

Freie Universität Berlin



Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

DISSERTATION

Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf  
der Grundlage optimierter kationischer Lipide

Detlef Groth  
Neue Scheune 5  
14548 Ferch

18. November 2000

Gutachter:

Prof. Dr. Burghardt Wittig  
Prof. Dr. Eberhard Riedel

Datum der Disputation: 23.10.2000

Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

Für Julia



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>13</b>
1.1 Ziele der Genapplikation . . . . .	13
1.2 Gentransfermethoden . . . . .	15
1.2.1 Physikalische und virale Verfahren . . . . .	15
1.2.2 Synthetische Gentransfersysteme . . . . .	17
1.3 Zielstellung der Arbeit . . . . .	31
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1 Materialien . . . . .	33
2.1.1 Chemikalien . . . . .	33
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen . . . . .	33
2.1.3 Geräte . . . . .	36
2.1.4 Biologische Materialien . . . . .	37
2.2 Methoden . . . . .	38
2.2.1 Herstellung der DNA . . . . .	38
2.2.2 Herstellung der Liposomen . . . . .	42
2.2.3 Herstellung der Lipoplexe . . . . .	44
2.2.4 Herstellung der Lipopolyplexe . . . . .	45
2.2.5 Biophysikalische Untersuchungen . . . . .	45
2.2.6 Elektronenmikroskopie . . . . .	48
2.2.7 Zellkultur . . . . .	49
2.2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen . . . . .	49
2.2.9 Bestimmung von Reportergenaktivität und Zellvitalität . . . . .	50
2.2.10 Bestimmung der Anzahl der transfizierten Zellen . . . . .	52
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1 Biophysik der Gentransfervesikel . . . . .	55
3.1.1 Eigenschaften der Liposomen . . . . .	55
3.1.2 Eigenschaften der Lipoplexe . . . . .	60
3.2 Transfektionsergebnisse . . . . .	65
3.2.1 Gentransfereigenschaften verschiedener kationischer Lipide . . . . .	65
3.2.2 Einfluß des Helferlipides auf die Gentransferrate . . . . .	69
3.2.3 Steigerung der Genexpression mit Hilfe kationischer Polymere . . . . .	73
3.2.4 Einfluß der Qualität der Plasmid-DNA . . . . .	78
3.2.5 Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses . . . . .	79

3.2.6	Einfluß des Komplexierungsmediums . . . . .	81
3.2.7	Einfluß der Komplexbildungszeit auf die Stabilität der Vesikel .	83
3.2.8	Einfluß der Serumkonzentration . . . . .	88
3.2.9	Einfluß von Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentra- tion . . . . .	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
4.1	Lipidchemie . . . . .	94
4.1.1	Kationisches Lipid . . . . .	94
4.1.2	Helferlipid . . . . .	97
4.2	Liposomen . . . . .	98
4.2.1	Bildung und Größe der Liposomen . . . . .	98
4.2.2	Elektrostatische Eigenschaften . . . . .	100
4.3	Lipoplexbildung . . . . .	103
4.4	Genstransfer . . . . .	107
4.4.1	Struktur des kationischen Lipides und Anteil des Helferlipides .	109
4.4.2	DNA-Qualität . . . . .	111
4.4.3	DNA-Komplexierung mit Polykationen . . . . .	111
4.4.4	Einfluß von Medium, Konzentration und Komplexbildungszeit .	114
4.4.5	Serumeinfluß . . . . .	117
4.4.6	Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentration . . . . .	119
4.5	Ausblick . . . . .	121
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>

## Abkürzungen

AAV	Adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
A-Chol	Alanylcholesterol
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrom</i> erworbenes Immundefizienz Syndrom
Amp	Ampicillin
ampr	Ampicillin-Resistenzgen
Axxxnm	Absorption bei xxx nm
$\beta$ -gal	$\beta$ -Galaktosidase
bp	Basenpaare
Chol	Cholesterol
CPRG	Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid
Da	Dalton
DAC-Chol	$3\beta$ [N-(N,N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DC	Dünnschichtchromatografie
DC-Chol	$3\beta$ [N-(N',N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DCQ-Chol	Ethylendiamin-[N-(Carboxycholesteryl) -N',N'-dimethyl-N'-(2-hydroxyethyl)-ammonium]-bromid
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-methylhydroxyethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(N5-carbamoyl-spermine)-propan
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermin
DOPE	1,2-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSGA	N-Amidino- $\beta$ -alanin-[2-(1,3-dioleoyloxy)propyl]amid-hydrochlorid
DOSPA	2,3-Diolyloxy-N-[2(spermincaboxamido)ethyl] -N,N-dimethyl-1-propanammoniumtrifluoroacetat
DOSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propan
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>good manufacturing practice</i> , gute Herstellungspraxis

