr der insertionellen Onkogenese. Die erfolgte Genexpression ist bedingt durch diesen Mechanismus jedoch nur von kurzer Dauer.

Ein gravierender Nachteil besteht in der natürlichen humanen Immunogenität gegen einen Großteil der adenoviralen Subtypen. So wird durch Entzündungs- und Immunreaktionen die klinische Anwendung auf einige wenige Gebiete (z.B. lokale Therapie von Krebserkrankungen) eingeschränkt und die wiederholte Applikation ausgeschlossen. Eine systemische Verabreichung kann zu ernsthaften Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie oder einem Multiorganversagen führen, auf welches bereits ein Todesfall während einer klinischen Studie zurückzuführen ist (Raper *et al.*, 2003). Leider konnte auch durch Modifizierungen des immunauslösenden Kapsidproteins bislang keine Besserung herbeigeführt werden.

In klinischen Studien werden derzeit am häufigsten Adeno- und Retroviren eingesetzt. Neben diesen beiden Gruppen gelangen zunehmend jedoch auch andere virale Systeme in den Fokus der Gentherapie. So wurden bereits erfolgreiche Ergebnisse mit Adeno-assoziierten Viren (Grimm und Kleinschmidt, 1999) und Herpesviren (Lachmann, 2004) erzielt. Die Probleme hinsichtlich Immunogenität und Mutagenität konnten trotz allem bislang von keinem viralen Vektor zufrieden stellend gelöst werden. Dies birgt ein unkalkulierbares Risiko und stellt somit eine starke Einschränkung für die therapeutische Nutzung dar. Aus diesem Grund werden Bestrebungen für die Entwicklung alternativer Gentransfersysteme angestellt.

1.3.2. Nichtvirale Gentransfervektoren

Nichtvirale Gentransfersysteme besitzen einige Vorteile gegenüber viralen Systemen, welche sie als eine attraktive Alternative erscheinen lassen. Der wohl wichtigste Aspekt ist deren fehlende bzw. nur geringe Immunogenität, welches die Voraussetzung für eine wiederholte Applikation darstellt. Des Weiteren lassen sie sich preiswert und relativ leicht in großen Mengen synthetisieren und flexibel entsprechend jeweiliger Anforderungen modifizieren. Zusätzlich ist es möglich, im Vergleich zu viralen Systemen größere Gene aufzunehmen und zu transportieren. Nichtsdestotrotz erfüllen auch nichtvirale Vektoren bislang noch nicht alle Anforderungen an ein optimales Gentransfersystem. Der derzeit größte Nachteil besteht in ihrer geringen Transfektionseffizienz. Verglichen mit viralen Systemen ist diese im Allgemeinen um ein Vielfaches niedriger und kann nur teilweise durch die Verwendung höherer DNA-Mengen ausgeglichen werden.

Die Einbringung eines fremden Gens in die Zelle mittels nichtviraler Methoden wird als „Transfektion“ bezeichnet. Einen Überblick über die verschiedenen nichtviralen Gentransfersysteme gibt TABELLE 1.1. Derzeit werden am häufigsten 3 verschiedene Methoden verwendet:

- (1) Transfer „nackter“ DNA
- (2) Transfer mit Hilfe von Lipiden
- (3) Transfer mit Hilfe von Polymeren.

1.3.2.1. Nackte Plasmid-DNA

Das einfachste nichtvirale Gentherapiesystem besteht in der direkten Applikation ungeschützter Plasmid-DNA (sog. „nackter“ DNA). Innerhalb der Gruppe der nichtviralen Methoden kam

dieses System bei klinischen Studien bislang am häufigsten zur Anwendung (Edelstein *et al.*, 2007). Insbesondere für die gentherapeutische Behandlung von Muskelgewebe scheint die Injektion nackter DNA (Wolff *et al.*, 1990) die Methode der Wahl darzustellen und resultiert im Vergleich zur Injektion von Lipoplexen in höherer Genexpression (Yang *et al.*, 1996). Hier spielt wohl das im Muskelgewebe relativ geringe Vorkommen von Nukleasen eine entscheidende Rolle. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, welche für den Abbau von DNA verantwortlich sind und somit normalerweise bei Verwendung ungeschützter DNA ein fundamentales Problem darstellen (Barry *et al.*, 1999). Insbesondere nach systemischer Applikation ist die Genexpression aufgrund von DNA-Degradation stark eingeschränkt. Eine Ausnahme bildet die intravenöse Injektion großer Volumina nackter DNA innerhalb kurzer Zeit mit erhöhtem Druck (sog. hydrodynamische Applikation oder Hydroporation), welche zu hoher Genexpression in den Hepatozyten der Leber führt (Liu *et al.*, 1999). Diese Methode konnte bereits in eine klinische Studie übertragen werden. Plasmid-DNA, welche für Thrombopoetin codiert, wurde dabei erfolgreich mittels eines angelegten Katheters zur Portalvene der Leber von Patienten mit Zytostatika-induzierter Thrombozytopenie transportiert (Habib, 2006). Des Weiteren besitzt auch die Vakzinierung mittels nackter DNA hohes Potential. Auf diesem Gebiet konnten bereits einige Erfolg versprechende Resultate erzielt werden (Wang *et al.*, 2004).

Eine Reihe von Strategien wurden entwickelt, um die Transfektionseffizienz nackter DNA zu steigern. So bietet sich für deren Applikation insbesondere die Kombination mit physikalischen Methoden an. Gute Ergebnisse konnten bislang durch den Partikelbeschuss der Zelle mit DNA-beschichteten Metallkügelchen („Gene gun“) (Kuriyama *et al.*, 2000), der Elektroporation (Somari *et al.*, 2000) und der Anwendung von Ultraschall (Bao *et al.*, 1997) erzielt werden.

Nachdem die systemische Verwendung nackter DNA *in vivo* meist jedoch stark eingeschränkt ist, wurden verschiedene nichtvirale Systeme entwickelt, um die Gentransfereigenschaften zu verbessern. Diese bestehen grundsätzlich aus 3 Komponenten:

- (1) eine Nukleinsäure (DNA), welche für ein therapeutisches Protein codiert
- (2) ein Vektorsystem, welches die Genexpression innerhalb der Zielzelle kontrolliert
- (3) ein Gentransfersystem, welches das Vektorsystem an den Ort der Genexpression transportiert

Die derzeit größte Relevanz besitzen dabei Lipoplexe und Polyplexe. Diese basieren auf der Komplexbildung zwischen unter physiologischen Bedingungen negativ geladener Plasmid-DNA und positiv geladenen kationischen Lipiden bzw. kationischen Polymeren zu Partikeln im

Nanometerbereich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung. Dadurch kann die DNA vor der enzymatischen Zerstörung durch Nukleasen wirkungsvoll geschützt werden.

1.3.2.2. Kationische Lipide

Im Gegensatz zu anionischen und neutralen Lipiden bilden kationische Lipide spontan einen Komplex mit DNA und wurden 1987 erstmalig für den *in vitro* Gentransfer beschrieben (Felgner *et al.*, 1987). Das dabei verwendete DOTMA (ABBILDUNG 1.2) diente seitdem als Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung einer großen Anzahl verschiedener Strukturen, welche im Anschluss auf ihre Eignung für den nichtviralen Gentransfer untersucht wurden. Auch konnten bereits erfolgreich klinische Studien mit kationischen Lipiden durchgeführt werden (Laitinen *et al.*, 2000).

Alle kationischen Lipide sind amphiphil und nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut. Sie enthalten eine hydrophobe „Schwanz“-Gruppe und eine hydrophile „Kopf“-Gruppe. Der hydrophobe Teil besteht meist aus ein oder zwei Fettsäure- bzw. Alkanketten mit einer Länge von 12 bis 18 Kohlenstoffatomen oder einer Cholesteroleinheit. Er stellt sicher, dass sich die kationischen Lipide bei Dispersion in wässrigen Medien zu einer vesikelähnlichen Struktur mit Doppelmembran, den Liposomen, zusammenlagern. Dabei ist die hydrophobe Struktur für strukturelle Unterschiede und individuelle Spezifität der einzelnen kationischen Lipide verantwortlich, während die Bindung der DNA über den hydrophilen Teil erfolgt.

Neben DOTMA wird heutzutage vor allem DOTAP (Leventis und Silvius, 1990) für den Gentransfer verwendet. Letzteres ist aufgrund der Estergruppe zwar etwas instabiler als DOTMA mit dessen Etherbindung (ABBILDUNG 1.2), zeigt dafür jedoch eine geringere Toxizität. Um die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* zu steigern, werden den kationischen Lipiden vor der Komplexbildung oftmals neutrale Lipide als so genannte Co- oder Helferlipide zugesetzt, welche eine Fusion mit der Zellmembran und somit verbessertes Eindringen in die Zelle vermitteln sollen. Weit verbreitet sind hier Cholesterol und DOPE (Kikuchi *et al.*, 1999). Mischungen aus DOTMA und DOPE mit einem Verhältnis von 1:1 sind auch unter dem Namen Lipofectin® als kommerzielles *in vitro* Gentransferkit erhältlich.

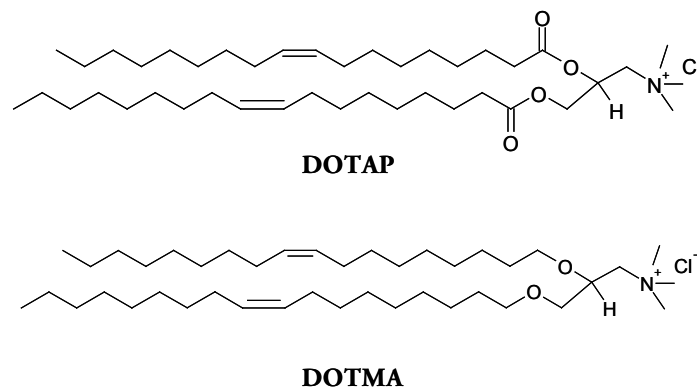


ABBILDUNG 1.2: Strukturformeln der kationischen Lipide DOTAP und DOTMA

Im Allgemeinen zeigen Lipoplexe aufgrund ihrer positiven Nettoladung gute Bindungsaffinität an die Zelloberfläche. Trotzdem besitzen sie oftmals nur eine relativ geringe Transfektionseffizienz. Dies könnte auf ihre schwache DNA-Kondensation zurückzuführen sein, welche zu instabilen und heterogenen Komplexen unterschiedlicher Größe führt (Lee *et al.*, 2001). Ein weiteres Problem der Lipoplexe stellt deren Zytotoxizität dar, welche bereits *in vitro* (Lappalainen *et al.*, 1994) und *in vivo* (Dokka *et al.*, 2000) beobachtet wurde.

1.3.2.3. Kationische Polymere

Gentransferkomplexe, welche aus kationischen Polymeren und Plasmid-DNA bestehen, werden Polyplexe genannt, der entsprechende Gentransfer in die Zelle als Polyfektion bezeichnet. Durch Variation der Kettenlänge bzw. des Verzweigungsgrades des Polymeren und des molaren Verhältnisses zur Plasmid-DNA kann die Nettoladung, Bindungsstärke und Größe der Komplexe gesteuert werden. Die derzeit wichtigsten Vertreter der kationischen Polymere für den nichtviralen Gentransfer sind in ABBILDUNG 1.3 dargestellt.

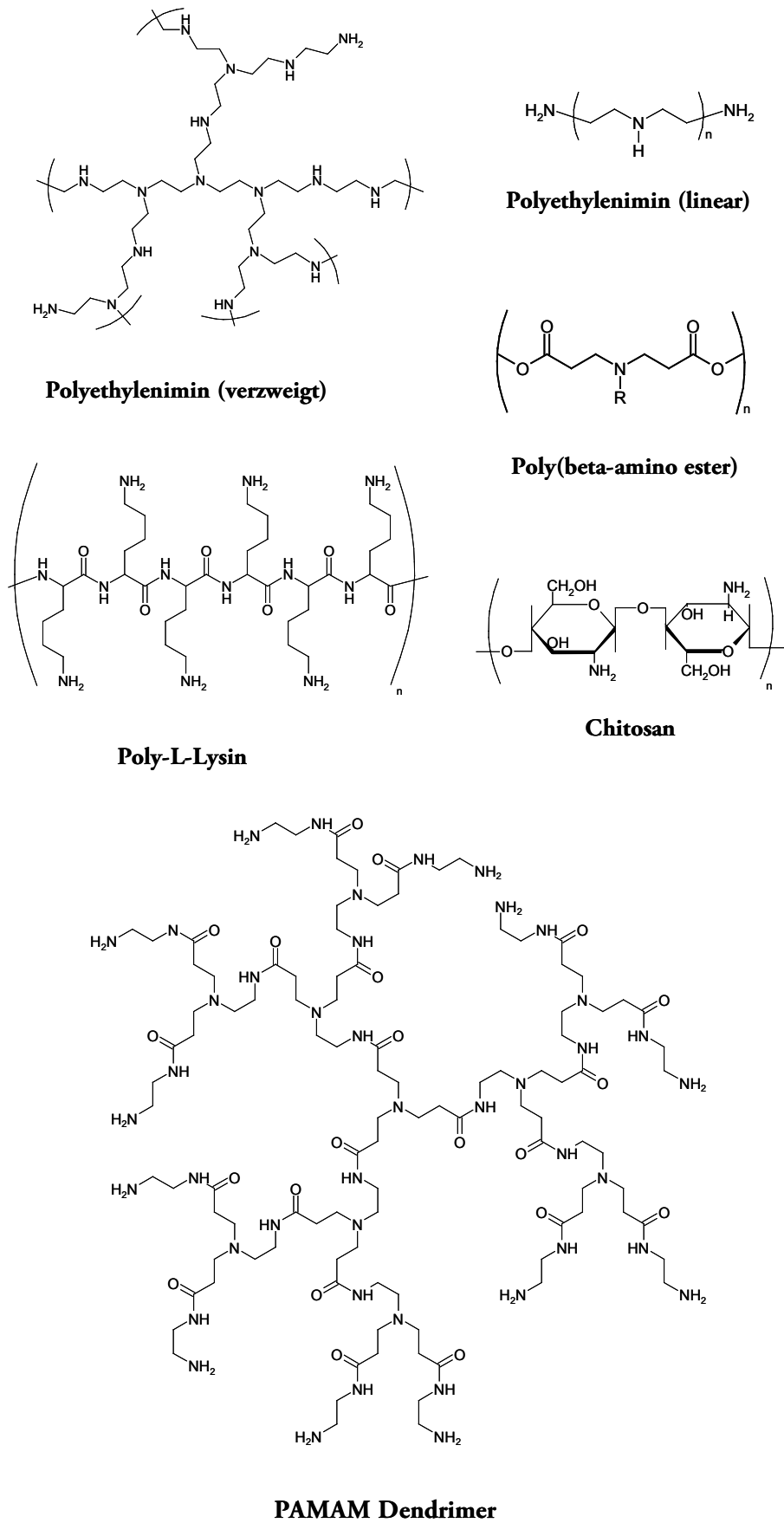


ABBILDUNG 1.3: Häufig verwendete kationische Polymere für den nichtviralen Gentransfer

Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (PLL) war eines der ersten Polymere, welches für den nichtviralen Gentransfer verwendet wurde (Wu und Wu, 1987). Es besitzt eine lineare Polypeptid-Struktur mit der Aminosäure Lysin als Einzelbaustein (ABBILDUNG 1.3). PLL gilt als das derzeit am besten untersuchte kationische Polymer für den DNA-Transfer, insbesondere im Zusammenhang mit *in vitro* Studien. Aufgrund seiner Bioabbaubarkeit ist es jedoch auch sehr gut für den Einsatz *in vivo* geeignet. Obwohl PLL/pDNA-Komplexe ähnlich effizient wie PEI-basierte Polyplexe in die Zelle aufgenommen werden, zeigen sie eine erheblich niedrigere Genexpression (Tiera *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu anderen kationischen Polymeren besitzt PLL keine Aminogruppen mit pKa- Werten zwischen 5 und 7, welche für den „Protonenschwammeeffekt“ verantwortlich gemacht werden (siehe KAPITEL 1.4.3). Dies hat zur Folge dass die Endosomolyseaktivität herabgesetzt ist und die transportierte DNA nicht ins Zytoplasma entlassen werden kann (Sonawane *et al.*, 2003). Daraufhin verbleibt sie in sauren Lysosomen und wird abgebaut (Akinc und Langer, 2002). Nichtsdestotrotz ist auch PLL in der Lage, durch den Zusatz von Hilfssubstanzen höhere Transfektionseffizienzen zu erzielen. Insbesondere fusogene bzw. membrandestabilisierende Peptide und Chloroquin zeigten bereits gute Ergebnisse (Wagner *et al.*, 1992; Pouton *et al.*, 1998). Eine weitere Strategie liegt in der kovalenten Kopplung von Imidazol-enthaltenden Strukturen, welche durch ihre funktionellen Gruppen mit einem pKa-Wert von ca. 6 zusätzliche Pufferkapazität schaffen (Midoux und Monsigny, 1999). Trotz allem ist der Einsatz von PLL in klinischen Studien aufgrund der schlechten Transfektionseigenschaften derzeit eher unwahrscheinlich.

Polyethylenimin

Polyethylenimin wurde erstmals 1995 erfolgreich für den nichtviralen Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt (Boussif *et al.*, 1995). Seitdem war es Gegenstand vieler Untersuchungen und besitzt derzeit den Rang als Referenz bzw. „Goldstandard“ innerhalb der kationischen Polymere. Die Grundstruktur des gut wasserlöslichen Moleküls ist eine einfache Wiederholung von CH₂-CH₂-NH Ethylenimin-Einheiten (ABBILDUNG 1.3), von denen jede eine Masse von 43 Da besitzt. Abhängig von ihrem Verzweigungsgrad werden Polyethylenimine in zwei Hauptgruppen unterteilt. Verzweigte Polyethylenimine beinhalten primäre, sekundäre und tertiäre Amin-Gruppen, während lineare Varianten größtenteils aus sekundären Aminen bestehen. Derzeit für den Gentransfer am häufigsten eingesetzten Typen besitzen Molekulargewichte von 25 kDa (verzweigt) bzw. 22 kDa (linear), es wurden jedoch auch schon höher- oder niedermolekulare Polymere (z.B. 800 kDa, 2 kDa) verwendet. Die hohe Dichte an Amin-Funktionen verleiht den Polyethyleniminen gute Pufferkapazität über einen weiten pH-Bereich. So stellt jedes dritte Atom des Grundgerüsts einen prinzipiell

protonierbaren Stickstoff dar. Bei einem physiologischen pH-Wert von ca. 7 ist jedoch lediglich nur jeder fünfe oder sechste Stickstoff protoniert (Kircheis *et al.*, 2001). Fällt der pH auf einen Wert von 5 ab, wie es beispielsweise während des endosomalen Transportes passiert, steigt die Pufferkapazität von PEI weiter an. Aufgrund dieser Eigenschaft, auch bezeichnet als „Protonenschwammeeffekt“ (siehe KAPITEL 1.4.3), kann normalerweise auf einen Zusatz von weiteren endosomolytischen Molekülen verzichtet werden. Die hohe Dichte an kationischer Ladung ist zusätzlich ideal, um Nukleinsäuren effizient in kleine Partikel im Nanometerbereich zu komplexieren (Dunlap *et al.*, 1997), welches in einem guten Schutz der pDNA vor Degradation durch Nukleasen resultiert. In diesem Zusammenhang bestehen jedoch auch Unterschiede innerhalb der Polyethylenimine. So konnte gezeigt werden, dass Plasmid-DNA durch verzweigtes Polyethylenimin besser komplexiert wurde als durch die lineare Form (Huth *et al.*, 2006).

Polyethylenimine besitzen die mitunter höchste Transfektionseffizienz innerhalb der nichtviralen Gentransfersysteme. So konnte verglichen mit Liposomen eine bis zu 1000-fach höhere *in vitro* Genexpression beobachtet werden (Wiseman *et al.*, 2003). Die Effektivität von PEI erhöht sich dabei mit zunehmender Molmasse, während der pH-Wert scheinbar keinen bedeutenden Einfluss besitzt (Godbey *et al.*, 1999a). Im Allgemeinen zeigt lineares, verglichen mit verzweigtem PEI, eine höhere Gentransfereffizienz (Wightman *et al.*, 2001; Wiseman *et al.*, 2003). Bei *in vivo* Anwendungen konnten PEI-basierte Polyplexe bereits gute Ergebnisse im Hinblick auf den Gentransfer ins Gehirn (Abdallah *et al.*, 1996; Lemkine *et al.*, 1999), zur Niere (Boletta *et al.*, 1997) und in die Lunge (Ferrari *et al.*, 1997), zeigen. Nichtsdestotrotz führt die hohe Dichte an positiver Ladung auch zum größten Nachteil von PEI. Hohe Toxizität des Polymers wurde bereits mehrfach *in vitro* (Godbey *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003) wie auch *in vivo* (Chollet *et al.*, 2002) berichtet und schränkt die möglichen Einsatzgebiete ein. Das Toxizitätsprofil wird in diesem Zusammenhang von vielen Faktoren beeinflusst. So spielen insbesondere das Molekulargewicht, der Grad der Verzweigung und das Zeta-Potential eine wesentliche Rolle (Zhang *et al.*, 2004).

Poly(β -Aminoester)

Poly(β -Aminoester) besitzen ein typisches Molekulargewicht zwischen 1 und 60 kDa und eine Grundstruktur aus tertiären Aminen, von denen sich die Polymerstruktur zu beiden Seiten der Kette mittels Estergruppen ausbildet (ABBILDUNG 1.3). Ihr wesentlicher Vorteil liegt in der guten Bioabbaubarkeit, nachdem das Polymer bei pH 7,4 durch Hydrolyse in die entsprechende Aminosäure und das korrespondierende Diol gespalten werden kann. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Poly(β -Aminoester) bis zu Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ keine

Toxizität *in vitro* verursachen, wohingegen Addition von PEI im gleichen Konzentrationsbereich einen nahezu vollständigen Verlust der Zellaktivität verursachte (Zugates *et al.*, 2005). Nachdem das grundlegende Potential für den Gentransfer erstmals 2000 beschrieben worden war (Lynn und Langer, 2000), konzentrieren sich die gegenwärtigen Bemühungen auf die Entwicklung von halb- bzw. vollautomatischen Methoden zur Synthese großer Bibliotheken von Poly(β -Aminoestern) unterschiedlicher Struktur und deren Korrelation mit der Gentransfereffizienz (Anderson *et al.*, 2003). Erste vielversprechende *in vivo* Resultate nach der direkten Injektion in Prostatatumorgewebe konnten bereits gezeigt werden (Anderson *et al.*, 2005).

Dendrimere

Bei Dendrimern (griech. Dendros = der Baum) handelt es sich um gut definierte, kugelförmig geartete Makromoleküle mit einem Zentralmolekül, von welchem aus eine Vielzahl verzweigter Äste in einer symmetrischen Anordnung entspringen (ABBILDUNG 1.3). Bei der Synthese wird zwischen einem Aufbau von innen nach außen (divergente Synthese) und dem umgekehrten Weg von außen nach innen (konvergente Synthese) unterschieden. Es wurden bereits mehr als 50 verschiedene Familien von Dendrimern entwickelt, von denen im Hinblick auf den nichtviralen Gentransfer Polyamidoamin (PAMAM)-Typen am relevantesten erscheinen (Haensler und Szoka, 1993). Diese basieren auf Ethylendiamin (tetravalent) oder Ammoniak (trivalent) als Kernmolekül mit 4 bzw. 3 Verzweigungspunkten. Die vergleichbar zu PEI hohe Dichte an Aminfunktionen in der Molekülperipherie wird für die chemische Modifikation des Polymers und zur DNA-Bindung benötigt. PAMAM/pDNA-Partikel besitzen typischerweise einen Durchmesser von ca. 50 nm mit toroidaler Struktur (Bielinska *et al.*, 1997). Die Größe und Verzweigung eines Dendrimers werden mit der Generation zum Ausdruck gebracht. Jede vollständig abgeschlossene Reaktionssequenz resultiert in einer „vollen“ Dendrimergeneration (z.B. G3, G4) mit endständigen Aminfunktionen, wohingegen die intermediären „halben“ Dendrimergenerationen (z.B. G2.5, G3.5) in Carboxylgruppen enden.

Chitosan

1995 wurde Chitosan erstmals als möglicher Transporter für die nichtvirale Gentherapie beschrieben (Mumper *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um ein β -1-4-verknüpftes Polysaccharid, bestehend aus den Grundbausteinen Glucosamin und N-Acetylglucosamin, welches mittels alkalischer Deacetylierung von Chitin hergestellt wird. Nachdem Chitosan schwach basische Eigenschaften besitzt (pKa \sim 6,8), muss die Lösung in leicht sauren wässrigen Medien mit einem pH-Wert kleiner

als 6 erfolgen. Diese Tatsache führt zu einer Einschränkung der chemischen Modifikationsmöglichkeiten des Moleküls. Im Verlauf mehrerer Studien konnte innerhalb der letzten Jahre gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Parametern wie Molekulargewicht, Konzentration, Komplexladung, pH, Partikelgröße, und der Grad der Deacetylierung die Transfektionseffizienz maßgeblich beeinflussen (Sato *et al.*, 2001). Ein Vorteil des Chitosan-basierten Gentransfers ist die hohe Transfektionseffizienz in Anwesenheit von Serum (Erbacher *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte jedoch auch eine hohe Abhängigkeit der Genexpression vom verwendeten Zelltyp gezeigt werden (Mao *et al.*, 2001).

Um die Transfektionseffizienz kationischer Polymere weiter zu verbessern wird auch die Kombination mit physikalischen Methoden immer populärer. Einen erfolgreichen Ansatz stellt die Magnetofektion dar (Plank *et al.*, 2003). Hierbei werden DNA-beladene superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel auf der Basis von PEI während des Transfektionprozesses entlang eines magnetischen Feldgradienten hin zu den Zellen geleitet (Huth *et al.*, 2004). Auch durch die Verwendung von Ultraschall konnte bereits eine Steigerung der Genexpression von PEI/pDNA-Komplexen gezeigt werden (Deshpande und Prausnitz, 2007).

1.4. Aufnahme und intrazellulärer Transport kationischer Polymer/pDNA-Partikel

Für einen erfolgreichen Transfer der DNA an ihren Zielort, den Zellkern, müssen die Gentransferkomplexe auf ihrem Weg einige Hürden überwinden. Der ablaufende Transfektionsprozess besteht auf zellulärer Ebene aus mehreren unmittelbar aufeinander folgenden Schritten (Medina-Kauwe *et al.*, 2005)(ABBILDUNG 1.4):

- (1) Zelloberflächenbindung
- (2) Zelleintritt (Endozytose)
- (3) endosomale Freisetzung
- (4) zytosolischer Transport zum Zellkern
- (5) Nukleäre Aufnahme

Obwohl sich bereits eine Vielzahl an Untersuchungen mit der Aufnahme und dem weiteren intrazellulären Transport von Polyplexen beschäftigt haben, sind derzeitige Kenntnisse über den vollständigen Mechanismus immer noch lückenhaft.

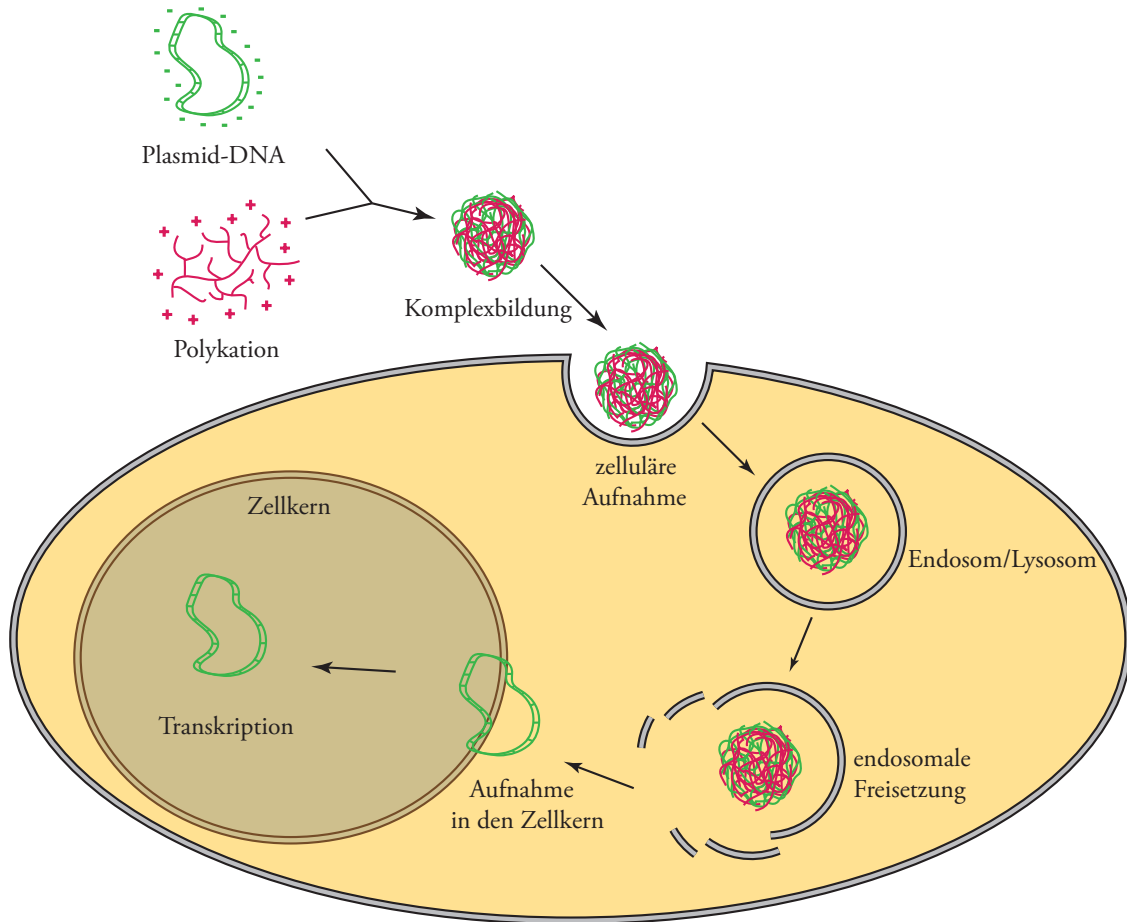


ABBILDUNG 1.4: Schematische Darstellung des nichtviralen Gentransfers

1.4.1. Zelloberflächenbindung

Bei der Zelloberflächenbindung wird zwischen unspezifischer Bindung und spezifischer, Rezeptor-vermittelter Bindung unterschieden. Unspezifische Bindung findet auf der Basis elektrostatischer Wechselwirkung zwischen Partikeln und Zelloberfläche statt. Nachdem der größte Anteil der Komplexe mit einem Überschuss an Polymer gebildet wird, besitzen diese nach außen hin eine positive Nettoladung und können somit mit negativ geladenen Bestandteilen der Zellmembran interagieren. Dabei spielen Proteoglykane bzw. Syndekane eine entscheidende Rolle (Mislick und Baldeschwieler, 1996; Kopatz *et al.*, 2004). Proteoglykane stellen eine spezielle Klasse der Glykoproteine dar und bestehen aus einem Kernprotein mit einem oder mehreren kovalent angehängten Glykosaminoglykan-Seitenketten. Variable Mengen von Proteoglykanen an der Oberfläche verschiedener Zelltypen könnten somit für Unterschiede in den Transfektionseffizienzen verantwortlich sein. Im Vergleich zur unspezifischen Bindung stellt die Rezeptor-vermittelte Bindung an die Zelloberfläche den weitaus effizienteren und selektiveren Weg dar (siehe KAPITEL 1.5).

1.4.2. Zelleintritt

Nach erfolgter Bindung an die Zelloberfläche folgt der Zelleintritt der Partikel, welcher mittels verschiedener Mechanismen stattfinden kann. Diese können im Allgemeinen in Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Wege eingeteilt werden.

Die große Mehrheit der Rezeptor-Ligand-Komplexe wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dabei kommt es ausgelöst durch die Rezeptorbindung zu einer lokalen Ansammlung von Clathrinstrukturen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, welche für die Bildung von Einstülpungen, so genannter Clathrin-bedeckter Vertiefungen, verantwortlich sind (Mellman, 1996). Letztere umschließen die Polymer/DNA-Komplexe, werden als Vesikel in die Zelle abgeklemmt und in frühe Endosomen ausgebildet (Brodsky *et al.*, 2001). Durch ATP-abhängige Protonenpumpen erfolgt eine Ansäuerung des vesikulären Lumens auf einen pH-Wert von 5,0-6,0 und Entwicklung des späten Endosoms. Schlussendlich verbindet sich dieses mit dem Lysosom (pH 5,0-5,5) und überträgt seinen Inhalt. Die Hauptaufgabe des Lysosoms besteht in der enzymatischen Degradierung seines Inhaltes. (Medina-Kauwe *et al.*, 2005)

Alternativ zur Clathrin-vermittelten Internalisierung bestehen Clathrin-unabhängige Wege, welche hauptsächlich mittels Caveolae-vermittelter Endozytose, der Makropinozytose und der Phagozytose ablaufen (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001). Bei Caveolae handelt es sich um Einbuchtungen der Zellmembran welche reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind, von Aktinfilamenten an der Oberfläche festgehalten werden und mit dem Membranprotein Caveolin markiert sind (Rothberg *et al.*, 1992). Die Internalisierung findet über einen Cholesterol-abhängigen Weg statt und dient insbesondere der Aufnahme von größeren Molekülen, Toxinen, Bakterien und einigen Viren (Parton und Richards, 2003), obwohl Caveolae selbst meist nur einen Durchmesser von 50 bis 100 nm besitzen (Cohen *et al.*, 2004). Bei der Makropinozytose werden die Partikel an der Zelloberfläche in inhomogen geformte Makropinosomen eingelagert, die sich aus einer Aktin-gesteuerten Einschnürung der Plasmamembran bilden und ins Zytoplasma ablösen. Makropinosomen können innerhalb der Zelle angesäuert werden, vereinen sich jedoch nicht mit Lysosomen und repräsentieren daher einen alternativen Aufnahmeweg für Gentransferkomplexe, welche vor der lysosomalen Degradation geschützt werden müssen. Von Phagozytose spricht man meist nur in Verbindung mit speziellen Zellen, hauptsächlich bei Makrophagen.

Die Internalisierung einer bestimmten Partikelart findet vermutlich gleichzeitig über verschiedene Wege statt. Viele experimentelle Studien beschäftigen sich mit der Korrelation zwischen Komplexeigenschaften und Aufnahmemechanismen. Hierbei ist anzunehmen, dass bei

unmodifizierten Partikeln die Komplexgröße einen wesentlichen Faktor darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass relativ große Moleküle über Makropinosomen oder Phagosomen in die Zelle gelangen, während kleine Partikel mit höherer Wahrscheinlichkeit über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Prozesse aufgenommen werden (Reyman *et al.*, 2004; Grosse *et al.*, 2005).

1.4.3. Endosomale Freisetzung

Im Anschluss an die Internalisierung sind Gentransferkomplexe meist in intrazellulären Vesikeln zu finden, welche eine Hauptbarriere für die effiziente Gentherapie darstellen. Nach Clathrin-vermittelter Endozytose werden die Polymer/DNA-Komplexe hauptsächlich zu Lysosomen transportiert, wo sie innerhalb eines sauren Milieus mit Hilfe von lysosomalen Enzymen abgebaut werden. Erfolgt die Aufnahme über alternative Wege, können die Lysosomen umgangen werden, die Partikel sind jedoch daraufhin in Endosomen eingeschlossen. Insbesondere die erste Generation nichtviraler Gentransfervektoren (z.B. PLL) konnte trotz hoher Aufnahme in die Zelle nur geringe Genexpression erzielen, da sie keine endosomolytische Eigenschaften besaßen, welche ihnen den Weg ins Zytoplasma ermöglicht hätten. Die gute Transfektionseffizienz von Polymeren der zweiten Generation, insbesondere von Polyethylenimin, wird mit der hohen Pufferkapazität bei physiologischen und leicht sauren pH-Werten in Verbindung gebracht (Boussif *et al.*, 1995). Der so genannte „Protonenschwammeffekt“ basiert auf der Anzahl titrierbarer Gruppen in der chemischen Struktur des Polymers und verleiht diesem endosomolytische Eigenschaften. Bei PEI ist jedes dritte Atom des Grundgerüsts ein Amin-Stickstoff. Dadurch wird innerhalb des Endosoms ein Absinken des pH-Wertes verhindert, welches in einem erhöhten aktiven Transport von Protonen aus dem Zytoplasma resultiert. Um den sich bildenden Ladungsgradienten auszugleichen erfolgt ein passiver Einstrom negativ geladener Chlorid-Ionen. Aufgrund der nun höheren Osmolarität innerhalb des Endosoms kommt es zu einer vermehrten Wasserabsorption, die ein Anschwellen des gesamten Endosoms verursacht, letztlich zu dessen Aufplatzen führt und den Inhalt in das Zytoplasma entlässt (Sonawane *et al.*, 2003). Die endosomolytischen Eigenschaften von Gentransfervektoren können durch Verwendung von membrandestabilisierenden Molekülen weiter gesteigert werden. Bislang erfolgreich eingesetzte Beispiele hierfür sind die Diphtherie-Toxin-Translokationsdomäne (Fisher und Wilson, 1997), die Peptide GALA (Haensler und Szoka, 1993) und INF7 (Plank *et al.*, 1994), sowie der Bienengiftbestandteil Melittin (Ogris *et al.*, 2001a).

1.4.4. Transport zum Zellkern

Nach erfolgter Freisetzung ins Zytoplasma müssen die Partikel zum Zellkern gelangen. Der genaue

Ablauf dieses Prozesses ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Passive Diffusion großer Moleküle wie z.B. DNA innerhalb des Zytoplasmas findet nur sehr träge statt (Lukacs *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wird ein aktiver Transport der DNA durch Mikrotubuli und Aktinfilamente angenommen (Suh *et al.*, 2003). Es stellt sich insbesondere die Frage, ob intrazellulärer Transport und Zellkernaufnahme durch intakte Polymer/pDNA-Komplexe erfolgt oder die Plasmid-DNA kurz nach der Freisetzung ins Endosom aus dem Polyplex freigesetzt wird und alleine den Zellkern erreicht. In diesem Zusammenhang sind bislang widersprüchliche Beobachtungen beschrieben worden. Für einen Transport des intakten Komplexes spricht die Tatsache, dass sowohl PEI wie auch Plasmid-DNA gemeinsam im Zellkern detektiert werden konnten (Godbey *et al.*, 1999b). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien zeigen, dass Plasmid-DNA aus den Polyplexen in Anwesenheit von zytosolischen Faktoren wie RNA oder löslichen Proteinen verdrängt wird (Huth *et al.*, 2006; Bertschinger *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2004). In letzterem Fall wäre die DNA jedoch der Gefahr durch zytosolische Nukleasen ausgeliefert, welche diese mit einer Halbwertszeit von 90 Minuten degradieren (Lechardeur *et al.*, 1999). Sollte keine Trennung erfolgen, würden die Eigenschaften des verwendeten Gentransferagens das zytoplasmatische Verhalten der Plasmid-DNA maßgeblich mitbestimmen.

1.4.5. Aufnahme in den Zellkern

Als letzter Schritt des nukleären Transportes muss die Zellkernmembran überwunden werden, welche ebenfalls eine große Hürde für nichtvirale Gentransfersysteme darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass weniger als 0,1 % direkt ins Zytoplasma injizierter Plasmid-DNA transkribiert wird (Pollard *et al.*, 1998). Der Eintritt in den Zellkern kann im Prinzip über zwei verschiedene Wege stattfinden. Mittels passiver Diffusion durch den Zellkernporenkomplex (NPC) können insbesondere kleine Moleküle internalisiert werden. So werden DNA mit bis zu 300 Basenpaaren oder Goldpartikel mit einer Größe von kleiner als 9-10 nm über diesem Mechanismus aufgenommen (Liu *et al.*, 2003a). Da der Durchmesser von Polymer/pDNA-Komplexen meist jedoch deutlich größer ist, wird eine Aufnahme dieser Partikel zum Großteil während der Zellteilung vermutet, in welcher die Kernmembran nicht vollständig ausgebildet ist. Die Gentransfereffizienz nichtviraler Systeme hängt somit in großem Maße vom Zellzyklus ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion während der Zellteilung verglichen mit Phasen ohne Zellteilung in bis zu 500-fach höherer Genexpression resultierte (Brunner *et al.*, 2000).

Um die Zellkernaufnahme zu verbessern, wurden Kernlokalisierungssequenzen (NLS) entwickelt, die meist an die Plasmid-DNA gekoppelt werden und einen kontrollierten Transport durch die

Kernporen ermöglichen sollen. Die NLS werden von zytoplasmatischen Proteinen (Karyopherine oder Importine) erkannt, gebunden und formieren mit diesen einen Poren-gesteuerten Komplex, welcher über Interaktion mit Fibrillen an den NPC andockt (Conti und Izaurralde, 2001). Hierbei konnten bereits erfolgreiche Steigerungen der Genexpression gezeigt werden (Zanta *et al.*, 1999).

1.5. Rezeptor-vermittelter Gentransfer

Unmodifizierte nichtvirale Gentransfersysteme interagieren mit der Zelloberfläche meist ausschließlich über elektrostatische Wechselwirkungen (vgl. KAPITEL 1.4.1). Nachdem sie dabei eine positive Nettoladung benötigen, müssen sie mit einem Überschuss an kationischem Polymer formuliert werden. Dies resultiert in unspezifischem Gentransfer, welcher gleichzeitig mit hoher Toxizität verbunden ist (Kircheis *et al.*, 2001). Eine Erfolg versprechende Strategie zur Erhöhung der Transfektionseffizienz bei gleichzeitiger Beeinflussung der Selektivität stellt das Konzept des Rezeptor-vermittelten Gentransfers dar. Hierbei wird Genvektoren die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Ziel- und Nicht-Zielgewebe gegeben, indem man sie mit Liganden für die Erkennung zielspezifischer zellulärer Rezeptoren ausstattet (Schatzlein, 2003). Gleichzeitig wird der Internalisierungsmechanismus des Liganden als Weg in die Zelle genutzt. Ziel ist es, im Hinblick auf eine *in vivo* Verabreichung die therapeutisch applizierte Dosis senken zu können und somit toxische Nebeneffekte zu verringern.

Ein Rezeptor-vermitteltes Gentransfersystem konnte bereits 1987 erstmalig beschrieben werden. Das kationische Polymer Poly-L-Lysin wurde mit Asialoorosomuroid (ASOR) als Ligand für den spezifischen Transport zu Hepatozyten modifiziert (Wu und Wu, 1987). Während nach der Transfektion mit ASOR-PLL/pDNA-Komplexen in Rezeptor-positiven HepG2-Zellen Genexpression nachweisbar war, konnte bei Rezeptor-negativen SK-Hep 1-Zellen kein signifikantes Signal detektiert werden. Die Funktionalität des Systems konnte im darauf folgenden Jahr auch *in vivo* durch den spezifischen Transport zur Leber demonstriert werden (Wu und Wu, 1988).

Seit diesem Zeitpunkt wurde diese Methode in einer Vielzahl von Untersuchungen verfolgt, um effektiven und spezifischen Gentransfer zu erreichen. Zum Einsatz kamen dabei eine große Anzahl unterschiedlicher Liganden wie z.B. kleine chemisch definierte Moleküle, Peptide, Proteine, Wachstumsfaktoren und Antikörper (TABELLE 1.2). Dabei konnten *in vitro* die Transfektionsraten abhängig von Polymer und Ligand bis zu 1000-fach im Vergleich zu unmodifizierten Komplexen gesteigert werden (Weiss *et al.*, 2006).

Ligand	Ziel	Zelltypen	ausgewählte Referenzen
Anti-CD3 Antikörper	CD3	verschiedene Zellen, z.B. T-Lymphozyten	Buschle <i>et al.</i> , 1995 Kircheis <i>et al.</i> , 1997
Anti-HER2 Antikörper (Trastuzumab)	HER2	entartete Zellen, z.B. Brustkrebszellen	Foster <i>et al.</i> , 1997 Chiu <i>et al.</i> , 2004
Anti-PECAM Antikörper	PECAM	Lungenepithelzellen	Li <i>et al.</i> , 2000
EGF / Anti-EGF Antikörper	EGF EGF-Rezeptor	entartete Zellen, z.B. Lungenkarzinomzellen	Chen <i>et al.</i> , 1994 Cristiano <i>et al.</i> , 1996 Blessing <i>et al.</i> , 2001 Wolschek <i>et al.</i> , 2002
Folat	Folat-Rezeptor	entartete Zellen, z.B. bei Ovarialkarzinom	Gottschalk <i>et al.</i> , 1994 Guo <i>et al.</i> , 1999 Wu <i>et al.</i> , 1987
Galaktose	ASGP-Rezeptor	Hepatozyten	Zanta <i>et al.</i> , 1997 Hashida <i>et al.</i> , 1998 Huckett <i>et al.</i> , 1990
Insulin	Insulin-Rezeptor	Hepatozyten, Brustzellepithel	Rosenkranz <i>et al.</i> , 1992 Sobolev <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 2003
Laktose	Laktose-Rezeptor	Hepatozyten	Erbacher <i>et al.</i> , 1995 Choi <i>et al.</i> , 1998
LDL / RAP-Protein	LDL-Rezeptor	Hepatozyten, Muskelzellen	Kim <i>et al.</i> , 1998 Kim <i>et al.</i> , 2004
Mannose	Mannose- Rezeptor	dentritische Zellen, Makrophagen	Ferkol <i>et al.</i> , 1996 Diebold <i>et al.</i> , 1999
Mannuronsäure	noch unbekannt	verschiedene Zellen, z.B. Lungenzellen, Hepatozyten	Weiss <i>et al.</i> , 2006
RGD-Peptid	Integrin	verschiedene Zellen, z.B. Melanomzellen, Epithelzellen, Fibroblasten	Erbacher <i>et al.</i> , 1999 Kunath <i>et al.</i> , 2003
Transferrin	Transferrin- Rezeptor	maligne Zellen, z.B. Leukämiezellen, Epidermoidkarzinom	Cotten <i>et al.</i> , 1990 Kircheis <i>et al.</i> , 1997 Dufes <i>et al.</i> , 2004

TABELLE 1.2: Häufig verwendete Liganden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer kationischer Polymere

Damit ein Ligand für den nichtviralen Gentransfer geeignet ist, müssen folgenden Kriterien erfüllt sein (Kircheis *et al.*, 2001):

- (1) eine große Anzahl von Rezeptoren an der gewünschten Zielzelle
- (2) eine hohe Affinität der Ligand-Rezeptor-Bindung
- (3) die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer Internalisierung

Bei der Wahl eines Liganden müssen somit verschiedenste Faktoren berücksichtigt werden, damit Rezeptor-vermittelte Gentransfersysteme ihr volles Potential zur Verfügung stellen können.