HBSS	Hanks' balancierte Salzlösung
HC	4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	$\beta$ -Lactamase-Gen für das Enzym $\beta$ -Galaktosidase
L/D	Lipid zu DNA (Verhältnis)
LPD	Lipid-Protamin-DNA(-Komplex)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
luc	Luziferase-Gen
LUV	große unilamellare Vesikel
M	Mol
MCS	<i>multi cloning site</i> , multipler Klonierungsort
MEM	modifiziertes Eagle's Medium
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MHC	Membranhistokompatibilitätskomplex
MLV	multilamellare Vesikel
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MTP	96-Well-Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
O-Chol	L-Ornithylcholesterol
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
P-Chol	Cholesterylputrescin
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDMAEMA	Polydimethylaminoethylmethacrylat
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PS	Protaminsulfat
PTH	Parathormon
RES	Retikuloendotheliales System
REV	<i>reverse phase evaporation vesicle</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut(-Medium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp-Chol	Dicarbobenzoxyspermin-Carbamoyl-Cholesterol bzw. Lipid #67
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i> , kleine unilamellare Vesikel
Tab.	Tabelle



TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit
ÜNK	Übernachtskultur
v/v	Volumen/Volumen = Volumenverhältnis
w/w	<i>weight/weight</i> = Gewichtsverhältnis
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel der Herstellung stabiler liposomaler Gentransfervesikel für den *in vitro* und *in vivo* Gentransfer angefertigt. Diese Vesikel sollen auch für eine klinische Anwendung am Menschen geeignet sein. Anforderungen an solche Vesikel sind: hohe Transfereffizienz, Stabilität und Sicherheit für Patient und Anwender.

Die Arbeit beinhaltete Untersuchungen zu der Herstellung, den biophysikalischen Eigenschaften, der *in vitro* Gentransfereffizienz sowie zur Stabilität und Lagerfähigkeit der Gentransfervesikel.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Gentransfereffizienz von folgenden Faktoren beeinflußt wird: den Bestandteilen der Gentransfervesikel, der Herstellung der Vesikel, dem Ablauf der Transfektion, der Zellart und deren Kulturbedingungen.

Bezüglich der Vesikelbestandteile wurde festgestellt, daß sich für hohe *in vitro* Transfektionsraten Lipide mit einer Sperminkopfgruppe besonders eignen. Die aus solchen Lipiden hergestellten liposomalen Gentransfervesikel sind jedoch nur kurzzeitig aktiv und für eine längere Lagerung nicht geeignet.

Dagegen waren aus monokationischen Lipiden (DAC-Chol) hergestellte Liposomen für eine Formulierung von längerfristig stabilen Gentransferkomplexen geeignet. Die Effizienz und Lagerfähigkeit dieser Vesikel konnte durch den Zusatz von Protaminsulfat noch gesteigert werden. Eine weiter erhöhte Stabilität und die Möglichkeit eines Einfrierens der vorformulierten Gentransferkomplexe wurde durch den Zusatz von Saccharose ermöglicht. Saccharose senkte jedoch die Kurzzeitaktivität der Gentransfervesikel auf etwa ein Drittel der Aktivität von Gentransfervesikeln, welche ohne Zuckerzusatz hergestellt worden waren. Die verringerte Kurzzeitaktivität konnte durch eine erhöhte Dosierung der Gentransferkomplexe ausgeglichen werden.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Verwendung von Lipid/Protaminsulfat/DNA-Komplexen, welche in saccharosehaltiger Lösung hergestellt wurden, einen effektiven Gentransfer *in vitro* gewährleistet und ein vielversprechender Ansatz für *in vivo* Untersuchungen sowie mögliche klinische Anwendungen ist.

## Abstract

The aim of this work was the preparation of stable liposomal gene transfer vesicles for the *in vitro* and *in vivo* gene transfer. It should be possible to use these vesicles for clinical issues on humans. The requirements for such vesicles are: high efficiency, stability and security for the user and the patient.

The work contained investigations to the production, the biophysical characteristics, that *in vitro* gene transfer efficiency as well as for stability and shelf-life of the gene transfer vesicles.

Our results show that the gene transfer efficiency is influenced by the following factors: the constituents of the gene transfer vesicles, the production of the vesicles, the flow of the transfection, the cell type and their culture conditions.

Concerning the vesicle constituents it was stated that for high *in vitro* transfection rates lipids with a spermin headgroup are particularly suitable. Out such lipids manufactured liposomal gene transfer vesicles are however only briefly active and for a longer storage not suitably.

On the other hand from monocationic lipids (DAC-Chol) manufactured liposomes were suitable for the preparation of long term stable gene transfer complexes. The efficiency and shelf-life of these vesicles could be still increased by the addition of protaminsulfate. An even more increased stability and the possibility of freezing the preformulated gene transfer complexes was enabled by the addition of saccharose. Saccharose lowered however the short time activity of the gene transfer vesicles to a third of the activity of gene transfer vesicles, which had been manufactured without sugar addition. However the reduced short time activity could become balanced by an increased dosage of the gene transfer complexes.

The investigations show that the use of lipid/protaminsulfate/DNA complexes, which were manufactured in a saccharose containing solution ensures an effective gene transfer *in vitro* and a promising beginning for *in vivo* investigations as well as possible clinical applications is.



# Literaturverzeichnis

- [1] B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J.P. Behr und B.A. Demeneix. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther*, 7(16):1947–54, 1996.
- [2] T. Akao, T. Nakayama, K. Takeshia und A. Ito. Design of a new cationic amphiphile with efficient DNA-transfection ability. *Biochem Mol Biol Int*, 34(5):915–20, 1994.
- [3] W. Anderson. Human gene therapy. *Nature*, 392:25–30, 1998.
- [4] C.V. Arancibia-Carcamo, H.B. Oral, D.O. Haskard, D.F. Larkin und A.J.T. George. Lipoadenofection-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplant*, 65:62–67.1998.
- [5] S.M. Arcasoy, J.D. Latoche, M. Gondor, B.R. Pitt und J.M. Pilewski. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene. *Gene Ther*, 4:32–38, 1997.
- [6] G. Ascadi, S.S. Jiao, A. Jani, D. Duke, P. Williams, W. Chon und J.A. Wolff. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol*, 3:71–81, 1991.
- [7] A. Baker, M. Saltik, H. Lehrmann, I. Killisch, V. Mautner, G. Lamm, G. Christofori und M. Cotten. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid-DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther*, 4:773–782.1997.
- [8] R.P. Balasubramaniam, M.J. Bennett, A.M. Aberle, J.G. Malone, M.H. Nantz und R.W. Malone. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain. *Gene Ther*, 3:163–172, 1996.
- [9] A.D. Bangham und R.W. Horne. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, 8:660–668, 1964.
- [10] A.D. Bangham, M.M. Standish und J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 13:238–252, 1965.
- [11] L.G. Barron, K.B. Meyer und F.C. Jr Szoka. Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther*, 9(3):315–23, 1998.