1.5.1. Lactoferrin als Ligand

Lactoferrin (auch als „Lactotransferrin“ bezeichnet) ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, welches zu zwei Lappen mit homologer Sequenz gefaltet ist (ABBILDUNG 1.5), von denen jeder ein Eisenion binden kann (Baker *et al.*, 2002; Brock, 2002). Es zeigt enge Verwandtschaft mit Transferrin, besitzt jedoch eine höhere Bindungsaffinität zu Eisen ($K_D \sim 10^{-20}M$) (Baker und Baker, 2004). Lactoferrin wird an verschiedensten Stellen im menschlichen Körper produziert und in einer eisenfreien Form durch Epithelzellen in das exokrine System sezerniert. Hohe Konzentration zwischen 1-7 mg/ml sind in der Muttermilch anzufinden, wohingegen die Blutkonzentration normalerweise relativ niedrig ist ($< 1 \mu g/ml$) und wahrscheinlich aus der Degradierung polynukleärer Leukozyten resultiert (Birgens, 1985). Lactoferrin war innerhalb der letzten Jahre Objekt vieler Untersuchungen und eine hohe Anzahl möglicher physiologischer Funktionen wie z.B. antimikrobielle, immunmodulatorische, antivirale und antitumorale Aktivität wurden beschrieben (Brock, 2002; Ward *et al.*, 2002). Im Bezug auf die Lunge scheint Lactoferrin eine wichtige Rolle im physiologischen Verteidigungsmechanismus gegenüber Bakterien zu besitzen (Cole und Waring, 2002).

Die vielfältigen Aktivitäten des Glykoproteins werden durch Lactoferrin-Rezeptoren vermittelt (Suzuki *et al.*, 2005). Zusätzlich zu ihrem Vorkommen im Gehirn (Talukder *et al.*, 2003), Darm (Ashida *et al.*, 2004) und weiteren Organen konnte gezeigt werden, dass Lactoferrin-Rezeptoren an der apikalen Oberfläche von bronchialen Epithelzellen vorhanden sind (Ghio *et al.*, 1999). Nachdem auch die Internalisierung und der Transport in den Zellkern berichtet wurde (Garre *et al.*, 1992; Penco *et al.*, 2001), besitzt Lactoferrin hohes Potential, als Ligand für den zielgerichteten Gentransfer zur Lunge geeignet zu sein.

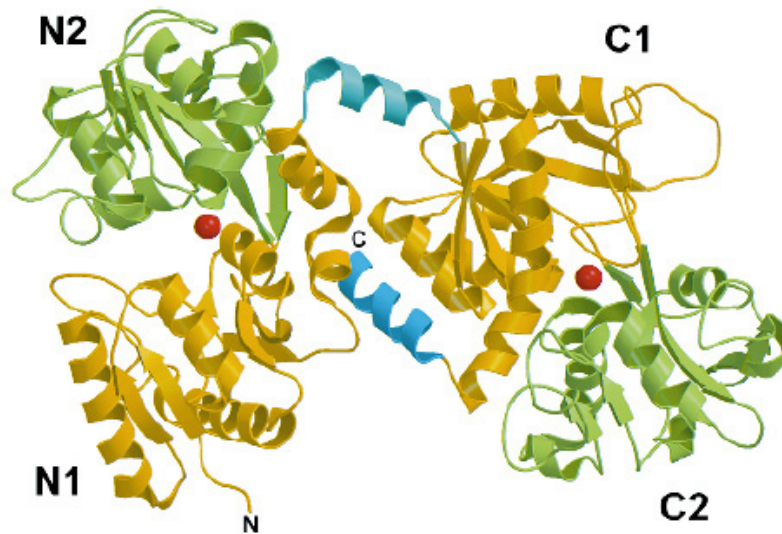
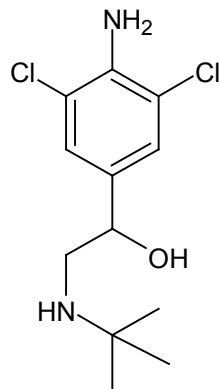


ABBILDUNG 1.5: Proteinfaltungsmuster von humanem Lactoferrin (aus Baker *et al.*, 2002). Die Aufteilung des Proteins erfolgt in einen N-terminalen (links) und einen C-terminalen Lappen (rechts), welche jeweils in 2 Domänen (grün+gelb) unterteilt sind. Blau markiert sind die α -Helices, welche die beiden Lappen miteinander verbinden. Jeder Lappen kann ein Fe^{3+} -Ion (rot) aufnehmen.

1.5.2. Clenbuterol als Ligand

Die sieben Transmembrandomänen umfassenden β -Adrenozeptoren sind der Familie der G-Proteingekoppelter Rezeptoren angehörig und können in drei verschiedene Untertypen gegliedert werden: β_1 , β_2 und β_3 , welche typischerweise in Herzmuskelgewebe, glatter Atemwegsmuskulatur und Fettgewebe zu finden sind (Johnson, 1998). Nachdem die Bindung von Agonisten an G-Proteingekoppelte Rezeptoren zur endosomalen Aufnahme der Rezeptor/Ligand-Komplexe führt (Clark *et al.*, 1999; Ferguson, 2001), scheinen β -Adrenozeptoragonisten geeignete zielgerichtete Liganden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer darzustellen.

Bei dem β_2 -Adrenozeptoragonisten Clenbuterol (ABBILDUNG 1.6) handelt es sich um einen verschreibungspflichtigen Arzneistoff, welcher in der Humanmedizin neben anderen Bronchodilatoren zur Therapie von Atemwegserkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale eingesetzt wird (Handelsnamen Spiropent®, Spasmo-Mucosolvan®). Es konnte gezeigt werden, dass Clenbuterol im Vergleich zu Salbutamol und Terbutalin höhere Affinität zu β_2 -Adrenozeptoren der Trachealmuskulatur besitzt, obwohl alle drei in etwa gleich potent sind (Törneke *et al.*, 1998). Dieses Verhalten wird auf den partiellen Agonismus von Clenbuterol zurückgeführt und könnte eine Option darstellen, die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Gentransferkomplexen zu ermöglichen, ohne gleichzeitig unerwünschte pharmakologische Nebenwirkungen zu verursachen.

ABBILDUNG 1.6: Strukturformel des β_2 -Adrenozeptoragonisten Clenbuterol

1.5.3. Insulin als Ligand

Bei Insulin handelt es sich um ein Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 5890 Da, welches aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren sowie einer B-Kette mit 30 Aminosäuren aufgebaut ist. Beide Ketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verknüpft, eine zusätzliche dritte Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette zwischen AS 6 und AS 11 trägt zur Stabilisierung der Raumstruktur bei (ABBILDUNG 1.7). Im Blut kommt Insulin sehr wahrscheinlich nur in monomerer Form vor. Bei höherer Konzentration und vor allem in Anwesenheit von Zinkionen bilden sich hexamere und dimere Insuline, welche leicht kristallisieren können. Die Insulinbiosynthese findet in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln innerhalb der Bauchspeicheldrüse statt. Physiologische Aufgaben des Insulins sind die Regulation des Glucose-, Lipid- und Proteinstoffwechsels, zusätzlich kann es auch als Wachstumsfaktor wirken (Löffler, 1998). Medizinisch wird es zur Behandlung von Diabetes Mellitus eingesetzt. Die Applikation erfolgt dabei fast ausschließlich durch subkutane Injektion von kurz- oder langwirksamen Insulinen (Handelsnamen z.B. Humalog®, Levemir®). Seit Anfang 2006 ist auch ein schnell wirksames Insulin zur inhalativen Anwendung in Deutschland zugelassen (Handelsname Exubera®). Das Präparat wurde jedoch freiwillig vom Hersteller im Oktober 2007 aufgrund geringer Akzeptanz unter den Patienten vom Markt genommen.

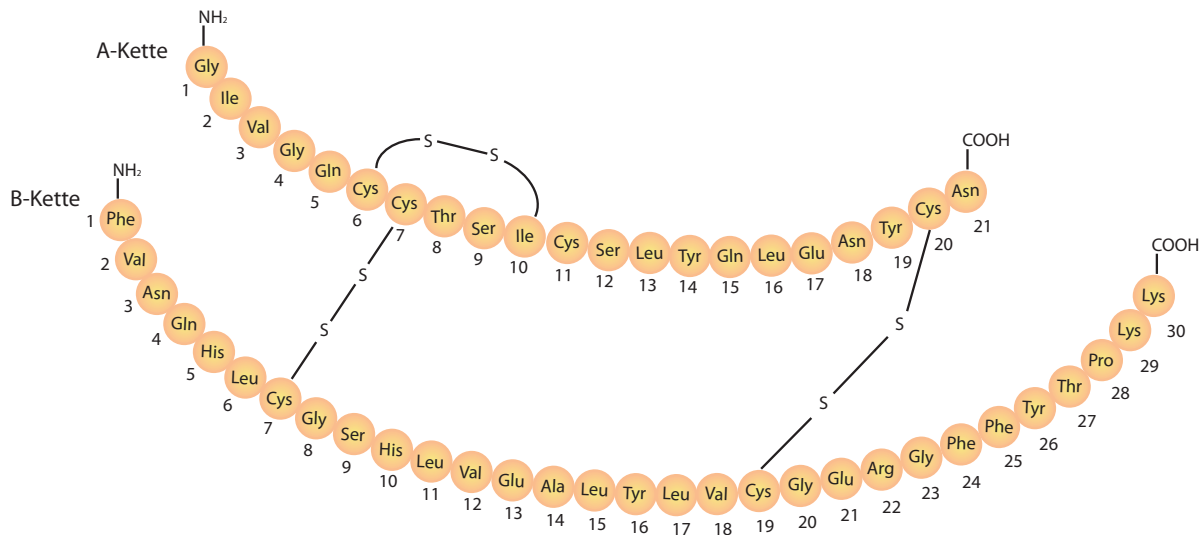


ABBILDUNG 1.7: Primärstruktur von Humaninsulin

Verschiedene Studien konnten bereits eine erhöhte Expression von Insulinrezeptoren auf Tumorzellen zeigen (Frittitta *et al.*, 1995; Spector *et al.*, 1999; Kalli *et al.*, 2002). Zusätzlich wurden Insulinrezeptoren auf Alveolarepithelzellen identifiziert (Shapiro *et al.*, 1986). Nach der Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes dissoziiert Insulin ab und wandert unter anderem in den Zellkern (Soler *et al.*, 1989; Shah *et al.*, 1995; Harada *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die gezielte Ansteuerung des Insulinrezeptors in bis zu 100-fach höherer Genexpression im Vergleich zum zielgerichteten Gentransfer des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor resultiert (Zhang *et al.*, 2003). Auch für den Rezeptor-vermittelten Transport von verschiedenen Substanzen konnte Insulin bereits erfolgreich verwendet werden (Liu *et al.*, 2003b; Ou *et al.*, 2003; Ou *et al.*, 2004).

1.6. Die Lunge als Zielorgan in der Gentherapie

Die Lunge stellt ein interessantes und zugleich wichtiges Zielorgan für die Gentherapie dar. Ein erfolgreicher Gentransfer zur Lunge birgt enormes Potential für die Behandlung vieler akuter oder chronischer Erkrankungen mit genetischer Ursache wie z.B. der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose). Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie ist der effektive und zielgerichtete Transport des therapeutischen Gens zu den entsprechenden pulmonalen zellulären Strukturen. Für die nichtvirale DNA-Applikation zur Lunge mit Polyethylenimin als Gentransfervektor bieten sich grundsätzlich zwei Wege an:

- (1) die systemische Applikation über die Blutbahn
- (2) die lokale Applikation über die Atemwege

Nach intravenöser Injektion gelangen die Polyplexe über die Blutbahn in die Lungenkapillaren, von wo aus ein Übertritt in die Lungenzellen erfolgen kann. Obwohl ein effizienter Gentransfer zur Lunge bereits mit unmodifizierten PEI/pDNA-Polyplexen gezeigt werden konnte (Zou *et al.*, 2000), bietet eine derartige Verabreichung gewisse Nachteile. So müssen intravenös applizierte Partikel auf ihrem Weg zur Lunge neben physikalischen Hürden auch eine Vielzahl von biologischen Barrieren wie z.B. das retikuloendotheliale System (RES) oder vaskuendotheliale Membranen überwinden. Folglich erreicht oftmals nur eine kleine Fraktion des eingesetzten Materials das Zielorgan. Dies erfordert den Einsatz hoher Substanzmengen und birgt insbesondere hinsichtlich der Toxizität Probleme (Chollet *et al.*, 2002). Modifikationen von PEI mit zielgerichteten Liganden wie z.B. Antikörpern führten zu Verbesserungen hinsichtlich Gentransfereffizienz und Toxizität (Li *et al.*, 2000), eine optimale Lösung konnte jedoch noch nicht gefunden werden.

Ein großer Vorteil in der lokalen Applikation von Gentransfervektoren über die Atemwege zur Lunge besteht in der nichtinvasiven und somit meist schonenderen Anwendung. Durch die direkte Applikation in das Zielgewebe können störende biologische und physiologische Barrieren, wie beispielsweise die Bindung an Plasmaproteine, größtenteils umgangen werden (Koshkina *et al.*, 2003). Hierfür stehen bereits gut entwickelte Methoden zur Verfügung, insbesondere die Aerosolapplikation. Dabei werden die Gentransferkomplexe mittels Druckluft bzw. Ultraschall zu kleinen Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-5 µm vernebelt. Es konnte gezeigt werden, dass PEI/pDNA-Nanopartikel in der Lage sind, nach deren Vernebelung effizient Atemwegsepithelzellen von Mäusen zu transfizieren (Rudolph *et al.*, 2005a). Nichtsdestotrotz ist die erzielte Genexpression des Lungengewebes im Hinblick auf klinische Anwendungen noch zu gering. Eine große Hürde stellt hierbei die Phagozytose der Transfektionskomplexe durch Makrophagen dar, welches letztendlich zur Elimination der Partikel aus der Lunge (alveoläre Clearance) führt (Lombry *et al.*, 2004; Dames *et al.*, 2006). Eine Modifikation der Partikel mit zielgerichteten Liganden könnte zur Lösung dieses Problems beitragen. Durch eine schnellere Internalisierung der Komplexe in die Zielzelle wären diese dann nicht mehr für extrazelluläre Abwehrmechanismen sichtbar und die Gefahr der Phagozytose würde geringer ausfallen.

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Nichtvirale Gentransfersysteme stellen eine vielversprechende und vor allem sichere Alternative zu viralen Vektoren für die Gentherapie dar. Innerhalb der Gruppe der kationischen Polymere erscheint insbesondere Polyethylenimin als aussichtsreicher Kandidat. Unmodifizierte PEI/pDNA-Partikel zeigen jedoch keine Spezifität in der Erkennung bestimmter Zell- bzw. Gewebetypen und führen nur zu geringer Genexpression, welches im Hinblick auf die klinische Anwendung unzureichend ist.

Unter den vielen Faktoren, welche die Gentransfereffizienz in die Lunge maßgeblich beeinflussen können, stellen neben der mukoziliären Clearance und dem Surfactant insbesondere die alveolären Makrophagen eine Hauptbarriere dar. Durch Phagozytose tragen diese zur Abwehr von Fremdpartikeln bei. Es konnte gezeigt werden, dass mehr als 50% der initialen Dosis an Plasmid-DNA innerhalb von 4 Tagen nach Vernebelung von PEI/pDNA-Partikeln aus der Lunge entfernt wurde (Dames *et al.*, 2006).

Die Modifikation kationischer Polymere mit zielgerichteten Liganden scheint eine vielversprechende Methode zur Schaffung intelligenterer Systeme mit höherer Effizienz darzustellen und konnte in der Vergangenheit bereits gute Ergebnisse erzielen (Schatzlein, 2003). Gegenstand dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung neuartiger zielgerichteter Gentransfersysteme auf der Basis von verzweigtem Polyethylenimin als Polymer. Verwendete Liganden sollten dabei das Glykoprotein Lactoferrin, der Arzneistoff Clenbuterol und das Peptidhormon Insulin sein.

Um das prinzipielle Potential eines Liganden für den zellulären Transport abschätzen zu können, muss zu Beginn jeder Studie stets das Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors auf den möglichen Zielzellen untersucht werden. Somit sollte auf der Basis selbst hergestellter Fluoreszenz-tragender Konjugate des Liganden (Lactoferrin, Clenbuterol) bzw. von Antikörpern (Insulin) eine Markierung des Rezeptors mit nachfolgender quantitativer Auswertung erfolgen.

Ist der spezifische Nachweis des Rezeptors erbracht, kann die Einbringung des Liganden in einen Gentransferkomplex auf mehreren Wegen erfolgen. In dieser Arbeit sollten Lactoferrin und Clenbuterol jeweils durch chemische Konjugation kovalent an Polyethylenimin gebunden werden (ABBILDUNG 1.8a). Im Gegensatz dazu wurde für Insulin eine andere Strategie verfolgt. Hier erfolgte die kontrollierte nichtkovalente Adsorption des unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Insulins an der Oberfläche von PEI/pDNA-Partikeln aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen (ABBILDUNG 1.8b).

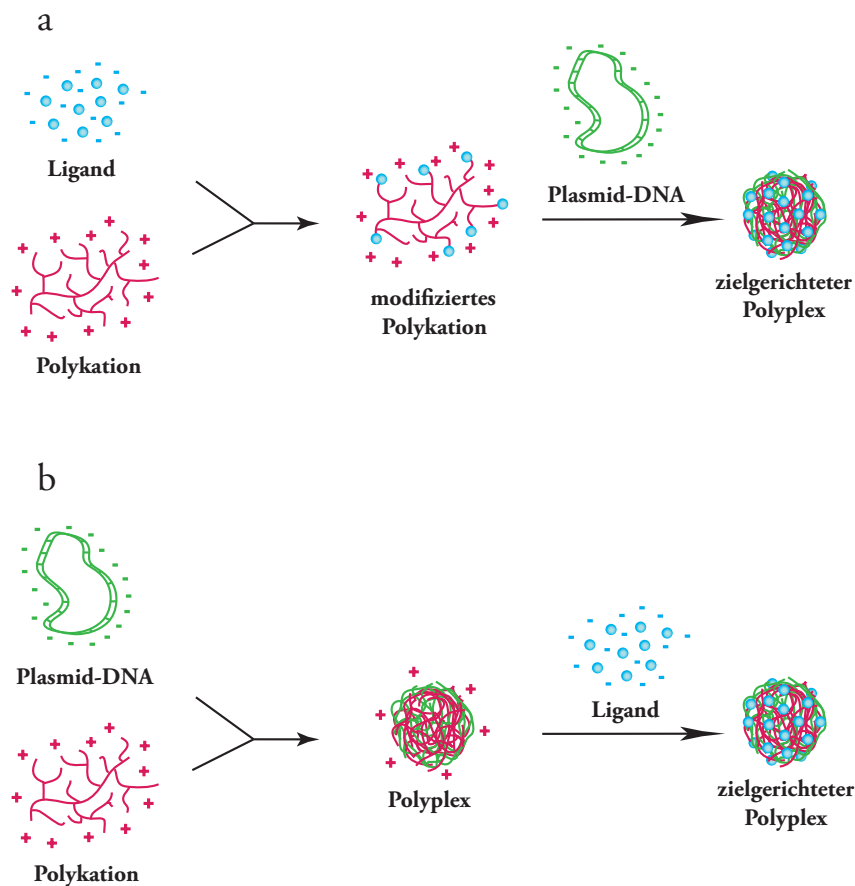


ABBILDUNG 1.8: Möglichkeiten zur Einbringung eines Liganden in PEI/pDNA-Komplexe. Eine Option besteht darin, den Liganden noch vor der Komplexierung mit Plasmid-DNA kovalent über biochemische Kopplungsprozesse an Polyethylenimin zu binden (a). Im Gegensatz dazu erfolgt bei der zweiten Strategie zuerst die Generierung des PEI/pDNA-Polyplexes, welcher eine positive Nettoladung trägt. In einem zweiten Schritt wird dann der negativ geladene Ligand durch elektrostatische Wechselwirkung an die Oberfläche des Komplexes adsorbiert (b).

Das Ziel aller Modifikation bestand darin, die Genexpression zu steigern und dabei gleichzeitig selektiv bestimmte Zelltypen ansteuern zu können. Im Fokus der *in vitro* Untersuchung waren insbesondere Lungenepithelzellen. Um Zelltyp-spezifisches Verhalten der Polyplexe zu erkennen, wurde deren Transfektionseffizienz sowohl auf Alveolar-, wie auch auf Bronchialepithelzellen evaluiert. Neben der Transfektionseffizienz stellte auch die Toxizität eine wichtige Kenngröße dar.

Um einen Eindruck über die Wirksamkeit der Liganden *in vivo* zu erhalten, sollte im Anschluss an die *in vitro* Experimente das Verhalten der modifizierten Polyplexe für den Gentransfer zur Lunge von Mäusen untersucht werden. Die Verabreichung der Komplexe erfolgte dabei durch Instillation, Vernebelung oder intravenöser Injektion.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Alexa Fluor 488 carboxylic acid, succinimidyl ester	Molecular Probes; Leiden, Niederlande
Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG	Molecular Probes; Leiden, Niederlande
Atipamezol (Antisedan®)	Pfizer GmbH; Karlsruhe
ATPlite Luminescence Detection Assay System	PerkinElmer; Boston, USA
Clenbuterol-HCl	Fährhaus Pharma; Barsbüttel
Complete® Protease Inhibitoren	Roche Diagnostics GmbH; Penzberg
Destilliertes Wasser	Delta Select GmbH;
D-Luziferin	Synchem OHG; Felsberg/Altenburg
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen; Hilden
Ellmans Reagenz	Pierce; Rockford, USA
Fentanyl (Fentanyl® Janssen 0,1mg)	Janssen-Cilag GmbH; Neuss
Flumazenil (Anexate® 0,5)	Hoffmann-LaRoche AG; Grenzach-Wyhlen
Fluorescein-5-Thiosemicarbazid (FTSC)	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
Gelelektrophorese DNA ladder 1kbp	PlasmidFactory GmbH & Co. KG; Bielefeld
Insulin (human)	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
iQ SYBR Green Supermix 2x	BioRad GmbH; München
Lactoferrin (human)	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
Medetomidin (Domitor®)	Pfizer GmbH; Karlsruhe
Midazolam (Midazolam-ratiopharm® 15mg/3ml)	ratiopharm; Ulm
Naloxon (Naloxon Inresa)	Inresa Arzneimittel; Freiburg
N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio) proprionat (SPDP)	Pierce; Rockford, USA
PBS	Gibco-Invitrogen; Karlsruhe
PCR-Primer	Metabion; Martinsried
Polyethylenimin (linear, 22 kDa)	Prof. Ernst Wagner; LMU München, Department Pharmazie,
Polyethylenimin (verzweigt, 25 kDa)	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
Purified Mouse Anti-Human CD 220 Antikörper	BD Pharmingen; Heidelberg
Rekombinante Luziferase	Roche Diagnostics GmbH; Penzberg
Standard Protein Assay	BioRad GmbH; München
XbaI	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Vectashield®	Vector Laboratories Inc; Burlingame, USA

TABELLE 2.1: Verwendete Reagenzien

Verzweigtes Polyethylenimin wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Alle weiteren Reagenzien, welche in TABELLE 2.1 nicht gelistet sind, wurden von Sigma-Aldrich (Schnelldorf) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

2.2. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
12-Well-Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
24-Well-Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
4-Kammer-Objektträger	NUNC; Rochester, USA
96-Well-PCR-Platten	4titude; Berlin
96-Well-Platten (durchsichtig)	TPP; Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platten (weiß)	TPP; Trasadingen, Schweiz
Amicon Ultra-15 5k Zentrifugenfilter-Säule	Millipore; Bedford, USA
FACS-Röhrchen (12/75 PS rund)	Josef Peske GmbH; Aindling-Arnhofen
Halb-Mikro-Küvette	Greiner Bio-One GmbH; Essen
Insulinspritzen 1ml (29G)	BD Biosciences, Heidelberg
Makro-Küvette	Greiner Bio-One GmbH, Essen
Sephadex G-25 M PD 10 Säule	GE Healthcare; Uppsala, Schweden
Tube 1,5ml	Greiner Bio-One GmbH; Essen
Tube 2ml	Greiner Bio-One GmbH; Essen
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Falcon; San Jose, CA, USA

TABELLE 2.2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

2.3. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 135 Epifluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss; Jena
Bio-Photometer	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Brookhaven 90 Plus Partikelgrößenmessgerät	Brookhaven Instruments Corporation; Wien, Österreich
Brookhaven ZetaPALS Analyzer	Brookhaven Instruments Corporation; Wien, Österreich
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH; Hanau
CM200 FEG Elektronenmikroskop	Philips/FEI; Eindhoven, Niederlande
EDAS 290 Gelkamera	Kodak GmbH; Stuttgart
FACScan	Becton Dickinson; San Jose, USA
iCycler IQ Real Time PCR Detection System	BioRad GmbH; München
IVIS 100 <i>in vivo</i> imaging System	Xenogen; Alameda, USA
Horizon 20.25 Gelkammer	Gibco-BRL; Gaithersburg, USA
LB9507 Röhrenluminometer	EG&G Berthold; München
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss; Jena
Nanodrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen
pH-Meter pH 330i	WTW; Weilheim
Turbo Boy® N / LC Plus	PARI GmbH; Starnberg
Ultrospec 3100pro	Amersham Pharmacia; Uppsala, Schweden
Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer; Boston, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf

TABELLE 2.3: Verwendete Geräte

2.4. Zellkultur

2.4.1. Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zelltyp	Bezugsquelle
A549	Alveolar-ähnliche Epithelzellen (human)	DSMZ, Braunschweig
BEAS-2B	Bronchialepithelzellen (human)	ATCC, Wesel
HeLa	Cervixkarzinomzellen (human)	DSMZ, Braunschweig
MLE-12	Alveolarepithelzellen (murin)	ATCC, Wesel

TABELLE 2.4: Verwendete Zelllinien

2.4.2. Verwendete Kulturmedien und Supplemente

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in MEM (Minimal Essential Medium; Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) kultiviert. Die nötigen Wachstumsfaktoren (z.B. Proteine) wurden durch Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FBS (Foetal Bovine Serum Gold; PAA Laboratories; Pasching, Österreich) zur Verfügung gestellt. Um eine mögliche Interaktion von FBS mit den Gentransferkomplexen zu verhindern, erfolgte die Durchführung aller Transfektionen in serumfreiem Medium. Da trotz steriler Arbeitsbedingungen eine bakterielle Kontamination nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, wurden im Anschluss an die Transfektion dem Medium Antibiotika in Form von 0,1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) und 0,5% (v/v) Gentamycin (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) zugesetzt.

2.4.3. Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte mit 75 cm²-Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit. Alle 2-3 Tage fand ein Medienwechsel statt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 – 1:20 passagiert. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und nach Zusatz von 2 ml Trypsin-EDTA (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein entsprechendes Aliquot der Suspension wurde in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Durch Zusatz von serumhaltigem Medium erfolgte eine Inaktivierung des Trypsins. Um die Gefahr von Mutationen zu reduzieren, wurde spätestens nach Erreichen einer Passagezahl von 20 auf neue Zellen aus der im Stickstofftank aufbewahrten Masterzellbank (Lagerung in Medium + 10% DMSO) gewechselt.

2.4.4. Aussäen der Zellen

Um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, wurde 24 h vor Beginn der Experimente eine definierte Anzahl von Zellen in die entsprechenden Well-Platten ausgesät. Die vorausgehende Zellzählung erfolgte durch Verwendung einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop mit 10 µl Zellsat.

2.5. Plasmide

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet (ABBILDUNG 2.1). Das Plasmid pCMVLuc (Plank *et al.*, 1992) enthält das Luziferase-Gen der Feuerfliege (*Photinus pyralis*, Gattung der Leuchtkäfer), welches unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht und wurde freundlicherweise von Prof. Ernst Wagner (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. pCpG-Luc wurde von PlasmidFactory GmbH & Co. KG (Bielefeld) hergestellt. Hier befindet sich das Luziferase-Gen innerhalb eines Grundgerüsts, bei welchem alle bakteriellen CpG-Motive ersetzt worden sind. Die Abwesenheit derartiger Sequenzen konnte in Tierversuchen als weniger immunogen beschrieben werden (Yew *et al.*, 2000). Beide Plasmide wurden in *Escherichia coli* vermehrt und in hochreiner Form (LPS-Gehalt ≤ 0.1 E.U./ μg DNA) von PlasmidFactory geliefert. Der Gehalt an „supercoiled“ pDNA betrug $\geq 90\%$ ccc für pCMVLuc und $\geq 98\%$ ccc für pCpGLuc.

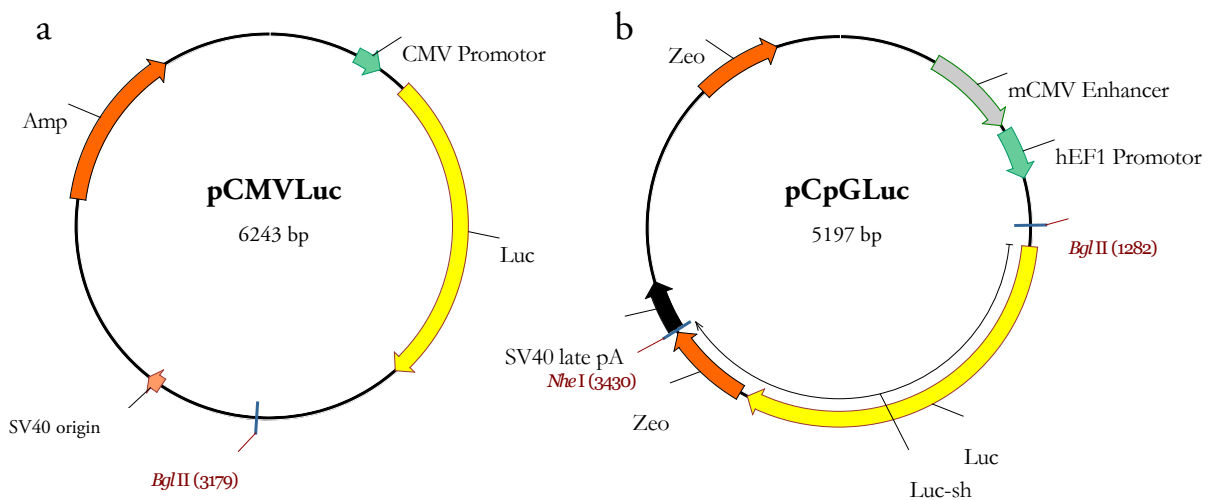


ABBILDUNG 2.1: Schematische Darstellung der Plasmide pCMVLuc (a) und pCpGLuc (b)

2.6. Synthese Lactoferrin-modifizierter Konjugate

2.6.1. Synthese von Lactoferrin-FTSC

Die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes FTSC an Lactoferrin wurde über eine reduktive Aminierung in Anlehnung an eine frühere Publikation (Leveugle *et al.*, 1993) durchgeführt. Dazu wurden 15 mg Lactoferrin (0,18 μmol) in 690 μl Reaktionspuffer (100 mM Natriumphosphat, 10 mM Natriumchlorid, pH 5,6) gelöst und mit 300 μl Natriumperiodat-Lösung (0,018 M) versetzt.

Nach 10-minütiger Inkubation bei 4°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl Ethylenglykol gestoppt und mit Hilfe einer Sephadex G-25 M PD-10-Säule in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,4) aufgereinigt. Im unmittelbaren Anschluss wurde das oxidierte Lactoferrin zusammen mit 10 µl einer FTSC-Lösung (5,5 mg in 100 µl DMF) für 20 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Um aus Hydrazon-Bindungen stabilere Bindungen zu generieren, erfolgte die Addition von 10 µl einer 4-molaren Natriumcyanoborohydrid-Lösung. Nach weiteren 2 Stunden wurde der ungekoppelte Anteil des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen weiteren Reinigungsschritt (Sephadex G-25 M PD-10-Säule) entfernt. Die Bestimmung des Verhältnisses von Fluorescein zu Protein konnte mittels Messung der Absorption bei 280 und 495 nm durchgeführt werden und betrug 1:1 (mol/mol).

2.6.2. Synthese von Lactoferrin-PEI

Für die Kopplung von Lactoferrin an PEI wurden 25 mg humanes Lactoferrin (0,3 µmol) in 1 ml Natriumacetat-Puffer pH 5,0 gelöst. Nach Zusatz eines 3-fach molaren Überschusses an Natriumperiodat erfolgte die Inkubation des Gemisches für 90 Minuten im Dunkeln auf Eis. Das erhaltene Produkt wurde über eine Sephadex G-25 M PD-10-Säule aufgereinigt. Je 0,0625 mol oxidiertes Lactoferrin wurde mit verschiedenen Mengen an verzweigtem PEI 25 kDa versetzt, welches in Verhältnissen zwischen 4:1 und 1:40 (mol/mol) resultierte. Im Anschluss einer 30-minütigen Inkubation wurden im Abstand von jeweils 1 Stunde vier Teile Natriumcyanoborohydrid (1 mg pro 10 mg Lactoferrin) zugesetzt. Nach weiteren 20 Stunden wurden die Mischungen auf einer BioLogic HR FPLC-Anlage durch eine Kationenaustauschsäule (POROS HS) mit einem 10-minütigen Salzgradienten von 0,5 M – 3,0 M Natriumchlorid und einer konstanten Menge von 20 mM HEPES aufgereinigt. Während ungekoppeltes Lactoferrin die Säule bereits bei niedrigen Mengen an NaCl im Laufpuffer verließ, konnte das Lf-PEI-Konjugat erst bei einer Konzentration von 2,5 M bis 3,0 M NaCl eluiert werden (ABBILDUNG 2.2).

Die gesammelten Fraktionen der Konjugate wurden vereint und durch dreifache Ultrazentrifugation mit einem Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter (MWCO 5.000 Da) entsalzt und aufkonzentriert. Die Bestimmung der Konzentration an PEI jeder Probe erfolgte mittels Ninhydrin-Assay (siehe KAPITEL 2.8.2), die des jeweiligen Lactoferrin-Gehalt durch UV-Messung bei 280 nm. Alle Konjugat-Lösungen wurden auf eine PEI-Konzentration von 1mg/ml eingestellt und bis zur weiteren Benutzung bei -80°C gelagert.

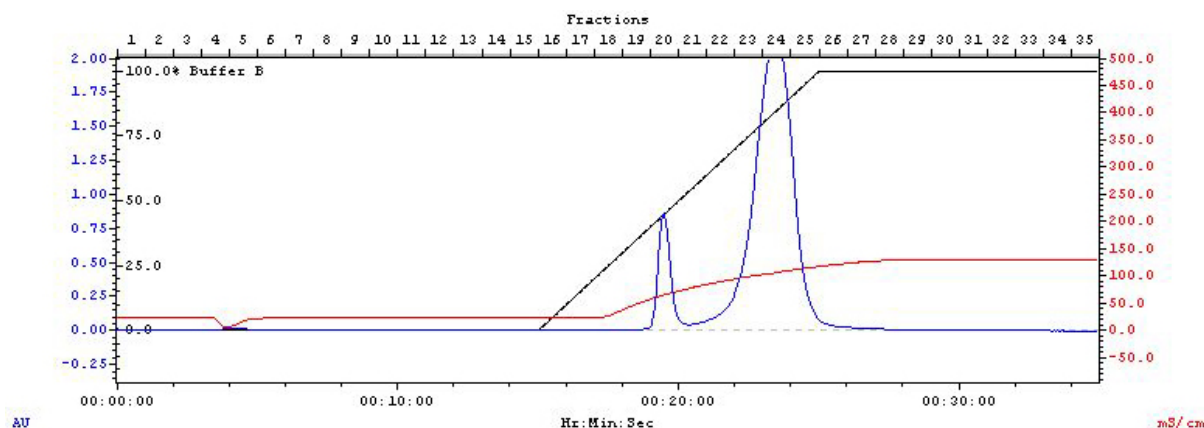


ABBILDUNG 2.2: Aufreinigung von Lf-PEI-Konjugaten durch Kationenaustauschchromatographie. Hergestellte Konjugate wurden auf einer POROS HS-Säule an einer BioLogic HR FPLC-Anlage mittels eines NaCl-Gradienten von 0,5-3,0 M in 20 mM HEPES aufgetrennt. Ungekoppeltes Lactoferrin verließ die Säule bereits bei einer geringen Salzkonzentration (linker Peak), während das Lactoferrin-PEI-Konjugat erst zwischen 2,5-3,0 M NaCl eluiert wurde (rechter Peak)

2.7. Synthese Clenbuterol-modifizierter Konjugate

2.7.1. N-[2-(4-Amino-3,5-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-N-(tert-butyl)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1yl)propionamid (Clen-MAL)

Die Herstellung und Charakterisierung der Konjugate Clen-MAL und des in KAPITEL 2.7.3 beschriebenen PEI-*g*-Clen wurden von Frau Dr. Nathalie Sieverling am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm durchgeführt.

Um die Konjugation von Clenbuterol mit anderen Molekülen zu ermöglichen, musste in die Struktur des Arzneistoffs eine reaktive Funktion eingebracht werden (Prezelj *et al.*, 2003). Dazu wurden 2,50 mmol Ethylchlorformat zu einer Lösung von 2,38 mmol Maleimidopropionsäure in 20 ml THF und 600 μ l Triethylamin bei 0°C gegeben und für 45 Minuten gerührt. Im Anschluss erfolgte die Addition von 2,20 mmol Clenbuterol (basisch ausgefällt). Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit einer basischen Salzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösemittel entfernt wurde, erfolgte eine abschließende Vakuumtrocknung. Die Reinheit des reaktiven Clenbuterolanalogons Clen-MAL wurde mittels NMR-Spektroskopie überprüft.

2.7.2. Alexa Fluor 488-BSA-Clenbuterol (Alexa-BSA-Clen)

10 mg (0,15 μmol) BSA wurden in 1 ml PBS gelöst und mit einem 5-fach molaren Überschuss an Alexa Fluor 488 Carbonsäuresuccinimidylester versetzt. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Im unmittelbaren Anschluss daran wurde ein 10-fach molarer Überschuss von SPDP (in DMSO gelöst) zugegeben und die Mischung für eine weitere Stunde inkubiert. Um freie Thiolgruppen für die weitere Kopplung zu erhalten, wurde das Konjugat über einen Zeitraum von 30 Minuten mit 50 mM DTT versetzt. Die quantitative Bestimmung der Thiolgruppen erfolgte mittels Ellman-Test (siehe KAPITEL 2.8.3). Ein 5-fach molarer Überschuss an Clen-MAL (siehe KAPITEL 2.7.1) wurde hinzugefügt und die Mischung über Nacht stehen gelassen. Nach jedem Zwischenschritt und am Ende der Synthese erfolgte stets eine Abtrennung ungekoppelter Reagenzien durch Aufreinigung des Produktes mittels Gelfiltration (Sephadex G-25 M PD 10). Die Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung von End- bzw. Intermediärprodukten erfolgte durch UV-Messung bei 280, 343 und 495 nm. Für die Berechnung wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet: 71.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für Alexa Fluor 488 bei 495 nm; Korrekturfaktor für Alexa Fluor 488 bei 280 nm 0,11; 43.824 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für BSA bei 280 nm; 8080 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für Pyridin-2-Thion bei 343 nm.

2.7.3. PEI-g-Clenbuterol (PEI-g-Clen)

0,35 g Clen-MAL (0,82 mmol) wurde in 20 ml Methanol gelöst und mit 10 μmol PEI (in 30 ml Methanol) gemischt. Nach 20-stündigem Rühren unter Lichtausschluss erfolgte die Aufreinigung der Mischung durch Dialyse (MWCO 4.000-6.000) gegen destilliertes Wasser. Der Gehalt an Clenbuterol wurde durch UV-Messung bei 293 nm, der von PEI mittels Kupfersulfat-Methode (siehe KAPITEL 2.8.1) bestimmt. Die Konjugate wurden auf eine PEI-Konzentration von 1mg/ml eingestellt, in Aliquote aufgeteilt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8. Quantitative Nachweisreaktionen

2.8.1. Kupfersulfat-Assay

Die quantitative Bestimmung von PEI erfolgte mittels einer Kupfersulfat-Methode (Ungaro *et al.*, 2003). Hierfür wurde eine CuSO_4 -Lösung (0,145 mg/ml in 0,1M Natriumacetat pH 5,2) hergestellt. Jeweils 500 μl der Lösung wurden mit den Testsubstanzen oder verzweigtem PEI als Standard in einer Konzentration von 0,01-0,1 mg/ml versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die sich ergebenden bläulichen Cu(II)/PEI-Komplexe wurden im Anschluss bei 285 und 630 nm mit einem Ultrospec 3100 Pro Photometer vermessen.

2.8.2. Ninhydrin-Assay

Für die Bestimmung von PEI kann anstatt der Komplexierung mit Kupfersulfat auch die Reaktion mit Ninhydrin verwendet werden. Hierbei wird die Eigenschaft von Aminosäuren und primären Aminen ausgenutzt, in Verbindung mit Ninhydrin einen blauen Farbstoff (Ruhemanns Purpur) zu bilden, welcher quantitativ gemessen werden kann. 0,3 g Ninhydrin wurden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Je 250 µl dieser Lösung wurden mit unterschiedlichen Mengen der Testsubstanzen oder verzweigtem PEI als Standard in einer Konzentration von 0,1 - 0,375 mg/ml versetzt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Die photometrische Bestimmung des Farbstoffes wurde bei 570 nm in einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter in durchsichtigen 96-Well-Platten durchgeführt.

2.8.3. Ellman-Test

Die freien Thiol-Gruppen einer Substanz in Lösung wurden mit Hilfe der Farbreaktion nach Ellman bestimmt. Dazu wurde eine Stocklösung von 5-5'-Dithio-bis(2-Nitro-Benzoessäure) (4 mg/ml) im Verhältnis 1:50 (mol/mol) mit Reaktionspuffer (0,1 M Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 8,0) verdünnt. 200 µl der Ellman-Verdünnung wurden mit unterschiedlichen Mengen an Probenlösung versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine UV-Bestimmung bei 405 nm (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter) in durchsichtigen 96-Well-Platten. Als Referenz wurde eine Standardkurve mit Cysteinhydrochlorid (0,02-0,25 mM) erstellt und für die Berechnung verwendet.

2.9. Rezeptorbindungsstudien

2.9.1. Inkubation von Lf-FTSC

Die Untersuchung der Rezeptorbindung und Aufnahme von Lactoferrin erfolgte durch Inkubation von Lf-FTSC auf BEAS-2B- und A549-Zellen. Für die Durchflusszytometrie wurden 24 h vor Zugabe der Konjugate 100.000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden in 4-Kammer-Objektträgern mit 25.000 Zellen pro Kammer durchgeführt.

Im direkten Anschluss an das Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation von Lactoferrin-FTSC mit einer Konzentration von 2 μM in MEM für 2 Stunden bei 37°C entweder in An- oder Abwesenheit eines 50-fachen Überschusses an freiem Lactoferrin.

2.9.2. Inkubation von Alexa-BSA-Clen

Die Anzahl an Clenbuterol-Rezeptoren wurde durch Inkubation von Alexa-BSA-Clen auf A549-Zellen untersucht. Für die FACS-Experimente wurden 24 h vor Zugabe der Konjugate 100.000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden in 4-Kammer-Objektträgern mit 25.000 Zellen pro Kammer durchgeführt. Alexa-BSA-Clen bzw. Alexa-BSA wurde mit MEM zu einer finalen Konzentration von 1 μM verdünnt und auf den Zellen in An- oder Abwesenheit eines Überschusses an freiem Clenbuterol für 4 h bei 37°C inkubiert.

2.9.3. Untersuchungen zum Insulinrezeptor

Der Status an Insulinrezeptoren auf A549- und BEAS-2B-Zellen wurde mit Hilfe einer Antikörpermarkierung evaluiert. Für die FACS-Experimente wurden 24 h vor Zugabe der Konjugate 100.000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden in 4-Kammer-Objektträgern mit 25.000 Zellen pro Kammer durchgeführt. Der murine Primärantikörper gegen den humanen Insulinrezeptor (CD 220) wurde 1:200 (vol/vol) mit eiskalter PBS verdünnt und auf den Zellen für 30 Min bei 0°C inkubiert. Nachdem die Zellen dreifach mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Addition einer 1:50 (vol/vol)-Verdünnung des fluoreszenztragenden Sekundärantikörpers (gerichtet gegen murines IgG) für weitere 30 Minuten auf Eis. Um unspezifische Bindung zu erkennen, wurden in Kontrolleexperimenten die Zellen ausschließlich mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

2.9.4. Durchflusszytometrie

Für die FACS-Messungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 μl Trypsin-EDTA pro Well für 8 Minuten bei 37°C abgelöst. Eine Ausnahme bildeten die Antikörper-Untersuchungen, bei denen die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 100 μl PBS suspendiert wurden. Alle Proben wurden im direkten Anschluss in FACS-Röhrchen überführt, auf ein Gesamtvolumen von 500 μl verdünnt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Bestimmung an Fluoreszenz-positiven Zellen erfolgte in einem FACScan Durchflusszytometer. FTSC bzw. Alexa Fluor 488 wurden mit Hilfe eines Argon-Lasers bei 488 nm angeregt, während die Emission bei 530 ± 15 nm detektiert wurde.

Um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, erfolgte eine Eingrenzung gemäß dem Vorwärtsstreulicht (FSC = Maß für die Größe) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC = Maß für die Granularität). Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: Flussrate: 60µl/min; AmpGain: FSC 1,35; SSC 1,65; FL1 1,00. Mindestens 2000 Zellen pro Probe wurden gezählt. Die Auswertung erfolgte mit der CellQuest 3.1 Analyse-Software. Dabei wurden die Auswertefenster stets so eingestellt, dass unbehandelte Zellen Positivraten zwischen 0 und 1% zeigten. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.9.5. Epifluoreszenzmikroskopie

In direkten Anschluss an die Inkubation der Konjugate wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd-Lösung pH 7,4 fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte eine 3-minütige Anfärbung der Zellkerne mit 0,33 µM DAPI. Um ein schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzsignale zu verhindern, wurden die fixierten Zellen mit 10 µl Vectashield® versetzt und mit einem Deckgläschen geschützt. Für die mikroskopische Untersuchung wurde ein Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 mit einem 100x/1,3 oil-plan neofluor-Objektiv verwendet. Die Anregung von FTSC bzw. Alexa Fluor 488 erfolgte bei 470 ± 20 nm, während die Emission bei 540 ± 25 nm detektiert wurde. Für DAPI erfolgte eine Anregung bei 380 ± 15 nm und Detektion der Emission bei 460 ± 25 nm. Digitalbilder wurden mit einer Zeiss AxioCam Kamera aufgenommen und mit Hilfe der Software Axivision LE 4.5 und Adobe Photoshop CS3 ausgewertet.