- [12] F. Barthel, J.S. Remy, J.P. Loeffler und J.P. Behr. Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol*, 12(6):553–60, 1993.
- [13] M. Baru, J.H. Axelrod und I. Nur. Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene*, 161(2):143–50, 1995.
- [14] C. F. Bennett, M. Y. Chiang, H. Chan, J. E. Shoemaker und C. Mirabelli. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, 41(6):1023–33, 1992.
- [15] T. Blessing, J.S. Remy und J.P. Behr. Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* , 95(4):1427–31, 1998.
- [16] R.C. Boucher. *Harrisons Innere Medizin. (K.J.K. Schmailzl Hrsg.)*, Zystische Fibrose.S. 1404–07. Blackwell Wissenschafts Verlag, Berlin, Wien.1995.
- [17] T. Boulikas. Status of gene therapy in 1997: molecular mechanism, disease targets, and clinical applications. *Gene Ther Mol Biol*, 1:1–172, 1998.
- [18] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, und J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* , 92(16):7297–301, 1995.
- [19] B. Buchberger, E. Fernholz, H. vd Eltz und M. Hinzpeter. DOSPER Liposomal Transfection Reagent: A Reagent with unique Transfection Properties. *Biochem Inf*, 98:27–29, 1996.
- [20] N.M. Calvin und P.C. Hanawalt. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 170:2796–801, 1988.
- [21] MR Capecchi. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22:479–488, 1980.
- [22] N.J. Caplen, E. Kinrade, F. Sorgi, X. Gao, D. Gruenert, D. Geddes, C. Coutelle, L. Huang, E.W. Alton und R. Williamson. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther*, 2(9):603–13, 1995.
- [23] C. P. Chang, C. S. Lazar, B. J. Walsh, M. Komuro, J. F. Collawn, L. A. Kuhn, J. A. Tainer, I. S. Trowbridge, M. G. Farquhar, M. G. Rosenfeld und et Al. Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *J Biol Chem*, 268(26):19312–20, 1993.
- [24] J.Y. Cherng. *Pharmaceutical aspects of polymer-based gene delivery systems. Preparation, characterisation and stabilisation*. PhD thesis, Utrecht University, Faculty of Pharmacy, 1999.
- [25] J.Y. Cherng, P. Vandewetering, H. Talsma und D.J.A. Crommelin. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency. *Pharm Res*, 13:1038–1042, 1996.

- [26] M. Y. Chiang, H. Chan, M. A. Zounes, S. M. Freier, W. F. Lima und C. Bennett. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 266(27):18162–71, 1991.
- [27] M. Chillón, J.H. Lee, A. Fasbender und M.J. Welsh. Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies in vitro. *Gene Ther*, 5(7):995–1002, 1998.
- [28] C.T.Chung und R.H. Miller. Preparation and Storage of Competent Escherichia Coli Cells. *Meth Enzymol*, 218:621–7, 1993.
- [29] P.R. Cullis und B. de Kruijff. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, 559:399–420, 1979.
- [30] H.Z. Cummins und E.R. Pike. *Photon Correlations Spectroscopy and Light Beating Spectroscopy*. Plenum Press, New York. NATO Advanced Study Institutes. Series B, Vol 3.1974.
- [31] H.Z. Cummins und E.R. Pike. *Photon Correlations Spectroscopy and Velocimetry*. Plenum Press, New York. NATO Advanced Study Institutes. Series B, Vol 23.1977.
- [32] D.T. Curiel, S. Agarwal, E. Wagner und M. Cotten. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:8850–4, 1991.
- [33] A. Dathe. Circular dichroismus-Untersuchungen von Ncp7/DNA-Komplexen. Persönliche Mitteilung.
- [34] R. J. Debs, L. P. Freedman, S. Edmunds, K. L. Gaensler, N. Duzgunes und K. R. Yamamoto. Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. *J Biol Chem*, 265(18):10189–92, 1990.
- [35] J.E. Diederichs, D. Groth und R. Reszka. Plasma protein adsorption patterns onto cationic liposomes and lipoplexes - influence of cationic lipid head group. *J Lipos Res*, 8:52–53, 1998.
- [36] S.J. Eastman, C. Siegel, J. Tousignant, A.E. Smith, S.H. Cheng und R.K. Scheule. Biophysical characterisation of cationic lipid:DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1325:41–62, 1997.
- [37] R.F. Epanand, R. Kraayenhof, G.J. Sterk, Fong Sang H.W. Wong und R.M. Epanand. Fluorescent probes of membrane surface properties. *Biochim Biophys Acta*, 1284(2):191–5, 1996.
- [38] V. Escriou, C. Ciolina, Leclerc A. Helbling, P. Wils und D. Scherman. Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol*, 14(2):95–104, 1998.

- [39] V. Escriou, C. Ciolina, F. Lacroix, G. Byk, D. Scherman und P. Wils. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta.*, 1368(2):276–88, 1998.
- [40] H. Farhood, R. Bottega, R.M. Epanand und L. Huang. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta*, 1111(2):239–46, 1992.
- [41] H. Farhood, N. Serbina und L. Huang. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1235(2):289–95, 1995.
- [42] A. Fasbender, J. Marshall, T.O. Moninger, T. Grunst, S. Cheng und M.J. Welsh. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 4:716–25, 1997.
- [43] W.G. Feero, S. Li, J.D. Rosenblatt, N. Sirianni, J.E. Morgan, T.A. Partridge, L. Huang und E.P. Hoffman. Selection and use of ligands for receptor-mediated gene delivery to myogenic cells. *Gene Ther*, 4(7):664–74, 1997.
- [44] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin und P.L. Felgner. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*, 269(4):2550–61, 1994.
- [45] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner und G. Wu. Nomenclature for synthetic gene delivery systems [editorial]. *Hum Gene Ther*, 8(5):511–2, 1997.
- [46] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold und M. Danielsen. Lipofection: a highly efficient and lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:7413–7, 1987.
- [47] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo und R.W. Hanson. Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:101–105, 1996.
- [48] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zacchello und M. Scarpa. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 4(10):1100–6, 1997.
- [49] D. S. Friend, D. Papahadjopoulos und R. Debs. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1278(1):41–50, 1996.
- [50] J.D. Fritz, H. Herweijer, G. Zhang und J.A. Wolff. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid-DNA. *Hum Gene Ther*, 7:1395–1404, 1996.
- [51] X. Gao und L. Huang. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 179:280–5, 1991.



- [52] X. Gao und L. Huang. Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. *Nucleic Acids Res*, 21(12):2867–72, 1993.
- [53] X. Gao und L. Huang. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 2:710–722, 1995.
- [54] X. Gao und L. Huang. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 35(3):1027–36, 1996.
- [55] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman und A. Minsky. Mode of formation of and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 32:7143–7151, 1993.
- [56] S. Gottschalk, J.T. Sparrow, J. Hauer, M.P. Mims, F.E. Leland S.L. Woo und L.C. Smith. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, 3:448–457, 1996.
- [57] F.L. Graham und A.J. van der Eb. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52:456–467, 1973.
- [58] D. Groth, O. Keil, C. Lehmann, M. Schneider, M. Rudolph und R. Reszka. Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *Int J Pharm*, 162:143–157, 1998a.
- [59] D. Groth, O. Keil, M. Schneider und R. Reszka. Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal Biochem*, 258:141–143, 1998.
- [60] D. Groth und R. Reszka. Verfahren zur dualen Bestimmung von Zellvitalität und Effizienz nach Gentransfer in eukaryontische Zellen. *Deut Pat Applik*, S. 197–50–790, 1997.
- [61] D. Groth, R. Reszka und J.A.Schenk. PEG mediated transformation of E. coli is increased by room temperature incubation,. *Anal Bioch*, 240:302–304, 1996.
- [62] J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson und M. Almgren. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim Biophys Acta*, 1235:305–12, 1995.
- [63] D. Hanahan. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557–80, 1983.
- [64] R.P. Harbottle, R.G. Cooper, S.L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A.M. Knight, E. Wagner, A.D. Miller und C. Coutelle. An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery [see comments]. *Hum Gene Ther*, 9(7):1037–47, 1998.
- [65] S.L. Hart, E. Mayall, M. Stern, F.M. Munkonge, A. Frost, L. Huang, M. Vasilliou, R. Williamson, E.W. Alton und C. Coutelle. The introduction of two silent mutations into a CFTR cDNA construct allows improved detection of exogenous mRNA in gene transfer experiments. *Hum Mol Gen*, 4(9):1597–602, 1995.