2.10. Herstellung der Gentransferkomplexe

2.10.1. Das N/P-Verhältnis

Das N/P-Verhältnis stellt den molaren Quotienten aus Stickstoffatomen (N) der Polymerstruktur und Phosphataten (P) des DNA-Grundgerüsts dar. Dieser spielt bei der Herstellung von Polyplexen eine entscheidende Rolle im Hinblick auf deren biophysikalische Eigenschaften. Mit Hilfe des N/P-Verhältnisses kann eine Aussage über die Nettoladung der Komplexe gemacht werden. Die Berechnung wird dabei nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{Polymer})}{M(\text{Polymermonomer})} \cdot \frac{M(\text{DNA-Monomer})}{m(\text{DNA})}$$

Im Fall der DNA wird die einzelne Monomereinheit durch ein Nukleotid beschrieben, welches die molekulare Masse von 330 g/mol besitzt. Die Ethylenimin-Grundeinheit des kationischen Polymers PEI weist eine Molekülmasse von 43 g/mol auf. Am konkreten Beispiel von Polyethylenimin/DNA-Komplexen lautet die Gleichung für das N/P-Verhältnis somit nun folgendermaßen:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{Polymer})}{43 \text{ g/mol}} \cdot \frac{330 \text{ g/mol}}{m(\text{DNA})}$$

2.10.2. Herstellung der Polyplexe

Für die Herstellung der Polyplexe bedient man sich der Tatsache, dass kationische Polymere mit negativ geladener Plasmid-DNA bei Aufeinandertreffen in wässrigem Medium durch elektrostatische Wechselwirkung interagieren und spontan Komplexe ausbilden. Als Polymer wurde in der ganzen Arbeit verzweigtes Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 25 kDa verwendet. Dieses besitzt bei der Applikation mittels Vernebelung im Vergleich zur linearen Form eine höhere Transfektionseffizienz (Koshkina *et al.*, 2003). Einen wichtigen Faktor für die Eigenschaften der generierten Polyplexe stellt das verwendete Lösungsmittel dar. Abhängig vom jeweiligen Medium, in welchem die Komplexierung durchgeführt wird (geringe oder hohe Ionenstärke), können sich Aggregate mit Durchmessern größer als 1 µm bilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von destilliertem Wasser als Komplexierungsmedium stabile Partikel erzeugt und im Vergleich zu HBS oder isotonischer Glukoselösung nach Aerosolapplikation in einer bis zu 100-fach höheren Genexpression innerhalb der Lunge resultiert (Rudolph *et al.*, 2005a). Als Ursache wird ein hypoosmotischer Schock angenommen, welcher zu einem Anschwellen der apikalen Membran des Atemwegsepithels führt und in einer erhöhten Permeabilität für Makromoleküle und Proteine resultiert (Widdicombe *et al.*, 1996). Mit Hinblick auf die *in vivo* Applikation zur Lunge wurden somit alle Gentransferkomplexe dieser Arbeit in destilliertem Wasser generiert.

Bei der praktischen Durchführung wurde die Plasmid-DNA zunächst in destilliertem Wasser gelöst. In einem getrennten Ansatz wurden je nach N/P-Verhältnis entsprechende Mengen an unmodifiziertem bzw. modifiziertem PEI im gleichen Lösungsmittel verdünnt. Äquivalente Volumina an DNA-Lösung wurden daraufhin zur Polymerlösung pipettiert und mit dieser durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (5-8 Mal) vermischt. Die Gentransferkomplexe mit einer finalen Konzentration von 20 oder 100 µg DNA/ml wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert

und im unmittelbaren Anschluss für die Transfektion oder zur weiteren Modifikation verwendet. Abhängig vom eingesetzten Liganden gab es Variationen in der genauen Zusammensetzung der Polyplexe.

2.10.2.1. Lactoferrin-modifizierte Polyplexe

Für die Studien mit Lactoferrin wurden PEI bzw. die entsprechend synthetisierten Lf-PEI-Konjugate jeweils mit pCMVLuc komplexiert. Der unterschiedliche Anteil an Lactoferrin in den jeweiligen Polyplexen wurde hierbei bereits durch die Synthese festgelegt (TABELLE 2.5). Verwendete N/P-Verhältnisse waren 4 und 8.

Polymerbezeichnung	theoretische Zahl an Lf-Liganden pro PEI [mol/mol]	verwendete N/P-Verhältnisse
Lf-PEI 4:1	4,0	4; 8
Lf-PEI 2:1	2,0	4; 8
Lf-PEI 1:5	0,2	4; 8
Lf-PEI 1:10	0,1	4; 8
Lf-PEI 1:20	0,05	4; 8
Lf-PEI 1:40	0,03	4; 8
PEI	0	4; 8

TABELLE 2.5: Zusammensetzung verwendeter Lactoferrin-modifizierter Polyplexe

2.10.2.2. Clenbuterol-modifizierte Polyplexe

Im Gegensatz zu Lactoferrin-modifizierten Polyplexen wurde bei den Untersuchungen mit Clenbuterol lediglich von einem einzigen PEI-*g*-Clen-Konjugat mit durchschnittlich vier Clenbuterol-Liganden pro Molekül Polyethylenimin ausgegangen. Um Polyplexe mit unterschiedlichen Mengen an Clenbuterol herzustellen, wurde PEI-*g*-Clen mit entsprechenden Mengen an unmodifiziertem PEI versetzt (TABELLE 2.6). Das Polymergemisch wurde im Anschluss daran mit Plasmid-DNA komplexiert. Die Transfektionsversuche erfolgten, falls nicht anders angegeben, mit einem N/P-Quotienten von 8.

Polymermischung	Anteil PEI-g-Clen [%]	Anteil PEI [%]	theoretische Zahl an Clen-Liganden pro PEI [mol/mol]	verwendete N/P-Verhältnisse
PEI-g-Clen	100	0	4,0	8
20/1	95	5	3,8	8
10/1	90	10	3,6	8
5/1	80	20	3,2	8
2/1	67	33	2,7	8
1/1	50	50	2,0	8
1/2	33	67	1,3	2; 4; 6; 8; 10; 20
1/5	20	80	0,8	8
1/10	10	90	0,4	8
1/20	5	95	0,2	8
PEI	0	100	0	2; 4; 6; 8; 10; 20

TABELLE 2.6: Zusammensetzung verwendeter Clenbuterol-modifizierter Polyplexe.

2.10.2.3. Insulin-modifizierte Polyplexe

Im Unterschied zu Lactoferrin und Clenbuterol erfolgte die Modifikation der Gentransferpartikel mit Insulin als Ligand nicht durch kovalente Bindung an das Polymergrundgerüst, sondern durch elektrostatische Adsorption an die Polyplexoberfläche. Hierzu wurden in allen Fällen zuerst unmodifizierte Komplexe aus PEI und pCMVLuc mit einem N/P-Quotienten von 8 hergestellt. Nach 20-minütiger Wartezeit wurden unterschiedliche Mengen an humanem Insulin in einem Konzentrationsbereich von 1-10 μg pro μg Plasmid-DNA der Lösung hinzugefügt (TABELLE 2.7) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die modifizierten Komplexe wurden im unmittelbaren Anschluss für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Komplexbezeichnung	Zusatz von Insulin [$\mu\text{g}/\mu\text{g}$ pCMVLuc]	verwendetes N/P-Verhältnis
PEI/pDNA	0	8
PEI/pDNA/Ins 1	1	8
PEI/pDNA/Ins 2	2	8
PEI/pDNA/Ins 3	3	8
PEI/pDNA/Ins 4	4	8
PEI/pDNA/Ins 5	5	8
PEI/pDNA/Ins 10	10	8

TABELLE 2.7: Zusammensetzung verwendeter Insulin-modifizierter Polyplexe

2.11. Charakterisierung der Gentransferkomplexe

2.11.1. Bestimmung der Partikelgröße

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Komplexe erfolgte mit einem Brookhaven Instruments 90 Plus Partikelgrößenmessgerät. Bei der dabei verwendeten Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, welches bereits ausführlich beschrieben worden ist (Müller und Schuhmann, 1996). Das Messprinzip basiert auf der Korrelation zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln im Medium und ihrer Größe. Kleine Teilchen besitzen aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung eine höhere Geschwindigkeit als große Partikel. Dies führt zu stärkerer Intensitätsschwankung eines einfallenden Laserlichtes und kann mit Hilfe eines Detektors (meist im 90°-Winkel) quantitativ ausgewertet werden. Für die Durchführung wurden jeweils 600 µl der hergestellten Polyplexe (20 µg DNA/ml Lösung) in eine Halb-Mikro-Küvette pipettiert und vermessen. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet: 5 Messungen pro Probe à 1 Minute; Viskosität von Wasser 0,89 cP; Ref-Index 1,330, Dielektrizitätskonstante 78,54.

2.11.2. Bestimmung des Zeta-Potentials

Das Zeta-Potential dient als Maß für die Stabilität von dispersen Systemen, indem es auf den Grad der Abstoßung zwischen benachbarten Partikeln schließen lässt. Falls hierbei ein bestimmter Wert unterschritten wird, kann ein System aus elektrostatischer Sicht zu Aggregation oder Ausflockung neigen (Müller, 1996). Für die Bestimmung der Oberflächenladung der Polyplexe wurde ein Brookhaven ZetaPALS Analyzer verwendet. Bei der Laser Doppler Anemometrie (LDA) mittels Elektrophorese Licht-Streuung (ELS) wird an die Probenlösung ein definiertes elektrisches Feld angelegt. Abhängig von ihrer Oberflächenladung wandern Partikel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (elektrophoretische Mobilität) zur entgegengesetzten Elektrode und führen zur Frequenzverschiebung eines Laserstrahls, welcher durch die Probenlösung strahlt. Durch Messung des Frequenzunterschiedes kann auf das Zeta-Potential rückgeschlossen werden. Für die Durchführung wurden 1,6 ml der hergestellten Komplexe (20 oder 100 µg DNA/ml Lösung) in einer Makro-Küvette vermessen. Folgende Parameter wurden dabei verwendet: 5 Läufe à 10 Zyklen pro Ansatz; Viskosität von Wasser 0,89 cP; Ref-Index 1,330, Dielektrizitätskonstante 78,54. Die Ermittlung des Zeta-Potentials erfolgte nach der Smoluchowski-Berechnung.

2.11.3. Gelelektrophorese

Jeweils 100 ng Plasmid-DNA wurden in 5 µl destilliertem Wasser mit entsprechenden Mengen an Polymer versetzt, um die gewünschten Komplexe für die Untersuchung zu generieren. Jede Probe wurde doppelt hergestellt. Eines der Duplikate wurde zusätzlich mit 10 µg Heparansulfat behandelt. Letzteres bewirkt eine kompetitive Verdrängung der Plasmid-DNA aus dem Komplex. Nach 45-minütiger Inkubation wurden den Proben je 2 µl Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol in Wasser) zugesetzt und diese im direkten Anschluss auf ein 0,8% Agarosegel (inkl. Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 120 V in TAE-Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA). Die DNA-Banden des Gels wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer Gelkamera aufgenommen.

2.11.4. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen Insulin-beschichteter Polyplexe wurden am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut) in Göttingen von Frau Dr. Mariola Monika Golas und Herrn Dr. Björn Sander aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Holger Stark durchgeführt.

2.11.4.1. Negativfärbung der Komplexe

PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexe wurden stets frisch durch Mischen von gleichen Volumina entsprechender Mengen an PEI und Plasmid-DNA in destilliertem Wasser hergestellt (siehe KAPITEL 2.10.2). Nach Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in ein Well eines Polyximethylen-Gefäßes gegeben. Die Partikel wurden für 90 Sekunden auf ein Stück Carbonfilm (3 x 3 mm) adsorbiert und 2 Minuten lang mit 2% Uranylformiat (in Wasser) behandelt. Der Carbonfilm mit den adsorbierten Partikeln wurde aus der Färbelösung entnommen und mittels eines zweiten Carbonfilmes verschlossen (Valentine *et al.*, 1968). Nachdem eine Trocknung bei Raumtemperatur durchgeführt worden war, erfolgte die Aufnahme von Bildern mittels eines CM200 FEG Elektronenmikroskopes. Folgende Parameter wurden dabei verwendet: angelegte Spannung 160 kV, Vergrößerung 70.000-fach, eingesetzte Kamera 4k x 4k CCD (charge-coupled device). Die Partikelgrößen wurden mit Hilfe der Software EMMENU (TVIPS; Gauting) bestimmt.

2.11.4.2. Native Kryopräparation

Die hergestellten Komplexe für die Negativfärbung wurden ebenfalls für die native Kryopräparation verwendet. Je fünf Mikroliter der Lösungen wurden auf ein EM-Probengitter gegeben und mit einem perforierten Carbonfilm verschlossen. Nach der Entfernung von überschüssigem Lösungsmittel wurden die Proben mit flüssigem Ethan schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert (Adrian *et al.*, 1984). Alle Aufnahmen wurden im gefrorenen Zustand mit einem CM200 FEG Elektronenmikroskop bei einer 70.000-fachen Vergrößerung durchgeführt. Die Partikelgrößen wurden mit Hilfe der Software EMMENU (TVIPS; Gauting) bestimmt.

2.12. *In vitro* Untersuchungen

2.12.1. Transfektionsstudien

Für Transfektionsstudien *in vitro* wurden 24 h vor Beginn des Experiments 100.000 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Dies resultierte am darauffolgenden Tag in einer Konfluenz von ca. 70-80%. Unmittelbar vor der Transfektion erfolgte ein Austausch des Mediums gegen 500 µl serumfreies MEM. Pro Well wurden Gentransferkomplexe mit einer korrespondierenden pDNA-Menge von 1 µg in einem Volumen von 50 µl auf die Zellen pipettiert. Bei einigen Ansätzen erfolgten Inhibierungsuntersuchungen durch Zusatz eines Überschusses an unmodifiziertem Ligand (Lactoferrin, Clenbuterol). Nach 4-stündiger Inkubation wurde die Transfektionslösung abgesaugt und gegen serumhaltiges Medium mit Zusatz von Antibiotika ersetzt.

2.12.2. Bestimmung der Luziferaseaktivität

Alle *in vitro* Transfektionsuntersuchungen wurden mit dem Plasmid pCMVLuc, einem für Luziferase kodierenden Reporter gen, durchgeführt. Bei dem Luziferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* handelt es sich um ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kDa, welches eine ATP-abhängige Reaktion katalysiert, in der durch Umsatz des Substrates Luziferin Licht emittiert wird. Die dabei ablaufende Reaktion besitzt den in ABBILDUNG 2.3 gezeigten Mechanismus.

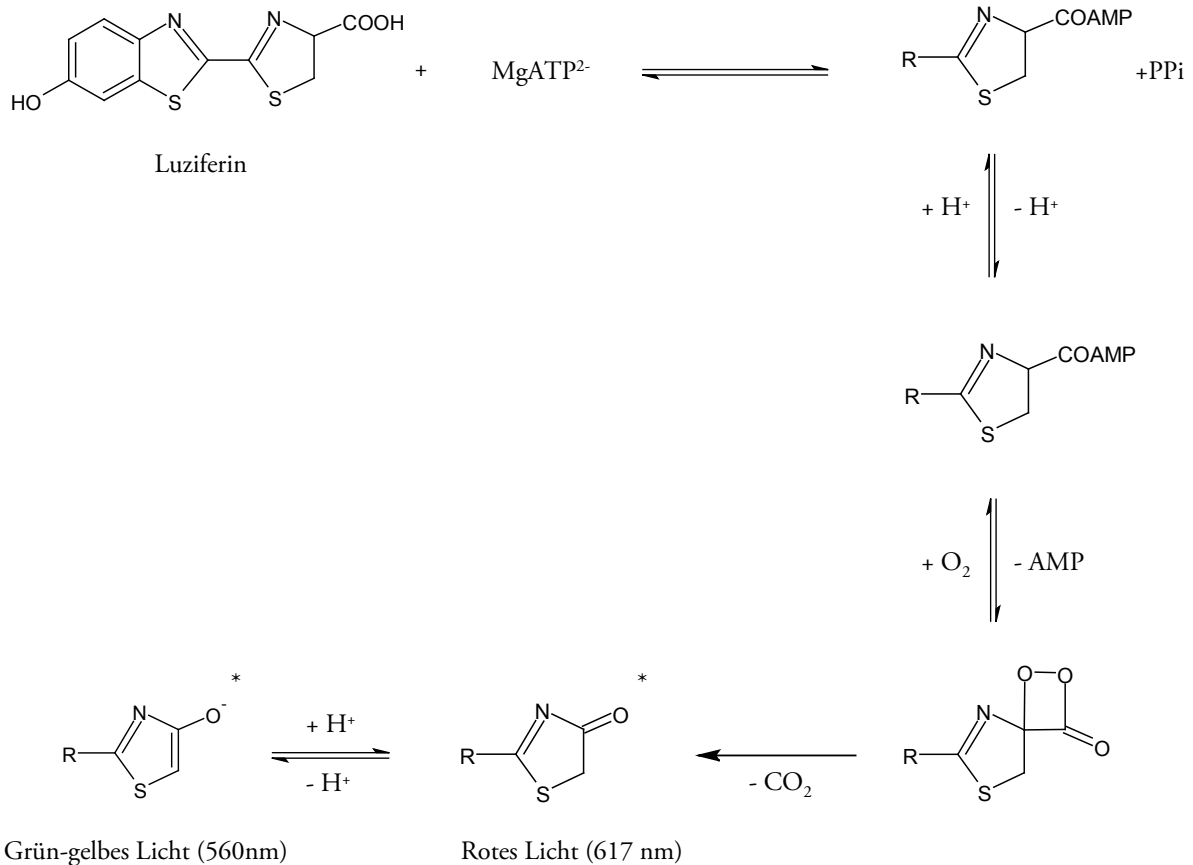


ABBILDUNG 2.3: Mechanismus der Luziferase-katalysierten Reaktionen (Viviani, 2002).

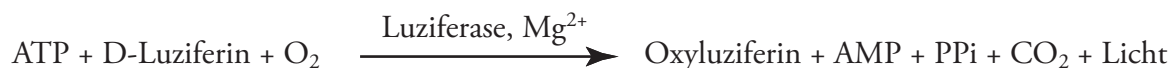
Sobald ein Substratüberschuss an Luziferin vorliegt, ist die Stärke des Lichtes proportional zur Menge an Luziferase. Durch quantitative Bestimmung der Lichtemission lässt sich somit eine gute Aussage über die Transfektionseffizienz der Polyplexe treffen.

Für die experimentelle Durchführung wurden 24 Stunden nach Beginn der Transfektion das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro Well erfolgte ein Zusatz von 100 µl Lyse-Puffer (25 mM TRIS, 0.1 % Triton X-100, pH 7,8). Nach Inkubation von 20 Minuten und Schütteln für 60 Sekunden wurde ein Aliquot von 50 µl des Zelllysates mittels automatischer Zugabe von 100 µl Luziferin-Puffer (470 µM D-Luziferin; 270 µM Coenzym A; 33 mM DTT; 530 µM ATP; 1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2$; 3 mM MgSO_4 ; 20 mM Tricin; 0,1 mM EDTA) versetzt und die Lumineszenz während eines Zeitraumes von 5 Sekunden in einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter gemessen. Die absolute Proteinkonzentration jeder Probe wurde mit Hilfe eines Standard Protein Assays (Methode nach Bradford) bestimmt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte jeweils in Quadruplikaten, wurde für die Auswertung nach Hintergrundkorrektur über einen Zeitraum von 10 Sekunden integriert und auf den entsprechenden Proteingehalt normalisiert.

2.12.3. Bestimmung der Zellviabilität

24 Stunden vor Zugabe der Polyplexe wurden je 25.000 Zellen pro Well in eine weiße 96-Well-Platte ausgesät. Unmittelbar vor den Untersuchungen wurde das Medium gegen 200 µl serumfreies MEM ausgetauscht. Die Komplexierung der Polymer/pDNA-Partikel erfolgte analog der Transfektionsexperimente bei 20 µg/ml DNA in destilliertem Wasser (siehe KAPITEL 2.10.2). Im direkten Anschluss an die 20-minütige Wartezeit wurden die Polyplexe mit einer korrespondierenden DNA-Menge von 0,5 µg pro Well in einem Volumen von 25 µl auf die Zellen pipettiert. Am Ende der 4-stündigen Inkubation erfolgte ein Austausch der Transfektionslösung gegen serumhaltiges Medium mit Zusatz von Antibiotika. Nach weiteren 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium abgesaugt, 100 µl PBS pro Well hinzu gegeben und die Zellvitalität mittels des ATPlite Zellproliferationstests gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt.

Dieser Test basiert auf der quantitativen Bestimmung von ATP, welches in lebenden Zellen mit aktivem Metabolismus vorhanden ist, bei toten Zellen jedoch nur in geringer Menge nachgewiesen werden kann. Das Nachweisverfahren beruht ebenfalls auf der in KAPITEL 2.12.2 beschriebenen Luziferasereaktion. Im Unterschied zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist hier das Enzym Luziferase bereits im Überschuss vorhanden, nicht jedoch das ebenfalls benötigte Substrat ATP. Nachdem das gemessene emittierte Licht direkt proportional zur ATP-Konzentration ist, kann ein Rückschluss auf dessen absolute Menge und folglich die metabolische Aktivität der Zelle gezogen werden. Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter. Die Lumineszenz von unbehandelten Zellen wurde als Referenzwert für 100% Viabilität verwendet.

2.13. *In vivo* Untersuchungen

Für die *in vivo* Experimente erfolgte die Applikation der Gentransferkomplexe auf bis zu drei verschiedenen Applikationswegen. Bei allen Untersuchungen wurden entsprechende Mengen Polymer und Plasmid-DNA bei einem N/P-Verhältnis von 10 in destilliertem Wasser komplexiert und 20 Minuten vor ihrer Anwendung bei Raumtemperatur inkubiert.

2.13.1. Tiere

Weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit einem Alter von 6-8 Wochen von Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) gekauft und unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Mäuse wurden an die Umgebung der Tierversuchsanstalt über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen vor der Versuchsdurchführung akklimatisiert. Alle Tierversuche wurden vom lokalen Ethikkomitee genehmigt und kontrolliert, die Durchführung erfolgte gemäß der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes.

2.13.2. Instillation

Bei der Instillation werden die Gentransferkomplexe tröpfchenweise direkt auf die Nase der Maus vorgelegt und von dieser durch Einatmen aufgenommen. Unmittelbar vor der Applikation wurden die Tiere mit einer intraperitoneal verabreichten Mischung aus Medetomidin (500 µg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (50 µg/kg KG) narkotisiert. Komplexe mit einer korrespondierenden pDNA-Menge von 30 µg in einem Gesamtvolumen von 100 µl destilliertem Wasser pro Tier wurden den Mäusen in Aliquoten auf die Nase pipettiert. Nach vollständiger Instillation der Lösung wurde ein Antidot, bestehend aus Atipamezol (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (500 µg/kg KG) und Naloxon (1,2 mg/kg KG), verabreicht. Die Mäuse erwachten innerhalb von 15 Minuten. Pro Gruppe wurden 3 bzw. 4 Mäuse verwendet.

2.13.3. Vernebelung

Die Aerosolstudien wurden mit 2 mg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 8 ml destilliertem Wasser pro Ansatz durchgeführt. Das Vernebelungssystem bestand aus einem Turbo Boy® N Kompressor mit LC Plus Vernebler, welcher über einen Spacer mit einer Ganzkörpervernebelungskammer verbunden war (Rudolph *et al.*, 2005b). Der Spacer war mit 150 g Kieselgel bedeckt, um eine Verschiebung der Tröpfchengrößen des Aerosols hin zu kleineren und damit effektiveren Partikeln zu erreichen. In der Kammer aus Plexiglas (9,8 x 13,2 x 21,5 cm) befanden sich je nach Ansatz zwischen 4 und 6 Mäusen. Die Komplexe wurden in zwei Teilen à 4 ml über einen Zeitraum von etwa 15-20 Minuten verabreicht. Um die Atmungsfrequenz der Mäuse zu erhöhen, wurde ein synthetisches Luftgemisch (Westfalen AG, Münster) mit einem CO₂-Anteil von 4,5 % und einer Flussrate von 5 l/min verwendet.

Für die *in vitro* Stabilitätsuntersuchungen nach Vernebelung der Gentransferkomplexe wurde unmittelbar hinter der Vernebelungskammer der Aerosolstrom mit Hilfe eines Spritzenkörpers in einem 2 ml Plastiktube aufgefangen (vernebelte Fraktion). Zusätzlich wurde der verbleibende Rückstand innerhalb der Kammer untersucht (Kammerfraktion). Als Kontrolle diente ein Aliquot der Komplexlösung, welches nicht vernebelt wurde (unvernebelte Fraktion).

2.13.4. Intravenöse Injektion

Zur intravenösen Applikation der hergestellten Komplexe wurden die Mäuse in einem Rückhaltesystem (Braintree Scientific Inc.; Braintree, USA) fixiert. Polyplexe mit einer korrespondierenden DNA-Menge von 30 µg wurden in einem Gesamtvolumen von 400 µl pro Maus mit Hilfe von 1 ml Insulinspritzen (29G) in die Schwanzvene injiziert. Pro Gruppe wurden 4 Mäuse verwendet

2.13.5. *In vivo* Luziferasedetektion

Für die Bestimmung der *in vivo* Transfektionseffizienz unter nichtinvasiven Bedingungen bedient man sich der Biolumineszenz. Bei dieser Methode erfolgt die Detektion der Lichtemission, welche durch Enzym-basierte Oxidation eines Substrates abläuft, sobald das Enzym in seiner Funktion als Reportergen exprimiert wird. Die Biolumineszenz der von der *Firefly*-Luziferase katalysierten Reaktion (vgl. ABBILDUNG 2.3) eignet sich dabei besonders für die Bestimmung der Genexpression innerhalb verschiedener Organe, da diese bis zu mehreren Zentimetern Tiefe im Organismus erfasst werden kann (Sadikot und Blackwell, 2005).

Zur optischen Auswertung wurden unabhängig von der Applikationsart alle Mäuse nach 24 Stunden mit einer intraperitoneal verabreichten Mischung aus Medetomidin (500 µg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (50 µg/kg KG) narkotisiert. Nachdem sich die Mäuse in Narkose befanden, wurden pro Tier je 3 mg D-Luziferin in 100 µl wässriger Lösung (pH 7,4) intraperitoneal injiziert. Im Anschluss an eine Wartezeit von 10 Minuten erfolgte die Bestimmung der Biolumineszenz mit Hilfe des IVIS 100 Systems. Für die Messung wurden die Mäuse auf dem Rücken liegend innerhalb einer mit 37°C beheizten Aufnahmekammer platziert. Folgende Parameter wurden dabei verwendet: Field of View 10, f1 f-stop, high resolution binning, Belichtungszeit 10 Minuten. Die quantitative Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm Living Image® 2.5. Dazu wurde die sich über den Lungen befindliche Lumineszenz nach Hintergrundkorrektur bestimmt.

2.13.6. Organentnahme und Herstellung des Gewebehomogenisates

Um die Luziferaseexpression innerhalb der Lungen besser quantitativ erfassen zu können, erfolgte eine Bestimmung des homogenisierten Lungengewebes. Dazu wurden unmittelbar nach den *in vivo* Aufnahmen die sich noch in Narkose befindlichen Mäuse per Genickbruch getötet. Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte mittels medianen Hautschnittes mit anschließender Durchtrennung des Peritoneums. Um die Lunge von Blutbestandteilen (z.B. Hämoglobin) zu reinigen, welche die Luziferasemessung verfälschen könnten (Colin *et al.*, 2000), wurde diese nach Durchtrennung der *Vena cava inferior* über das Blutsystem durch die Injektion von 1 ml isotonischer Kochsalzlösung in die rechte Herzkammer gespült. Die Lungen wurden mit Hilfe von chirurgischem Operationsbesteck entnommen, nach Überführung in ein 2 ml Plastiktube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zerkleinerung der Organe erfolgte im gefrorenen Zustand mittels Mörser und Pistill. Hierbei wurde ein Aliquot des Homogenisates (15-25 mg) für die DNA-Extraktion mit anschließender PCR-Bestimmung, der verbleibende größere Anteil (ca. 100-250 mg) für die Luziferase-Messung verwendet.

2.13.7. Bestimmung der Luziferaseaktivität des Lungengewebes

Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde das hergestellte Lungenhomogenisat (siehe KAPITEL 2.13.6) aufgetaut, mit 400 µl Lysepuffer (25 mM TRIS, 0,1 % Triton X-100, Complete® Protease Inhibitoren, pH 7,8) versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Vortexen und anschließender 10-minütiger Zentrifugation mit 10.000 g bei 4°C wurden je 100 µl des Überstandes in ein Plastikröhrchen pipettiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in Duplikaten mittels einem Lumat LB9507 Röhrchenluminometer nach automatisierter Zugabe von 100µl Luziferin-Substrat-Puffer (470 µM D-Luziferin; 270 µM Coenzym A; 33 mM DTT; 530 µM ATP; 1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2$; 3 mM MgSO_4 ; 20 mM Tricin; 0,1 mM EDTA). Die über 10 s emittierten Photonen (RLU) wurden detektiert und nach Hintergrundkorrektur für die Auswertung verwendet. Um die Genexpression innerhalb der Lunge quantitativ darstellen zu können, wurde mit rekombinanter Luziferase eine Standardkurve erstellt.

2.13.8. DNA-Extraktion aus dem Lungengewebe

Die Extraktion der Gesamt-DNA der Lunge, bestehend aus genomischer DNA der Maus und applizierter Plasmid-DNA, erfolgte mittels dem DNEasy® Blood & Tissue Kit. Dazu wurden 15-25 mg des homogenisierten Lungenpulvers (siehe KAPITEL 2.13.6) über Nacht bei 56°C in

einem Puffer mit Proteinase K verdaut, welcher eine Denaturierung der Proteine bewirkte. Am darauf folgenden Tag wurde die DNA nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 100 µl Elutionspuffer isoliert. Die quantitative Bestimmung der Gesamt-DNA erfolgte durch UV-Messung bei 260 bzw. 280 nm.

2.13.9. Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Analyse von pCpGLuc und pCMVLuc wurde mittels einem iCycler IQ Real Time PCR Detection System durchgeführt. Das Prinzip zur Quantifizierung der Plasmid-DNA beruht hierbei auf der Messung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (2-{2-[(3-Dimethylaminopropyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation) während der Amplifikation.

2.13.9.1. pCpGLuc

Spezifische Primer für die Zeocin-codierende Sequenz von pCpGLuc wurden entworfen. Diese besitzen folgende Sequenz:

Primer A (forward): 5'-GCC ATG TTG ACC AGT GCT GTC-3'

Primer B (reverse): 5'-CCT CAG TCC TGC TCC TCT GCC-3'

Für die Bestimmung mittels Real Time PCR wurde eine Menge von 500 ng isolierter Gesamt-DNA (siehe KAPITEL 2.13.8) auf ein Gesamtvolumen von 14,6 µl mit destilliertem Wasser verdünnt und in 96-Well-PCR-Platten vorgelegt. Es erfolgte die Addition von 15,6 µl PCR-Mix-Lösung, bestehend aus 15 µl iQ SYBR Green Supermix 2x und je 0,2 µl von Primer A und Primer B (100 µM). Zur Durchführung der PCR wurde folgendes Protokoll verwendet: 95°C für 3 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C, 67°C und 72°C für jeweils 20 sec.

Um die ermittelten c(t)-Werte (ABBILDUNG 2.4) mit dem Gehalt an Plasmid-DNA korrelieren zu können, wurde eine Standardkurve erstellt, bei welcher definierte Mengen zwischen 2 fg und 20 ng pCpGLuc mit dem gleichen PCR-Protokoll eingesetzt wurden. Alle Daten wurden mit der Optical System Software 3.1 ausgewertet.

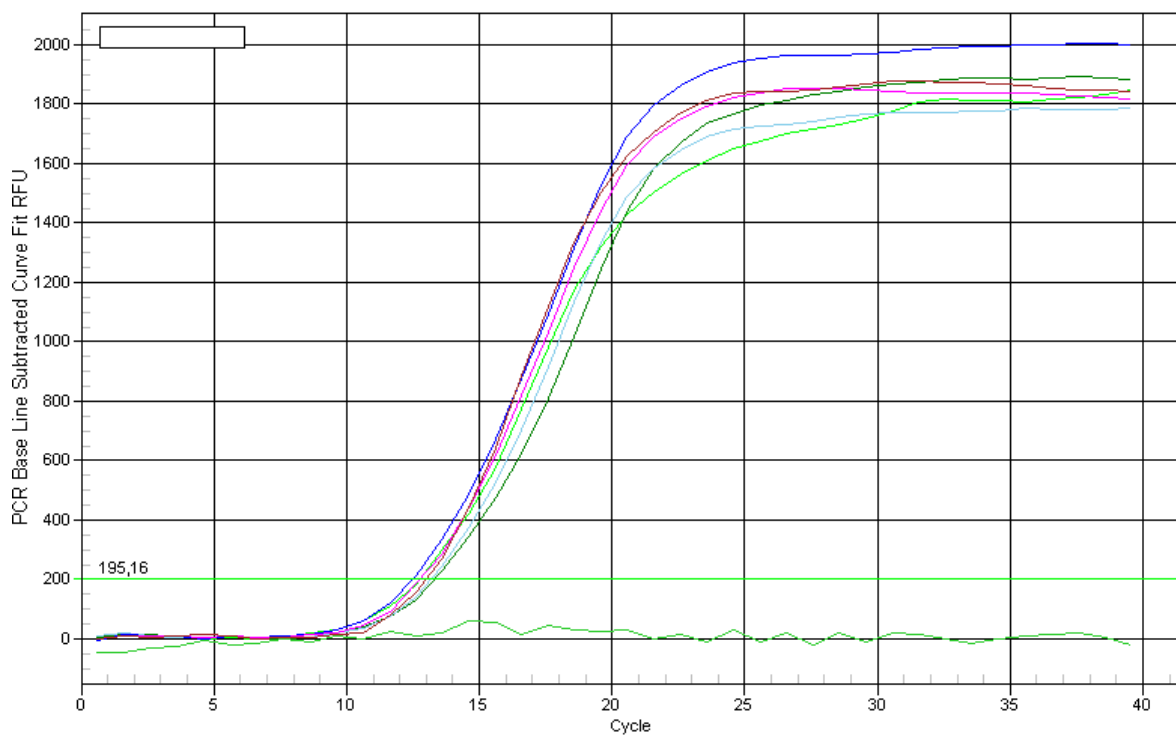


ABBILDUNG 2.4: Beispielhaftes Diagramm der Real Time PCR von pCpGLuc-haltigen DNA-Extrakten.

2.13.9.2. pCMVLuc

Im Vergleich zur Untersuchung von pCpGLuc wurde für die quantitative Bestimmung von pCMVLuc mittels Real Time PCR ein etwas abgeändertes Protokoll verwendet. Nach Extraktion der Gesamt-DNA aus dem Lungenhomogenisat (siehe KAPITEL 2.13.8) erfolgte ein Verdau mit Hilfe der Restriktionsendonuklease XbaI für 3 h bei 37°C, um die in den Proben vorhandene Plasmid-DNA zu linearisieren. Im Anschluss an die Aufreinigung der Proben mittels eines Qiaquick Nucleotide Removal Kit wurde die Real Time PCR mit 80 ng Gesamt-DNA in einem Volumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt.

Die verwendeten Primer besaßen dabei diesmal Spezifität für die Luziferase-codierende Sequenz des Plasmids und hatten folgende Struktur:

Primer A (forward): 5'-TCC ATC TTC CAG GGA TAC G-3'

Primer B (reverse): 5'-ATC CAG ATC CAC AAC CTT CG-3'

Zur Durchführung der Real Time PCR wurde folgendes Protokoll verwendet: 95°C für 4 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec und 60°C für 1 min. Um aus den erhaltenen c(t)-Werten die Plasmidmengen ermitteln zu können, wurde auch hier eine Standardkurve erstellt, diesmal mit pCMVLuc als Referenz.

2.14. Statistische Berechnungen

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm der jeweiligen Standardabweichungen angegeben. Die Untersuchungen erfolgten, falls nicht anders angegeben, in Triplikaten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests berechnet. Messergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ war.

3. Lactoferrin als Ligand für den nichtviralen Gentransfer

3.1. Synthese von Lf-FTSC und Lf-PEI

Die Kopplung von Lactoferrin an verzweigtes PEI oder FTSC wurde über einen vergleichbaren Reaktionsmechanismus durchgeführt. Das Schema der Synthese von Lactoferrin-PEI ist in **ABBILDUNG 3.1** gezeigt. Um eine Konjugation zu ermöglichen, musste eine Amin-reaktive Gruppe in die Struktur von Lactoferrin eingefügt werden. Dazu wurden die Hydroxylgruppen der N-Acetylneuraminsäure-Seitenketten des Glykoproteins mit Hilfe von Natriumperiodat zu Aldehyden oxidiert. Letztere konnten daraufhin mit Polyethylenimin oder FTSC unter Bildung einer Schiff'schen Base reagieren. Da die Aldimin-Struktur chemisch noch sehr labil ist und sich somit bei der Lagerung wieder zersetzen könnte, erfolgte durch die Zugabe von Natriumcyanoborohydrid eine reduktive Aminierung zu weit stabileren sekundären oder tertiären Aminen.

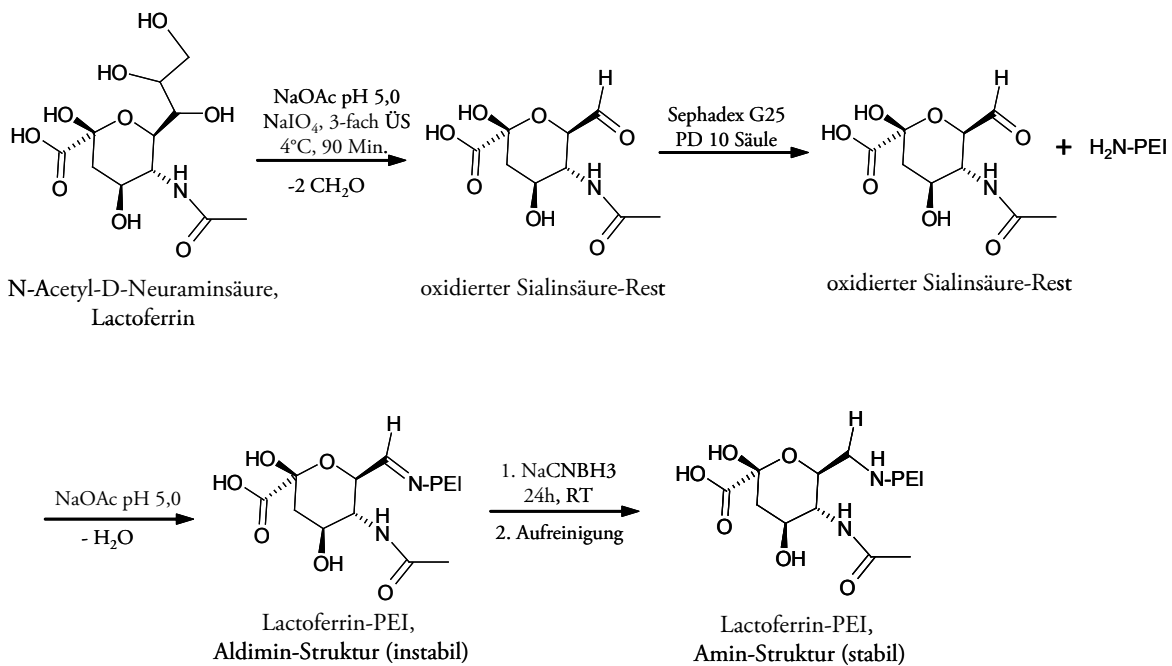


ABBILDUNG 3.1: Reaktionsschema der Kopplung von humanem Lactoferrin an verzweigtes Polyethylenimin.

Die Kopplungseffizienzen, welche sich aus dem Verhältnis zwischen eingesetztem und gemessenem Lactoferrin-Gehalt der PEI-Konjugate berechneten, betragen zwischen 62% und 95% (TABELLE 3.1).

Konjugat	Theoretisches Verhältnis	Ermitteltes Verhältnis	Effizienz
	Lf zu PEI [mol/mol]	Lf zu PEI [mol/mol]	
Lf-PEI 4:1	4:1	2.8 : 1,0	70.0%
Lf-PEI 2:1	2:1	1.9 : 1,0	95.0%
Lf-PEI 1:5	1:5	1.0 : 4,5	90.0%
Lf-PEI 1:10	1:10	1.0 : 8,5	85.0%
Lf-PEI 1:20	1:20	1.0 : 17,2	86.0%
Lf-PEI 1:40	1:40	1.0 : 25,0	62.5%

TABELLE 3.1: Kopplungseffizienzen hergestellter Konjugate aus Lactoferrin und PEI. Die Effizienzen sind als der Quotient aus eingesetzter und ermittelter Ausbeute der Konjugate basierend auf dem Gehalt an Lactoferrin berechnet.

3.2. Zelluläre Aufnahme von Lf-FTSC bei Alveolar- und Bronchialepithelzellen

Die zelluläre Aufnahme von Lactoferrin durch Alveolar- bzw. Bronchialepithelzellen wurde mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht, nachdem Lf-FTSC 2 Stunden lang mit einer Konzentration von 2 μM bei 37°C auf BEAS-2B- bzw. A549-Zellen inkubiert wurde. FACS-Messungen zeigten, dass mehr als 50% der BEAS-2B-, jedoch lediglich etwa 1% der A549-Zellen Fluoreszenz-positiv waren (ABBILDUNG 3.2, schwarze Balken). Die Spezifität der Bindung wurde durch Zusatz eines 50-fachen Überschusses an freiem Lactoferrin während der Inkubation belegt. Dies resultierte in einer signifikanten 10-fachen Abnahme Fluoreszenz-positiver BEAS-2B-Zellen, während die Inhibierungslösung auf A549-Zellen keinen relevanten Einfluss nahm (ABBILDUNG 3.2, graue Balken).

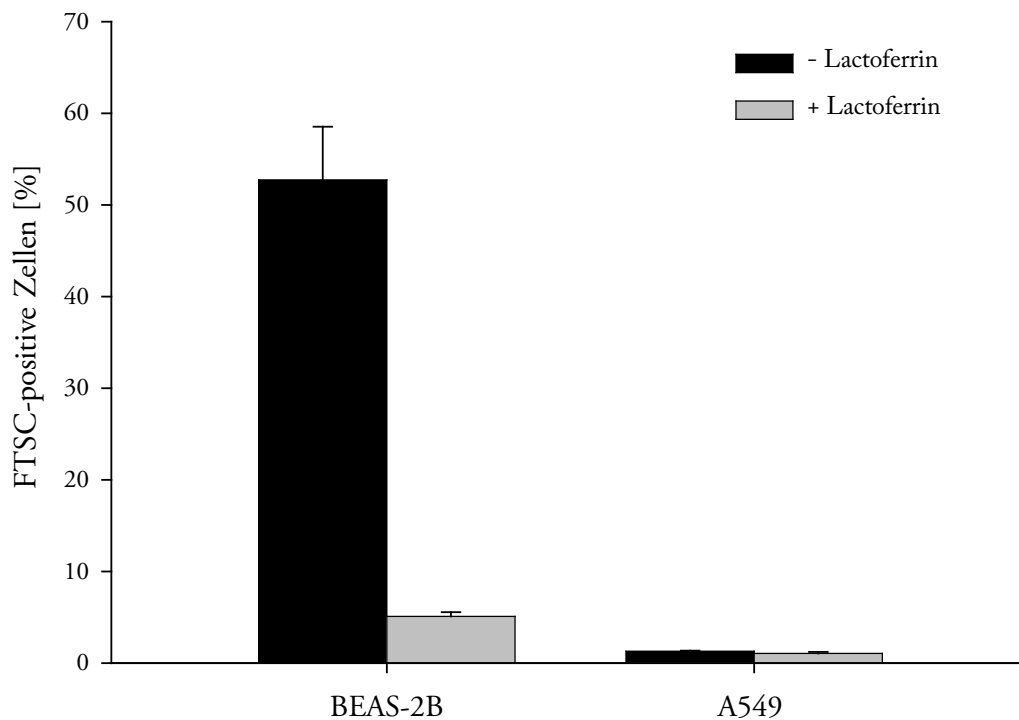
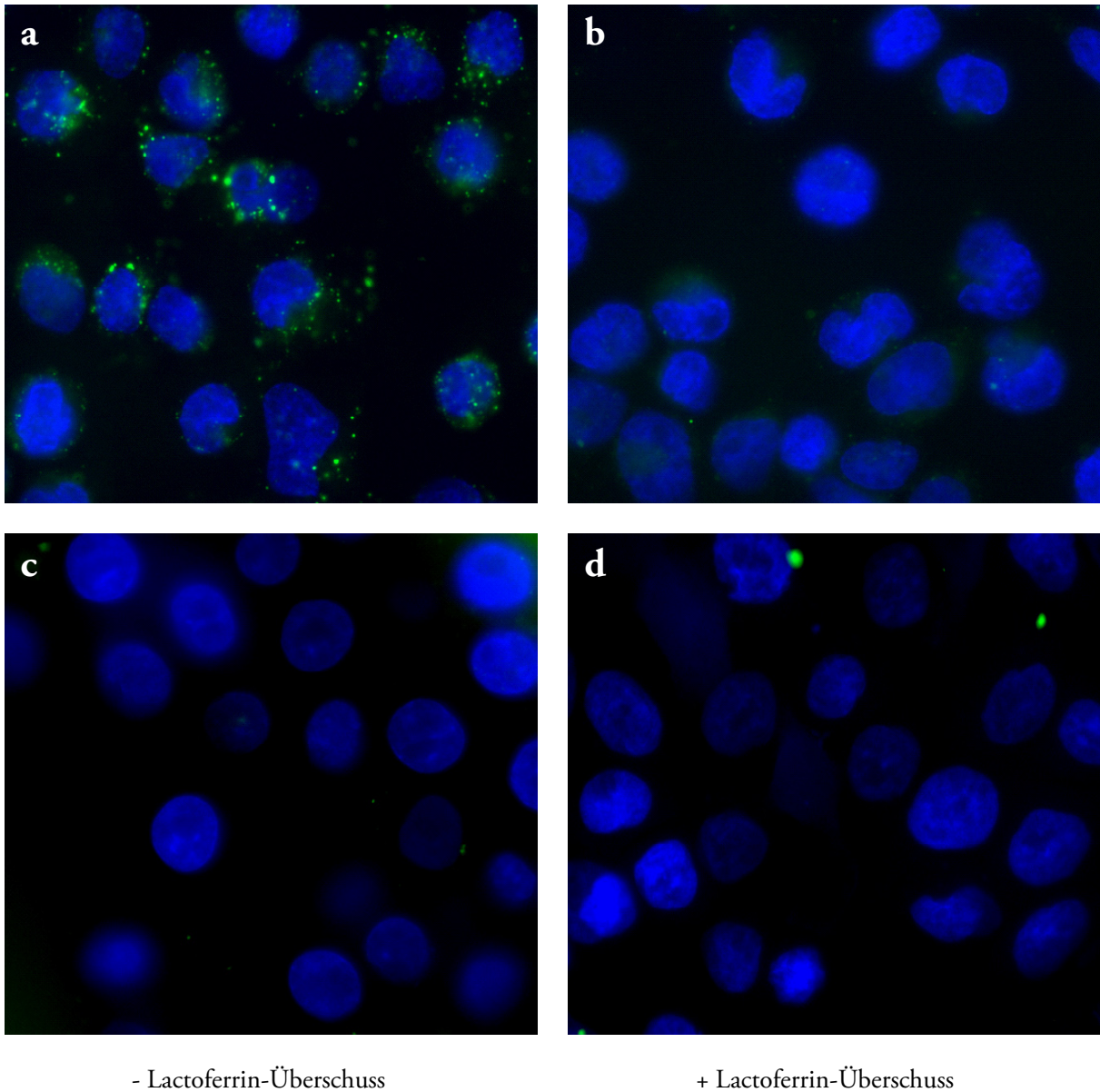


ABBILDUNG 3.2: Messung der zellulären Aufnahme von Lactoferrin durch Alveolar- und Bronchialepithelzellen mittels Durchflusszytometrie. Lactoferrin-FTSC wurde 2 h lang bei 37°C mit einer Konzentration von 2 μ M auf BEAS-2B- bzw. A549-Zellen in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (graue Balken) eines 50-fachen Überschusses an freiem Lactoferrin inkubiert. Fluoreszenz-positive Zellen wurden im direkten Anschluss an die Inkubation per FACS-Analyse vermessen.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie konnten durch die Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Auf BEAS-2B-Zellen wurden punktförmige Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Größe beobachtet, welche auf eine endosomale Aufnahme schließen lassen (ABBILDUNG 3.3a). Die Zugabe eines Überschusses an Lactoferrin bewirkte ein nahezu vollständiges Verschwinden der Signale (ABBILDUNG 3.3b). Im Gegensatz dazu konnte auf A549-Zellen weder in Ab- noch in Anwesenheit von freiem Lactoferrin relevante Fluoreszenz detektiert werden (ABBILDUNG 3.3c+d).