- [66] R. P. Haugland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.*, Nucleic acid stains.S. 144–156. M.T.Z. Spence. Molecular Probes, Inc.1996.
- [67] P. Hawley-Nelson, V. Cicarrone, G. Gebeyehu und J. Jessee. LipofectAMINE reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus*, 15:73–79, 1993.
- [68] T. Heath. Covalent attachment of proteins to liposomes. *Meth Enzymol*, 149:111–9, 1987.
- [69] D. Hirsch-Lerner und Y. Barenholz. Probing DNA-cationic lipid interactions with the fluorophore trimethylammonium diphenyl-hexatriene (TMADPH). *Biochim Biophys Acta*, 1370(1):17–30, 1998.
- [70] R.M. Hoffmann, L.B. Margolis und L.D. Bergelson. Binding and Entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes. *FEBS Lett*, 93:229–232, 1978.
- [71] K. Hong, W. Zheng, A. Baker und D. Papahadjopoulos. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and polyethyleneglycol-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett*, 400(2):233–7, 1997.
- [72] L. Huang, A.L. Klivanov, A. Mori und X. Gao. Targeted delivery of drugs and DNA with liposomes. *J Lipos Res*, 3:505–515, 1993.
- [73] S.W. Hui, M. Langner, Y.L. Zhao, P. Ross, E. Hurley und K. Chan. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J*, 71(2):590–9, 1996.
- [74] S.E. Jones, J.D. McHugh, C. Jomary, A. Shallal und M.J. Neal. Assessment of liposomal transfection of ocular tissues in vivo. *Gene Ther*, 1 Suppl 1:S61, 1994.
- [75] Y. Kaneda, K. Iwai und T. Uchida. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem*, 264:12126–9, 1989.
- [76] Y. Kaneda, K. Kato, M. Nakanishi und T. Uchida. Introduction of plasmid DNA and nuclear protein into cells by using erythrocyte ghosts, liposomes and Sendai virus. *Meth Enzymol*, 221:317–27, 1993.
- [77] C. Kawaura, A. Noguchi, T. Furuno und M. Nakanashi. Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *FEBS Lett*, 421:69–72, 1998.
- [78] A. Kichler, W. Zauner, M. Ogris und E. Wagner. Influence of the DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA particles. *Gene Ther*, 5:855–860, 1998.
- [79] R. Kircheis, A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger und E. Wagner. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*, 4:409–18, 1997.

- [80] L. Ko, A. Koestner und W. Wechsler. Characterisation of cell cycle and biological parameters of transplantation glioma cell clones. *Acta Neuropathol*, 51:107–111, 1980.
- [81] R. Kraayenhof, G.J. Sterk und H.W. Sang. Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. *Biochemistry*, 32(38):10057–66, 1993.
- [82] E. Krauss, D. Groth, S. Armeanu, R. Curth, J. Pelisek, O. Keil, B. Höfling, R. Reszka und S. Nikol. Optimization of non-viral gene transfer into vascular smooth muscle cells in vitro. *in preparation*, 1999.
- [83] J.F. Kukowska-Latallo, A.U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D.A. Tomalia, und J.R. Baker. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4897–4902, 1996.
- [84] F. Labat-Moleur, A.M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla und J.P. Behr. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther*, 3(11):1010–7, 1996.
- [85] R.A. Lake und M.J. Owen. *Gene Transfer and Expression Protocols.*, Transfection of the Chloramphenicol-Acetyltransferase Gene into Eukaryotic cells using Diethyl-Aminoethyl (DEAE)-Dextran., Ed. Murray EJ. The Humana Press Inc. Clifton, NY, USA, 1991.
- [86] I. Lang, M. Scholz und R. Petrs. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol*, 102:1183–1190, 1986.
- [87] D.D. Lasic. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1993.
- [88] D.D. Lasic. *Liposomes: from physics to applications.*, Chemical stability of lipids: Oxidation. S. 35–37. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1993.
- [89] R.J. Lee und L. Huang. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem*, 271(14):8481–7, 1996.
- [90] R.J. Lee und L. Huang. Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carr System*, 14(2):173–206, 1997.
- [91] C. Lehmann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DOCSPER/DNA-Lipoplexen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Persönliche Mitteilung.
- [92] C. Lehmann. Untersuchungen zum Einfluß des Helferlipides auf die Liposomenformulierung mittels der Elektronenmikroskopie. Persönliche Mitteilung.