- Lactoferrin-Überschuss

+ Lactoferrin-Überschuss

ABBILDUNG 3.3: Beobachtung der zellulären Aufnahme von Lactoferrin durch Alveolar- und Bronchialepithelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Aufnahmen wurden nach 2-stündiger Inkubation von 2 μM Lf-FTSC bei 37°C durchgeführt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit 0,33 μM DAPI. BEAS-2B-Zellen zeigten FTSC-Fluoreszenzsignale bei Abwesenheit eines 50-fachen Überschusses an freiem Lactoferrin (a), nicht jedoch bei dessen Anwesenheit (b). Auf A549-Zellen ergab sich kein Unterschied für die Inkubation ohne (c) bzw. mit (d) Lf-Überschuss.

Sowohl mittels Durchflusszytometrie wie auch durch Fluoreszenzmikroskopie konnte somit gezeigt werden, dass Lactoferrin-Rezeptoren bevorzugt auf Bronchial-, nicht jedoch auf Alveolarepithelzellen exprimiert werden.

3.3. Charakterisierung der Gentransferkomplexe

3.3.1. Partikelgröße und Zeta-Potential

Die Partikelgröße der untersuchten Polyplexe war von verschiedenen Faktoren abhängig. Generell zeigten sich sowohl bei PEI/pDNA- wie auch bei Lf-PEI/pDNA-Komplexen nach der Formulierung mit einem N/P-Verhältnis von 8 geringere hydrodynamische Durchmesser im direkten Vergleich zu einem N/P-Quotienten von 4 (TABELLE 3.2). Zusätzlich konnte eine starke Abhängigkeit der Partikelgröße vom Konjugationsgrad der Lf-PEI/pDNA-Komplexe beobachtet werden. Bei hohen Lactoferrin-Konjugationsgraden (z.B. Lf-PEI 4:1) zeigten die entsprechenden Polyplexe sowohl bei N/P 8 wie auch bei N/P 4 einen ca. 2-5-fach größeren Durchmesser als Konjugate mit einem geringeren Anteil an Lactoferrin (z.B. Lf-PEI 1:20). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Konjugation von Lf einen Einfluss auf die Komplexbildung zwischen PEI und Plasmid-DNA ausüben könnte.

Im Gegensatz zur Bestimmung der Größe fanden sich bei Zeta-Potential-Messungen von Lf-PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA-Komplexen keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kopplungsgraden (TABELLE 3.2). Im Bezug auf die Oberflächenladung der Polyplexe hat die Konjugation von Lactoferrin also keine Auswirkung.

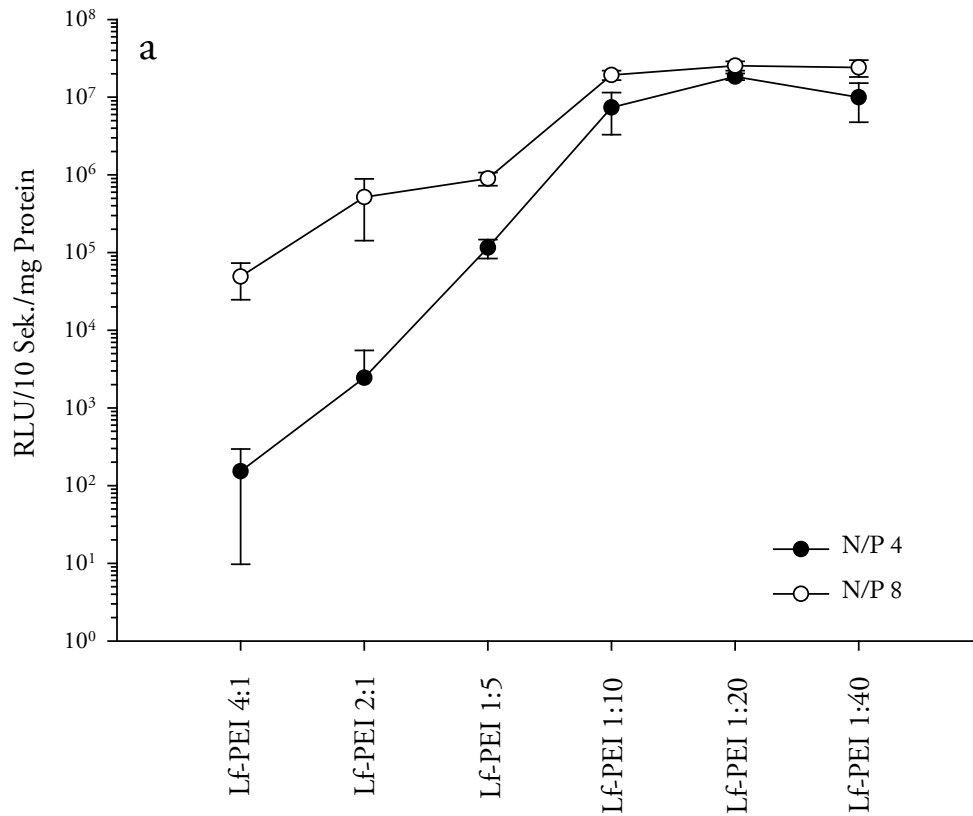
	N/P 4		NP 8	
	Größe [nm]	ζ-Potential [mV]	Größe [nm]	ζ-Potential [mV]
PEI	47 ± 1	11 ± 5	44 ± 3	25 ± 1
Lf-PEI 4:1	224 ± 3	12 ± 4	105 ± 1	23 ± 1
Lf-PEI 2:1	151 ± 1	12 ± 3	87 ± 1	25 ± 1
Lf-PEI 1:5	119 ± 1	11 ± 3	54 ± 3	27 ± 1
Lf-PEI 1:10	83 ± 2	11 ± 4	59 ± 2	24 ± 1
Lf-PEI 1:20	70 ± 3	12 ± 4	48 ± 2	27 ± 1
Lf-PEI 1:40	47 ± 1	12 ± 3	47 ± 1	21 ± 1

TABELLE 3.2: Physikalische Eigenschaften von PEI/pDNA- und Lf-PEI/pDNA-Komplexen. Der PI war für alle Messungen zwischen 0,2 und 0,3.

3.4. *In vitro* Transfektionsstudien

3.4.1. Genexpression in Abhängigkeit von Zelltyp und N/P-Verhältnis

Die Untersuchungen zur *in vitro* Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI/pDNA-Komplexen wurden über die Messung der Luziferaseexpression auf BEAS-2B- bzw. A549-Zellen ausgewertet. Generell war die Transfektionseffizienz beider Zelllinien bei einem N/P-Verhältnis von 8 höher als bei einem N/P-Verhältnis von 4. Des Weiteren zeigten Konjugate mit einem hohen Anteil an Lactoferrin (z.B. Lf-PEI 4:1) im Allgemeinen nur geringe Genexpression. Einen Überblick über die Transfektionsergebnisse Lactoferrin-modifizierter Polyplexe gibt ABBILDUNG 3.4.



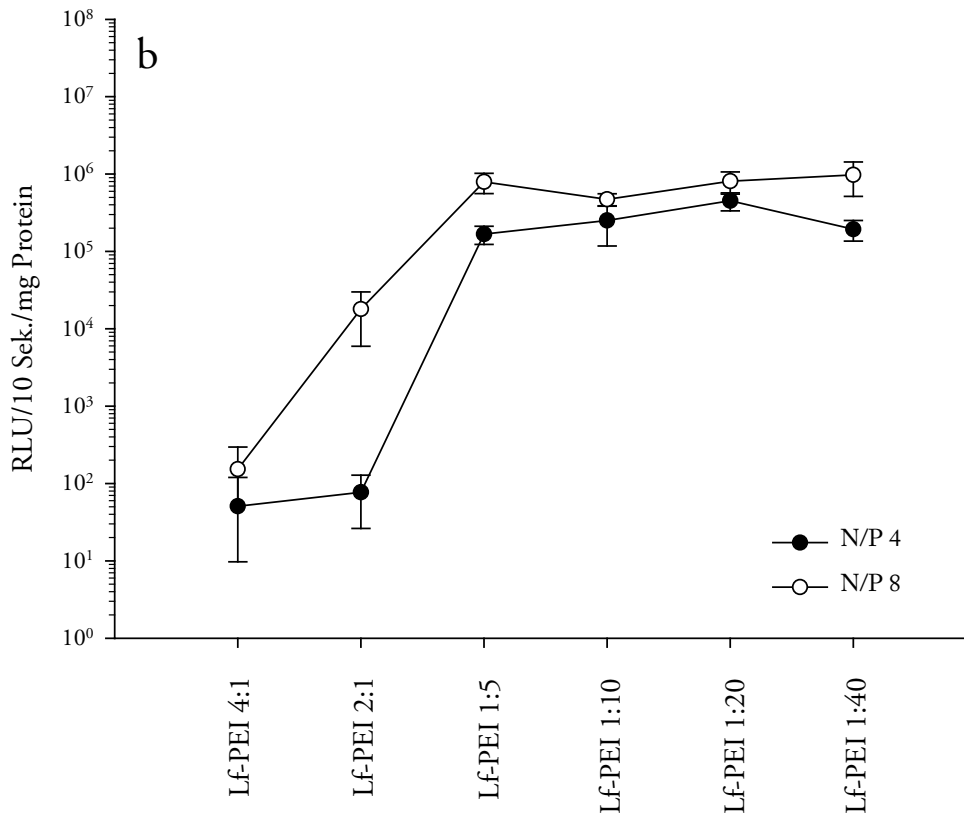


ABBILDUNG 3.4: Transfektionseffizienzen von Lf-PEI/pDNA-Komplexen verschiedener Zusammensetzung auf BEAS-2B- (a) und A549-Zellen (b) mit N/P-Quotienten von 4 (schwarze Punkte) oder 8 (weiße Punkte). Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=4$).

Auf BEAS-2B-Zellen stieg die Transfektionseffizienz mit abnehmenden Konjugationsgraden von Lactoferrin an und zeigte ein Maximum bei Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen. Hier konnte insbesondere bei einem N/P-Verhältnis von 4 eine signifikante 5-fache Steigerung gegenüber unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln beobachtet werden (ABBILDUNG 3.5a). Bei einem N/P-Quotienten von 8 konnte der Lactoferrin-modifizierte Polyplex hingegen keinen Vorteil zu unbehandelten Referenzkomplexen aufweisen (ABBILDUNG 3.5b). Im Gegensatz dazu wurde auf A549-Zellen keine Steigerung der Transfektionseffizienz durch die Modifikation mit Lactoferrin erreicht. Bei einem N/P-Verhältnis von 8 war sogar ein signifikanter Abfall des Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexes im Vergleich zu PEI/pDNA-Partikeln zu beobachten. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen und zeigte Übereinstimmung mit den Rezeptorbindungsstudien (vgl. KAPITEL 3.2).

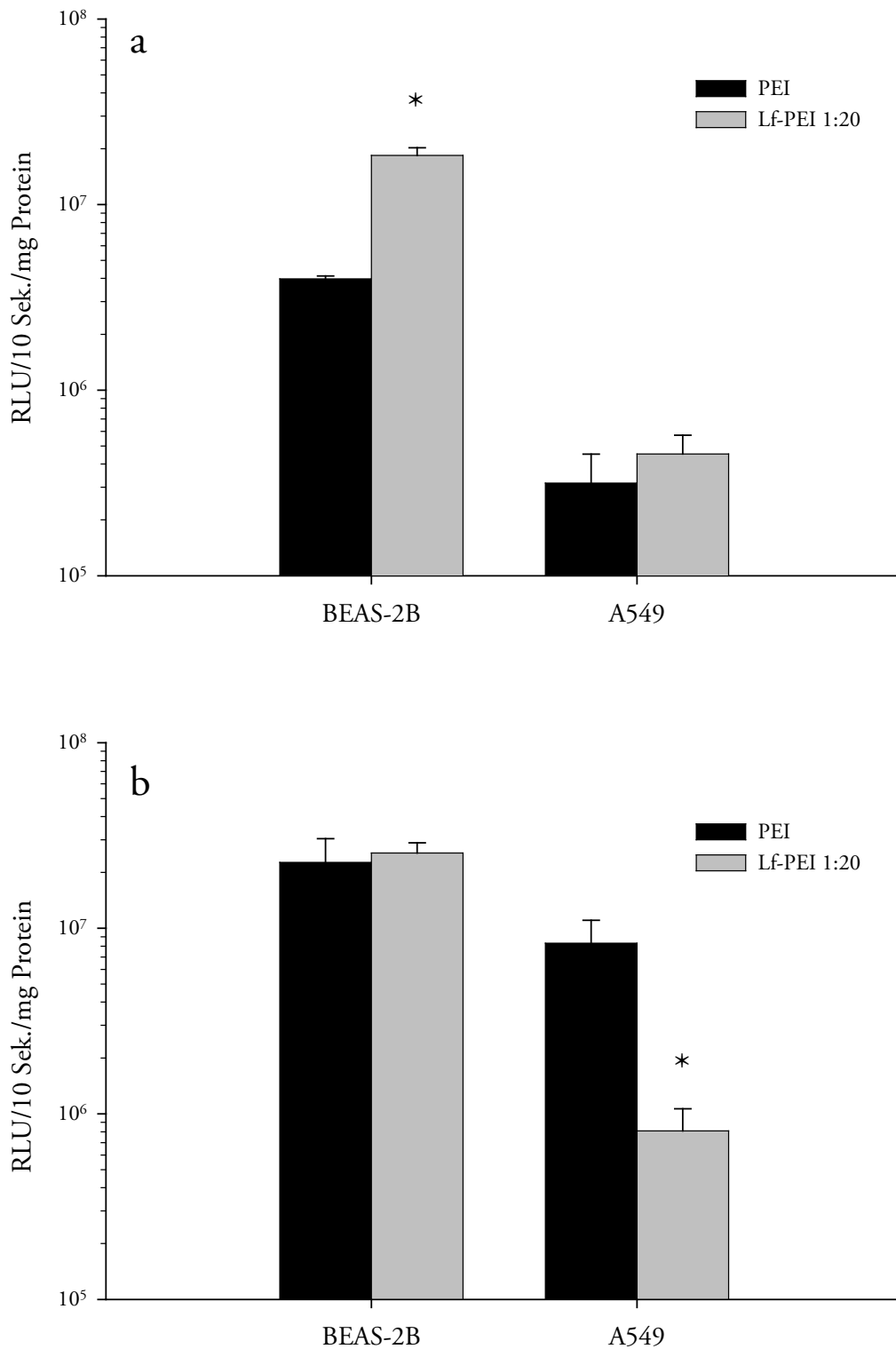


ABBILDUNG 3.5: Transfektionseffizienzen von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen auf BEAS-2B- und A549-Zellen mit einem N/P-Verhältnis von 4 (a) oder 8 (b). Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen korrespondierenden PEI/pDNA- und Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

3.4.2. Inhibierungsuntersuchungen

Um die Spezifität des Anstieges der Genexpression durch Lactoferrin-modifizierte Polyplexe zu überprüfen, wurden Inhibierungsversuche mit einem Überschuss an freiem Lactoferrin durchgeführt. Dazu erfolgte die Transfektion von BEAS-2B-Zellen mit PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Partikeln bei einem N/P-Verhältnis von 4 in Ab- oder Anwesenheit von 100 µg/ml Lactoferrin im Medium. Hierbei zeigte sich ein signifikanter 2,5-facher Abfall der Luziferaseexpression mit Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen, wohingegen PEI/pDNA-Komplexe nicht signifikant beeinflusst wurden (ABBILDUNG 3.6).

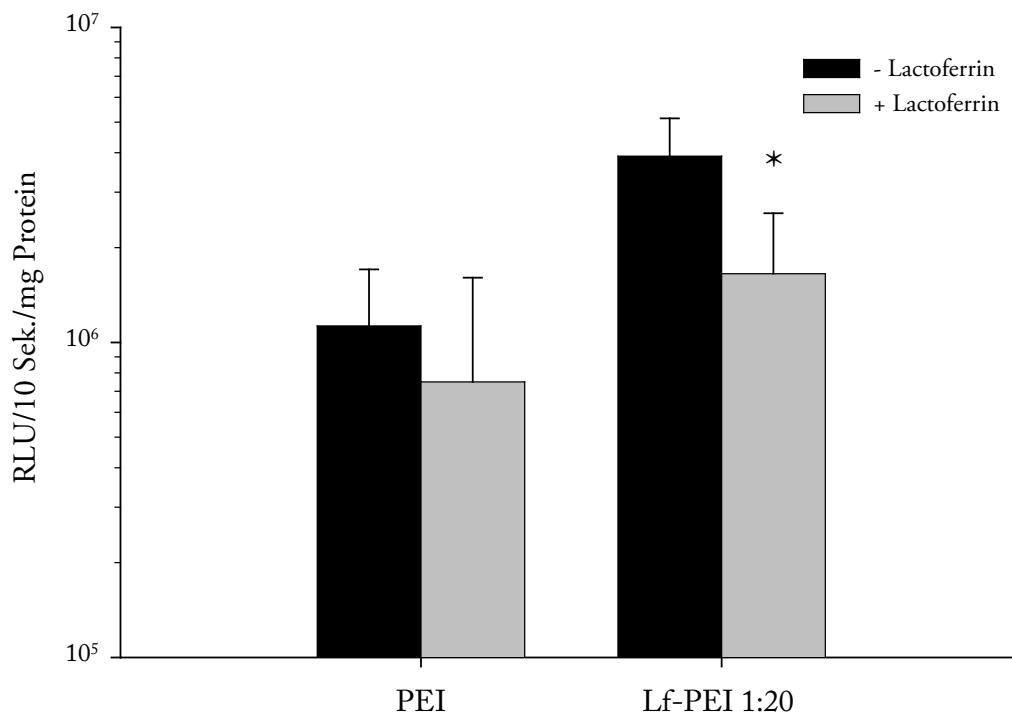


ABBILDUNG 3.6: Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen auf BEAS-2B-Zellen mit einem N/P-Verhältnis von 4 in An- oder Abwesenheit von 100 µl/ml freiem Lactoferrin. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen korrespondierenden Polyplexen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Verwendung optimaler Verhältnisse von Lactoferrin zu PEI die Transfektionseffizienz auf Bronchialepithelzellen, welche Lactoferrin-Rezeptoren exprimieren, erhöhen kann. Bei Alveolarepithelzellen ist dieser Effekt nicht vorhanden, vermutlich aufgrund eines Mangels an spezifischen Rezeptoren für Lactoferrin.

3.5. Zellviabilität

Die Zytotoxizität von Lf-PEI/pDNA- und PEI/pDNA-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8 wurde auf der Basis eines ATP-Testsystems bestimmt, welches einen Indikator für die metabolische Zellaktivität darstellt. Die Addition von PEI/pDNA-Partikeln resultierte nach 24 h im Vergleich zu unbehandelten Referenzzellen in einer Zellviabilität von weniger als 60% (ABBILDUNG 3.7). Im Gegensatz dazu zeigten Lactoferrin-modifizierte Polyplexe mit Ausnahme von Lf-PEI 1:40/pDNA-Partikeln keine signifikante Toxizität. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Modifikation von Polyethylenimin mit entsprechenden Mengen an Lactoferrin zu einer signifikanten Abnahme der Zytotoxizität führt.

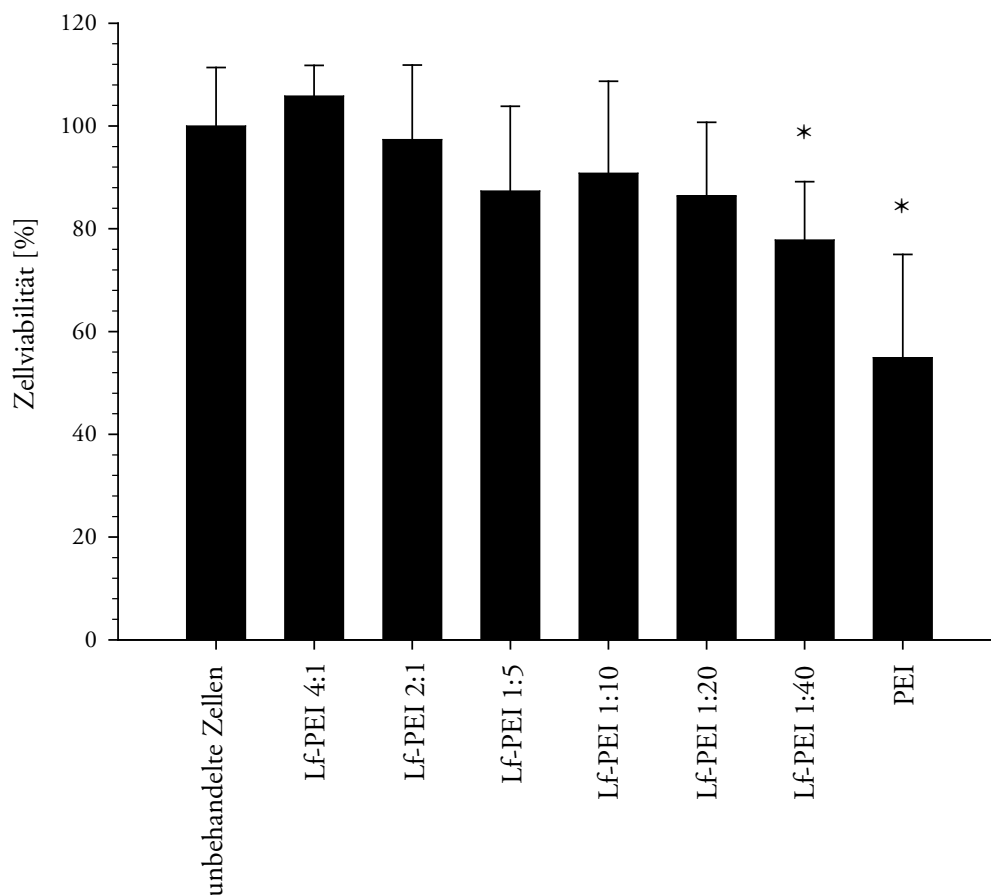


ABBILDUNG 3.7: Metabolische Zellaktivität von BEAS-2B-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI/pDNA-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8. Die Bestimmung der ATP-Lumineszenz wurde 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Messergebnisse von unbehandelten Zellen wurden für die Berechnung mit einem Wert von 100% festgelegt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=3$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Polymer/pDNA-Komplexen und unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen markiert.

3.6. *In vivo* Applikation

3.6.1. Herstellung der Gentransferpartikel

Für die *in vivo* Applikation wurden Lf-PEI 1:20/pCMVLuc- und PEI/pCMVLuc-Komplexe bei einem N/P-Verhältnis von 10 sowohl per Instillation wie auch per Aerosolvernebelung BALB/c-Mäusen verabreicht. Um die erfolgreiche Komplexbildung der Partikel sicherzustellen, wurden unmittelbar nach der Applikation deren hydrodynamische Durchmesser ermittelt (TABELLE 3.3). Hier zeigte sich ein geringer Anstieg der Partikelgröße von PEI/pDNA-Polyplexen durch die Lactoferrin-Modifikation. Da dieser jedoch nicht sehr hoch ausfiel, wird kein Einfluss auf die Partikelapplikation und zelluläre Aufnahme angenommen.

	Partikelgröße Instillation [nm]	Partikelgröße Vernebelung [nm]
PEI/pDNA	183 ± 4	180 ± 2
Lf-PEI 1:20/pDNA	216 ± 4	205 ± 2

TABELLE 3.3: Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Partikeln für die *in vivo* Applikation. Die Polyplexe wurden in destilliertem Wasser bei einem N/P-Verhältnis von 10 komplexiert. Alle Messungen zeigten PI-Werte von 0,2-0,3.

3.6.2. *In vivo* Imaging

24 h nach der Anwendung wurde die Genexpression mittels nichtinvasiver Biolumineszenz-Messungen analysiert. Insgesamt konnten nach Korrektur des Hintergrundes jedoch keine relevanten Lichtsignale detektiert werden (ABBILDUNG 3.8). Lediglich nach der Instillation von PEI/pDNA-Komplexen ist Lumineszenz an Nase und Teilen der rechten Lunge erkennbar, welche jedoch sehr gering ausfällt. Die Bilder lassen somit auf eine insgesamt niedrige Genexpression schließen.

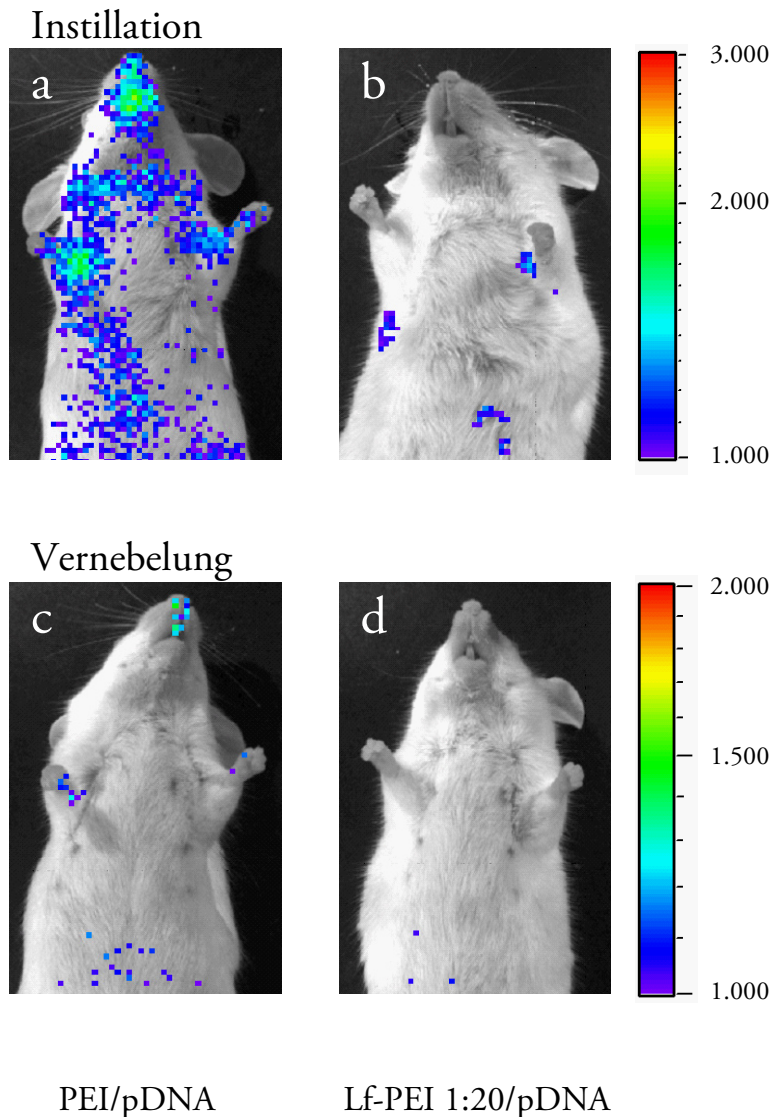


ABBILDUNG 3.8: *In vivo* Aufnahmen nach der Applikation von PEI/pDNA- (a, c) bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA- (b, d) Komplexen. Polyplexe mit einem N/P von 10 wurden per Instillation (a, b) oder Vernebelung (c, d) verabreicht. Nach 24 h wurde die nach Luziferin-Gabe emittierte Lumineszenz über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt.

3.6.3. Bestimmung der Luziferaseaktivität im Lungenhomogenisat

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Genexpression innerhalb der Lungen treffen zu können, wurden diese homogenisiert und nach Zugabe von Luziferin als Substrat das emittierte Licht mit einem sensitiven Röhrenluminometer gemessen. Hier zeigten Lactoferrin-modifizierte Komplexe jedoch weder nach der Instillation, noch nach der Vernebelung eine bessere Transfektionseffizienz im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln (ABBILDUNG 3.9).

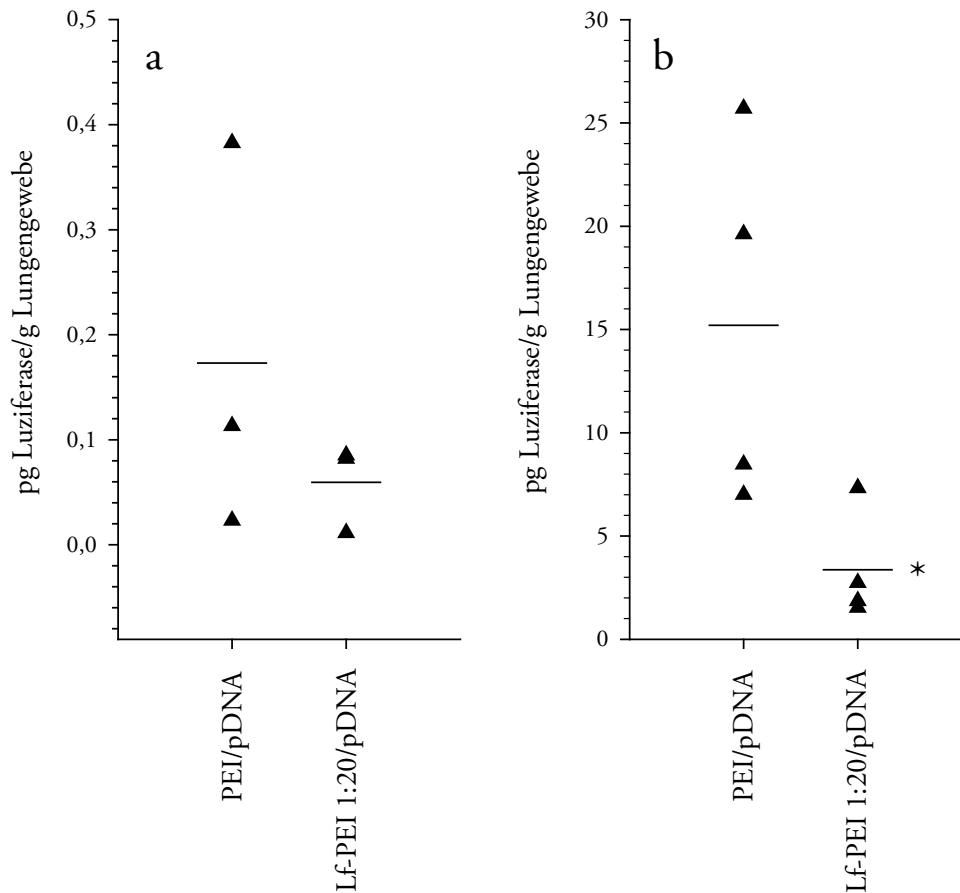


ABBILDUNG 3.9: Luziferaseexpression des Lungengewebes von BALB/c Mäusen nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 generiert und durch Instillation (a; n=3) oder Vernebelung (b; n=4) appliziert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb einer Applikationsart sind mit einem Sternchen markiert

3.6.4. Quantitative Bestimmung der Plasmid-DNA mittels Real Time PCR

Ein Aliquot des Lungenhomogenisates, welches nach der Vernebelung der Polyplexe hergestellt worden war, wurde zusätzlich mittels Real Time PCR auf seinen Gehalt an pCMVLuc untersucht. Hierbei konnte weniger Plasmid-DNA nach Vernebelung von Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen als nach Vernebelung von PEI/pDNA-Polyplexen pro Lunge detektiert werden (ABBILDUNG 3.10). Diese Verteilung erscheint analog zu den Expressionsuntersuchungen und könnte für die geringere Transfektionseffizienz von Lactoferrin-modifizierten Partikeln verantwortlich sein.

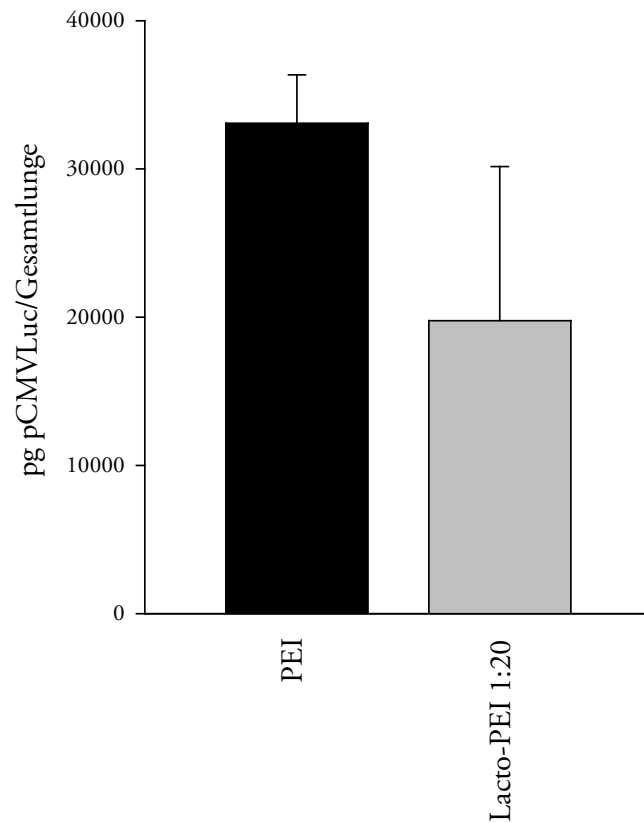


ABBILDUNG 3.10: Quantitative Bestimmung von pCMVLuc innerhalb des Lungengewebes von BALB/c Mäusen. 24 h nach der Vernebelung von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen mit einem N/P-Verhältnis von 10 (n=4) wurde die Plasmid-DNA extrahiert und mittels Real Time PCR bestimmt.

3.7. Diskussion

Mittels dieser Studie sollte untersucht werden, inwiefern Lactoferrin einen geeigneten Liganden für den nichtviralen Gentransfer in die Lunge darstellt. Als generelle Aussage bleibt festzuhalten, dass die Polyethylenimin-vermittelte *in vitro* Transfektionseffizienz auf Bronchialepithelzellen, nicht jedoch auf Alveolarepithelzellen signifikant erhöht werden konnte. Gleichzeitig war die Zytotoxizität des kationischen Polymers PEI reduziert. *In vivo* Untersuchungen zur Gentransfereffizienz in die Lunge konnten jedoch weder nach Applikation mittels Instillation, noch nach der Vernebelung einen Vorteil der Lactoferrin-konjugierten Polyplexe gegenüber unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln zeigen.

Für die Untersuchung der Bindung und Internalisierung von Lactoferrin wurde ein Fluoreszenzmarkiertes Lactoferrin-Konjugat synthetisiert. Nach dessen Inkubation konnte beobachtet werden, dass Lactoferrin-Rezeptoren auf Bronchialepithel-, nicht jedoch auf Alveolarepithelzellen vorhanden sind. Dieses Ergebnis wurde mittels Durchflusszytometrie gezeigt und durch Epifluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen bestätigt. Somit lässt sich daraus folgern, dass Lactoferrin einen viel versprechenden Liganden für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in das Bronchialepithel darstellt.

Für funktionelle Untersuchungen im Hinblick auf den Gentransfer wurden molekulare Konjugate von Lactoferrin und Polyethylenimin hergestellt. Um die Rezeptorbindung von Lactoferrin nicht zu gefährden, fand die Kopplung von PEI über eine analoge Synthesestrategie zur Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffes statt. Verschiedene molekulare Verhältnisse zwischen Lactoferrin und Polyethylenimin von 4:1 bis 1:40 wurden eingesetzt. Die Kopplungseffizienzen bewegten sich zwischen 62% und 95%.

In den Transfektionsstudien zeigte sich, dass die Konjugation von Lactoferrin je nach Kopplungsgrad und eingesetztem N/P-Verhältnis in einer bis zu 5-fach höheren Genexpression von PEI/pDNA-Komplexen auf Bronchialepithelzellen, nicht jedoch auf Alveolarepithelzellen resultierte. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Beobachtungen auf den unterschiedlichen Rezeptorstatus der beiden Zelltypen zurückzuführen sind und somit einen Beweis für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer liefern. Diese Annahme wurde insbesondere durch Inhibierungsuntersuchungen auf BEAS-2B-Zellen verstärkt, bei welchen die Transfektionseffizienz durch die Zugabe eines Überschusses von freiem Lactoferrin signifikant gesenkt werden konnte. Nachdem es jedoch zu keiner vollständigen Blockierung der Aufnahme kam, muss davon ausgegangen werden, dass neben einer Rezeptor-vermittelten Internalisierung zusätzlich ein Teil der Partikel durch unspezifische

Endozytosewege in die Zelle aufgenommen wurde. Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass eine Verbesserung der Transfektionseffizienz durch die Modifikation der Polymerpartikel mit Lactoferrin lediglich bei einem N/P-Quotienten von 4 erfolgreich war. Bei einem N/P-Verhältnis von 8 konnte auf BEAS-2B-Zellen keine Überlegenheit der Lf-PEI-Konjugate beobachtet werden. Auf A549-Zellen sank hierbei sogar die Transfektionseffizienz nach Modifikation der Polyplexe.

Interessanterweise resultierte die Kopplung hoher Mengen Lactoferrin an Polyethylenimin in einem bis zu 100-fachen Abfall der Genexpression. Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits in früheren Untersuchungen gemacht, bei der Transferrin/PEI-Konjugate für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer zu Jurkat-Zellen eingesetzt wurden (Lee *et al.*, 2005). In dieser Studie zeigten molare Verhältnisse von 1:40 bzw. 1:20 zwischen Transferrin und PEI die höchste β -Galaktosidase-Aktivität. Eine Erhöhung der Anzahl an Transferrin-Liganden pro Polymereinheit führte zu einer schlechteren Interaktion von Polymer und Plasmid-DNA und folglich zu reduzierten Gentransferraten. Dieses Verhalten könnte auch für die in dieser Studie untersuchten Lf-PEI-Konjugate zutreffen.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass auch die Größe der Gentransferkomplexe einen wesentlichen Einfluss auf deren Transfektionseffizienz besitzt. Die hydrodynamischen Durchmesser von Lf-PEI/pDNA-Partikeln mit hohem Anteil an Lactoferrin waren im direkten Vergleich zu Komplexen mit geringem Anteil an Lactoferrin bis zu 5-fach größer. So könnten beispielsweise Lf-PEI 4:1/pDNA-Polyplexe mit einer Partikelgröße von 225 nm zu groß für eine effiziente Internalisierung durch Rezeptor-vermittelte Endozytose sein. Im Gegensatz dazu besaßen Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexe lediglich einen Durchmesser von etwa 70 nm, welches eine Zellaufnahme über diesen Mechanismus ermöglichen würde (vgl. KAPITEL 1.4.2). In diesem Zusammenhang konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Größe von PEI/pDNA einen wesentlicher Faktor für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme darstellt, wenn zielgerichtete Liganden wie beispielsweise Transferrin, der CD3-Antikörper oder EGF an Polyethylenimin gekoppelt sind. Lediglich kleine Partikel wurden über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert, wohingegen größere Komplexe nur an der Oberfläche gebunden waren (Ogris *et al.*, 2001b). Ähnliche Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, welche zeigen konnte, dass die Aufnahme von Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm 3-4 fach geringer im Vergleich zu Partikeln mit einem Durchmesser von 50 nm ausfiel, jedoch 8-10-fach erhöht im Vergleich zu Partikeln mit einer Größe von 200 nm war (Reyman *et al.*, 2004). Somit stehen die Ergebnisse dieser Studie gut im Einklang mit bereits früher gemachten Beobachtungen im Bezug auf die zelluläre Aufnahme nanopartikulärer Systeme.

Modifizierte Lf-PEI/pDNA-Partikel zeigten im Vergleich zu PEI/pDNA-Polyplexen eine signifikant höhere Zellviabilität. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die Konjugation von Lactoferrin Teile des Polyethylenimin-Gründerüstes nach außen hin abgeschirmt werden und sich somit die Anzahl der erkennbaren Aminfunktionen an der Partikeloberfläche, welche für die positive Nettoladung des Moleküls verantwortlich sind, verringert. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Zytotoxizität eng mit der Dichte der geladenen Gruppen des Polymers verknüpft ist (Hong *et al.*, 2006).

Obwohl die *in vitro* Ergebnisse vielversprechend aussahen, konnte bei der *in vivo* Anwendung keine Steigerung der Transfektionseffizienz in die Lunge durch die Konjugation von Lactoferrin erzielt werden. Weder nach Instillation, noch nach Aerosolapplikation wurde eine Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln festgestellt. Hier stellt sich die Frage, inwiefern Lactoferrin während der *in vivo* Applikation funktionell erhalten bleibt.

Die Zerstörung (z.B. mechanisch oder enzymatisch) der Ligand-Struktur würde erklären, dass die *in vivo* Genexpression der Polyplexe nach Lactoferrin-Modifikation im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln hier sogar niedriger ausfällt. Falls der Ligand nicht mehr vom entsprechenden Rezeptor erkannt werden kann, ist der Vorteil einer zielgerichteten und höheren Aufnahme nicht mehr vorhanden. Im Gegensatz dazu sind unerwünschte Effekte, welche durch eine Konjugation von Molekülen an Polymer/pDNA-Partikel verursacht werden, weiterhin vorhanden. Insbesondere die Größenzunahme der Polyplexe und sterische Effekte von voluminösen Liganden wie Lactoferrin könnten zu einer verminderten Transfektionseffizienz im Vergleich zu unbehandelten Partikeln führen. In diesem Zusammenhang konnte bereits demonstriert werden, dass kleine Nanopartikel (~100 nm) gut durch die pulmonale Mukusschicht diffundieren können, während diese für Komplexe mit einem größeren Durchmesser nahezu undurchlässig erscheint (Sanders *et al.*, 2000).

Zusätzlich könnte bei *in vivo* Experimenten auch die verwendete Lactoferrin-Spezies eine wichtige Rolle spielen. Nachdem murines Lactoferrin kommerziell nicht erhältlich ist, wurden bisherige *in vivo* Untersuchungen fast ausschließlich mit bovinem oder humanem Lactoferrin durchgeführt (Suzuki *et al.*, 2005). Auch in dieser Arbeit wurde bei allen Versuchen humanes Lactoferrin verwendet. Da vergleichende *in vivo* Daten zur Bindung von humanem und murinem Lactoferrin bislang nicht beschrieben sind, muss auch dieser Aspekt als mögliche Ursache für die geringe Transfektionseffizienz der Lactoferrin-modifizierten Konjugate nach der Applikation in die Maus in Betracht gezogen werden.

Eine Einschränkung der Anwendung von Lactoferrin könnte es insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen Krankheitsbilder geben. So wurde bereits beschrieben, dass Lf durch Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa*-positivem Sputum, welches aus der Lunge von Mukoviszidose-Patienten gewonnen wurde, enzymatisch zerstört wird (Rogan *et al.*, 2004). Somit ist für dieses Krankheitsbild ein Lactoferrin-vermittelter Gentransfer eher unwahrscheinlich.

Weitere wichtige Faktoren, welche den Gentransfer maßgeblich beeinflussen können, bestehen in einer Reihe physiologischer Abwehrmechanismen der Lunge. Neben physikalischen Barrieren wie dem Surfactant (surface active agent) treten insbesondere Makrophagen in der Erkennung und Zerstörung von Fremdstoffen auf und zeichnen sich besonders durch ihre hohe Phagozytoseaktivität aus. Schon frühere Studien konnten zeigen, dass PEI/pDNA-Partikel nach Aerosolapplikation von Makrophagen aufgenommen werden (Rudolph *et al.*, 2005a). Somit könnte auch hier eine Ursache für die reduzierte Transfektionseffizienz Lactoferrin-modifizierter Komplexe bestehen. Denkbar wäre, dass durch die Konjugation von Lactoferrin eine erhöhte Erkennung seitens der Makrophagen besteht und dies in stärkerem Maße zum Abbau der Partikel beiträgt. Solche Effekte müssen in zukünftigen Untersuchungen genauer in Betracht gezogen werden.

Inzwischen konnte auch in anderen Studien der erfolgreiche Gentransfer mittels Lactoferrin als zielgerichtetem Liganden gezeigt werden. Einer chinesischen Arbeitsgruppe gelang es, den Lactoferrin-Rezeptor auf Endothelzellen des Gehirns zu charakterisieren (Huang *et al.*, 2007). In den folgenden Untersuchungen zeigten kovalent gekoppelte Lf-PEG-PAMAM/pDNA-Partikel nach intravenöser Injektion von 50 µg DNA pro Maus innerhalb des Gehirns eine 2,3-fach höhere Genexpression im Vergleich mit Tf-PEG-PAMAM/pDNA-Partikeln (Huang *et al.*, 2008). Eine andere Gruppe konnte den Einsatz von Lactoferrin für den zielgerichteten Transport in die Leber zeigen. In dieser Studie resultierte die Bindung von Lf an Lipidkomplexe im direkten Vergleich zu unmodifizierten Partikeln in einer gesteigerten Aufnahme in Hepatozyten. Obwohl auch hier die *in vitro* Transfektion von HepG2 und COS-7 Zellen erfolgreich war, konnte keine Steigerung der Genexpression *in vivo* detektiert werden (Weeke-Klimp *et al.*, 2007). Der Transfer von *in vitro* Transfektionsbedingungen auf erfolgreiche *in vivo* Ansätze bleibt mit Lactoferrin als zielgerichteten Liganden demnach schwierig und muss weiter optimiert werden.

4. Clenbuterol als Ligand für den nichtviralen Gentransfer

4.1. Synthese von PEI-*g*-Clen und Alexa-BSA-Clen

Die kovalente Bindung von Clenbuterol an Polyethylenimin wurde über ein mehrstufiges Reaktionsschema durchgeführt, welches in **ABBILDUNG 4.1** dargestellt ist. Um eine Kopplung zu ermöglichen, musste eine Maleimidgruppe in die Struktur von Clenbuterol eingeführt werden. Dazu wurde Maleimidopropionsäure mit Hilfe von Ethylchloroformat aktiviert und mit dem sekundären Amin von Clenbuterol zu einem tertiären Carbonsäureamid (Clen-MAL) umgesetzt. Dieses besitzt Reaktivität sowohl gegenüber Amin- wie auch Thiofunktionen und konnte somit mit dem verzweigten Polyethylenimin reagieren. Das aufgereinigte Produkt PEI-*g*-Clen zeigte einen Mittelwert von 4 Clenbuterol-Liganden pro Molekül PEI.

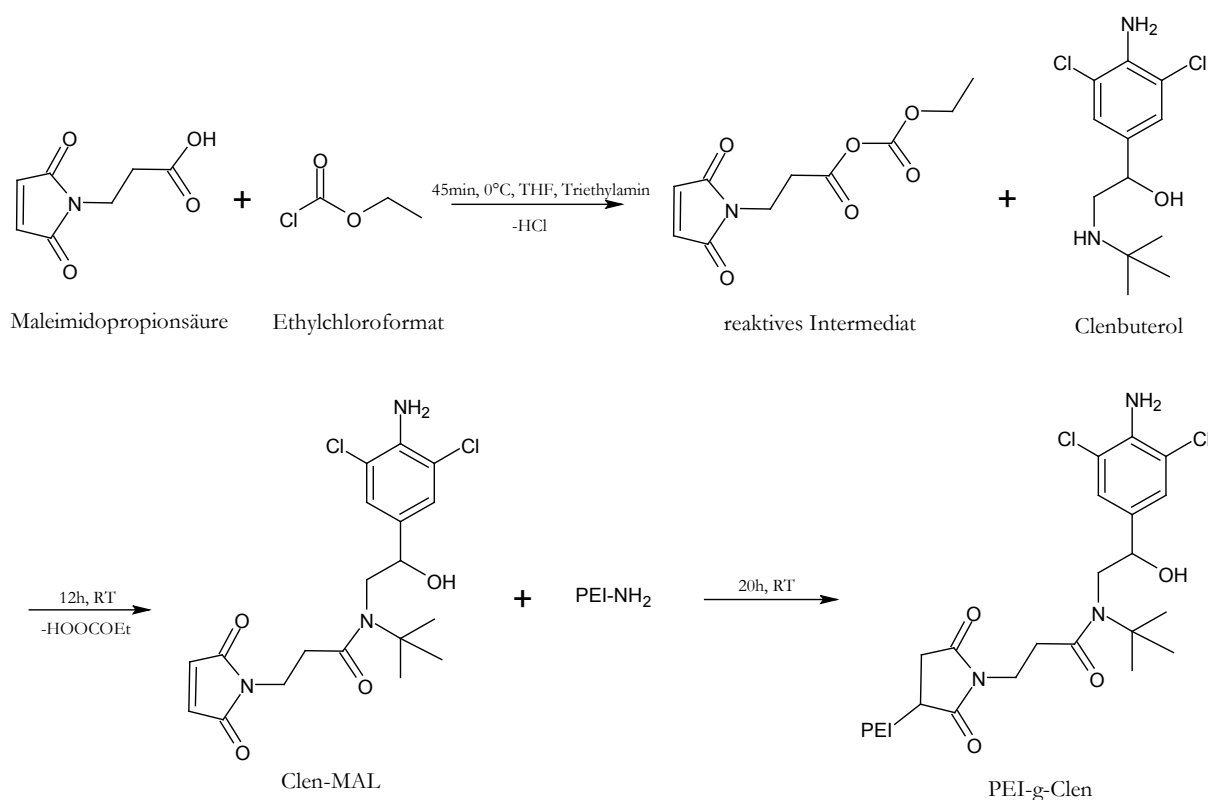


ABBILDUNG 4.1: Syntheschema der Kopplung von Clenbuterol an Polyethylenimin

Die Herstellung von Alexa-BSA-Clen verlief über ein analoges Reaktionsschema. Um die Reaktion besser zu kontrollieren und das fertige Produkt aufzureinigen zu können, erfolgte die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffes an Clenbuterol nicht direkt, sondern indirekt über das Protein BSA. Diese Strategie besitzt zusätzlich den Vorteil, bereits von Beginn an erkennen zu können, inwiefern

Clenbuterol in der Lage ist, auch größere Moleküle Rezeptor-vermittelt in Zellen einzuschleusen. Für die Herstellung des Konjugates wurden zuerst durch Kopplung von SPDP und anschließender Reduktion mittels DTT Thiolfunktionen in BSA eingeführt. Nach der Aufreinigung von überschüssigen Reagenzien konnte Alexa-BSA-SH dann an Clen-MAL gebunden werden. Das Verhältnis des fertigen Produktes von Alexa Fluor 488 zu BSA zu Clenbuterol betrug 2 : 1 : 9.

4.2. Inkubation von Alexa-BSA-Clen

Rezeptor-Bindung und Aufnahme von Alexa-BSA-Clen auf Alveolarepithelzellen wurde sowohl mit Hilfe der Durchflusszytometrie wie auch durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Um die Spezifität der Bindung zu erkennen, wurde Alexa-BSA als Negativkontrolle eingesetzt. Die FACS-Messungen zeigten nach Inkubation mit 1 μ M Alexa-BSA-Clen mehr als 60% Fluoreszenz-positive Zellen (ABBILDUNG 4.2a). Im Gegensatz dazu waren nach Inkubation von Alexa-BSA lediglich ca. 10% der Zellen positiv. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Nach Behandlung mit Alexa-BSA-Clen deuteten punktförmig angedeutete Fluoreszenzsignale auf eine Anreicherung in unmittelbarer Umgebung an endosomale Strukturen hin (ABBILDUNG 4.2b), wohingegen in den korrespondierenden Alexa-BSA-Proben kein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (ABBILDUNG 4.2c).

Als weitere Kontrolle für eine spezifische Bindung der Konjugate wurden Inhibitionsversuche mit einem Überschuss an freiem Clenbuterol durchgeführt. Die Anzahl Fluoreszenz-positiver Zellen nahm bei Untersuchungen von Alexa-BSA-Clen mit ansteigender Clenbuterol-Konzentration ab. (ABBILDUNG 4.2a). Dies lässt auf eine kompetitive Hemmung der zellulären Bindung von Alexa-BSA-Clen durch unmarkiertes Clenbuterol schließen und spricht für einen Rezeptor-vermittelten Prozess. Im Gegensatz dazu konnten bei Inkubation von Alexa-BSA durch die Inhibierung keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

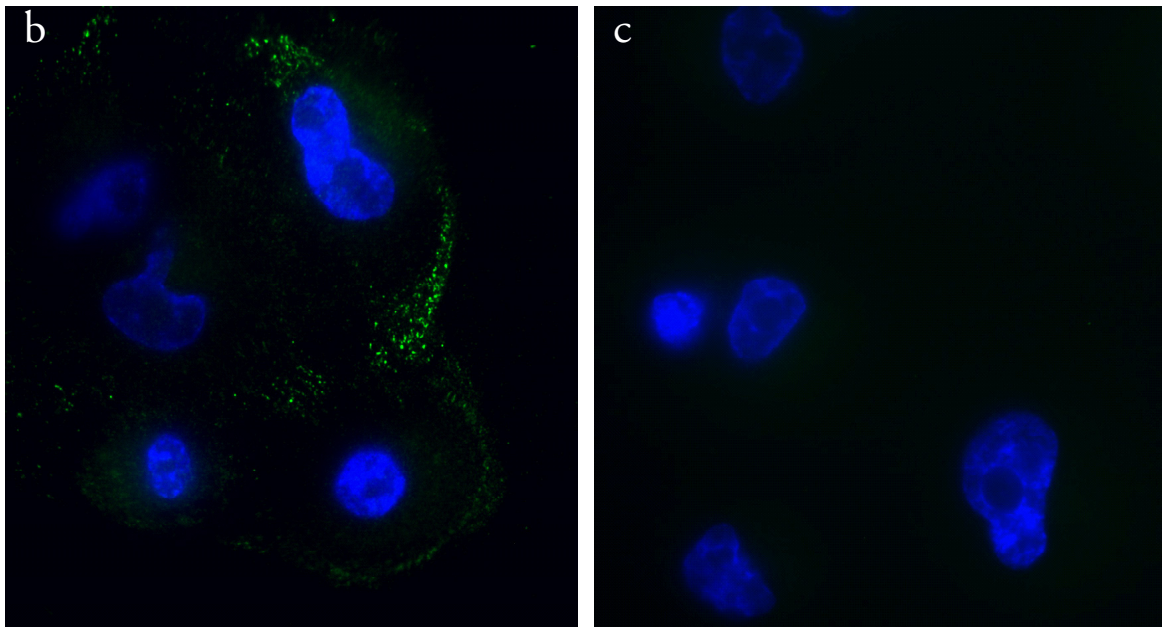
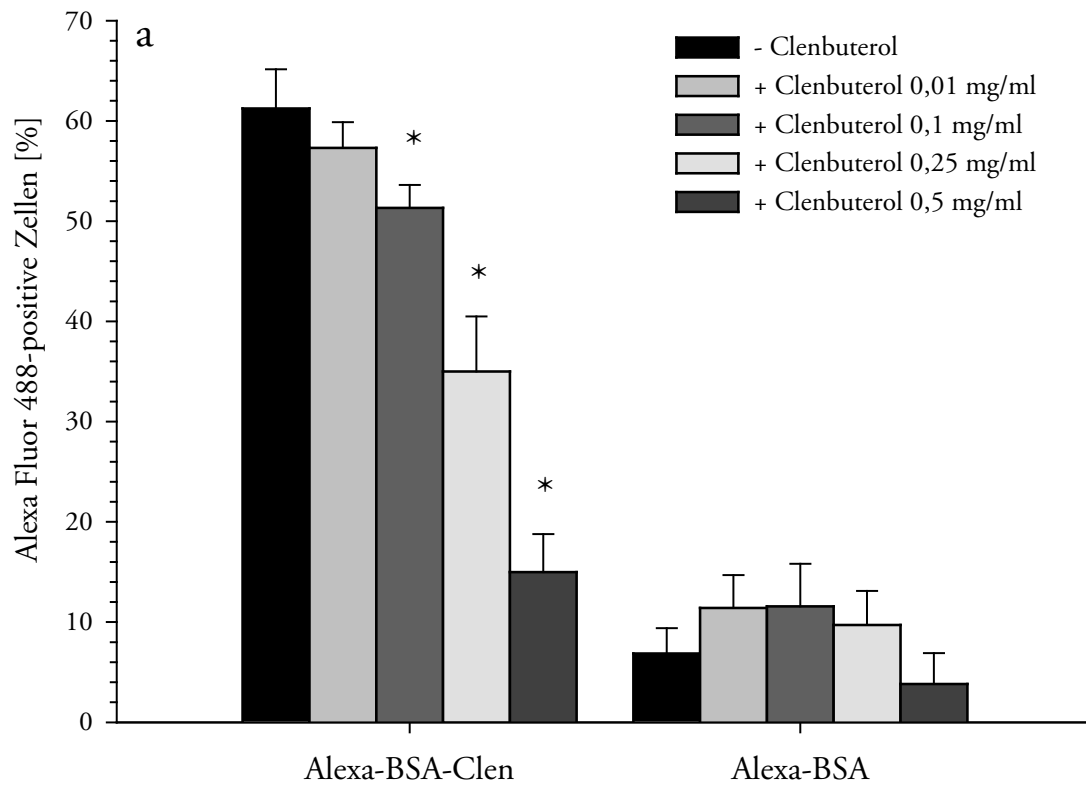


ABBILDUNG 4.2: Rezeptorbindung von Clenbuterol an Alveolarepithelzellen. Die Inkubation von Alexa-BSA-Clen bzw. Alexa-BSA erfolgte mit einer Konzentration von 1 μ M für 4 h bei 37°C auf A549-Zellen. FACS-Messungen wurden in An- oder Abwesenheit an unterschiedlichen Konzentrationen von freiem Clenbuterol durchgeführt (a). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n = 3), statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) mit einem Sternchen angegeben. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden nach der Inkubation von Alexa-BSA-Clen (b) oder Alexa-BSA (c) durchgeführt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit 0,33 μ M DAPI.

4.3. Charakterisierung der Gentransferkomplexe

4.3.1. Partikelgröße und Zeta-Potential

Die Partikelgröße und das Zeta-Potential der Polymer/pDNA-Komplexe mit einem N/P-Quotienten von 8 waren vom Verhältnis zwischen PEI-*g*-Clen zu unmodifiziertem PEI abhängig (TABELLE 4.1). Komplexe mit hohem Anteil an PEI-*g*-Clen (z.B. 20/1) zeigten im Vergleich zu solchen mit einem niedrigen Anteil an PEI-*g*-Clen (z.B. 1/10) einen etwa 4-5-fach größeren hydrodynamischen Durchmesser.

Im Hinblick auf die Oberflächenladung führte ein zunehmender Anteil von unmodifiziertem PEI zu einem Anstieg des Zeta-Potentials. Diese Daten legen den Verdacht nahe, dass eine höhere Anzahl von Clenbuterol-Liganden die Komplexierung von PEI und Plasmid-DNA beeinflussen könnte, indem sie einen Teil der positiv geladenen Oberfläche des Polymers abschirmen.

Polymerzusammensetzung	Größe [nm]	ζ-Potential [mV]
PEI- <i>g</i> -Clen	251 ± 5	22 ± 1
20/1	220 ± 3	24 ± 1
10/1	219 ± 3	30 ± 1
5/1	120 ± 1	36 ± 1
2/1	83 ± 1	40 ± 1
1/1	65 ± 1	44 ± 1
1/2	55 ± 1	41 ± 1
1/5	57 ± 1	45 ± 1
1/10	57 ± 2	44 ± 1
1/20	51 ± 2	43 ± 1
PEI	55 ± 1	41 ± 1

TABELLE 4.1: Physikalische Eigenschaften von PEI und PEI-*g*-Clen/PEI-Mischungen nach der Komplexierung mit pCMVLuc. Die Gentransferpartikel wurden in destilliertem Wasser bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und einem N/P-Quotienten von 8 generiert. Der PI-Wert lag für alle Messungen zwischen 0,2 und 0,3.

Für Komplexe aus PEI bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2) mit pCMVLuc wurde zusätzlich der Einfluss verschiedener N/P-Verhältnisse in einem Bereich von 2-20 untersucht. Hier zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede (TABELLE 4.2).

Polymerzusammensetzung und N/P-Verhältnis	Größe [nm]	ζ-Potential [mV]
PEI N/P 2	*	16 ± 1
PEI N/P 4	59 ± 1	39 ± 1
PEI N/P 6	53 ± 1	47 ± 2
PEI N/P 8	60 ± 2	41 ± 1
PEI N/P 10	57 ± 1	42 ± 1
PEI N/P 20	57 ± 1	56 ± 2
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 2	*	17 ± 1
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 4	90 ± 1	34 ± 2
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 6	74 ± 1	34 ± 2
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 8	72 ± 1	36 ± 2
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 10	71 ± 2	45 ± 1
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2) N/P 20	73 ± 3	48 ± 1

TABELLE 4.2: Physikalische Eigenschaften von Komplexen aus PEI bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2) mit pCMVLuc bei verschiedenen N/P-Verhältnissen. Die Generierung der Polyplexe erfolgte in destilliertem Wasser. Der PI-Wert lag bei 0,2-0,3. Ein Sternchen signalisiert, dass die Größe der Komplexe aufgrund von Aggregationsverhalten nicht bestimmbar war.

Während für Clenbuterol-haltige Polyplexe eine geringfügige Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers erkennbar war, zeigten sich bei der Bestimmung der Oberflächenladung keine Änderung zu unmodifizierten PEI/pDNA-Komplexen. Bei einem N/P-Verhältnis von 2 konnte in beiden Gruppen keine Partikelgröße bestimmt werden. Hier scheint der Anteil an kationischem Polymer für die Bildung von zu homogenen und definierten Komplexen zu gering zu sein.

4.3.2. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese konnten keine Unterschiede zwischen Polyplexen aus PEI-*g*-Clen/PEI-Mischungen und reinem PEI beobachtet werden. Unabhängig vom prozentualen Anteil an PEI-*g*-Clen wurde keine Plasmid-DNA im Gel detektiert (ABBILDUNG 4.3). Dies kann als Indiz für eine gute und vollständige Komplexierung der pDNA gewertet werden. Nur durch die Addition von Heparansulfat war es möglich, die Plasmid-DNA aus allen Komplexen freizusetzen. Nachdem hier die Gelbanden ein vergleichbares Bild zu unbehandeltem pCMVLuc zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass keine Zerstörung der Struktur durch die Komplexierung stattgefunden hat. Auch bei Untersuchungen verschiedener N/P-Verhältnisse in einer Spanne von 2 bis 20 wurden keine Abweichungen von PEI-*g*-Clen/pDNA-Komplexen zu PEI/pDNA-Komplexen festgestellt (Gelbild nicht gezeigt).

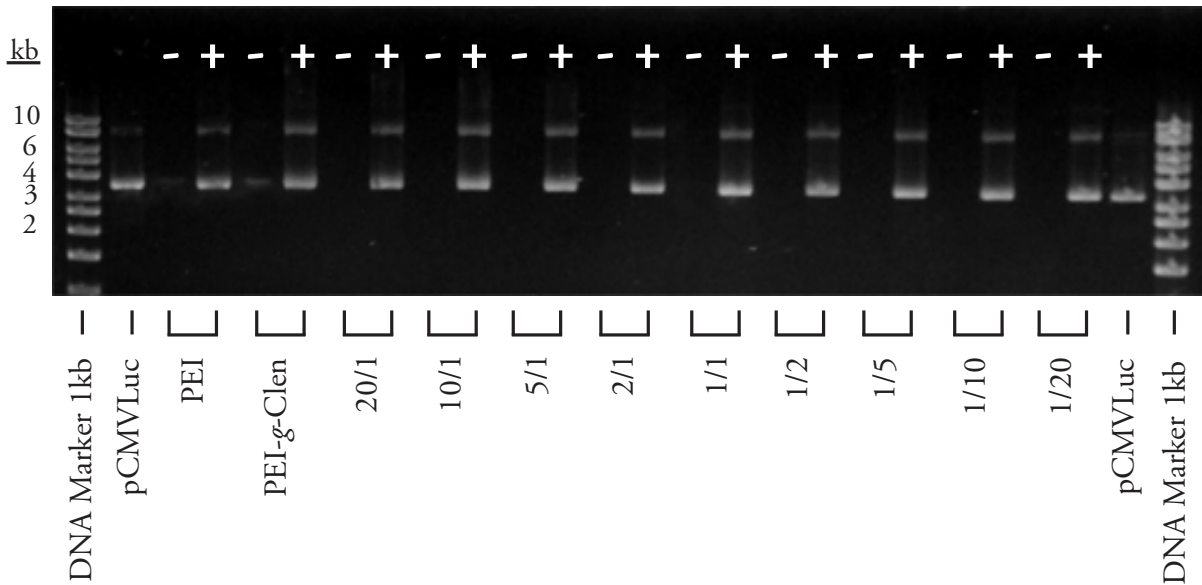


ABBILDUNG 4.3: Vergleich des Komplezierungsverhaltens von PEI, PEI-g-Clen und PEI-g-Clen/PEI-Mischungen. Komplexe verschiedener Polymer-Zusammensetzung mit einem N/P von 8 wurden ohne (-) und mit (+) Heparansulfat inkubiert, durch Gelelektrophorese auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mittels Zusatz von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Unkomplexierte pCMVLuc Plasmid-DNA diente als Kontrolle.

4.4. *In vitro* Transfektionsstudien

4.4.1. Untersuchung verschiedener Polymerzusammensetzungen

Die *in vitro* Transfektionseffizienz von PEI/pDNA und PEI-g-Clen/PEI/pDNA-Komplexen mit einem N/P-Verhältnis von 8 wurde auf A549-, BEAS-2B-, MLE-12- und HeLa-Zellen durch Messung der Luziferase-Genexpression nach 24 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind in ABBILDUNG 4.4 zusammengefasst. Mit Ausnahme von BEAS-2B-Zellen zeigten Komplexe mit einem hohen Prozentsatz an PEI-g-Clen niedrigere Genexpression als diejenigen mit geringerem Anteil an PEI-g-Clen. Auf A549-Zellen konnte eine maximale Transfektionsrate mit einem Polymerverhältnis zwischen PEI-g-Clen und PEI von 1/2 beobachtet werden. Die Genexpression war hier im Vergleich zu unmodifiziertem PEI signifikant 14-fach erhöht. Gleiches Verhalten zeigten MLE-12- (9-fach) und HeLa-Zellen (8-fach). Im Gegensatz dazu war bei BEAS-2B-Zellen unabhängig von der Menge an Clenbuterol innerhalb des Gentransferkomplexes kein signifikanter Anstieg der Transfektionsrate im Vergleich zu PEI/pDNA-Komplexen zu erkennen.

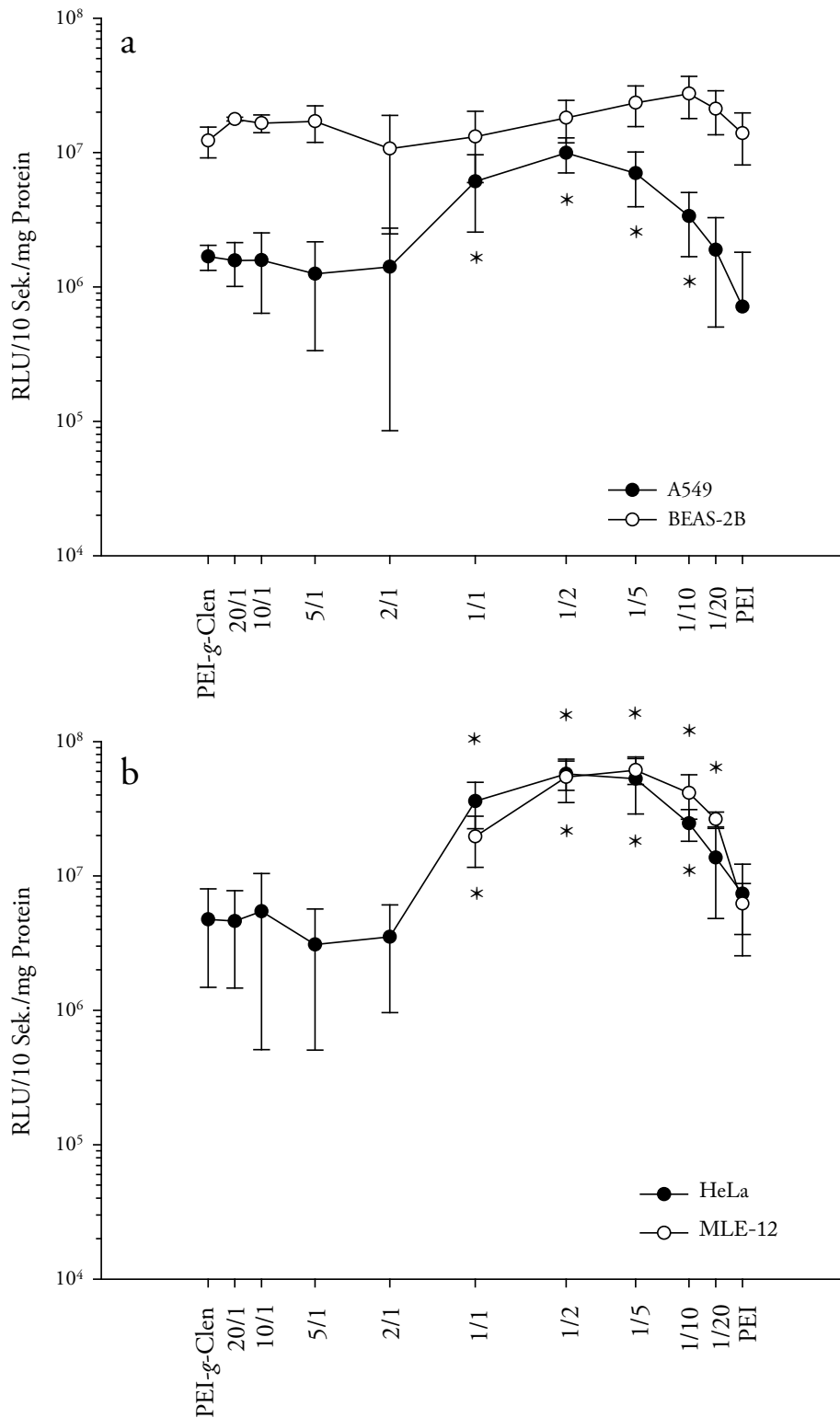


ABBILDUNG 4.4: Transfektionseffizienz von Polyplexen aus PEI-g-Clen, PEI und verschiedenen PEI-g-Clen/PEI-Mischungen mit pCMVLuc. Die Komplexe wurden bei einem N/P-Verhältnis von 8 generiert und auf A549-, BEAS-2B-(a), MLE-12- und HeLa-(b)Zellen transfiziert. Die Luciferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4) und statistisch signifikante Unterschiede zu PEI mit einem Sternchen markiert.

4.4.2. Untersuchung verschiedener N/P-Verhältnisse

Die vorangegangenden Transfektionsuntersuchungen zeigten, dass bei einem N/P-Verhältnis von 8 ein Polymerverhältnis von 1/2 zwischen PEI-*g*-Clen und unmodifiziertem PEI zu einem Maximum der Luziferaseexpression führte. Diese Polymerzusammensetzung wurde auch bei anderen N/P-Quotienten auf A549-Zellen getestet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Komplexe aus PEI-*g*-Clen/PEI(1/2) im Vergleich zu Polyplexen aus unmodifiziertem PEI im gesamten Bereich von N/P 6 bis N/P 20 eine signifikant höhere Genexpression erreichten (ABBILDUNG 4.5). Die maximale Differenz wurde bei einem N/P-Verhältnis von 8 festgestellt.

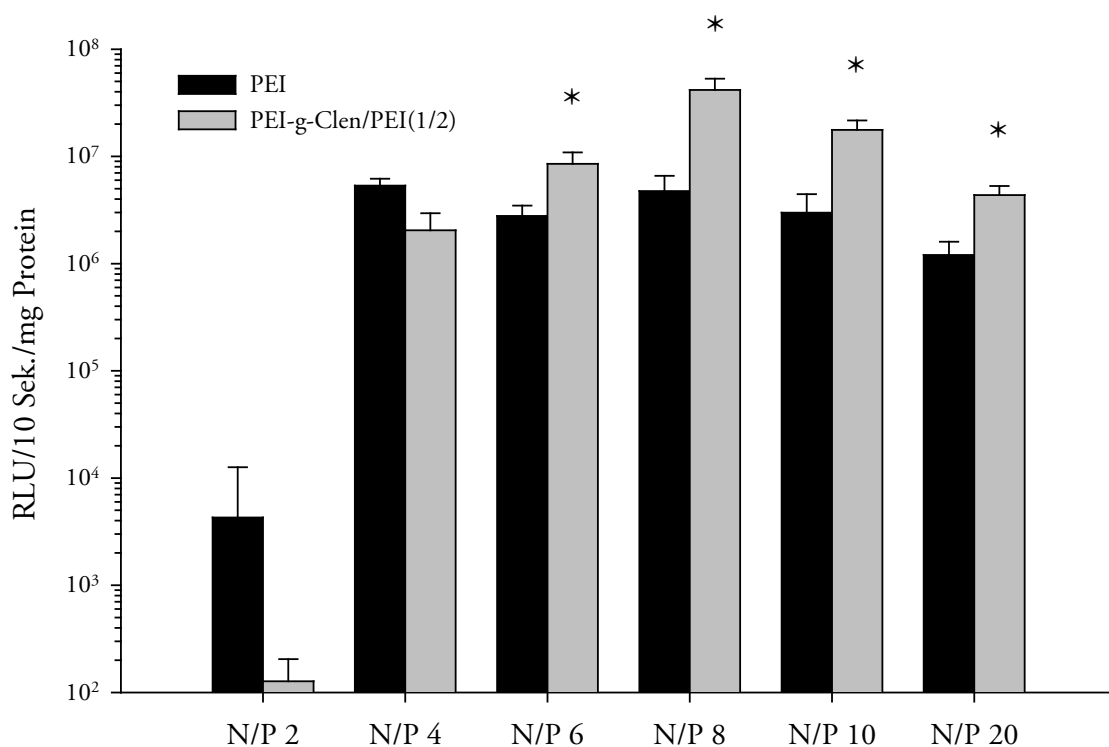


ABBILDUNG 4.5: Vergleich der Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- und PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen *in vitro* bei verschiedenen N/P-Verhältnissen auf A549-Zellen. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4). Statistisch signifikante Steigerungen von PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen im Vergleich zu PEI/pDNA-Komplexen sind mit einem Sternchen markiert.

4.4.3. Inhibierungsexperimente

Um die Spezifität der gesteigerten Genexpression zu überprüfen, wurde bei Inhibierungsexperimenten dem Transfektionsmedium 0,01 mg/ml freies Clenbuterol zugefügt. Im unmittelbaren

Anschluss erfolgte die Addition von PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA- und PEI/pDNA-Komplexen mit einem N/P von 8 auf A549-Zellen. Bei Verwendung von reinem MEM als Transfektionsmedium zeigte die Clenbuterol-haltige Polymermischung die gewohnte Überlegenheit gegenüber unmodifiziertem PEI. Bei Anwesenheit eines Überschuss an freiem Ligand konnte jedoch ein ca. 100-facher Abfall der Genexpression beobachtet werden. Dies deutet auf eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme hin. Im Gegensatz dazu wurde die Transfektion von PEI/pDNA-Partikeln durch den Zusatz von Clenbuterol nicht signifikant beeinflusst (ABBILDUNG 4.6).

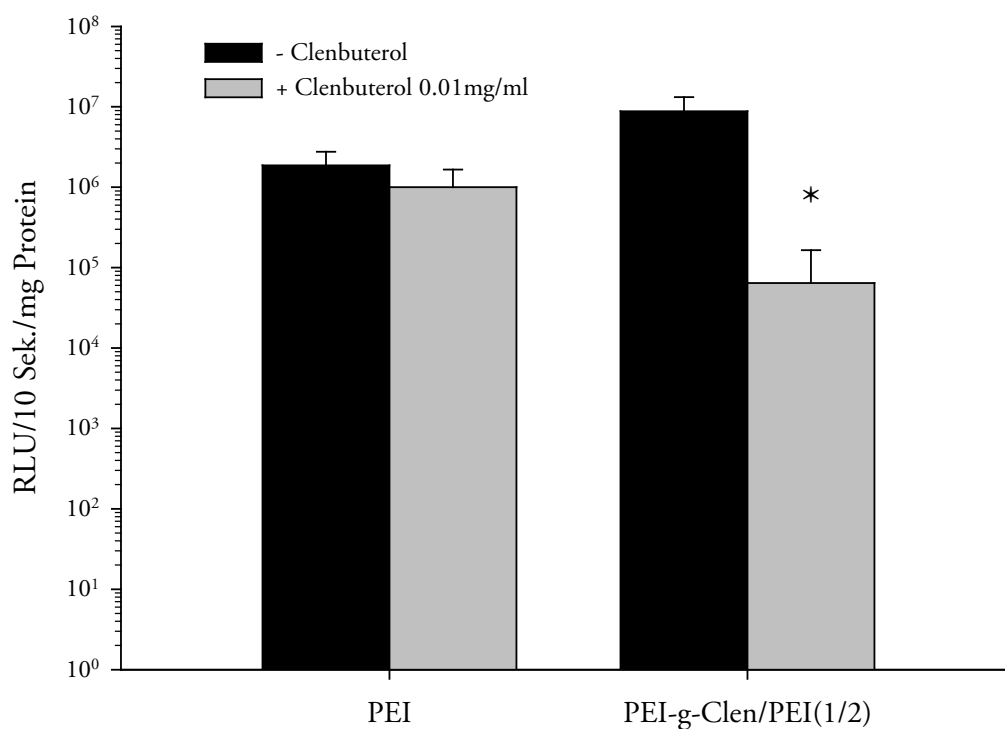


ABBILDUNG 4.6: Inhibitionsuntersuchungen mit PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen. Die Transfektion erfolgte bei einem N/P-Verhältnis von 8 mit und ohne Überschuss an freiem Clenbuterol auf A549-Zellen. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4) und statistisch signifikante Unterschiede zwischen korrespondierenden Gruppen mit einem Sternchen markiert.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die *in vitro* Transfektionsergebnisse somit deutlich, dass durch die Verwendung eines optimalen Verhältnisses von PEI-*g*-Clen zu PEI die Polyethylenimin-vermittelte Gentransfereffizienz auf Alveolarepithel- und Zervixkarzinomzellen, nicht jedoch auf Bronchialepithelzellen verbessert werden kann.

4.5. Zellviabilität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde 24 Stunden nach der Applikation von Polymer/pDNA-Komplexen mit Hilfe eines ATP-Testsystems bestimmt. PEI-*g*-Clen/pDNA-Komplexe zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen keine signifikante Toxizität. Mit steigendem Anteil an unmodifiziertem PEI in den Polymermischungen konnte jedoch ein Anstieg der Zytotoxizität beobachtet werden. Ab einem Mischungsverhältnis zwischen PEI-*g*-Clen und PEI von 1/1 war ein durchgehend signifikanter Abfall der Zellviabilität zu erkennen (ABBILDUNG 4.7). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die Konjugation von Clenbuterol die Zytotoxizität von PEI reduziert wird.

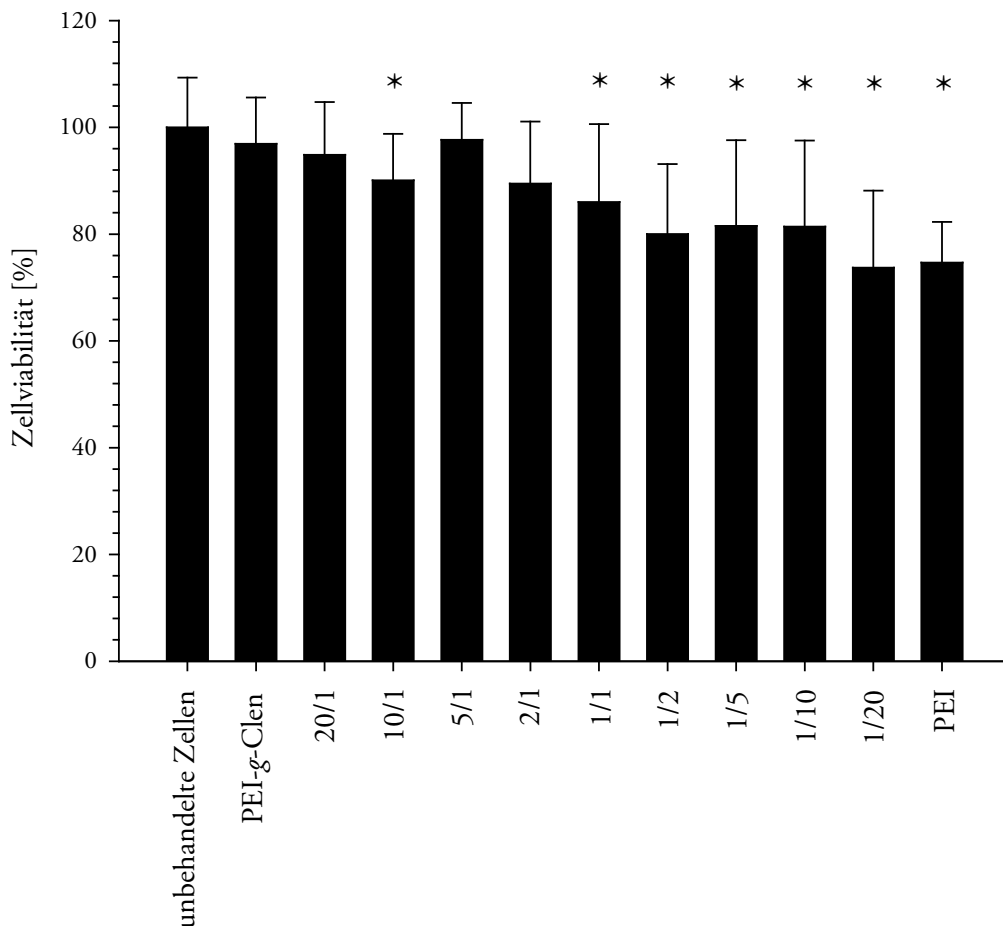


ABBILDUNG 4.7: Metabolische Zellaktivität von A549-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI/pDNA-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8. Die Bestimmung der ATP-Lumineszenz wurde 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Messergebnisse von unbehandelten Zellen wurden für die Berechnung als Referenzwert bei 100% festgelegt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=8$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Polymer/pDNA-Komplexen und unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen markiert.

4.6. *In vitro* Vernebelung

Um den Einfluss der Vernebelungsprozedur auf Stabilität und Transfektionseigenschaften der Polyplexe mit und ohne Clenbuterol-Modifikation zu untersuchen, wurde vor der Applikation der Partikel am Tier ein *in vitro* Vernebelungsversuch durchgeführt. Dazu erfolgte die Herstellung von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen bei einer Konzentration von 20 µg DNA/ml in destilliertem Wasser (siehe KAPITEL 2.10.2). Im Hinblick auf die nachfolgenden *in vivo* Versuche wurde das N/P- Verhältnis dabei auf einen Wert von 10 angepasst. Je 2,5 ml Komplexlösung wurden in einem Turbo Boy® N Kompressor mit LC Plus Kammer über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten vernebelt. Zusätzlich erfolgte die Vernebelung einer gleichen molaren Menge an pCpGLuc in unkomplexiertem Zustand. Die vernebelte Fraktion (ca. 600 µl) wurde mit Hilfe eines 2 ml Plastikubes aufgefangen. Auch der verbliebene Rückstand innerhalb der Vernebelungskammer wurde entnommen und untersucht. Als unbehandelte Kontrolle diente ein Aliquot der entsprechenden Komplex- oder DNA-Lösung, welches vor der Vernebelungsprozedur entnommen worden war.

Die Charakterisierung der gesammelten Fraktionen erfolgte durch Messung ihres hydrodynamischen Durchmessers und mittels Gelelektrophorese. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Komplexe durch die Vernebelungsprozedur lediglich eine geringfügige Änderung ihrer Größe erfahren hatten (TABELLE 4.3).

	Größe [nm] vor Vernebelung	Größe [nm] Vernebelungskammer	Größe [nm] nach Vernebelung
PEI	65 ± 1	69 ± 1	79 ± 1
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)	77 ± 1	82 ± 1	91 ± 1
pCpGLuc	*	*	*

TABELLE 4.3: Partikelgrößen von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen vor und nach der Vernebelungsprozedur. Der PI-Wert aller Proben lag zwischen 0,2 und 0,3. Ein Sternchen symbolisiert, dass kein hydrodynamischer Durchmesser der Probe mittels Photonenkorrelationsspektroskopie ermittelt werden konnte.

Durch die gelelektrophoretische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sowohl PEI/pDNA- wie auch PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexe während der Vernebelungsprozedur stabil bleiben. In keiner der Proben wurde freie pDNA, welche sich aus dem Komplex gelöst haben könnte, auf dem Gel detektiert. Erst der Zusatz von Heparansulfat konnte eine Freisetzung bewirken (ABBILDUNG 4.8). Hierbei wurde beobachtet, dass die aus den Komplexen freigesetzte Plasmid-DNA vergleichbare Banden wie die unbehandelte DNA-Kontrolle zeigte. Im Gegensatz dazu führte die Vernebelungsprozedur bei unkomplexierter DNA zu einer Zerstörung der Struktur.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Schädigung der komplexierten DNA gekommen war.

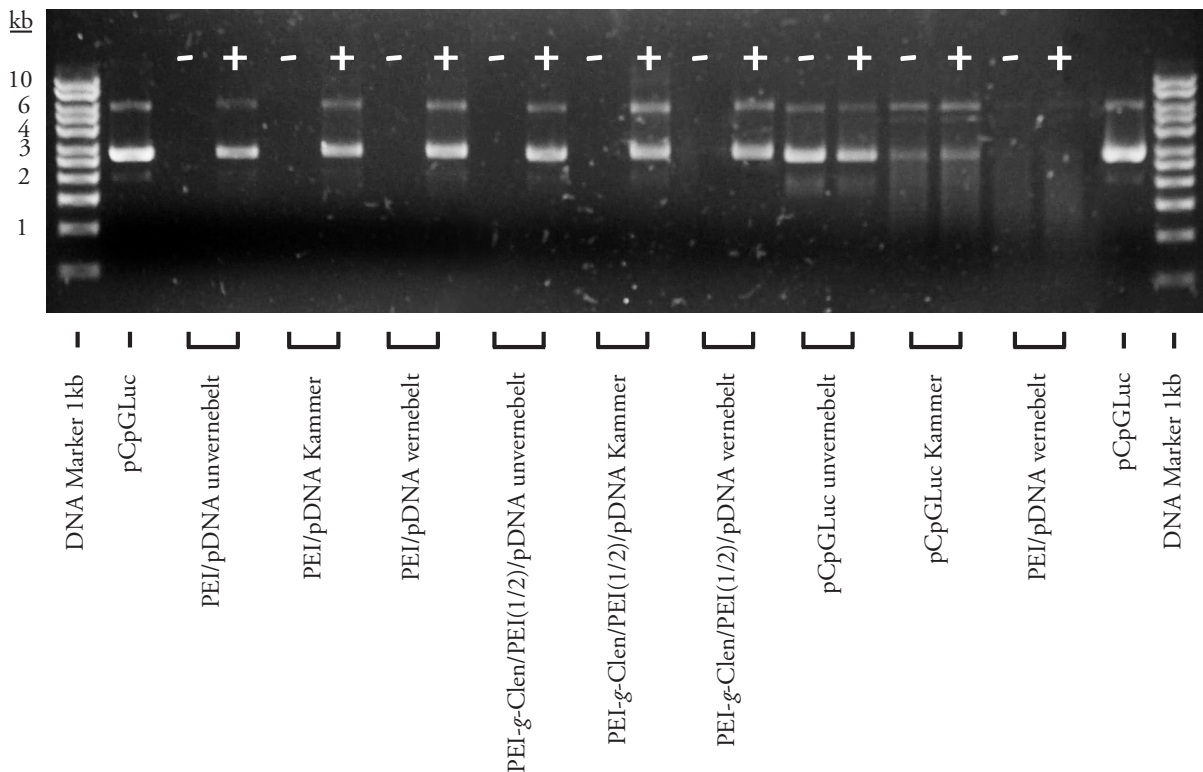


ABBILDUNG 4.8: Gelelektrophorese von PEI/pDNA- und PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen mit einem N/P-Verhältnis von 10 vor bzw. nach Vernebelung. Komplexe verschiedener Polymer-Zusammensetzung wurden ohne (-) und mit (+) Heparansulfat inkubiert, durch Gelelektrophorese auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mittels Zusatz von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Unkomplexierte pCpGLuc Plasmid-DNA diente als Kontrolle.

Um Aussagen zur Funktionalität der vernebelten Polymer/pDNA-Komplexe machen zu können, wurde eine *in vitro* Transfektionsuntersuchung auf A549- und BEAS-2B-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die vernebelte Fraktion und der Kammerrückstand mit einer unvernebelten Fraktion der jeweiligen Komplexe verglichen. Die Durchführung der Transfektion erfolgte wie in KAPITEL 2.12 beschrieben mit 1 µg pCpGLuc pro Well. Bei unkomplexierter Plasmid-DNA fiel die Luziferaseexpression nach der Vernebelung deutlich ab, was vermutlich auf Zerstörung durch die bei der Prozedur einwirkenden Scherkräfte zurückzuführen ist (ABBILDUNG 4.9). Dieser Unterschied war bei den Polymer/pDNA-Komplexen weit weniger ausgeprägt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Clenbuterol-haltigen Polyplexe sowohl vor wie auch nach der Vernebelung auf A549-Zellen eine signifikant höhere Genexpression im Vergleich zu unmodifizierten PEI-Komplexen zeigten. Auf BEAS-2B-Zellen war dies nicht der Fall, welches im Einklang mit den zuvor gemachten Beobachtungen der regulären *in vitro* Transfektionen steht (vgl. KAPITEL 4.4).

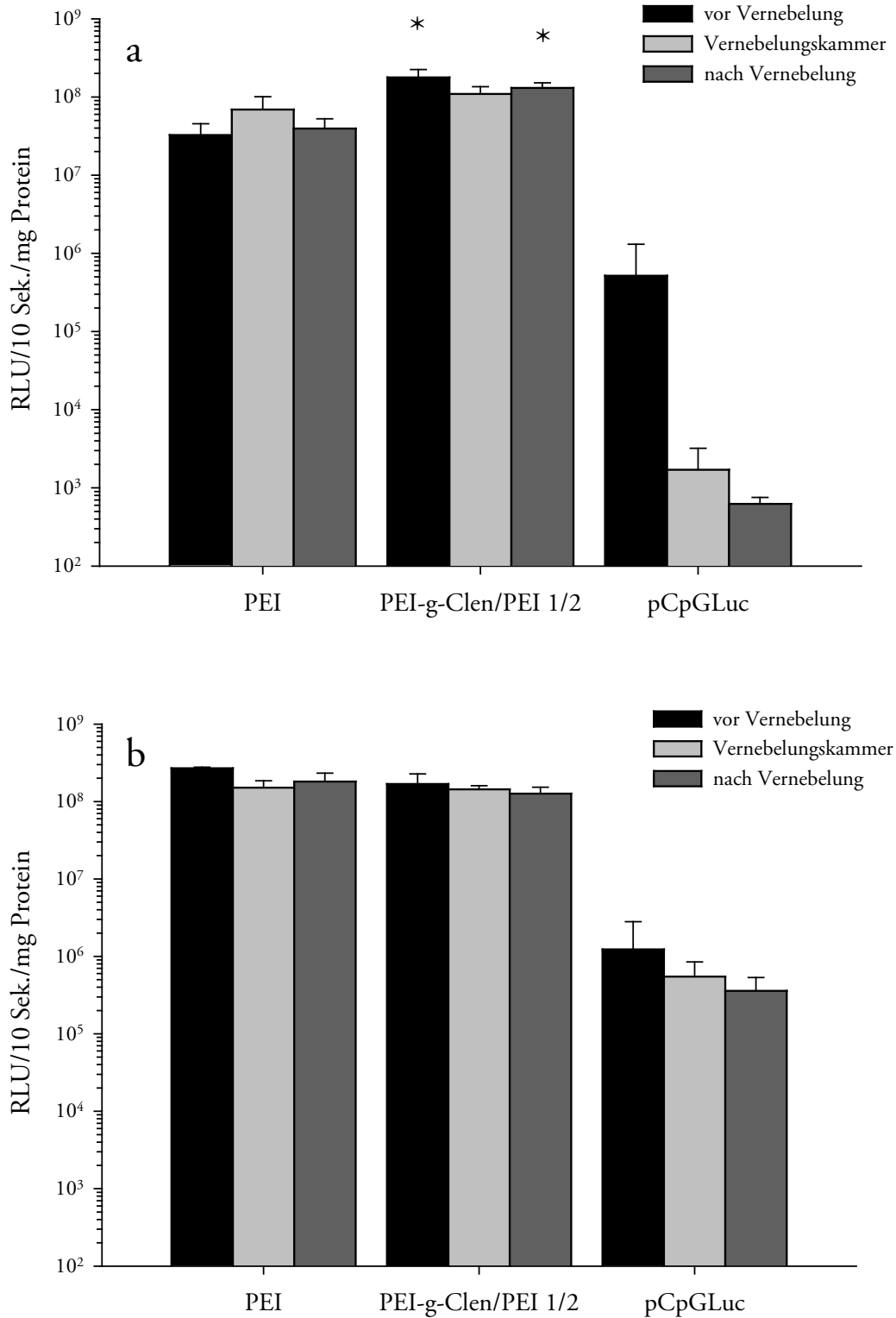


ABBILDUNG 4.9: Vergleich der Transfektionseffizienzen vor bzw. nach Vernebelung auf A549-(a) und BEAS-2B-Zellen(b). PEI/pDNA- und PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexe wurden mit einem N/P von 10 in destilliertem Wasser generiert. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=4). Statistisch signifikante Erhöhungen der Transfektionseffizienz im Vergleich zu unmodifiziertem PEI sind mit einem Sternchen markiert.