- [93] R. Leventis und J.R. Silvius. Interactions of mammalian cells with lipids dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1023:124–132, 1990.
- [94] S. Li und L. Huang. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*, 4(9):891–900, 1997.
- [95] S. Li, M.A. Rizzo, S. Bhattacharya und L. Huang. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther*, 5(7):930–7, 1998.
- [96] W.W. Liang, X. Shi, D. Deshpande, C.J. Malanga und Y. Rojanasakul. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1279:227–234, 1996.
- [97] J.P. Loeffler und J.P. Behr. Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA. *Meth Enzymol*, 217:599–618, 1993.
- [98] C.B. Lozzio und B.B. Lozzio. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*, 50:535–8, 1973.
- [99] R.H. Lyons, B.Q. Ferguson und M. Rosenberg. Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol Cell Biol*, 7:2451–2456, 1987.
- [100] R.W. Malone, P.L. Felgner und I. Verma. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:6077–6081, 1989.
- [101] R.J. Mannino und S. Gould-Fogerite. Liposome mediated gene transfer. *Bio-Techniques*, 6:682–690, 1988.
- [102] M. Marquet, N.A. Horn und J.A. Meek. Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. *Pharm*, 4:28–46, 1996.
- [103] F. Martin und T. Boulikas. The challenge of liposomes in gene therapy. *Gene Ther Mol Biol*, 1:173–214, 1998.
- [104] H. Matsui, L.G. Johnson, S.H. Randell und R.C. Boucher. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 272(2):1117–26, 1997.
- [105] L.D. Mayer und L.C.L. Tai ... *Cancer Res*, 49:5922–5930, 1989.
- [106] R.A. McMasters, R.L. Saylor, K.E. Jones, M.E. Hendrix, M.P. Moyer und R.R. Drake. Lack of Bystander Killing in Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase-Transduced Colon Cell Lines Due to Deficient Connexin43 Gap Junction Formation. *Hum Gene Ther*, 9:2253–61, 1998.
- [107] C. Meunier-Durmort, R. Picart, T. Ragot, M. Perricaudet, B. Hainque und C. Forest. Mechanism of adenovirus improvement of cationic liposome-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1330(1):8–16, 1997.

- [108] O. Meyer, D. Kirpotin, K. Hong, B. Sternberg, J.W. Park, M.C. Woodle und D. Papahadjopoulos. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem*, 273(25):15621–7, 1998.
- [109] K.A. Mislick und J.D. Baldeschwieder. Evidence for a role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:12349–12354, 1996.
- [110] W.A. Mohler, C.A. Charlon und H.M. Blau. Spectrophotometric quantitation of tissue culture cell number in any medium. *BioTechniques*, 21:260–266, 1996.
- [111] R.H. Mueller. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Rezepturen Für Pufferlösungen*. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.1996.
- [112] R.R.C. New. Liposomes a Practical Approach. Introduction. *Practical Approach Series*, S. 1–31, 1990.
- [113] C. Nicolau, A. Le-Pape, P. Soriano, F. Fargette und M. F. Juhel. In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(4):1068–1072, 1983.
- [114] B.S. Oler und E. Schenborn. Transfast Transfection Reagent Update. *Promega Notes*, 71:18–21, 1999.
- [115] A. Vaheri J.S. Pagano. *Virology*, 27:434–436, 1965.
- [116] R. Pal, W.A. Petri Jr, V. Ben-Yashar, R.R. Wagner und Y. Barenholz. Characterization of the fluorophore 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin: a probe for the head-group region of lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, 24:573–81, 1985.
- [117] B. Pitard, O. Aguerre, M. Airiau, A.M. Lachages, T. Boukhnikachvili, G. Byk, C. Dubertret, C. Herviou, D. Scherman, J.F. Mayaux und J. Crouzet. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:14412–7, 1997.
- [118] H. Potter. Application of Electroporation in Recombinant DNA Technology. *Meth Enzymol*, 217:561–583, 1993.
- [119] C. Qiu, Young M.B. De, A. Finn und D.A. Dichek. Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the fiber receptor and alpha(v)-integrins. *Hum Gene Ther*, 9(4):507–20, 1998.
- [120] J.O. Raedler, I. Koltover, T. Salditt und Safinya. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275:810–814, 1997.
- [121] J.S. Remy, A. Kichler, V. Mordvinov, F. Schuber und J.P. Behr. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* , 92(5):1744–8, 1995.

- [122] J.S. Remy, C. Sirlin, P. Vierling und J.P. Behr. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconj Chem*, 5(6):647–54, 1994.
- [123] R. Reszka, J. Zhu, F. Weber und W. Walther. Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J Liposom Res*, 5:149–167, 1995.
- [124] A.P. Rolland. From genes to gene medicines: Recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carr System*, 15:143–198, 1998.
- [125] J.K. Rose, L. Buonocore und M.A. Whitt. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*, 4:520–525, 1991.
- [126