4.7. *In vivo* Applikation

Die Tierversuche an Mäusen wurden auf 3 verschiedenen Applikationswegen (Instillation, Vernebelung und intravenöse Injektion) durchgeführt. Entsprechende Polymer/pCpGLuc-Partikel wurden bei einem N/P-Verhältnis von 10 in destilliertem Wasser generiert. Unmittelbar nach der Anwendung erfolgte die Bestimmung der Komplexgrößen mittels dynamischer Lichtstreuung (TABELLE 4.4). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Komplexierung in allen Fällen erfolgreich war. Es zeigten sich jedoch Differenzen des Durchmesser zwischen Polyplexen für verschiedene Applikationsarten. Als Ursache kann mit hoher Wahrscheinlichkeit die unterschiedliche Konzentration an Plasmid-DNA im Medium während der Komplexierung (Instillation: 300 µg/ml; Vernebelung: 250 µg/ml; i.v. Injektion: 75 µg/ml) angenommen werden, welche in Abhängigkeit von der späteren Anwendung variierte. Die Partikeldurchmesser innerhalb einer Applikationsart waren jedoch sehr ähnlich, welches für den direkten Vergleich wichtig ist.

	Partikelgröße Instillation [nm]	Partikelgröße Vernebelung [nm]	Partikelgröße i.v. Injektion [nm]
PEI/pDNA	195 ± 7	117 ± 1	70 ± 1
PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/20)/pDNA	223 ± 3	116 ± 1	69 ± 1

TABELLE 4.4: Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/20)/pDNA-Partikeln für die *in vivo* Anwendung. Die Komplexierung erfolgte in destilliertem Wasser bei einem N/P-Verhältnis von 10. Der PI-Wert aller Komplexe lag zwischen 0,2 und 0,3.

24 Stunden nach der Behandlung wurde die Luziferaseexpression sowohl am lebenden Tier wie auch im homogenisierten Lungengewebe nach der Organentnahme gemessen. Abhängig von der Applikationsroute konnte bei PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)-Polyplexen eine höhere Genexpression im Vergleich zu Komplexen aus unmodifiziertem PEI beobachtet werden.

4.7.1. *In vivo* Imaging

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz *in vivo* unter nichtinvasiven Bedingungen wurde durch Messung der Biolumineszenz durchgeführt. Einen Überblick über ausgewählte Aufnahmen gibt ABBILDUNG 4.11. Bei der quantitativen Auswertung der sich im Bereich der Lunge befindlichen Lumineszenz konnte für PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexe im Vergleich zu PEI/pDNA-Polyplexen sowohl nach Instillation, wie auch nach Vernebelung lediglich ein kleiner Vorteil (1,4- bzw. 1,1-fach) beobachtet werden (ABBILDUNG 4.10). Dieser war jedoch in beiden Fällen statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach intravenöser Applikation ein signifikanter 2,8-facher Anstieg der emittierten Photonen durch die Verwendung Clenbuterol-haltiger Konjugate. Nach intravenöser Applikation konnten auch insgesamt die höchsten Signale detektiert werden (für PEI/pDNA-Komplexe etwa 5-fach höher als nach Instillation oder Vernebelung).

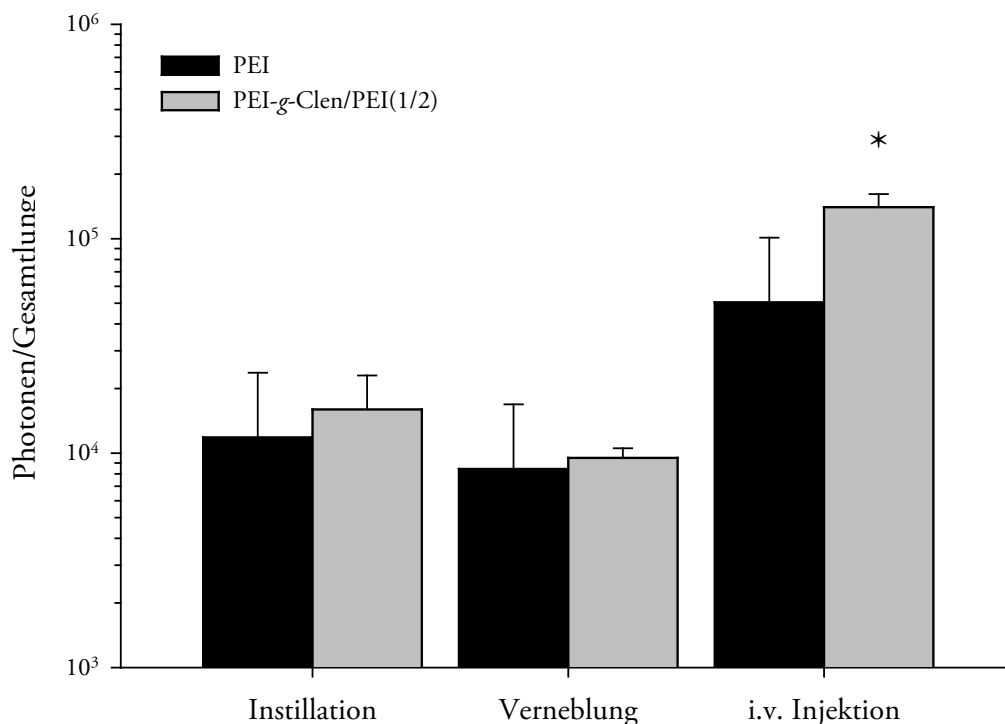


ABBILDUNG 4.10: Quantitative *in vivo* Biolumineszenz-Auswertung im Bereich der Lunge nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 generiert und durch Instillation (n=4), Vernebelung (n=6) oder intravenöser Injektion (n=4) verabreicht. Nach 24 h wurde die durch Luziferin-Gabe emittierte Lumineszenz über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach Korrektur des Hintergrundes. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppen innerhalb einer Applikationsart sind mit einem Sternchen markiert.

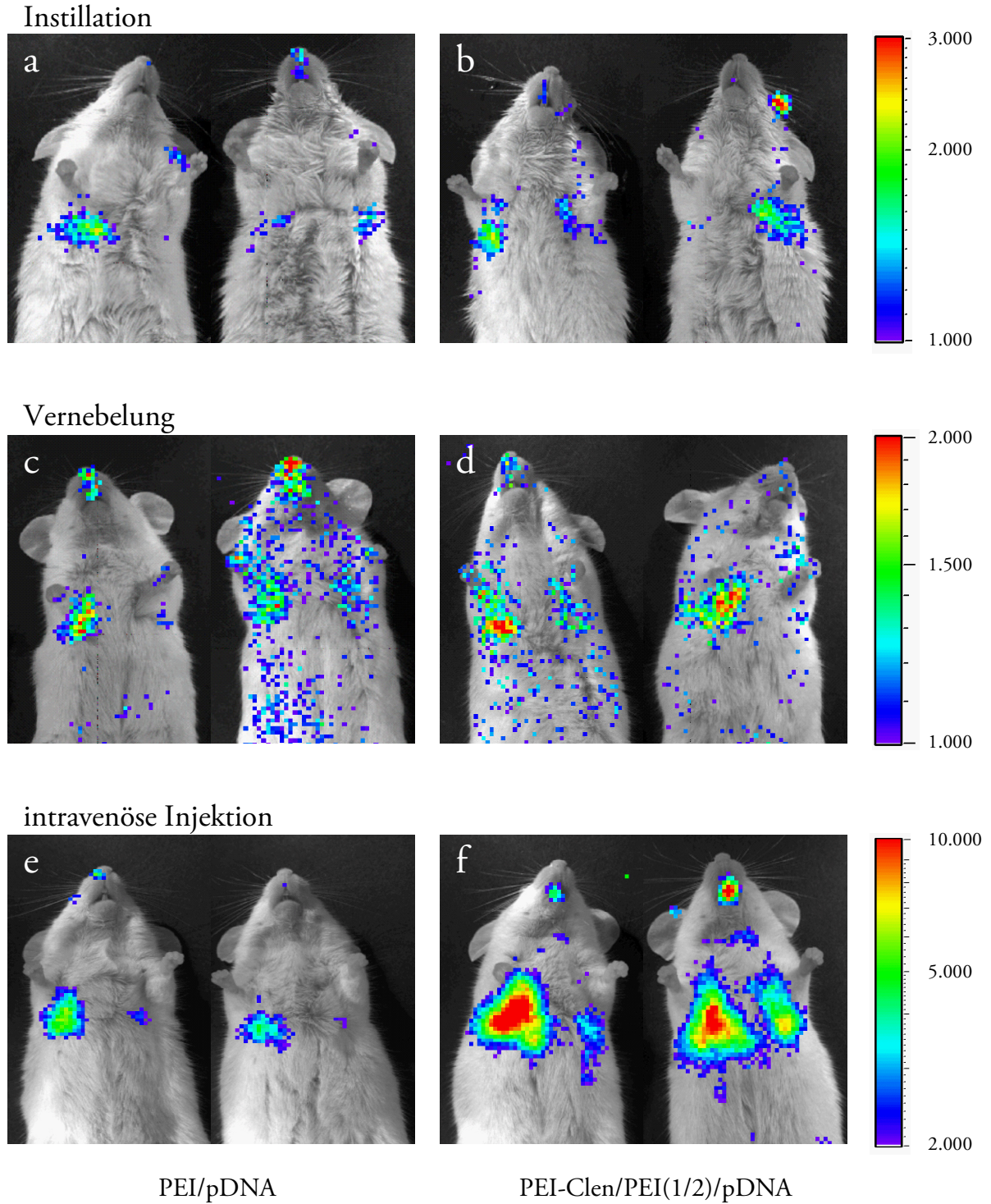


ABBILDUNG 4.11: *In vivo* Biolumineszenz-Aufnahmen nach der Applikation von PEI/pDNA-(a, c, e) bzw. PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-(b, d, f) Komplexen. Polyplexe mit einem N/P-Verhältnis von 10 wurden per Instillation (a, b), Vernebelung (c, d) oder intravenöser Injektion (e, f) verabreicht. Nach 24 h wurde die durch Luziferin-Gabe emittierte Lumineszenz über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt.

4.7.2. Bestimmung der Luziferaseaktivität im Lungengewebe

Um die genaue Menge an Luziferase im Lungengewebe bestimmen zu können, wurden 24 h nach Applikation der Gentransferkomplexe die Lungen entnommen, zu einem Pulver homogenisiert und die Genexpression mittels eines Röhrenluminometers nach der Zugabe von D-Luziferin gemessen. Hierbei lieferte die Instillation bezogen auf ein Gramm Lungengewebe insgesamt die höchste Luziferaseexpression. Bei dieser Applikationsart konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA- und PEI/pDNA-Polyplexen festgestellt werden (ABBILDUNG 4.12a). Im Gegensatz dazu wurde nach der Vernebelung eine 1,6-fache Steigerung der Genexpression von Clenbuterol-modifizierten gegenüber unmodifizierten Polyplexen beobachtet (ABBILDUNG 4.12b). Der deutlichste Unterschied zeigte sich jedoch nach intravenöser Injektion der Komplexe. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexe erreichten eine signifikante 2,7-fache Steigerung der Luziferaseaktivität innerhalb des Lungengewebes im Vergleich zu PEI/pDNA-Komplexen (ABBILDUNG 4.12c).

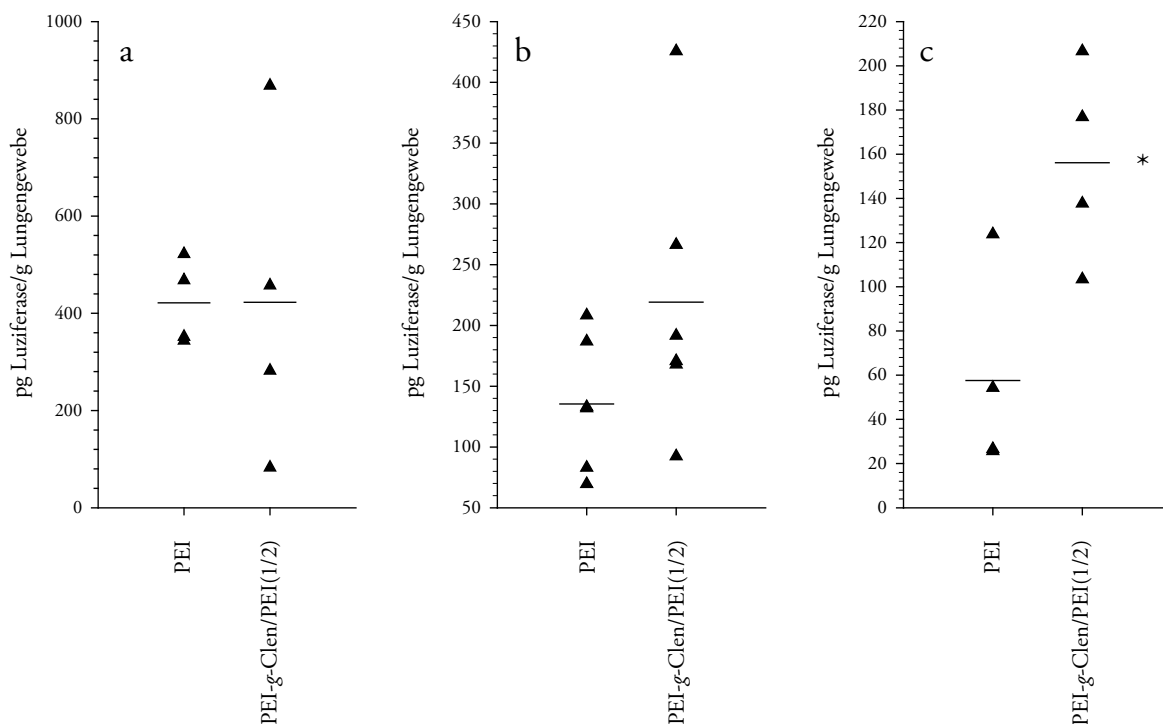
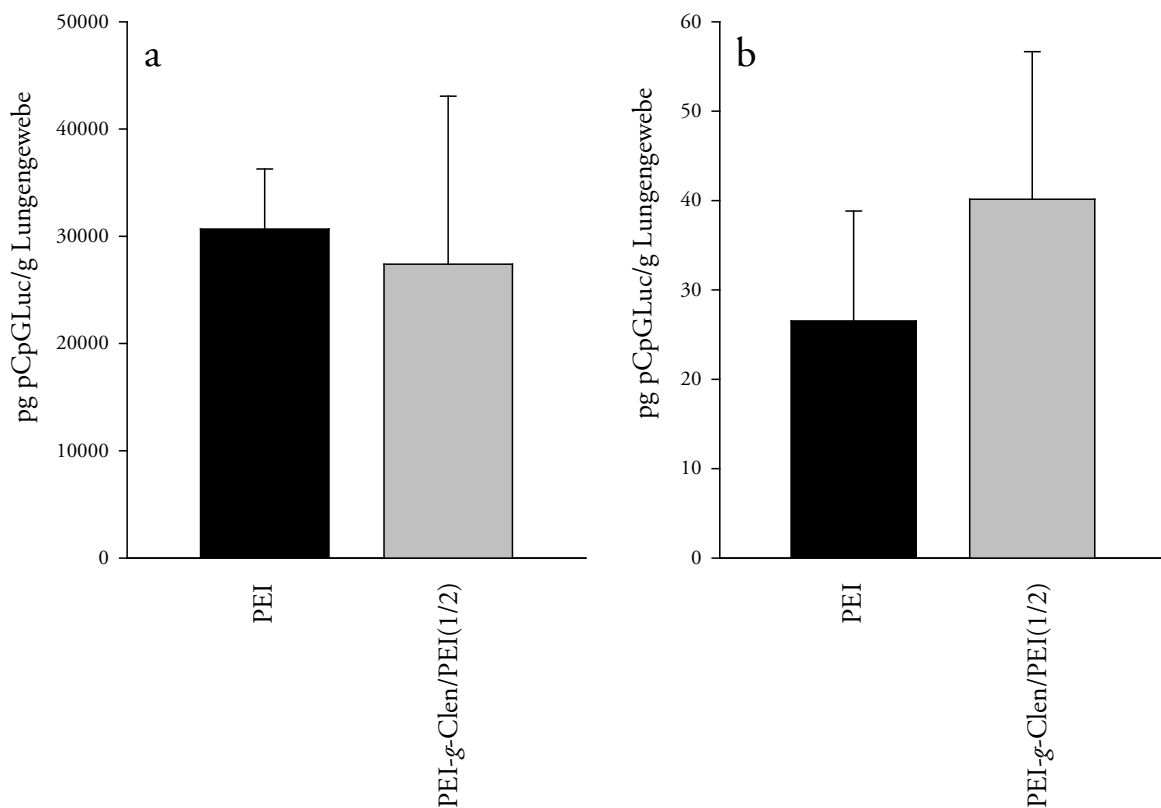


ABBILDUNG 4.12: Luziferaseexpression des homogenisierten Lungengewebes 24 h nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 generiert und durch Instillation (a; n=4), Vernebelung (b; n=6) oder intravenöser Injektion (c; n=4) verabreicht. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppen innerhalb einer Applikationsart sind mit einem Sternchen markiert.

4.7.3. Quantitative Bestimmung der Plasmid-DNA mittels Real Time PCR

Zusätzlich zur funktionellen Untersuchung durch Bestimmung der Genexpression wurde eine quantitative Auswertung der im Lungengewebe deponierten Dosis an Plasmid-DNA mittels Real Time PCR durchgeführt. Dazu erfolgte die Extraktion der Gesamt-DNA aus einem Aliquot des Lungenhomogenisates. Durch den Einsatz spezifischer Primer für den Zeocin-codierenden Genabschnitt von pCpGLuc konnte dessen absolute Menge mit Hilfe einer Standardkurve berechnet werden. Die Ergebnisse sind in ABBILDUNG 4.12 dargestellt. Hier zeigte sich nach Instillation die höchste Menge an pCpGLuc im Lungengewebe. Bei dieser Methode war jedoch keine Zunahme der Plasmid-Menge durch die Verwendung Clenbuterol-haltiger Gentransferpartikel zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte nach der Aerosolapplikation von PEI- β -Clen/PEI(1/2)-Mischungen im Vergleich zu unmodifiziertem PEI die 1,5-fache Menge an Plasmid-DNA detektiert werden. Der höchste Unterschied ergab sich nach intravenöser Injektion. Hier zeigte sich ein 2,0-facher Unterschied zwischen PEI- β -Clen/PEI(1/2) und PEI. Es ist also eine gute Korrelation zwischen deponierter Plasmid-DNA und gemessener Genexpression zu erkennen.



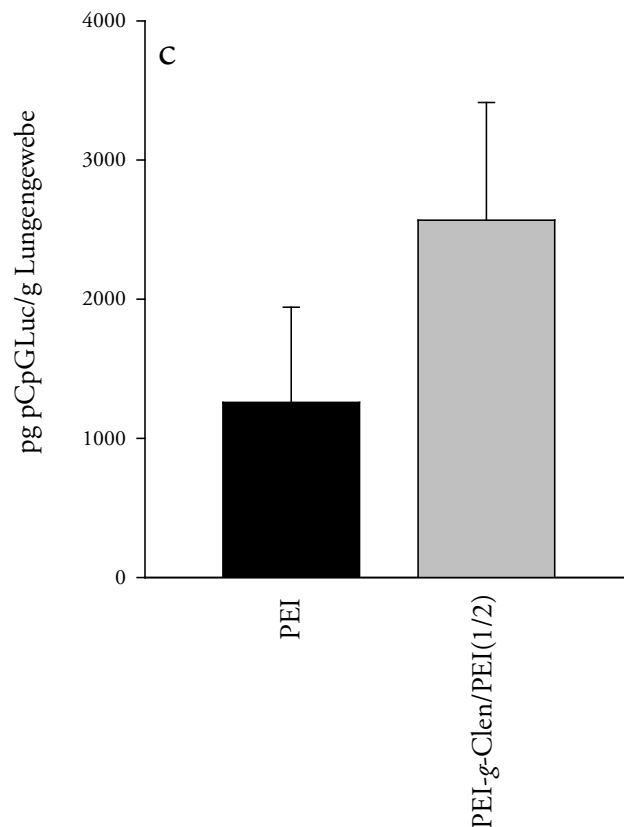


ABBILDUNG 4.13: Quantitative Bestimmung von pCpGLuc innerhalb des Lungengewebes von BALB/c Mäusen mittels Real Time PCR 24 h nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 generiert und durch Instillation (a; n=4), Vernebelung (b; n=6) oder intravenöser Injektion (c; n=4) verabreicht.

4.7.4. Beurteilung der Effektivität verschiedener Applikationsmethoden in die Lunge

Um Aussagen zur Effektivität der einzelnen Applikationsmethoden treffen zu können, wurden die ermittelten Expressionsdaten gegen die aus der Real Time PCR erhaltenen Daten aufgetragen. Mit Hilfe dieser Betrachtungsweise ist es möglich, die Genexpression bezogen auf die deponierte Dosis an Plasmid-DNA innerhalb der Lunge zu bestimmen. Es konnte bei allen drei Applikationsarten beobachtet werden, dass sich innerhalb einer Gruppe zwischen PEI/pDNA- und PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Partikeln keine signifikanten Unterschiede ergaben (ABBILDUNG 4.14). Zwischen den einzelnen Methoden gab es jedoch sehr große Differenzen. Während bei der Instillation 1 pg Plasmid-DNA zu einer Expression von etwa 17 fg Luziferase führte, betrug dieser Wert nach intravenöser Injektion ca. 54 und nach Vernebelung ungefähr 6000 fg Luziferase/pg pCpGLuc.

Die Vernebelung zeigte somit gegenüber der intravenösen Applikation eine etwa 110-fache und gegenüber der Instillation sogar eine ca. 350-fach höhere Effektivität.

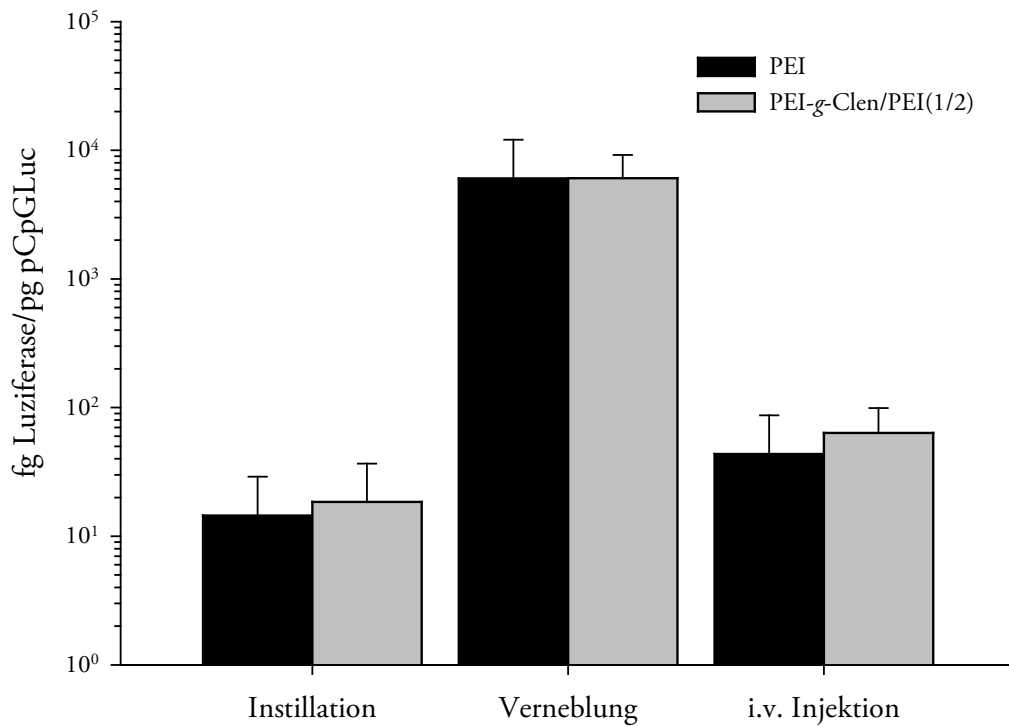


ABBILDUNG 4.14: Beurteilung der Effektivität verschiedener Applikationsmethoden in die Lunge. PEI/pDNA- bzw. PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 generiert und durch Instillation, Vernebelung oder intravenöser Injektion verabreicht. Aus dem Lungenhomogenisat wurden sowohl die Luziferaseexpression wie auch die Menge an Plasmid-DNA ermittelt und gegeneinander aufgetragen.

4.8. Diskussion

In dieser Studie sollte gezeigt werden, inwiefern die Konjugation des β_2 -Adrenozeptoragonisten Clenbuterol an verzweigtes Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 25 kDa die Gentransfereffizienz von Polymer/pDNA-Partikeln *in vitro* und *in vivo* in Lungenzellen steigern kann. Als prinzipielles Ergebnis der Untersuchungen wurde eine verbesserte Genexpression auf Alveolarepithelzellen (A549, MLE-12), nicht jedoch auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) festgestellt. Zusätzlich konnte die Gentransfereffizienz in die Lunge abhängig von der Applikationsart um das bis zu 2,7-fache gesteigert werden.

Um die zelluläre Rezeptorbindung und Aufnahme zu charakterisieren, wurde ein Fluoreszenzmarkiertes Clenbuterol-Konjugat synthetisiert. Nach dessen Inkubation konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Epifluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass β_2 -Adrenozeptoren auf der Oberfläche von A549-Zellen vorhanden sind. Die Spezifität der Bindung wurde durch Inhibierungsexperimente mit freiem Clenbuterol gezeigt, welches zu einer Reduktion Fluoreszenzpositiver Zellen führte. Eine weitere Kontrolle erfolgte durch die Verwendung eines Fluoreszenzmarkierten Konjugates ohne Clenbuterol-Modifikation. Dessen Inkubation auf den Zellen resultierte lediglich in einem Hintergrundsignal. In diesem Zusammenhang wurde bereits in einer früheren Untersuchung mit Hilfe der Konfokalmikroskopie das Vorhandensein von β_2 -Adrenozeptoren auf A549-Zellen demonstriert, welche nach erfolgreicher Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes in die Zelle internalisiert werden (Hegener *et al.*, 2004).

Im Hinblick auf funktionelle Genexpressionsstudien wurde Clenbuterol über ein Amin-reaktives Zwischenprodukt an verzweigtes Polyethylenimin gebunden. Die Kopplung resultierte in einem Konjugat mit durchschnittlich 4 Liganden pro Molekül PEI. Um Polyplexe mit unterschiedlichen Verhältnissen an Clenbuterol zu erhalten, wurden unmittelbar vor der Komplexierung mit Plasmid-DNA Mischungen aus PEI-*g*-Clen und unmodifiziertem PEI hergestellt. Partikel mit hohem Anteil an PEI-*g*-Clen besaßen hydrodynamische Durchmesser von über 200 nm. Diese könnten folglich zu groß sein, um über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden (siehe KAPITEL 1.4.2). Im Gegensatz dazu zeigten Mischungen mit einem Anteil von mindestens 33% an unkonjugiertem PEI nach Komplexierung mit pCMVLuc Partikelgrößen kleiner als 100 nm, welches zu einer besseren Aufnahme in die Zelle führt (Reyman *et al.*, 2004).

Die Modifikation der Polyplexe mit Clenbuterol resultierte auf A549-Zellen in einem Anstieg der Transfektionseffizienz. Ein Maximum wurde bei einer Polymermischung PEI-*g*-Clen/PEI von 1 zu 2 erreicht, welches einer theoretischen Zahl von 1,3 Clenbuterol-Liganden pro Molekül

PEI entspricht. Hierbei konnte ein signifikanter, 14-facher Anstieg der Luziferaseexpression im Vergleich zu unmodifiziertem PEI beobachtet werden. Ähnliches Verhalten zeigte sich auf MLE 12- (9-fache Steigerung) und auf HeLa-Zellen (8-facher Anstieg). MLE-12-Zellen stellen ebenfalls Alveolarepithelzellen dar, diese sind im Unterschied zu A549 (human) jedoch muriner Herkunft. Bei HeLa handelt es sich um immortalisierte Zellen aus einem Zervixkarzinom, für welche bereits das Vorhandensein von β_2 -Adrenozeptoren an deren Zelloberfläche beschrieben wurde (Cramb, 1986). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte mit BEAS-2B-Zellen in verschiedenen Untersuchungen kein signifikanter Anstieg der Genexpression durch die Clenbuterol-Modifikation beobachtet werden. Auf Bronchialepithelzellen scheint somit keine Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Polyplexe zu erfolgen.

Zur weiteren Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismus wurden auf A549-Zellen Inhibitionsuntersuchungen mit einem Überschuss an freiem Ligand durchgeführt. Die Anwesenheit von 0,01mg/ml Clenbuterol im Transfektionsmedium führte zu einer signifikanten Reduktion der Gentransfereffizienz von PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen. Bei unmodifizierten PEI/pDNA-Polyplexen konnte hingegen kein Unterschied durch die Anwesenheit eines Überschusses an Clenbuterol beobachtet werden.

Die vielversprechendste Polymermischung stellt somit PEI-g-Clen/PEI im Verhältnis 1 zu 2 dar. Für dessen Komplexe mit pCMVLuc wurde zusätzlich das Transfektionsverhalten bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Überlegenheit gegenüber unmodifizierten PEI/pDNA-Komplexen in einem durchgängigen N/P-Bereich von 6 - 20.

Die Charakterisierung der Partikeloberfläche zeigte bei zunehmendem Anteil von unkonjugiertem PEI in den Mischungen einen Anstieg des Zeta-Potentials. Gleichzeitig konnte ein Absinken der Zellviabilität beobachtet werden. Ein möglicher Grund liegt auch hier, ähnlich wie bei der Lactoferrin-Modifikation (vgl. KAPITEL 3.7), in der Oberflächenladung. Die Dichte an positiv geladenen Gruppen wurde bereits früher in Zusammenhang mit der Toxizität kationischer Polymere gebracht (Hong *et al.*, 2006). Aus diesem Grund scheint die Kopplung von zielgerichteten Liganden eine viel versprechende Strategie für die Senkung der Toxizität bei gleichzeitiger Erhöhung der Spezifität darzustellen.

Um sicherzustellen, dass der Vernebelungsprozess zu keiner Zerstörung der Gentransferpartikel führt, wurde bereits vor der Durchführung der Tierexperimente anhand einer *in vitro* Untersuchung die Auswirkung der Methode auf Partikelgröße, Komplexstabilität und Transfektionseigenschaften

untersucht. Unvernebelte Komplexe wurden mit gesammelten Fraktionen der vernebelten Partikel und dem verbliebenden Rückstand innerhalb der Vernebelungskammer verglichen. Insgesamt wurden für die Polyplexe jedoch nur kleinere Unterschiede festgestellt. Die Partikel zeigten nach der Vernebelung einen leichten Anstieg ihres hydrodynamischen Durchmessers. Mittels Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass alle Komplexe auch nach der Prozedur stabil waren und keine pDNA freigesetzt wurde. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Vernebelung unkomplexierter Plasmid-DNA Spuren starker Zerstörung, welche vermutlich auf die wirkenden Scherkräfte während des Vernebelungsprozesses zurückzuführen sind. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Komplexierung von Plasmid-DNA mittels Polyethylenimin einen effektiven Schutz vor der Zerstörung durch Aerosolapplikation bietet. Gleichzeitig wird durch die Modifikation des Polymers mit Clenbuterol dieser protektive Mechanismus nicht beeinträchtigt.

Bei *in vivo* Versuchen konnte ein Anstieg der Luziferaseexpression innerhalb der Lungen in Abhängigkeit vom Applikationsweg beobachtet werden. Insgesamt wurden drei verschiedene Methoden für den Gentransfer untersucht. Für die Herstellung Clenbuterol-modifizierter Polyplexe wurde dabei stets PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA als Polymermischung verwendet, welches bei den *in vitro* Studien die höchste Gentransfereffizienz zeigte. Die Auswertung der Genexpression erfolgte sowohl mittels Biolumineszenz-Messung am lebenden Tier als auch durch Messung der Luziferaseexpression des Lungenhomogenisates.

Die Messung der Biolumineszenz zeigte nach Instillation und Aerosolapplikation nur geringe Vorteile für Clenbuterol-modifizierte Partikel im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Polyplexen. Im Gegensatz dazu konnte nach intravenöser Injektion eine signifikante 2,8-fache Steigerung bei PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen beobachtet werden. Hier wurden insgesamt auch die höchsten Lumineszenz-Werte detektiert. Im Vergleich zu Instillation und Vernebelung, welche sich nur geringfügig voneinander unterschieden, konnte nach intravenöser Applikation eine etwa 5-fach höhere Genexpression innerhalb der Lungen festgestellt werden.

Um die Ergebnisse der *in vivo* Biolumineszenz-Messungen zu bestätigen, wurde die Luziferaseaktivität im Lungenhomogenisat bestimmt. Auch hier zeigte sich nach Instillation kein signifikanter Anstieg der Genexpression von PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Partikeln im Vergleich zu PEI/pDNA-Komplexen. Im Gegensatz dazu resultierte die Modifikation mit Clenbuterol bei der Vernebelung in einer 1,6-fachen Zunahme der Transfektionseffizienz. Der größte Effekt konnte jedoch nach intravenöser Applikation der Polyplexe beobachtet werden. PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Partikel zeigten im Vergleich zu unmodifizierten Polyplexen einen signifikanten 2,7-fachen Anstieg der

Luziferaseaktivität. Bezogen auf absolute Werte konnte die insgesamt höchste Genexpression im homogenisierten Lungengewebe nach der Instillation festgestellt werden. Diese war 2- bzw. 4-fach höher als nach Vernebelung oder intravenöser Applikation. Während das Verhältnis von Instillation zu Vernebelung somit ungefähr jenem der *in vivo* Biolumineszenz-Auswertung entsprach, fiel für die intravenöse Injektion ein Widerspruch auf. Obwohl hier bei Messungen am lebenden Tier die höchste Lumineszenz gemessen worden war, fand sich bei der Auswertung des Lungenhomogenisates im Vergleich mit den anderen beiden Methoden die geringste Luziferaseexpression. Möglicherweise werden nach intravenöser Applikation auch Zelltypen (z.B. Makrophagen) transfiziert, welche sich innerhalb der Lungenkapillaren befinden. Diese würden dann zur Biolumineszenz beitragen, im homogenisierten Lungengewebe aufgrund des durchgeführten Spülvorganges vor der Lungenentnahme jedoch nicht mehr erscheinen.

Für eine weitere Charakterisierung der *in vivo* Genexpression wurde mittels quantitativer Real Time PCR die Plasmid-Menge innerhalb des Lungengewebes bestimmt. Während bei Instillationsuntersuchungen kein Unterschied der Dosis an pCpGLuc durch Clenbuterol-modifizierte Polyplexe festgestellt werden konnte, zeigte sich bei Vernebelungsexperimente mit PEI-g-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Partikeln eine 1,5-fach höhere Menge an Plasmid-DNA innerhalb des Lungengewebes im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Komplexen. Nach intravenöser Applikation konnte bei Clenbuterol-haltigen Partikeln sogar 2,0-fach mehr pCpGLuc nachgewiesen werden. Somit fiel eine starke Korrelation zwischen deponierter Plasmid-Menge und Genexpression auf.

Die Effektivität der verschiedenen Applikationsmethoden wurde durch Auswertung des Verhältnisses von Genexpression und deponierter Plasmid-DNA-Dosis innerhalb des Lungenhomogenisates ermittelt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Vernebelung die mit Abstand höchste Effektivität besitzt. Diese zeigte bei gleichbleibender Plasmid-DNA-Menge gegenüber der intravenösen Applikation eine etwa 110-fache und gegenüber der Instillation eine etwa 350-fache Steigerung der Luziferaseexpression. Ähnliche Beobachtungen zur hohen Effektivität der Aerosolvernebelung konnten bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden (Rudolph *et al.*, 2005a).

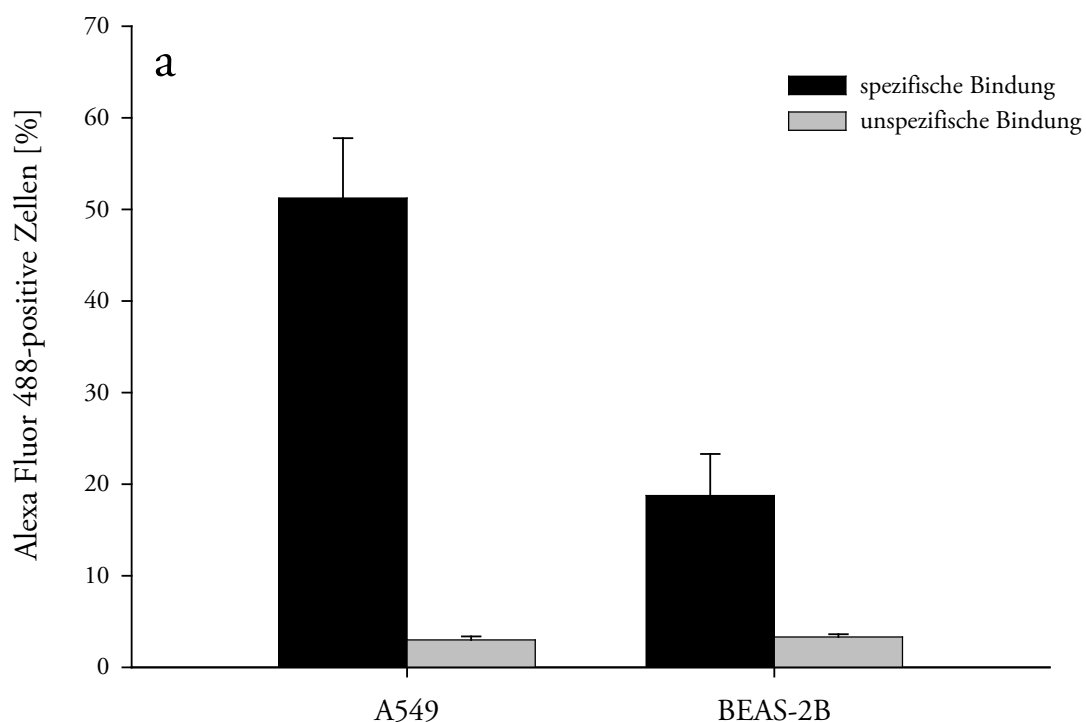
Um zu untersuchen, inwiefern eine Steigerung der Genexpression Clenbuterol-modifizierter Partikel auf einem pharmakologischen Effekt des gekoppelten Arzneistoffes beruht, wurde ein *in vivo* Kontrollexperiment durchgeführt. Hierbei erfolgte die intravenöse Injektion von PEI/pDNA-Komplexen in Anwesenheit von freiem Clenbuterol. Die dabei verwendete Dosis entsprach einer bei

PEI-*g*-Clen/PEI(1/2)/pDNA-Partikeln kovalent gekoppelten Menge. Unglücklicherweise starben innerhalb der ersten 24 h nach der Applikation 4 von 5 Mäusen der Clenbuterol-Gruppe, obwohl die applizierte Menge an Clenbuterol pro Maus ca. 1000-fach unter der in der Literatur beschriebenen LD₅₀-Wert (http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00003714/8279_08.htm?wir/00003714/8279_08.htm) lag. Die fünfte Maus zeigte im Vergleich zu PEI/pDNA-Partikeln keine Steigerung der Genexpression. Kovalent gebundenes Clenbuterol scheint somit im Vergleich zu ungebundenem freiem Clenbuterol weniger toxische Auswirkungen zu besitzen. Diese Vermutung wäre auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vitro* Viabilitätsuntersuchungen bei denen Konjugate mit einem hohen Anteil an gebundenem Clenbuterol keine signifikante zelluläre Toxizität zeigten.

5. Insulin als Ligand für den nichtviralen Gentransfer

5.1. Untersuchungen zum Insulinrezeptor

Zur quantitativen Untersuchung von Insulinrezeptoren auf der Oberfläche von A549- und BEAS-2B-Zellen wurden diese fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu erfolgte die Inkubation eines primären monoklonalen Antikörpers gegen den humanen Insulinrezeptor (CD220), welcher im Anschluss mittels Zugabe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht wurde. Um unspezifische Signale zu erkennen, wurde als Negativkontrolle der Zweitantikörper, welcher das Fluoreszenzsignal trägt, alleine auf den Zellen inkubiert. FACS-Messungen zeigten, dass mehr als 50% der A549-, jedoch nur 19% der BEAS-2B-Zellen positiv für den Insulinrezeptor waren (ABBILDUNG 5.1a). Die unspezifische Bindung lag für beide Zelllinien unter 4%. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen bestätigt. Nach der Addition beider Antikörper auf A549-Zellen konnte eine punktförmige Anordnung von Fluoreszenzsignalen in Korrelation mit zellulären Membranen beobachtet werden (ABBILDUNG 5.1b). Im Gegensatz dazu wurden bei dem zugehörigen Kontrollexperiment keine Signale detektiert (ABBILDUNG 5.1c). Gleiches Verhalten zeigten BEAS-2B-Zellen. Hier wurden bei der Positivprobe jedoch insgesamt weniger Fluoreszenzsignale mit geringerer Intensität detektiert (ABBILDUNG 5.1d+e).



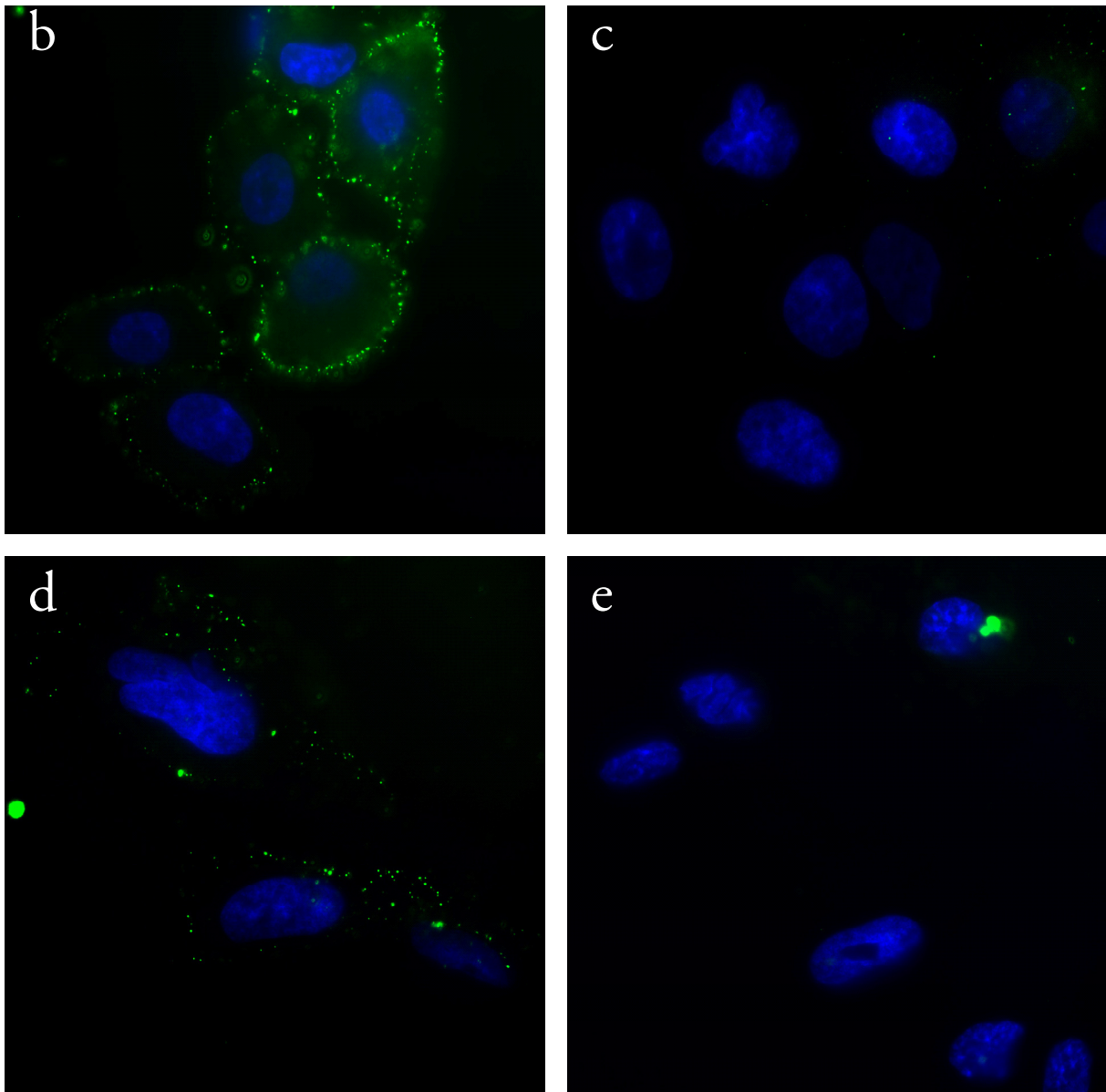


ABBILDUNG 5.1: Rezeptorstatus für Insulin auf Alveolar- und Bronchialepithelzellen. Die Inkubation der Antikörper erfolgte wie in KAPITEL 2.9.3 beschrieben. FACS-Messungen wurden auf A549 und BEAS-2B-Zellen durchgeführt (a). Spezifische Bindung (schwarze Balken) wurde nach Behandlung mit Primär- und Sekundärantikörper erhalten. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung (graue Balken) wurde ausschließlich der Sekundärantikörper inkubiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt ($n = 3$). Fluoreszenzaufnahmen nach der Inkubation von Primär- und Sekundärantikörper auf A549-(b) und BEAS-2B-(d)-Zellen. Auch hier wurde bei Kontrollexperimenten nur die Inkubation des Zweitantikörpers auf A549-(c) und BEAS-2B-(e)-Zellen durchgeführt.

5.2. Biophysikalische Charakterisierung der Polyplexe

5.2.1. Partikelgröße und Zeta-Potential

Die Partikelgröße und das Zeta-Potential der modifizierten PEI/pDNA/INS-Komplexe waren bei einem N/P-Verhältnis von 8 maßgeblich von der zugegebenen Menge an Insulin abhängig. Eine Erhöhung des Insulin/pDNA-Verhältnisses führte ausgehend von unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln zu einem graduellen Anstieg des hydrodynamischen Durchmesser (TABELLE 5.1). Die Zugabe von 5 µg Insulin pro µg pCMVLuc resultierte in Komplexgrößen von etwa 300 nm. Im Gegensatz dazu fand bei einem Verhältnis von 10 µg Insulin/µg pCMVLuc eine Aggregation der Polyplexe mit Partikeldurchmessern im Mikrometerbereich statt. Bei der Bestimmung der Oberflächenladung konnte beobachtet werden, dass die Addition zunehmender Mengen an Insulin zu einer graduellen Erniedrigung des Zeta-Potentials führte. Ein Verhältnis von 10 µg Insulin/µg pCMVLuc resultierte bereits in negativen Werten.

Menge an Insulin [µg/µg pCMVLuc]	Größe [nm]	ζ-Potential [mV]
0	43 ± 1	35 ± 3
1	48 ± 1	37 ± 3
2	152 ± 1	23 ± 3
3	180 ± 2	19 ± 2
4	230 ± 4	14 ± 5
5	283 ± 2	15 ± 4
10	*	-7 ± 3

TABELLE 5.1: Größe und Zeta-Potential von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen. Polyplexe wurden mit verschiedenen Verhältnissen an Insulin bei einem N/P-Verhältnis von 8 generiert. Der PI-Wert lag in allen Fällen bei 0,2-0,3. Komplexe, welche aufgrund von Aggregationsverhalten nicht bestimmbar waren, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Diese Resultate verstärken die Annahme, dass das unter physiologischen Bedingungen negativ geladene Insulin an der Oberfläche von PEI/pDNA-Partikeln angelagert wird. Die ursprünglich positive Nettoladung der Partikel wird dadurch abgeschirmt und bei Unterschreitung eines gewissen Schwellenwertes kommt es zur Aggregation der Komplexe. Durch Wahl eines geeigneten Verhältnisses von Insulin zu Plasmid-DNA kann dabei die Partikelgröße und Oberflächenladung der modifizierten Polyplexe sehr gut gesteuert werden .

5.2.2. Elektronenmikroskopie

Zusätzlich zur Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung erfolgte eine Untersuchung der Größe, Dispersität und Morphologie von PEI/pDNA- und PEI/pDNA/INS-Komplexen mittels Elektronenmikroskopie. Um Artefakte auszuschließen, wurden die gleichen Komplexe sowohl nach Negativfärbung wie auch nach nativer Kryopräparation analysiert. Unabhängig von der Probenaufarbeitung und Bildaufnahme ergaben sich jedoch keine Unterschied der Komplexe im Hinblick auf Form, Größe und Aggregationsverhalten. PEI/pDNA-Komplexe zeigten eine homogene Population mit nahezu runder Form und definierter Größe von ca. 40-50 nm (ABBILDUNG 5.2a,b). Größere Durchmesser (> 100 nm) konnten hierbei nur in geringem Ausmaß bei etwa 5% der Partikel beobachtet werden. Insgesamt erschienen die Komplexe dicht und kompakt. Die Zugabe von Insulin mit einer Konzentration von 5 µg/µg Plasmid-DNA führte zu einem Anstieg des Partikeldurchmessers auf etwa 200 - 300 nm. Ein monodisperses Auftreten ohne Aggregation der Partikel war jedoch erhalten geblieben (ABBILDUNG 5.2c,d). Auch hier war eine dichte und kompakte Morphologie zu beobachten. Zusätzlich konnte jedoch eine zweite, kleinere Subpopulation von globulären und kompakten Partikeln mit einer maximalen Dimension von 50 nm erkannt werden, welche ähnliche Struktur mit unbehandelten PEI/pDNA-Partikeln (ohne Addition von INS) zeigte. Im Gegensatz dazu resultierte die Addition von 15 µg Insulin pro µg pCMVLuc in einer Aggregation der Polyplexe (ABBILDUNG 5.2e,f). Dabei bildeten diese eine Netzwerk-ähnliche Struktur mit Partikeldurchmessern von bis zu 700 nm aus. Eine weitere Erhöhung des Insulin-Verhältnisses auf 25 µg INS/µg pDNA führte ebenfalls zu starker Aggregation der Komplexe (ABBILDUNG 5.2g,h).

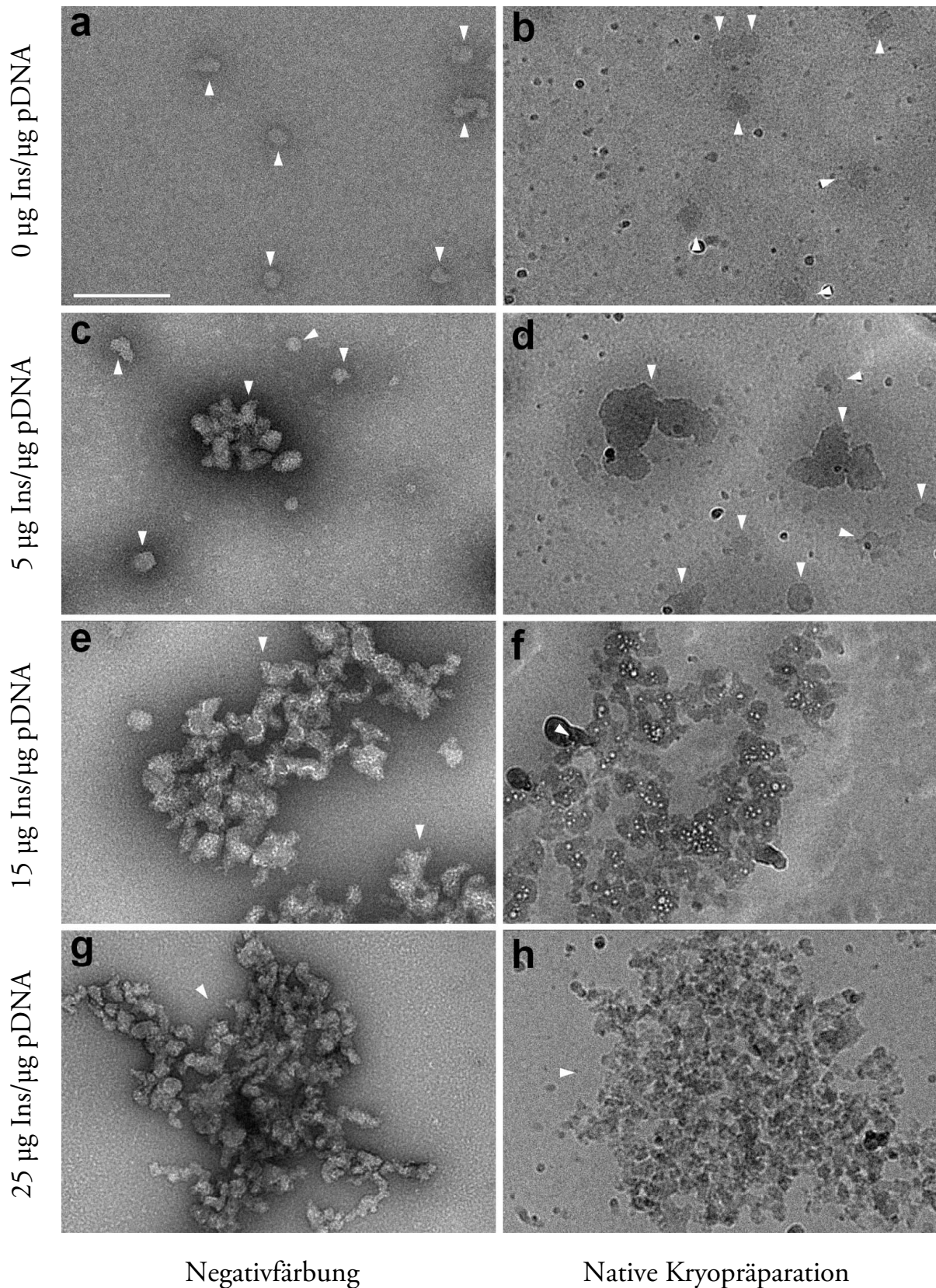


ABBILDUNG 5.2: Elektronenmikroskopie von PEI/pDNA- (a,b) bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen. Modifizierte Polyplexe wurden mit Verhältnissen von 5 µg (c,d), 15 µg (e,f) und 25 µg (g,h) Insulin pro µg Plasmid-DNA generiert. Die Partikel wurden mittels Negativfärbung (linke Bildleiste) oder nativer Kryopräparation (rechte Bildleiste) behandelt und per EM sichtbar gemacht. Einzelne Partikel sind mit Pfeilen markiert. Die Skalierung entspricht 200 nm.

5.2.3. Gelelektrophorese

Die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen PEI/pCMVLuc- und PEI/pCMVLuc/INS-Komplexen. Unabhängig von der Beladung der Partikeloberfläche mit Insulin konnte keine freie Plasmid-DNA im Gel detektiert werden (ABBILDUNG 5.3). Dies stellt einen Indikator für die gute und vollständige Komplexierung der Polyplexe dar. Erst nach der Addition von Heparansulfat konnte pCMVLuc kompetitiv aus allen Komplexen freigesetzt werden und zeigte ein vergleichbares Laufmuster zu un behandelter Plasmid-DNA, welches deren Intaktheit demonstriert. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die Addition zunehmender Mengen an Insulin kein höheres Signal im Well der jeweiligen Banden verursacht. Somit verstärkt sich die Annahme, dass Insulin tatsächlich auf der Oberfläche und nicht im Inneren der Komplexe gebunden wird, wo es ansonsten durch dessen Auflockerung zu einer Verdrängung der pDNA und folglich zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals kommen würde.

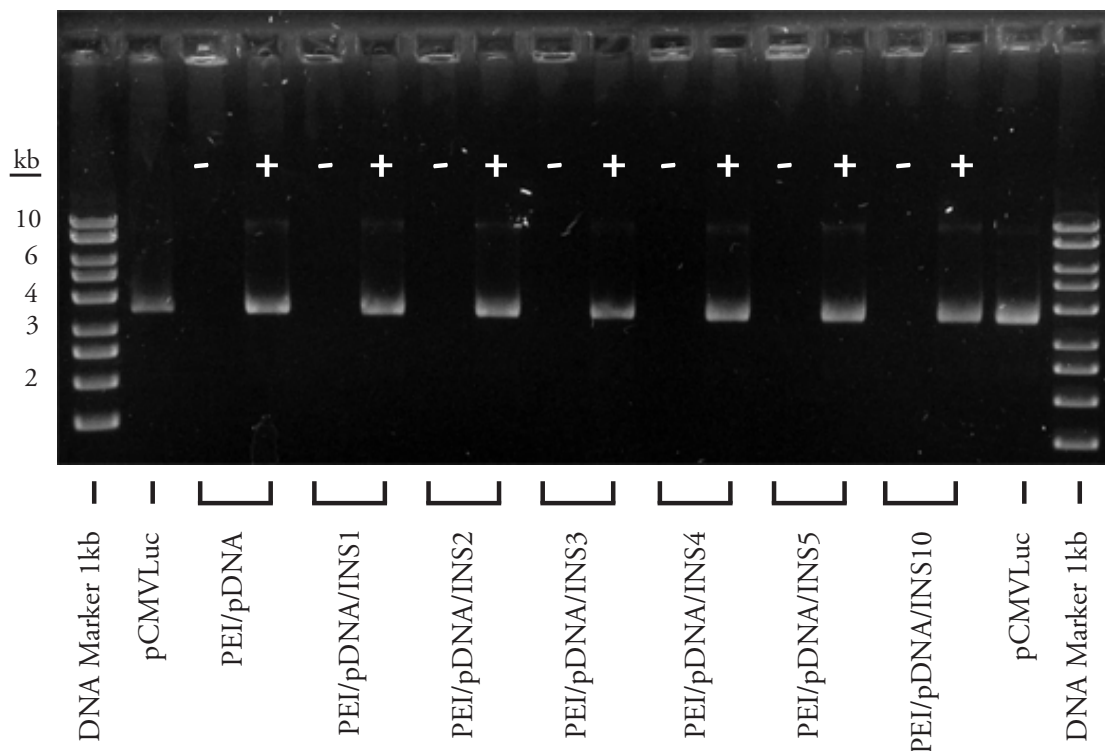


ABBILDUNG 5.3: Gelelektrophorese von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen. Die Polyplexe wurden entweder in An-(+) oder in Abwesenheit (-) von Heparansulfat inkubiert, auf dem Gel laufen gelassen und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. Das unbehandelte Plasmid pCMVLuc wurde als Kontrolle eingesetzt.

5.3. *In vitro* Transfektionsstudien

5.3.1. Überprüfung verschiedener Verhältnisse an Insulin

Die *in vitro* Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen wurde bei einem N/P-Verhältnis von 8 auf A549- und BEAS-2B-Zellen evaluiert. Die Ergebnisse sind in **ABBILDUNG 5.4** zusammengefasst. Auf A549-Zellen führte die Oberflächenmodifikation mit Insulin zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression. Hierbei konnte ein Maximum bei einem Verhältnis von 5 μg Insulin pro μg Plasmid-DNA beobachtet werden. PEI/pDNA/INS5-Polyplexe resultierten im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln in einer signifikanten 16-fachen Steigerung der Luziferaseexpression. Im Gegensatz dazu konnte auf BEAS-2B-Zellen kein signifikanter Anstieg der Transfektionseffizienz durch die Beschichtung der Partikeloberfläche mit Insulin beobachtet werden.

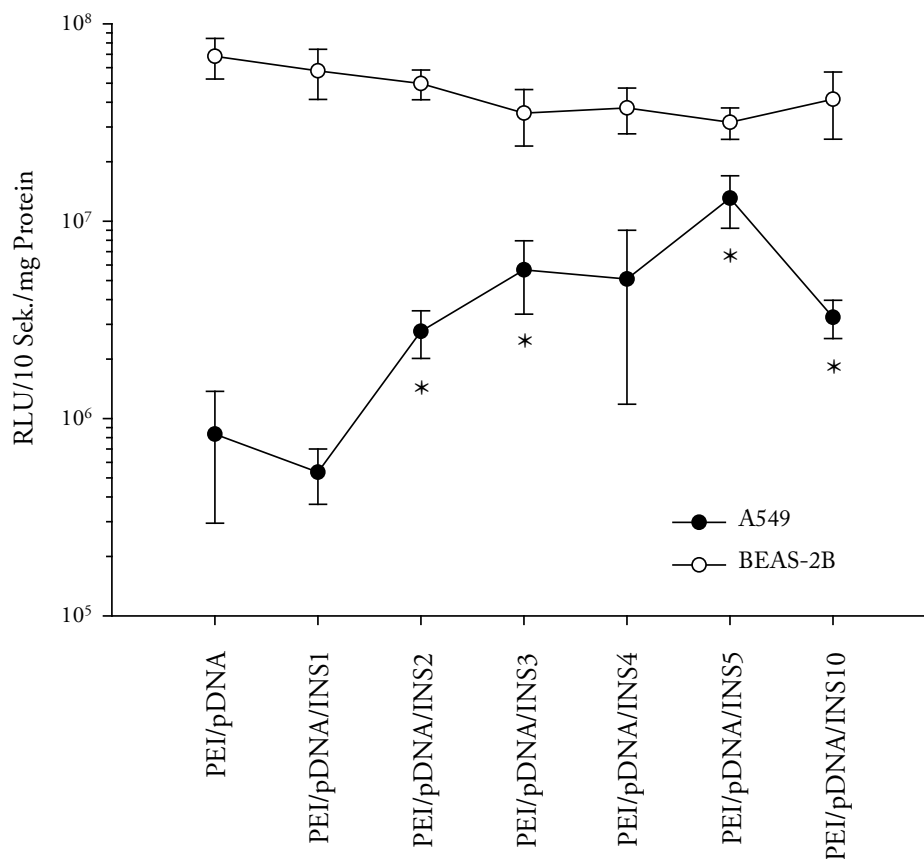


ABBILDUNG 5.4: Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Insulin. Polyplexe wurden bei einem N/P-Verhältnis von 8 generiert und auf A549- und BEAS-2B-Zellen getestet. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=4$). Statistisch signifikante Erhöhungen der Transfektionseffizienz im Vergleich zu unmodifiziertem PEI sind mit einem Sternchen markiert.

Es konnte also demonstriert werden, dass die Modifizierung der Oberfläche von PEI/pDNA-Komplexen mit einem optimalen Verhältnis an Insulin zu Plasmid-DNA in der Lage ist, die Gentransfereffizienz auf Alveolarepithel-, nicht jedoch auf Bronchialepithelzellen zu steigern.

5.3.2. Koinkubation von Insulin

Um sicherzustellen, dass die Erhöhung der Luziferaseexpression nicht auf einem physiologischen, durch Insulin ausgelösten proliferativem Effekt beruht (vgl. KAPITEL 1.5.3), wurden A549-Zellen mit unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln bei einem N/P-Verhältnis von 8 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an freiem Insulin innerhalb des Mediums in einem Bereich von 0,001 mg/ml bis 0,25 mg/ml transfiziert. Die höchste Konzentration beinhaltet dabei bereits die 12,5-fache Insulin-Menge im Vergleich zur maximal eingesetzten Stoffmenge an Insulin für die Oberflächenmodifizierung der PEI/pDNA-Komplexe.

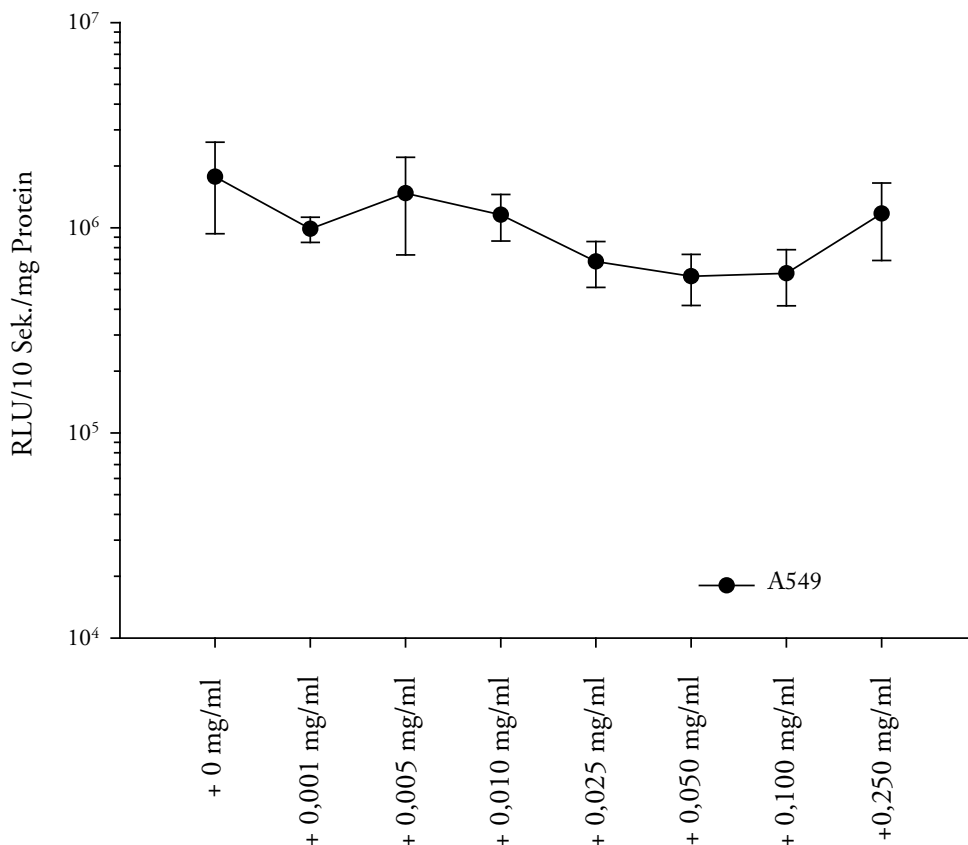


ABBILDUNG 5.5: Transfektionseffizienz von PEI/pDNA-Komplexen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freiem Insulin. Gentransferkomplexe wurden bei einem N/P-Verhältnis von 8 generiert und auf A549-Zellen transfiziert. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

Die Koinkubation zeigte unabhängig von der eingesetzten Insulin-Konzentration keine signifikante Steigerung der Luziferaseexpression (ABBILDUNG 5.5). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der proliferative Effekt durch Insulin bei in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen zu keinem falsch positiven Ergebnis im Bezug auf die Auswertung der Genexpression führt.

5.3.3. Einfluss des verwendeten Polymers

Um zu überprüfen, inwiefern zwischen der Insulin-vermittelten Erhöhung der Gentransfereffizienz und der verwendeten Polymerstruktur ein Zusammenhang besteht, wurden Komplexe aus verzweigtem (25 kDa), wie auch aus linearem (22 kDa) PEI mit pCMVLuc bei einem N/P-Verhältnis von 8 hergestellt. Analog zu den bereits durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Addition von 5 µg Insulin pro µg Plasmid-DNA. Die oberflächenmodifizierten Polyplexe wurden bezüglich ihrer Partikelgröße und der *in vitro* Transfektionseigenschaften auf A549-Zellen charakterisiert.

Bei der Bestimmung der Komplexgröße zeigten sich zwischen den beiden Polymeren keine relevanten Unterschiede. Die Größe der unmodifizierten Partikel lag in beiden Fällen bei 40 - 50 nm, wohingegen die Addition von Insulin eine Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser auf 300 - 400 nm verursachte (TABELLE 5.2).

	Partikelgröße [nm] verzweigtes PEI (25 kDa)	Partikelgröße [nm] lineares PEI (22 kDa)
PEI/pDNA	44 ± 1	54 ± 2
PEI/pDNA/INS5	310 ± 10	390 ± 6

TABELLE 5.2: Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS5-Partikeln mit unterschiedlichen Polyethylenimin. Für die Komplexierung in destilliertem Wasser bei einem N/P-Verhältnis von 8 wurde entweder verzweigtes oder lineares Polyethylenimin verwendet. Der PI-Wert der Komplexe lag zwischen 0,2 und 0,3.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Hinblick auf die Transfektionseffizienz abhängig vom eingesetzten Polyethylenimin unterschiedliches Verhalten der Gentransferpartikel. Komplexe aus linearem PEI erreichten im Vergleich zu Polyplexen aus verzweigtem PEI eine insgesamt deutlich höhere Genexpression (ABBILDUNG 5.6). Für l-PEI/pDNA-Partikel konnte jedoch keine signifikante Zunahme der Luziferaseexpression durch die Oberflächenmodifikation mit Insulin beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Partikeln aus verzweigtem PEI analog zu den vorangegangenen Ansätzen eine signifikante Steigerung der Genexpression nach Insulin-Addition. Die Steigerung der Genexpression scheint somit auch von der Polymerstruktur abhängig zu sein.

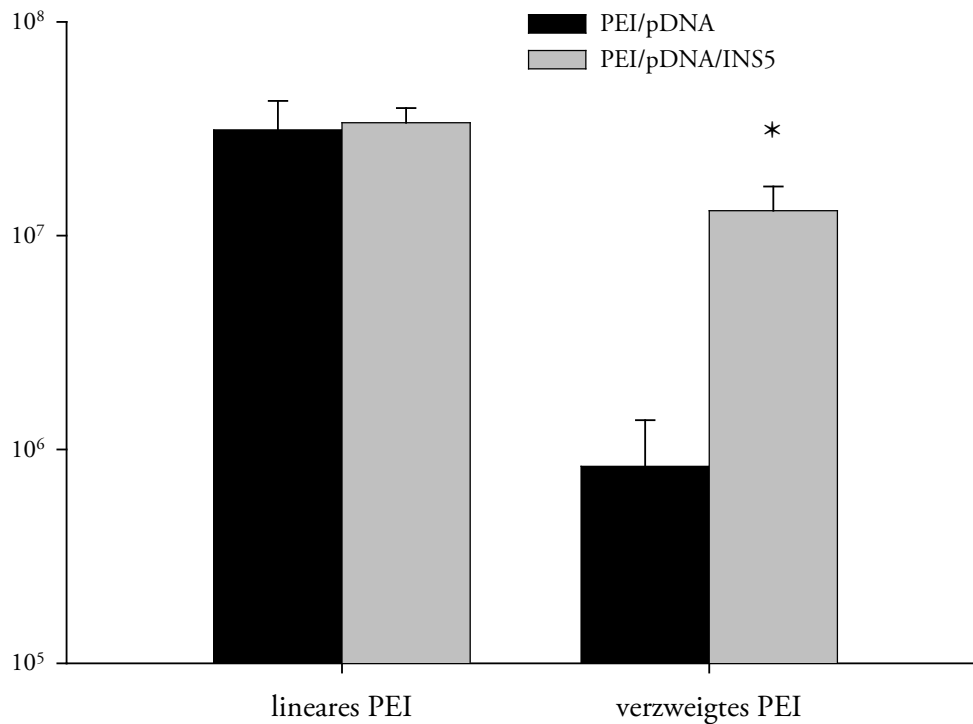


ABBILDUNG 5.6: Einfluss des Polymers auf die Transfektionseffizienz. PEI/pDNA bzw. PEI/pDNA/INS5-Komplexe wurden entweder mit linearem oder mit verzweigtem PEI bei einem N/P-Verhältnis von 8 generiert und auf A549-Zellen transfiziert. Die Luziferase-Genexpression wurde als Relative Lichteinheiten während 10 Sekunden pro Milligramm Protein berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4). Statistisch signifikante Erhöhungen der Transfektionseffizienz innerhalb einer Gruppe sind mit einem Sternchen markiert.

5.4. Zellviabilität

Für die Bestimmung der Zytotoxizität der Komplexe wurde 24 h nach der Transfektion die Konzentration an ATP gemessen. Unmodifizierte PEI/pDNA-Komplexe zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen einen signifikanten Abfall der Zellviabilität (ABBILDUNG 5.7). Im Gegensatz dazu konnte bei allen PEI/pDNA/INS-Komplexen keine signifikante Zytotoxizität festgestellt werden. Bereits die Oberflächenmodifikation mit einem Verhältnis von 1 μ g Insulin pro μ g pCMVLuc führte zu einem deutlichen Anstieg der Zellviabilität von PEI/pDNA-Partikeln. Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch die Addition von Insulin die Toxizität von PEI/pDNA-Komplexen signifikant reduziert werden kann.

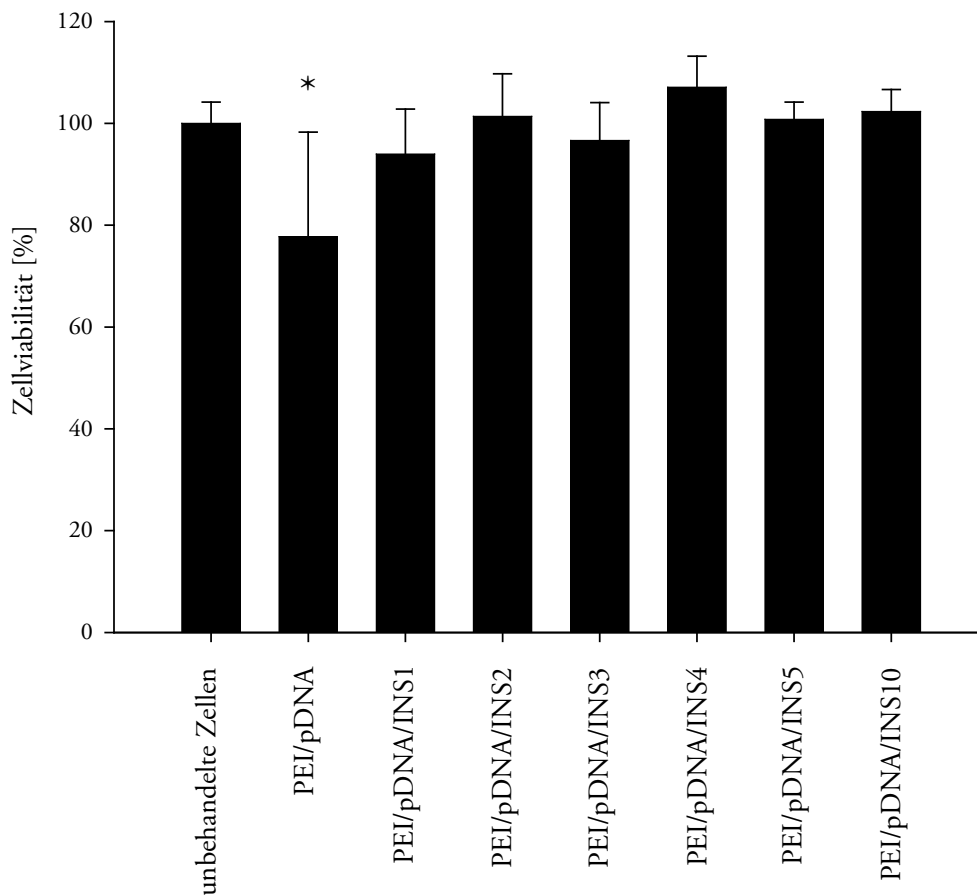


ABBILDUNG 5.7: Metabolische Zellaktivität von A549-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8. Die Bestimmung der ATP-Lumineszenz wurde 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Messergebnisse von unbehandelten Zellen wurden für die Berechnung bei einem Wert von 100% festgelegt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=8$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Polymer/pDNA-Komplexen und unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen markiert.

5.5. Diskussion

In dieser Studie sollte untersucht werden, inwiefern das Peptidhormon Insulin als Ligand für den nichtviralen *in vitro* Gentransfer in Lungenepithelzellen geeignet ist. Im Gegensatz zu einer kovalenten Bindung des Liganden an das kationische Polymer (vgl. Lactoferrin, Clenbuterol) erfolgte die Einführung von Insulin in den Gentransferkomplex durch elektrostatische Wechselwirkung an der Polyplexoberfläche. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Genexpression auf Alveolarepithel- (A549), nicht jedoch auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) erhöht werden konnte. Zusätzlich führte die Oberflächenmodifikation mit Insulin zu einer signifikanten Reduzierung der Zytotoxizität von PEI/pDNA-Polyplexen. Diese Resultate besitzen somit hohe Relevanz für zukünftige *in vivo* Untersuchungen.

Der Status an Insulinrezeptoren wurde mittels einer Antikörper-basierten Strategie evaluiert. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Expression einer hohen Anzahl an Rezeptoren auf Alveolarepithelzellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde auf Bronchialepithelzellen nur eine geringe Anzahl Fluoreszenz-positiver Zellen detektiert. Eine Bestätigung dieser Beobachtungen erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Zusätzlich wurde unspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers durch Kontrollexperimente ausgeschlossen. Insulinrezeptoren konnten bereits früher von einer anderen Arbeitsgruppe auf Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden (Shapiro *et al.*, 1986). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Insulin einen geeigneten Kandidaten für den zielgerichteten Gentransfer in Alveolarepithelzellen darstellt.

Für funktionelle Genexpressionsstudien wurden Polyplexe aus PEI und Plasmid-DNA generiert und im Anschluss mit Insulin versetzt. Dies bewirkte dessen nichtkovalente Adsorption an die Komplexoberfläche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen (siehe ABBILDUNG 1.8). Die Bildung ternärer oberflächenmodifizierter Komplexe wurde in diesem Fall der kovalenten Bindung des Liganden vorgezogen, um einer möglichen Zerstörung dessen Peptidstruktur und daraus resultierendem Aktivitätsverlust vorzubeugen.

Prinzipiell ist die Herstellung ternärer Komplexe aus Polymer, Plasmid-DNA und einem zielgerichtetem Peptid-Liganden auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Die erste Möglichkeit stellt die Mischung von Peptid und Polymer mit nachfolgender Zugabe der Plasmid-DNA dar („Peptid first“-Methode). Das Peptid ist somit bereits während der Komplexbildung anwesend. Eine zweite Strategie besteht in der Herstellung unmodifizierter positiv geladener Komplexe durch Mischen von Plasmid-DNA und Polymer, welche erst im Anschluss mit dem negativ geladenen Peptid umgesetzt werden („Polymer first“-Methode).

In dieser Arbeit wurde die „Polymer first“-Methode zur Generierung der Gentransferpartikel verwendet, um eine definierte Bindung des Insulins ausschließlich auf der Komplexoberfläche zu erreichen. Bei der „Peptid first“-Methode besteht stets die unerwünschte Möglichkeit, dass der zielgerichtete Ligand im Inneren des Polyplexes eingeschlossen wird und somit nicht für die Erkennung durch den Rezeptor zur Verfügung steht. Zu dieser theoretischen Betrachtung liegen bereits experimentelle Daten vor. So konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von Polymer/pDNA-Partikeln zu ternären Komplexen mit einem NGF-Peptid mittels „Polymer-first“-Methode zu einer dosisabhängigen Zunahme der Transfektionseffizienz führte. Im Gegensatz dazu zeigten Gentransferkomplexe auf der Basis der „Peptid first“-Methode keine Verbesserung im Vergleich zu unmodifizierten Partikeln (Zeng *et al.*, 2007).

Bei der Charakterisierung der Komplexgrößen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie zeigte sich, dass durch die Adsorption von Insulin an der Partikeloberfläche eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte. Ein Verhältnis von 5 µg Insulin pro µg Plasmid-DNA resultierte in definierten Partikeln mit einer Größe unter 300 nm, wohingegen eine weitere Erhöhung des Insulinanteils Aggregation der Komplexe verursachte. Dieses Verhalten konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden.

Die Modifikation der Gentransferkomplexe resultierte gleichzeitig in einer Reduzierung des Zeta-Potentials. Zwischen einem Verhältnis von 5 auf 10 µg Insulin pro µg Plasmid-DNA erfolgte ein Abfall der Oberflächenladung von positiven auf negative Werte. Aufgrund der sich daraus ergebenden geringeren Abstoßung zwischen den Partikeln kommt es folglich zur Aggregation mit Partikeln im Mikrometer-Bereich.

Mit Hilfe der Ergebnisse der Untersuchungen von Partikelgröße und Zeta-Potential konnte deutlich gezeigt werden, dass es durch Verwendung eines bestimmten Verhältnisses von Insulin zu Plasmid-DNA möglich ist, eine definierte Modifikation der Komplexoberfläche zu erreichen. Die physikalischen Eigenschaften der Partikel können somit gesteuert werden. Dabei wurde trotz Abfall der Oberflächenladung die Bindung zwischen Polymer und Plasmid-DNA nicht beeinträchtigt. Mit Hilfe von gelelektrophoretischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass pCMVLuc in allen Gentransferpartikeln unabhängig des eingesetzten Insulin-Verhältnisses stabil komplexiert war und es zu keiner Auflockerung der Komplexe kam.

Die Addition von Insulin führte gleichzeitig zu einer Zunahme der Zellviabilität von PEI/pDNA-Komplexen. Analog zu früheren Vermutungen wird diese mit der Maskierung positiv geladener

Ladungen an der Komplexoberfläche in Verbindung gebracht (Hong *et al.*, 2006). Zusätzlich können jedoch auch metabolische Eigenschaften von Insulin als Effekt auf die Zellaktivität nicht ausgeschlossen werden.

Bei *in vitro* Transfektionsexperimenten konnte beobachtet werden, dass die Oberflächenmodifikation der Polyplexe mit Insulin zu einer Steigerung der Genexpression auf Alveolarepithel-, jedoch nicht auf Bronchialepithelzellen führte. Ein Verhältnis von 5 µg Insulin pro µg Plasmid-DNA resultierte in einem Maximum mit einer im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln 16-fach höheren Luziferaseexpression. Um ein falsch positives Ergebnis aufgrund zellproliferativer Effekte des Insulins auszuschließen, wurde eine Transfektion mit PEI/pDNA-Komplexen in Anwesenheit von freiem Insulin durchgeführt. Die Konzentration an Insulin war dabei deutlich höher als bei der Komplexmodifikation. Es konnte jedoch unabhängig von der zugegebenen Menge an Insulin keine signifikante Veränderung der Genexpression beobachtet werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Zellproliferation keinen entscheidenden Faktor bei denen in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen an Insulin darstellt.

Für die verbesserte Transfektionseffizienz oberflächenmodifizierter Komplexe werden Rezeptorvermittelte Mechanismen verantwortlich gemacht. Nichtsdestotrotz muss auch der Einfluss einer Größenänderung der Gentransferpartikel in Betracht gezogen werden. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass größere Polyplexe im Vergleich zu kleineren Partikeln zu höherer *in vitro* Genexpression führen (Ogris *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu kam jedoch eine andere Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass die Aufnahme kleiner Partikel unter 100 nm bis zu 10-fach effizienter vonstatten geht als die Internalisierung von jenen mit einer Größe von 200 nm (Reyman *et al.*, 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit gemacht, bei der Lactoferrin- bzw. Clenbuterol-modifizierte Partikel mit kleineren Komplexgrößen bessere Transfektionseigenschaften zeigten. Ein wichtiges Indiz für die Tatsache, dass die Genexpression nicht ausschließlich an der Komplexgröße festgemacht werden kann, zeigten die Untersuchungen mit linearem Polyethylenimin. Obwohl die Insulin-Addition analog zu Komplexen mit verzweigtem PEI zu einer Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers führte, konnte keine Steigerung der Luziferaseexpression beobachtet werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch die Polymerstruktur einen wichtiger Faktor darstellt und in der Komplexgröße nicht der entscheidende Grund für das verbesserte Transfektionsverhalten besteht. Trotzdem sollten weitere Studien durchgeführt werden, um dessen Effekt näher zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Die Gentherapie stellt einen neuartigen und viel versprechenden Ansatz für die zukünftige Behandlung angeborener oder erworbener Krankheiten dar, bei denen herkömmliche Therapieformen bislang nur geringe Effizienz zeigen. Hierbei ist die Lunge im Hinblick auf viele akute und chronische Erkrankungen wie beispielsweise Zystischer Fibrose, Asthma oder Tumoren ein wichtiges Zielorgan.

Eine therapeutische Anwendung der Gentherapie setzt den erfolgreichen Transfer der applizierten Nukleinsäure in die Zielzelle voraus. Transkription eines Gens kann nur dann erfolgen, wenn die DNA den Zellkern erreicht. Die momentan größte Herausforderung besteht somit in der technologischen Entwicklung geeigneter Gentransfervektoren. Derzeitige Gentransfersysteme lassen sich in virale und nichtvirale Methoden einteilen. Obwohl Viren bislang deutlich höhere Transfektionseffizienzen zeigen konnten, bergen sie aufgrund immunogener und mutagener Eigenschaften unkalkulierbare Risiken. Dies führte zur Entwicklung nichtviraler Systeme, welche eine weit sicherere Alternative darstellen.

Innerhalb der kationischen Polymere stellt Polyethylenimin (PEI) ein effizientes nichtvirales Gentransferagens dar, welches bereits Gegenstand vieler Untersuchungen war. Nichtsdestotrotz konnte im Vergleich zu viralen Systemen noch keine ausreichend hohe Transfektionseffizienz, insbesondere bei *in vivo* Applikationen, erreicht werden. Zusätzlich besitzt PEI eine hohe Zytotoxizität.

Die Modifikation kationischer Polymere mit zielgerichteten Liganden scheint vor diesem Hintergrund eine viel versprechende Methode zur Schaffung intelligenterer Systeme darzustellen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine höhere Genexpression und Selektivität erstrebenswert. Verschiedenste Liganden wie zum Beispiel Transferrin, Folsäure oder EGF wurden bereits erfolgreich für den Rezeptor-vermittelten nichtviralen Gentransfer beschrieben (siehe KAPITEL 1.5). Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung neuartiger zielgerichteter Gentransfersysteme auf der Basis von verzweigtem PEI. Verwendete Liganden waren dabei das Glykoprotein Lactoferrin, der Arzneistoff Clenbuterol und das Peptidhormon Insulin.

Im Hinblick auf die spätere pulmonale *in vivo* Anwendung erfolgten die *in vitro* Untersuchungen bevorzugt mit Lungenzellen. Dabei wurden insbesondere Alveolarepithel- und Bronchialepithelzellen verwendet.

Um das Potential eines Liganden abschätzen zu können, wurden zu Beginn jeder Studie *in vitro* Rezeptoruntersuchungen durchgeführt. Diese erfolgten durch Inkubation hergestellter Fluoreszenzfarbstoff-Ligand-Konjugate oder mittels Antikörper-basierter Methoden. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Lactoferrin-Rezeptoren bevorzugt auf Bronchialepithelzellen exprimiert werden. Im Gegensatz dazu wurde eine hohe Anzahl von Rezeptoren für Clenbuterol und Insulin insbesondere auf Alveolarepithelzellen gefunden.

Die Einbringung der Liganden in die Gentransferkomplexe erfolgte auf unterschiedlichen Wegen. Lactoferrin und Clenbuterol wurden jeweils durch biochemische Reaktionen kovalent an das PEI-Grundgerüst gekoppelt. Somit waren diese schon während der Komplexbildung mit Plasmid-DNA anwesend. Im Gegensatz dazu wurde Insulin durch nichtkovalente Adsorption aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an die Oberfläche bereits komplexierter PEI/pDNA-Partikel gebunden. Für alle Komplexe wurden verschiedene molare Verhältnisse zwischen Polymer und Ligand hergestellt und untersucht.

Bei der biophysikalischen Charakterisierung der Partikel konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit hoher Anteile der Liganden zu Komplexen mit einem größeren hydrodynamischen Durchmesser führte. Dies zeigte sich unabhängig von der Tatsache, auf welche Weise die Einführung des Liganden stattfand. Die Größenzunahme dürfte jedoch in unterschiedlichen Ursachen begründet sein. Während hohe Anteile kovalent an PEI gebundener Liganden (Lactoferrin bzw. Clenbuterol) wahrscheinlich die Komplexbildung mit Plasmid-DNA stören, basiert ein Anstieg der Komplexgröße bei elektrostatischer Adsorption auf der Partikeloberfläche vermutlich auf einer Zunahme der Schichtdicke gebundenen Insulins.

Diese Vermutungen wurden durch Messungen der Oberflächenladung der Polyplexe bestätigt. Die Adsorption von Insulin an der Oberfläche von PEI/pDNA-Komplexen führte zu einem drastischen Abfall des Zeta-Potentials bis hin zu negativen Werten, bei denen Aggregation der Partikel beobachtet werden konnte. Auch die Clenbuterol-Konjugation führte zu einer Reduzierung des Zeta-Potentials, welche jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu resultierte die Kopplung von Lactoferrin diesbezüglich zu keiner relevanten Änderung. Gleichzeitig konnte mittels gelelektrophoretischer Untersuchungen jedoch gezeigt werden, dass in allen Fällen die Plasmid-DNA vollständig durch die Polymere komplexiert werden konnte.

Bei *in vitro* Transfektionsstudien konnte für Lactoferrin-modifizierte Konjugate auf Bronchialepithelzellen ein Maximum der Genexpression bei einem Konjugationsverhältnis von 1 zu 20

zwischen Lactoferrin und PEI ermittelt werden. Dieses zeigte bei einem N/P-Verhältnis von 4 im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln eine signifikante 5-fache Steigerung der Transfektionseffizienz. Die Spezifität der Zunahme konnte durch Inhibierungsuntersuchungen mit einem Überschuss an Lactoferrin gezeigt werden. Auf Alveolarepithelzellen hingegen führte die Modifikation mit Lactoferrin zu keiner signifikanten Steigerung. *In vivo* Versuche zur Lunge wurden mittels Instillation und Vernebelung als Applikationsarten durchgeführt. Es konnte jedoch kein Vorteil der Genexpression durch die Lactoferrin-Modifizierung von PEI/pDNA-Komplexen beobachtet werden. Hier bleibt zu klären, inwiefern Lactoferrin *in vivo* strukturell erhalten bleibt und ob die verwendete Lactoferrin-Spezies eine Rolle spielt.

Verschiedene Anteile an Clenbuterol wurden in die Transfektionskomplexe durch Herstellung von Mischungen aus PEI-*g*-Clen mit unmodifiziertem PEI eingeführt. Die höchste *in vitro* Gentransfereffizienz zeigte eine molare Zusammensetzung von 1,3 Clenbuterol-Liganden pro Molekül Polyethylenimin, welche bei einem N/P-Verhältnis von 8 im Vergleich zu PEI/pDNA-Polyplexen in einem signifikanten 14-fachen Anstieg der Luziferaseexpression resultierte. Dieser Vorteil war über einen weiten N/P-Bereich von 6-20 erkennbar. Der Abfall der Genexpression durch Zugabe eines Überschusses an freiem Clenbuterol ließ auf einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus schließen. Die Clenbuterol-Modifikation der Gentransferpartikel führte auf zwei weiteren Zelllinien (murines Alveolarepithel, humanes Zervixkarzinom) ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Transfektionseffizienz, wohingegen auf Bronchialepithelzellen kein Effekt festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse korrelierten mit der β_2 -Rezeptordichte auf den jeweiligen Zelllinien.

In vivo Untersuchungen mit Clenbuterol als Ligand wurden auf drei verschiedenen Applikationswegen durchgeführt. Während bei der Instillation kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar war, führte die Modifikation von PEI/pDNA-Partikeln mit Clenbuterol nach Vernebelung zu einem 1,6-fachen und nach intravenöser Applikation zu einem signifikanten 2,7-fachen Anstieg der Genexpression innerhalb der Lunge. Quantitative Bestimmungen im Lungengewebe mittels Real Time PCR zeigten, dass in diesen Fällen Clenbuterol-modifizierte Konjugate in der Lage waren, mehr Plasmid-DNA in das Zielgewebe zu transportieren. Bei der Auswertung des Verhältnisses von Genexpression und Plasmid-Menge innerhalb des Lungenhomogenisates konnte festgestellt werden, dass die Vernebelung die mit Abstand höchste Effektivität besitzt. Diese zeigte, bezogen auf die deponierte Menge an Plasmid-DNA, gegenüber der intravenösen Applikation eine etwa 110-fache und gegenüber der Instillation eine etwa 350-fache Steigerung der Luziferaseexpression. Unabhängig davon konnte mittels eines *in vitro* Versuches gezeigt werden, dass die Vernebelungsprozedur zu

keiner Zerstörung komplexierter Plasmid-DNA führte, wohingegen unkomplezierte Plasmid-DNA den Scherkräften der Vernebelungskammer ausgesetzt war und dabei Schaden nahm.

Die Oberflächenmodifikation mit Insulin führte bei PEI/pDNA-Komplexen zu einer Steigerung der *in vitro* Transfektionseffizienz auf Alveolarepithel-, jedoch nicht auf Bronchialepithelzellen. Ein Verhältnis von 5 µg Insulin pro µg Plasmid-DNA resultierte in einem Maximum mit einer im Vergleich zu unmodifizierten PEI/pDNA-Partikeln 16-fach höheren Luziferaseexpression. Untersuchungen mittels Koinkubation freien Insulins zeigten, dass die Zunahme nicht auf proliferative Effekte des Liganden zurückzuführen war. Des Weiteren konnte die Notwendigkeit der Anwesenheit von verzweigtem Polyethylenimin gezeigt werden, nachdem die Addition von Insulin bei Verwendung von linearem PEI zu keiner Erhöhung der Genexpression führte.

Einen Überblick über den Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Liganden im Bezug auf die Transfektionseffizienz von PEI/pDNA-Partikeln *in vitro* auf Lungenepithelzellen und *in vivo* zur Lunge zeigt TABELLE 6.1.

Verwendeter Ligand	Transfektionseffizienz <i>in vitro</i>		Transfektionseffizienz <i>in vivo</i>
	Alveolarepithelzellen	Bronchialepithelzellen	
Lactoferrin	--	+	--
Clenbuterol	++	--	+
Insulin	++	--	n.d.

TABELLE 6.1: Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Liganden auf die Transfektionseffizienz von PEI/pDNA-Partikeln *in vitro* und *in vivo*. Der Einfluss wurde mit sehr gut (++) , gut (+) oder nicht vorhanden (--) beurteilt. n.d. = nicht durchgeführt

Insgesamt spielt auch die Toxizität der Gentransferkomplexe eine wichtige Rolle im Hinblick auf die spätere klinische Applikation. PEI ist als toxisches Gentransferagens bekannt. Hohe Toxizität des Polymers wurde bereits mehrfach *in vitro*, wie auch *in vivo* berichtet. Es konnte für alle drei Liganden demonstriert werden, dass durch deren Einführung in PEI/pDNA-Komplexe die *in vitro* Toxizität, evaluiert durch die metabolische Zellaktivität, signifikant gesenkt werden konnte.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lactoferrin, Clenbuterol und Insulin als zielgerichtete Liganden geeignet sind, in Verbindung mit verzweigtem Polyethylenimin intelligentere Systeme für den Gentransfer in die Lunge zu bilden. Diese zeichnen sich insbesondere durch ihre höhere Genexpression, durch selektive Unterscheidung zwischen Alveolar- und Bronchialepithel und durch geringere Toxizität aus.

7. Summary

Gene therapy represents a novel and attractive approach for the future treatment of inherited or acquired diseases, where conventional clinical procedures have poor efficacy. The lungs are an important target organ for gene therapeutic intervention with respect to many acute and chronic diseases like cystic fibrosis, asthma and cancer.

Therapeutic implementation of gene therapy requires the successful transfer of the applied nucleic acid into the target cell. Transgene expression results only when the DNA is transported into the cell nucleus. Presently, the greatest obstacle revolves around the engineering of appropriate gene delivery systems. Current gene delivery systems can be divided into viral and nonviral methods. Although viruses show much higher transfection efficiencies so far, their usage is limited due to safety concerns, such as immunogenicity and integration into the host genome. This has stimulated efforts into the development of nonviral systems, which represent a more safe alternative.

Among cationic polymers, polyethylenimine (PEI) is an effective nonviral gene transfer agent and has already been subject of many investigations. Nevertheless, it shows relatively low transfection efficiency compared to viral systems, in particular for *in vivo* applications. In addition, PEI exhibits a high cytotoxicity.

The modification of cationic polymers with targeting ligands seems to be a promising method to create more efficient systems, in particular with respect to both higher gene expression and selectivity. Numerous ligands have already been evaluated for nonviral receptor-mediated gene delivery, like transferrin, folic acid or EGF (see CHAPTER 1.5). The current work was aimed at the development and characterization of novel targeted gene transfer systems. Therefore, the glycoprotein lactoferrin, the chemical drug clenbuterol and the peptide hormone insulin were used to modify branched polyethylenimine.

With regard to the pulmonary *in vivo* application, all *in vitro* investigations were preferentially performed on lung cells, in particular alveolar epithelial and bronchial epithelial cells.

To evaluate the potential of a targeting ligand, initial *in vitro* receptor investigations were performed. For this purpose, cells were incubated with fluorescently labelled specific ligands or antibodies. It could be seen that lactoferrin receptors were predominantly expressed on bronchial epithelial cells, while in contrast, a high number of receptors for clenbuterol and insulin were found particularly on alveolar epithelial cells.

Introduction of the ligands to the gene transfer complexes was performed in different ways. Lactoferrin as well as clenbuterol were conjugated through biochemical reactions to the PEI backbone. As a result of this, they were already present during complexation process with plasmid DNA. In contrast to that, insulin was bound to the surface of already complexed PEI/pDNA particles due to electrostatic adsorption. For all complexes, numerous molar ratios between polymer and ligand were evaluated.

Biophysical characterization of the particles showed that the presence of high ratios of ligand to polymer resulted in complexes with larger hydrodynamic diameters, independently of the method used for introducing the targeting ligand. This increase of size could be due to different reasons. Whereas high ratios of ligands covalently attached to PEI (lactoferrin or clenbuterol) may interfere with the complexation to plasmid DNA, the increase of complex size for electrostatic adsorption on the particle surface may probably be due to greater coating thickness of the bound insulin.

These assumptions were further confirmed by surface charge measurements of the polyplexes. Adsorption of insulin to the surface of PEI/pDNA complexes led to a strong decrease of zeta potential to negative values, concomitant with particle aggregation. Conjugation of clenbuterol also resulted in reduction of zeta potential, but only with lower impact. In contrast, coupling of lactoferrin did not result in any relevant changes. At the same time, gel retardation assays showed that plasmid DNA was successfully complexed by all polymers, irrespective of the formulation.

In vitro transfection studies with lactoferrin-modified conjugates on bronchial epithelial cells showed a maximum of gene expression for a lactoferrin to PEI ratio of 1:20. Using a N/P ratio of 4, a significant increase in transfection efficiency compared to unmodified PEI/pDNA particles was observed. Specificity could be demonstrated in inhibition experiments with an excess of free lactoferrin. In contrast, modification with lactoferrin had no effect on alveolar epithelial cells. *In vivo* experiments were performed in mice via nasal instillation and aerosol application. However, with respect to gene expression, no benefit could be demonstrated by the modification of PEI/pDNA complexes with lactoferrin. Further studies will be necessary to address the questions, if the structure of lactoferrin stays intact *in vivo* and if the used lactoferrin species also plays an important role.

Different amounts of clenbuterol were introduced into transfection complexes by mixing PEI-*g*-Clen with unmodified PEI. Highest *in vitro* gene expression efficiency was obtained with a molar composition of 1.3 clenbuterol ligands per molecule of PEI, which showed a significant 14-fold

increase in luciferase expression compared to PEI/pDNA polyplexes at a N/P-ratio of 8. This could be demonstrated over a wide range of N/P-ratios from 6 to 20. After addition of an excess of free clenbuterol gene expression decreased, which indicated a receptor-mediated mechanism. Significant benefit of clenbuterol-modification could also be shown on two additional cell lines (murine alveolar epithelial, human cervix carcinoma), whereas no effect was seen on bronchial epithelial cells. These results correlated well with the density of β_2 -receptors on respective cell lines.

In vivo experiments in mice with clenbuterol as a targeting ligand were performed via three different application routes. Whereas no difference in gene expression within the lungs of mice was seen after nasal instillation, modification of PEI/pDNA particles with clenbuterol resulted in a 1.6-fold increase after aerosol delivery and a significant 2.7-fold increase following intravenous injection of complexes. Quantitative Real Time PCR measurements of lung tissue showed that clenbuterol-modified conjugates were able to transport a higher amount of plasmid-DNA into the target tissue. Calculating the ratio of gene expression versus the amount of quantified plasmid-DNA, aerosol delivery was identified to have the highest efficiency. Related to the deposited amount of plasmid-DNA, aerosol delivery showed a 110-fold increase of luciferase expression compared to intravenous application and a 350-fold increase compared to instillation. In addition, it could be demonstrated that aerosolisation procedure did not cause any damage to the complexed plasmid-DNA, whereas uncomplexed plasmid-DNA was exposed to the shearing forces of the aerosolisation chamber and thus destroyed.

Surface modification of PEI/pDNA complexes with insulin resulted in an increase of *in vitro* transfection efficiency on alveolar, but not on bronchial epithelial cells. A ratio of 5 μg insulin per μg of plasmid-DNA resulted in a maximum, showing a 16-fold higher luciferase expression compared to unmodified PEI/pDNA particles. Coincubation experiments with free insulin revealed that the increased expression was not caused by proliferative influences of the ligand. Furthermore, it could be demonstrated that this effect was polymer-specific. Addition of insulin in combination with linear PEI did not result in increased gene expression.

An overview of the impact of ligands used in this work on transfection efficiency with PEI/pDNA particles *in vitro* to lung epithelial cells as well as *in vivo* to the lung is given in TABLE 7.I.

Used Ligand	Transfection efficiency <i>in vitro</i>		Transfection efficiency <i>in vivo</i>
	alveolar epithelial cells	bronchial epithelial cells	
Lactoferrin	--	+	--
Clenbuterol	++	--	+
Insulin	++	--	n.d.

TABLE 7.1: Impact of ligands used in this work on transfection efficiency with PEI/pDNA particles *in vitro* and *in vivo*. Impact was rated with very good (++) , good (+) or nonexistent (--). n.d. = not determined.

Toxicity of gene transfer complexes also plays a major role with regard to their later clinical applications. PEI is known as a toxic gene transfer agent. High toxicity has been reported in several studies both *in vitro* and *in vivo*. It could be demonstrated for all three ligands, that after their introduction to PEI/pDNA complexes, *in vitro* toxicity, evaluated by measurements of the metabolic cell activity, was significantly reduced.

In summary, this work demonstrates that lactoferrin, clenbuterol and insulin represent suitable targeting ligands, which form with branched polyethylenimine efficient nanoparticulate systems for successful gene transfer to the lung. Additionally, these complexes have the desired attributes of higher gene expression, lower toxicity and targeted delivery to alveolar or bronchial epithelial cells.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

ADA	Adenosindesaminase
AFM	Atomic Force Microscopy
AS	Aminosäure
ASGP	Asialoglykoprotein
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
brPEI	verzweigtes Polyethylenimin
BSA	Bovines Serum-Albumin
ccc	covalently closed circular
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
cP	cPoise
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DOPE	1,2-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumchlorid
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Elektronenmikroskopie
FACS	Fluorescence Absorption Correlation Spectroscopy
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	US Food and Drug Administration
fg	Femtogramm
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

FSC	Forward Angle Light Scatter
FTSC	Fluorescein-5-Thiosemicarbazid
g	Gramm/Gewichtskraft
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LDL	Low Density Lipoprotein
Lf	Lactoferrin
LMO	LIM Domain Only
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molekülmasse, molekulare Masse
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
MWCO	Molecular Weight Cutoff
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Komplex
OTC	Ornithin Transcarbamylase
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDNA	Plasmidische Desoxyribonukleinsäure
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
pH	potentia Hydrogenii
PI	Polydispersitätsindex
PLL	Poly-L-Lysin
RAP	Rezeptor-assoziiertes Protein
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio) propionat
siRNA	small interfering RNA
SSC	Side Angle Light Scatter
Tf	Transferrin
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Verwendete Gentransfersysteme in klinischen Studie bis 2007	S. 11
Abbildung 1.2	Strukturformeln der kationischen Lipide DOTAP und DOTMA	S. 17
Abbildung 1.3	Häufig verwendete kationische Polymere für den nichtviralen Gentransfer	S. 18
Abbildung 1.4	Schematische Darstellung des nichtviralen Gentransfers	S. 23
Abbildung 1.5	Proteinfaltungsmuster von humanem Lactoferrin	S. 30
Abbildung 1.6	Strukturformel des β_2 -Adrenozeptoragonisten Clenbuterol	S. 31
Abbildung 1.7	Primärstruktur von Humaninsulin	S. 32
Abbildung 1.8	Möglichkeiten zur Einbringung von Liganden in PEI/pDNA-Komplexe	S. 35
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung der Plasmide pCMVLuc und pCpGLuc	S. 40
Abbildung 2.2	Aufreinigung von Lf-PEI-Konjugaten durch Kationenaustauschchromatographie	S. 42
Abbildung 2.3	Mechanismus der Luziferase-katalysierten Reaktionen	S. 53
Abbildung 2.4	Beispielhaftes Diagramm der Real Time PCR von pCpGLuc-haltigen DNA-Extrakten	S. 59
Abbildung 3.1	Reaktionsschema der Kopplung von humanem Lactoferrin an verzweigtes Polyethylenimin	S. 61
Abbildung 3.2	Messung der zellulären Aufnahme von Lactoferrin durch Alveolar- und Bronchialepithelzellen mittels Durchflusszytometrie	S. 63
Abbildung 3.3	Beobachtung der zellulären Aufnahme von Lactoferrin durch Alveolar- und Bronchialepithelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	S. 64
Abbildung 3.4	Transfektionseffizienz von Lf-PEI/pDNA-Komplexen verschiedener Zusammensetzung auf BEAS-2B- und A549-Zellen mit N/P-Quotienten von 4 oder 8	S. 67
Abbildung 3.5	Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen auf BEAS-2B- und A549-Zellen mit einem N/P-Verhältnis von 4 oder 8	S. 68

Abbildung 3.6	Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen auf BEAS-2B-Zellen mit einem N/P-Verhältnis von 4 in An- oder Abwesenheit von 100 µl/ml freiem Lactoferrin	S. 69
Abbildung 3.7	Metabolische Zellaktivität von A549-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI/pDNA-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8	S. 70
Abbildung 3.8	<i>In vivo</i> Aufnahmen nach der Applikation von PEI/pDNA bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen	S. 72
Abbildung 3.9	Luziferaseexpression des Lungengewebes von BALB/c-Mäusen nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Komplexen	S. 73
Abbildung 3.10	Quantitative Bestimmung von pCMVLuc innerhalb des Lungengewebes von BALB/c-Mäusen	S. 74
Abbildung 4.1	Syntheschema der Kopplung von Clenbuterol an Polyethylenimin	S. 79
Abbildung 4.2	Rezeptorbindung von Clenbuterol an Alveolarepithelzellen	S. 81
Abbildung 4.3	Vergleich des Komplexierungsverhaltens von PEI, PEI- <i>g</i> -Clen und PEI- <i>g</i> -Clen/PEI-Mischungen	S. 84
Abbildung 4.4	Transfektionseffizienz von Polyplexen aus PEI- <i>g</i> -Clen, PEI bzw. verschiedenen PEI- <i>g</i> -Clen/PEI-Mischungen mit pCMVLuc	S. 85
Abbildung 4.5	Vergleich der Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- und PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen <i>in vitro</i> bei verschiedenen N/P-Verhältnissen auf A549-Zellen	S. 86
Abbildung 4.6	Inhibitionsuntersuchungen mit PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen	S. 87
Abbildung 4.7	Metabolische Zellaktivität von A549-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI/pDNA-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8	S. 88
Abbildung 4.8	Gelelektrophorese von PEI/pDNA- und PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen mit einem N/P-Verhältnis von 10 vor bzw. nach Vernebelung	S. 90

Abbildung 4.9	Vergleich der Transfektionseffizienzen vor bzw. nach Vernebelung auf A549- und BEAS-2B-Zellen	S. 91
Abbildung 4.10	Quantitative <i>in vivo</i> Biolumineszenz-Auswertung im Bereich der Lunge nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen	S. 93
Abbildung 4.11	<i>In vivo</i> Biolumineszenz-Aufnahmen nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen	S. 94
Abbildung 4.12	Luziferaseexpression des homogenisierten Lungengewebes 24 h nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen	S. 95
Abbildung 4.13	Quantitative Bestimmung von pCpGLuc innerhalb des Lungengewebes von BALB/c Mäusen mittels Real Time PCR nach der Applikation von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA-Komplexen	S. 97
Abbildung 4.14	Beurteilung der Effektivität verschiedener Applikationsmethoden in die Lunge	S. 98
Abbildung 5.1	Rezeptorstatus für Insulin auf Alveolar- und Bronchialepithelzellen	S. 105
Abbildung 5.2	Elektronenmikroskopie von PEI/pDNA- (a, b) bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen	S. 108
Abbildung 5.3	Gelelektrophorese von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen	S. 109
Abbildung 5.4	Transfektionseffizienz von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Insulin	S. 110
Abbildung 5.5	Transfektionseffizienz von PEI/pDNA-Komplexen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freiem Insulin	S. 111
Abbildung 5.6	Einfluss des Polymers auf die Transfektionseffizienz	S. 113
Abbildung 5.7	Metabolische Zellaktivität von A549-Zellen nach der Behandlung mit PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS-Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 8	S. 114

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Aktuelle Gentransfervektoren	S. 12
Tabelle 1.2	Häufig verwendete Liganden für den Rezeptor-vermittelten Gentransfer kationischer Polymere	S. 28
Tabelle 2.1	Verwendete Reagenzien	S. 36
Tabelle 2.2	Verwendetes Verbrauchsmaterial	S. 37
Tabelle 2.3	Verwendete Geräte	S. 38
Tabelle 2.4	Verwendete Zelllinien	S. 38
Tabelle 2.5	Zusammensetzung verwendeter Lactoferrin-modifizierter Polyplexe	S. 48
Tabelle 2.6	Zusammensetzung verwendeter Clenbuterol-modifizierter Polyplexe	S. 49
Tabelle 2.7	Zusammensetzung verwendeter Insulin-modifizierter Polyplexe	S. 49
Tabelle 3.1	Kopplungseffizienzen hergestellter Konjugate aus Lactoferrin und PEI	S. 62
Tabelle 3.2	Physikalische Eigenschaften von PEI/pDNA- und Lf-PEI/pDNA- Komplexen	S. 65
Tabelle 3.3	Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. Lf-PEI 1:20/pDNA-Partikeln für die <i>in vivo</i> Applikation	S. 71
Tabelle 4.1	Physikalische Eigenschaften von PEI und PEI- <i>g</i> -Clen/PEI- Mischungen nach der Komplexierung mit pCMVLuc	S. 82
Tabelle 4.2	Physikalische Eigenschaften von Komplexen aus PEI bzw. PEI- <i>g</i> - Clen/PEI(1/2) mit pCMVLuc bei verschiedenen N/P-Verhältnissen	S. 83
Tabelle 4.3	Partikelgrößen von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/PEI(1/2)/pDNA- Komplexen vor und nach der Vernebelungsprozedur	S. 89
Tabelle 4.4	Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. PEI- <i>g</i> -Clen/ PEI(1/20)/pDNA-Partikeln für die <i>in vivo</i> Anwendung	S. 92
Tabelle 5.1	Größe und Zeta-Potential von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/INS- Komplexen	S. 106
Tabelle 5.2	Hydrodynamischer Durchmesser von PEI/pDNA- bzw. PEI/pDNA/ INS5-Partikeln mit unterschiedlichen Polyethylenimininen	S. 112
Tabelle 6.1	Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Liganden auf die Transfektionseffizienz von PEI/pDNA-Partikeln <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	S. 121

9. Referenzen

- Abdallah, B., Hassan, A., Benoist, C., Goula, D., Behr, J. P. and Demeneix, B. A. (1996). A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7(16): 1947-54.
- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. and McDowell, A. W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308(5954): 32-6.
- Akinc, A. and Langer, R. (2002). Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: implications for lysosomal trafficking. *Biotechnol Bioeng* 78(5): 503-8.
- Anderson, D. G., Lynn, D. M. and Langer, R. (2003). Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 42(27): 3153-8.
- Anderson, D. G., Akinc, A., Hossain, N. and Langer, R. (2005). Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Mol Ther* 11(3): 426-34.
- Ashida, K., Sasaki, H., Suzuki, Y. A. and Lonnerdal, B. (2004). Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals* 17(3): 311-5.
- Baker, E. N., Baker, H. M. and Kidd, R. D. (2002). Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol* 80(1): 27-34.
- Baker, H. M. and Baker, E. N. (2004). Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals* 17(3): 209-16.
- Bao, S., Thrall, B. D. and Miller, D. L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 23(6): 953-9.
- Barry, M. E., Pinto-Gonzalez, D., Orson, F. M., McKenzie, G. J., Petry, G. R. and Barry, M. A. (1999). Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther* 10(15): 2461-80.
- Bertschinger, M., Backliwal, G., Schertenleib, A., Jordan, M., Hacker, D. L. and Wurm, F. M. (2006). Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *J Control Release* 116(1): 96-104.

- Bielinska, A. U., Kukowska-Latallo, J. F. and Baker, J. R., Jr. (1997). The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta* 1353(2): 180-90.
- Birgens, H. S. (1985). Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia. *Scand J Haematol* 34(4): 326-31.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270(5235): 475-80.
- Blessing, T., Kursa, M., Holzhauser, R., Kircheis, R. and Wagner, E. (2001). Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 12(4): 529-37.
- Boletta, A., Benigni, A., Lutz, J., Remuzzi, G., Soria, M. R. and Monaco, L. (1997). Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 8(10): 1243-51.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7297-301.
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 80(1): 1-6.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C. and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 517-68.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M. and Wagner, E. (2000). Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 7(5): 401-7.
- Buschle, M., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Schaffner, G., Zauner, W., Birnstiel, M. L. and Wagner, E. (1995). Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther* 6(6): 753-61.

- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288(5466): 669-72.
- Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433(7026): 561.
- Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A. and Shimizu, N. (1994). A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett* 338(2): 167-9.
- Chiu, S. J., Ueno, N. T. and Lee, R. J. (2004). Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine. *J Control Release* 97(2): 357-69.
- Choi, Y. H., Liu, F., Park, J. S. and Kim, S. W. (1998). Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug Chem* 9(6): 708-18.
- Chollet, P., Favrot, M. C., Hurbin, A. and Coll, J. L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 4(1): 84-91.
- Clark, R. B., Knoll, B. J. and Barber, R. (1999). Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci* 20(7): 279-86.
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W. and Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84(4): 1341-79.
- Cole, A. M. and Waring, A. J. (2002). The role of defensins in lung biology and therapy. *Am J Respir Med* 1(4): 249-59.
- Colin, M., Moritz, S., Schneider, H., Capeau, J., Coutelle, C. and Brahim-Horn, M. C. (2000). Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo. *Gene Ther* 7(15): 1333-6.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 310-9.
- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H. and Birnstiel, M. L. (1990). Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4033-7.
- Cramb, G. (1986). Selective lysosomal uptake and accumulation of the beta-adrenergic antagonist propranolol in cultured and isolated cell systems. *Biochem Pharmacol* 35(8): 1365-72.

- Cristiano, R. J. and Roth, J. A. (1996). Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* 3(1): 4-10.
- Dames, P., Ortiz, A., Schillinger, U., Lesina, E., Plank, C., Rosenecker, J. and Rudolph, C. (2006). Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent. *J Mol Med*.
- Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S125-38.
- Deshpande, M. C. and Prausnitz, M. R. (2007). Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro. *J Control Release* 118(1): 126-35.
- Diebold, S. S., Lehrmann, H., Kurs, M., Wagner, E., Cotten, M. and Zenke, M. (1999). Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther* 10(5): 775-86.
- Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V. and Rojanasakul, Y. (2000). Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm Res* 17(5): 521-5.
- Dufes, C., Muller, J. M., Couet, W., Olivier, J. C., Uchegbu, I. F. and Scharzlein, A. G. (2004). Anticancer drug delivery with transferrin targeted polymeric chitosan vesicles. *Pharm Res* 21(1): 101-7.
- Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R. and Monaco, L. (1997). Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 25(15): 3095-101.
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R. and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update. *J Gene Med* 9(10): 833-842.
- Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M. and Midoux, P. (1995). Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size. *Bioconjug Chem* 6(4): 401-10.
- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M. and Remy, J. S. (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 15(9): 1332-9.
- Erbacher, P., Remy, J. S. and Behr, J. P. (1999). Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 6(1): 138-45.

- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7413-7.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
- Ferkol, T., Perales, J. C., Mularo, F. and Hanson, R. W. (1996). Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 101-5.
- Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J. P., Zacchello, F. and Scarpa, M. (1997). ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 4(10): 1100-6.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24(7): 1121-31.
- Fisher, K. J. and Wilson, J. M. (1997). The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer. *Biochem J* 321 (Pt 1): 49-58.
- Foster, B. J. and Kern, J. A. (1997). HER2-targeted gene transfer. *Hum Gene Ther* 8(6): 719-27.
- Frittitta, L., Vigneri, R., Stampfer, M. R. and Goldfine, I. D. (1995). Insulin receptor overexpression in 184B5 human mammary epithelial cells induces a ligand-dependent transformed phenotype. *J Cell Biochem* 57(4): 666-9.
- Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J. and Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 11(4): RA110-21.
- Garre, C., Bianchi-Scarra, G., Sirito, M., Musso, M. and Ravazzolo, R. (1992). Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J Cell Physiol* 153(3): 477-82.
- Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364(9452): 2181-7.
- Ghio, A. J., Carter, J. D., Dailey, L. A., Devlin, R. B. and Samet, J. M. (1999). Respiratory epithelial cells demonstrate lactoferrin receptors that increase after metal exposure. *Am J Physiol* 276(6 Pt 1): L933-40.

- Ginn, S. L., Curtin, J. A., Kramer, B., Smyth, C. M., Wong, M., Kakakios, A., McCowage, G. B., Watson, D., Alexander, S. I., Latham, M., *et al.* (2005). Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med J Aust* 182(9): 458-63.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (1999a). Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 45(3): 268-75.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (1999b). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5177-81.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (2001). Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22(5): 471-80.
- Gottschalk, S., Cristiano, R. J., Smith, L. C. and Woo, S. L. (1994). Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression. *Gene Ther* 1(3): 185-91.
- Grimm, D. and Kleinschmidt, J. A. (1999). Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther* 10(15): 2445-50.
- Grosse, S., Aron, Y., Thevenot, G., Francois, D., Monsigny, M. and Fajac, I. (2005). Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J Gene Med* 7(10): 1275-86.
- Guo, W. and Lee, R. L. (1999). Receptor-targeted gene delivery via folate-conjugated polyethylenimine. *AAPS PharmSci* 1(4): E19.
- Habib, N. (2006). Clinical Study with Hydrodynamic Gene Delivery into Hepatocytes in Humans. ASGT, 9th Annual Meeting, Executive Summaries: 36-37.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., *et al.* (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346(16): 1185-93.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., *et al.* (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348(3): 255-6.

- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644): 415-9.
- Haensler, J. and Szoka, F. C., Jr. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 4(5): 372-9.
- Harada, S., Smith, R. M. and Jarett, L. (1999). Mechanisms of nuclear translocation of insulin. *Cell Biochem Biophys* 31(3): 307-19.
- Hashida, M., Takemura, S., Nishikawa, M. and Takakura, Y. (1998). Targeted delivery of plasmid DNA complexed with galactosylated poly(L-lysine). *J Control Release* 53(1-3): 301-10.
- Hegener, O., Prenner, L., Runkel, F., Baader, S. L., Kappler, J. and Haberlein, H. (2004). Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 43(20): 6190-9.
- Hong, S., Leroueil, P. R., Janus, E. K., Peters, J. L., Kober, M. M., Islam, M. T., Orr, B. G., Baker, J. R., Jr. and Banaszak Holl, M. M. (2006). Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem* 17(3): 728-34.
- Huang, R. Q., Ke, W. L., Qu, Y. H., Zhu, J. H., Pei, Y. Y. and Jiang, C. (2007). Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain. *J Biomed Sci* 14(1): 121-8.
- Huang, R., Ke, W., Liu, Y., Jiang, C. and Pei, Y. (2008). The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain. *Biomaterials* 29(2): 238-46.
- Huckett, B., Ariatti, M. and Hawtrey, A. O. (1990). Evidence for targeted gene transfer by receptor-mediated endocytosis. Stable expression following insulin-directed entry of NEO into HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 40(2): 253-63.
- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S. W., Rudolph, C., Plank, C., Welsch, U. and Rosenecker, J. (2004). Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 6(8): 923-36.
- Huth, S., Hoffmann, F., von Gersdorff, K., Laner, A., Reinhardt, D., Rosenecker, J. and Rudolph, C. (2006). Interaction of polyamine gene vectors with RNA leads to the dissociation of plasmid DNA-carrier complexes. *J Gene Med* 8(12): 1416-24.

- Ishii, T., Okahata, Y. and Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514(1): 51-64.
- Johnson, M. (1998). The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3): S146-53.
- Kalli, K. R., Falowo, O. I., Bale, L. K., Zschunke, M. A., Roche, P. C. and Conover, C. A. (2002). Functional insulin receptors on human epithelial ovarian carcinoma cells: implications for IGF-II mitogenic signaling. *Endocrinology* 143(9): 3259-67.
- Kikuchi, A., Aoki, Y., Sugaya, S., Serikawa, T., Takakuwa, K., Tanaka, K., Suzuki, N. and Kikuchi, H. (1999). Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Hum Gene Ther* 10(6): 947-55.
- Kim, J. S., Kim, B. I., Maruyama, A., Akaike, T. and Kim, S. W. (1998). A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system. *J Control Release* 53(1-3): 175-82.
- Kim, T. G., Kang, S. Y., Kang, J. H., Cho, M. Y., Kim, J. I., Kim, S. H. and Kim, J. S. (2004). Gene transfer into human hepatoma cells by receptor-associated protein/polylysine conjugates. *Bioconjug Chem* 15(2): 326-32.
- Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M. and Wagner, E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4(5): 409-18.
- Kircheis, R., Wightman, L. and Wagner, E. (2001). Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 53(3): 341-58.
- Kopatz, I., Remy, J. S. and Behr, J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 6(7): 769-76.
- Koshkina, N. V., Agoulnik, I. Y., Melton, S. L., Densmore, C. L. and Knight, V. (2003). Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered DNA-polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and retention. *Mol Ther* 8(2): 249-54.
- Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Haberlein, H. and Kissel, T. (2003). Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med* 5(7): 588-99.
- Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, M. and Fukui, H. (2000). Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther* 7(13): 1132-6.

- Lachmann, R. (2004). Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol* 85(4): 177-90.
- Laitinen, M., Hartikainen, J., Hiltunen, M. O., Eranen, J., Kiviniemi, M., Narvanen, O., Makinen, K., Manninen, H., Syvanne, M., Martin, J. F., *et al.* (2000). Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 11(2): 263-70.
- Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjanen, K., Urtti, A. and Syrjanen, S. (1994). Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res* 11(8): 1127-31.
- Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H. and Lukacs, G. L. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 6(4): 482-97.
- Lee, H., Williams, S. K., Allison, S. D. and Anchordoquy, T. J. (2001). Analysis of self-assembled cationic lipid-DNA gene carrier complexes using flow field-flow fractionation and light scattering. *Anal Chem* 73(4): 837-43.
- Lee, K. M., Kim, I. S., Lee, Y. B., Shin, S. C., Lee, K. C. and Oh, I. J. (2005). Evaluation of transferrin-polyethylenimine conjugate for targeted gene delivery. *Arch Pharm Res* 28(6): 722-9.
- Lemkine, G. F., Goula, D., Becker, N., Paleari, L., Levi, G. and Demeneix, B. A. (1999). Optimisation of polyethylenimine-based gene delivery to mouse brain. *J Drug Target* 7(4): 305-12.
- Leventis, R. and Silvius, J. R. (1990). Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1023(1): 124-32.
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1993). Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur J Biochem* 213(3): 1205-11.
- Li, S., Tan, Y., Viroonchatapan, E., Pitt, B. R. and Huang, L. (2000). Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(3): L504-11.
- Liu, F., Song, Y. and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6(7): 1258-66.
- Liu, G., Li, D., Pasumarthy, M. K., Kowalczyk, T. H., Gedeon, C. R., Hyatt, S. L., Payne, J. M., Miller, T. J., Brunovskis, P., Fink, T. L., *et al.* (2003a). Nanoparticles of compacted DNA transfect postmitotic cells. *J Biol Chem* 278(35): 32578-86.

- Liu, W. S., Huang, Y. and Zhang, Z. R. (2003b). Synthesis and characterization of the tumor targeting mitoxantrone-insulin conjugate. *Arch Pharm Res* 26(11): 892-7.
- Löffler, G. (1998). Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. in Löffler, G. and Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Springer-Verlag. 6. Auflage.
- Lombry, C., Edwards, D. A., Preat, V. and Vanbever, R. (2004). Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(5): L1002-8.
- Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N. and Verkman, A. S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 275(3): 1625-9.
- Lynn, D. M. and Langer, R. (2000). Degradable Poly(beta-amino-esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J Am Chem Soc* 122(44): 10761-10768.
- Mao, H. Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., August, J. T. and Leong, K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 70(3): 399-421.
- Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286(5448): 2244-5.
- Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. and Hamm-Alvarez, S. (2005). Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* 12(24): 1734-51.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Midoux, P. and Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem* 10(3): 406-11.
- Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12349-54.
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314(5796): 126-9.
- Müller, R. H. (1996). *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Müller, R. H. and Schuhmann, R. (1996). *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

- Mumper, R. J., Wang, J., Claspell, J. M. and Rolland, A. P. (1995). Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 22: 178-179.
- Nichols, B. J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11(10): 406-12.
- Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R. and Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 5(10): 1425-33.
- Ogris, M., Carlisle, R. C., Bettinger, T. and Seymour, L. W. (2001a). Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J Biol Chem* 276(50): 47550-5.
- Ogris, M., Steinlein, P., Carotta, S., Brunner, S. and Wagner, E. (2001b). DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci* 3(3): E21.
- Okuda, T., Niidome, T. and Aoyagi, H. (2004). Cytosolic soluble proteins induce DNA release from DNA--gene carrier complexes. *J Control Release* 98(2): 325-32.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12(4): 401-9.
- Ou, X. H., Kuang, A. R., Peng, X. and Zhong, Y. G. (2003). Study on the possibility of insulin as a carrier of IUDR for hepatocellular carcinoma-targeted therapy. *World J Gastroenterol* 9(8): 1675-8.
- Ou, X. H., Kuang, A. R., Liang, Z. L., Peng, X. and Zhong, Y. G. (2004). Receptor binding characteristics and cytotoxicity of insulin-methotrexate. *World J Gastroenterol* 10(16): 2430-3.
- Parton, R. G. and Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4(11): 724-38.
- Penco, S., Scarfi, S., Giovine, M., Damonte, G., Millo, E., Villaggio, B., Passalacqua, M., Pozzolini, M., Garre, C. and Benatti, U. (2001). Identification of an import signal for, and the nuclear localization of, human lactoferrin. *Biotechnol Appl Biochem* 34(Pt 3): 151-9.
- Peng, Z. (2007). Current status of gene therapy in China. XVth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Oct 27-30 2006, Rotterdam, Niederlande.

- Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Mechtler, K. and Wagner, E. (1992). Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem* 3(6): 533-9.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C. and Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 269(17): 12918-24.
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Remy, J. S., Krotz, F., Anton, M., Lausier, J. and Rosenecker, J. (2003). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 384(5): 737-47.
- Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P. and Escande, D. (1998). Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273(13): 7507-11.
- Pouton, C. W., Lucas, P., Thomas, B. J., Uduehi, A. N., Milroy, D. A. and Moss, S. H. (1998). Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release* 53(1-3): 289-99.
- Prezelj, A., Strancar, J., Gubensek, F., Pecar, S. and Degand, G. (2003). Quantification of binding of some thiol-reactive clenbuterol analogues to bovine serum albumin by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* 315(2): 202-7.
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80(1-2): 148-58.
- Regnstrom, K., Ragnarsson, E. G., Koping-Hoggard, M., Torstensson, E., Nyblom, H. and Artursson, P. (2003). PEI - a potent, but not harmless, mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice. *Gene Ther* 10(18): 1575-83.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 377(Pt 1): 159-69.
- Rogan, M. P., Taggart, C. C., Greene, C. M., Murphy, P. G., O'Neill, S. J. and McElvaney, N. G. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 190(7): 1245-53.

- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., *et al.* (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323(9): 570-8.
- Rosenkranz, A. A., Yachmenev, S. V., Jans, D. A., Serebryakova, N. V., Murav'ev, V. I., Peters, R. and Sobolev, A. S. (1992). Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp Cell Res* 199(2): 323-9.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4): 673-82.
- Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Plank, C., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H. and Rosenecker, J. (2005a). Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol Ther* 12(3): 493-501.
- Rudolph, C., Ortiz, A., Schillinger, U., Jauernig, J., Plank, C. and Rosenecker, J. (2005b). Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application. *J Gene Med* 7(1): 59-66.
- Sadikot, R. T. and Blackwell, T. S. (2005). Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2(6): 537-40, 511-2.
- Sanders, N. N., De Smedt, S. C., Van Rompaey, E., Simoens, P., De Baets, F. and Demeester, J. (2000). Cystic fibrosis sputum: a barrier to the transport of nanospheres. *Am J Respir Crit Care Med* 162(5): 1905-11.
- Sato, T., Ishii, T. and Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22(15): 2075-80.
- Schatzlein, A. G. (2003). Targeting of Synthetic Gene Delivery Systems. *J Biomed Biotechnol* 2003(2): 149-158.
- Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M. and Brauchle, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294(5548): 1929-32.
- Shah, N., Zhang, S., Harada, S., Smith, R. M. and Jarett, L. (1995). Electron microscopic visualization of insulin translocation into the cytoplasm and nuclei of intact H35 hepatoma cells using covalently linked Nanogold-insulin. *Endocrinology* 136(7): 2825-35.

- Shapiro, D. L., Livingston, J. N., Maniscalco, W. M. and Finkelstein, J. N. (1986). Insulin receptors and insulin effects on type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 885(2): 216-20.
- Sobolev, A. S., Rosenkranz, A. A., Smirnova, O. A., Nikitin, V. A., Neugodova, G. L., Naroditsky, B. S., Shilov, I. N., Shatski, I. N. and Ernst, L. K. (1998). Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. *J Biol Chem* 273(14): 7928-33.
- Soler, A. P., Thompson, K. A., Smith, R. M. and Jarett, L. (1989). Immunological demonstration of the accumulation of insulin, but not insulin receptors, in nuclei of insulin-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17): 6640-4.
- Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J. J., Gilbert, R. A., Heller, R., Jaroszeski, M. J. and Malone, R. W. (2000). Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2(3): 178-87.
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr. and Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* 278(45): 44826-31.
- Spector, S. A., Olson, E. T., Gumbs, A. A., Friess, H., Buchler, M. W. and Seymour, N. E. (1999). Human insulin receptor and insulin signaling proteins in hepatic disease. *J Surg Res* 83(1): 32-5.
- Suh, J., Wirtz, D. and Hanes, J. (2003). Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3878-82.
- Suzuki, Y. A., Lopez, V. and Lonnerdal, B. (2005). Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 62(22): 2560-75.
- Talukder, M. J., Takeuchi, T. and Harada, E. (2003). Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves. *J Vet Med Sci* 65(9): 957-64.
- Tiera, M. J., Winnik, F. O. and Fernandes, J. C. (2006). Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives. *Curr Gene Ther* 6(1): 59-71.
- Torneke, K., Ingvast Larsson, C. and Appelgren, L. E. (1998). A comparison between clenbuterol, salbutamol and terbutaline in relation to receptor binding and in vitro relaxation of equine tracheal muscle. *J Vet Pharmacol Ther* 21(5): 388-92.
- Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A. and Quaglia, F. (2003). Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal* 31(1): 143-9.

- Valentine, R. C., Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 7(6): 2143-52.
- Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci* 59(11): 1833-50.
- Volpers, C. and Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S164-71.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. and Birnstiel, M. L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 7934-8.
- Wang, R., Epstein, J., Charoenvit, Y., Baraceros, F. M., Rahardjo, N., Gay, T., Banania, J. G., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Richie, T. L., et al. (2004). Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *J Immunol* 172(9): 5561-9.
- Ward, P. P., Uribe-Luna, S. and Conneely, O. M. (2002). Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 80(1): 95-102.
- Weeke-Klimp, A. H., Bartsch, M., Morselt, H. W., Van Veen-Hof, I., Meijer, D. K., Scherphof, G. L. and Kamps, J. A. (2007). Targeting of stabilized plasmid lipid particles to hepatocytes in vivo by means of coupled lactoferrin. *J Drug Target* 15(9): 585-94.
- Weiss, S. I., Sieverling, N., Niclasen, M., Maucksch, C., Thunemann, A. F., Mohwald, H., Reinhardt, D., Rosenecker, J. and Rudolph, C. (2006). Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethyleneglycol (PEG)-graft-copolymers as novel synthetic gene carriers. *Biomaterials* 27(10): 2302-12.
- Widdicombe, J. H., Azizi, F., Kang, T. and Pittet, J. F. (1996). Transient permeabilization of airway epithelium by mucosal water. *J Appl Physiol* 81(1): 491-9.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M. and Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 3(4): 362-72.
- Wiseman, J. W., Goddard, C. A., McLelland, D. and Colledge, W. H. (2003). A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10(19): 1654-62.

- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wolschek, M. F., Thallinger, C., Kursa, M., Rossler, V., Allen, M., Lichtenberger, C., Kircheis, R., Lucas, T., Willheim, M., Reinisch, W., *et al.* (2002). Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice. *Hepatology* 36(5): 1106-14.
- Wu, G. Y. and Wu, C. H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262(10): 4429-32.
- Wu, G. Y. and Wu, C. H. (1988). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* 263(29): 14621-4.
- Yang, J. P. and Huang, L. (1996). Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther* 3(6): 542-8.
- Yew, N. S., Zhao, H., Wu, I. H., Song, A., Tousignant, J. D., Przybylska, M. and Cheng, S. H. (2000). Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* 1(3): 255-62.
- Zanta, M. A., Boussif, O., Adib, A. and Behr, J. P. (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconj Chem* 8(6): 839-44.
- Zanta, M. A., Belguise-Valladier, P. and Behr, J. P. (1999). Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 91-6.
- Zeng, J., Wang, X. and Wang, S. (2007). Self-assembled ternary complexes of plasmid DNA, low molecular weight polyethylenimine and targeting peptide for nonviral gene delivery into neurons. *Biomaterials* 28(7): 1443-51.
- Zhang, Y., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2003). Marked enhancement in gene expression by targeting the human insulin receptor. *J Gene Med* 5(2): 157-63.
- Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D. and Li, Z. (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release* 100(2): 165-80.
- Zou, S. M., Erbacher, P., Remy, J. S. and Behr, J. P. (2000). Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med* 2(2): 128-34.
- Zugates, G. T., Little, S. R., Anderson, D. G. and Langer, R. (2005). Poly(beta-amino ester)s for DNA delivery. *Israel Journal of Chemistry* 45: 477-485.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Carsten Rudolph, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir somit die Möglichkeit gab, diese Arbeit zu erstellen. Sein ungebrochener Optimismus, das in mich gesetzte Vertrauen und die mir gewährten Freiheiten waren sehr motivierend für mich. Durch zahlreiche Anregungen und konstruktive Diskussionen entstand ein sehr produktives Arbeitsklima, in dem ich mich als Naturwissenschaftler entscheidend weiterentwickeln konnte. Des Weiteren wurde mir ermöglicht, verschiedenste Themengebiete kennen zu lernen und auf nationalen wie auch auf internationalen Kongressen teilzunehmen.

Im gleichen Maße möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rainer Müller, für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung dieser Arbeit von Berlin aus bedanken. Die Treffen in Berlin oder auf Kongressen waren stets von einer äußerst positiven und konstruktiven Atmosphäre geprägt.

Vielen herzlichen Dank auch an die gesamte Prüfungskommission, insbesondere Herrn PD Dr. Josef Rosenecker für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe in München danke ich für die wunderbare Zeit. Die vielen schönen Stunden, auch nach der Arbeit, werden mir besonders in Erinnerung bleiben. Vor allem möchte ich mich bei Senta Üzgün, Christof Maucksch, Alexander Bohla, Johannes Matschke und Johannes Geiger für zahlreiche fachliche Diskussionen und Anregungen, sowie die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung danken. Für die gute Einarbeitung in viele neue Methoden im ersten Abschnitt meiner Doktorandenzeit danke ich besonders Dr. Stefanie Huth, Dr. Sabine Weiss und Petra Dames.

Ich bedanke mich herzlich bei Senta Üzgün und Dr. Michael Kormann für die schnelle und gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.

Dr. Manish Aneja und Eugenia Lesina möchte ich für die sorgfältige Revision der englischsprachigen Manuskripte danken. Weiterhin gilt mein Dank Marta Illenyi und Rabea Imker für ihre Unterstützung bei den Tierversuchen und ihre ausgezeichnete Arbeit in der Zellkultur.

Mein Dank gilt auch Dr. Nathalie Sieverling für die Synthese der Clenbuterol-Konjugate sowie Dr. Monika Monika Golas und Herrn Dr. Björn Sander für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des BioFuture-Programmes (FKZ 0311898) gefördert.

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre immerwährende uneingeschränkte Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen danken.

Nicht zuletzt danke ich Sonja für ihre fortwährende Liebe und ihre Geduld, insbesondere in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Publikationen

Zeitschriftenartikel

Elfinger M, Maucksch C, Rudolph C

„Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells“ *Biomaterials*, 2007 Aug;28(23):3448-55

Elfinger M, Uezguen S, Rudolph C

„Cationic polymers for gene delivery - polymer structure, targeting ligands, and controlled devices“ *Current Nanoscience*, akzeptiert

Elfinger M, Uezguen S, Golas MM, Sander B, Maucksch C, Stark H, Rudolph C

„Surface adsorbed insulin improves gene delivery of PEI-pDNA nanoparticles to alveolar-like epithelial cells“ *in Vorbereitung*

Elfinger M, Uezguen S, Sieverling N, Aneja M, Maucksch C, Rudolph C

„Targeting of the β_2 -adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells *in vitro* and lungs *in vivo*“ *in Vorbereitung*

Maucksch C, Hoffmann F, Schleef M, Aneja M, **Elfinger M**, Hartl D, Rudolph C

„Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells“ *Biochemical Journal*, eingereicht

Maucksch C, Aneja M, Hennen E, Bohla A, Hoffmann F, **Elfinger M**, Rosenecker J, Rudolph C

„Cell type specific activity of the Streptomyces bacteriophage ϕ C31 integrase“ *Nucleic Acids Research*, eingereicht

Patente

Rosenecker J, Rudolph C, Plank C, **Elfinger M**

„Transport of nano- and macromolecular structures into cytoplasm and nucleus of cells“ Patent WO2006089668

Konferenzbeiträge

Elfinger M, Rudolph C

„Lactoferrin as a new targeting ligand for non-viral gene delivery to airway epithelial cells“ *33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Vienna, Austria, Jul 22-26, 2006

Elfinger M, Rudolph C

„Insulin enhances polyethylenimine-mediated gene transfer into alveolar epithelial cells“ *XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy*, Athens, Greece, Nov 9-12, 2006

Elfinger M, Maucksch C, Rudolph C

„Characterization of lactoferrin as a novel targeting ligand for non-viral gene delivery to airway epithelial cells“ *6. Präsentation BMBF BioFuture*, Berlin, Germany, Jan 29-30, 2007

Elfinger M, Uezguen S, Kummerloewe G, Luy B, Rudolph C

“In vitro gene transfer efficiency of urocanic acid-modified non-viral polymeric gene transfer agents” *34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Long Beach, USA, Jul 7-11, 2007

Elfinger M, Uezguen S, Sieverling N, Aneja M, Maucksch C, Rudolph C

„Targeting of the β_2 -adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells *in vitro* and lungs *in vivo*“ *11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*, Boston, USA, May 28 - Jun 1, 2008

Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten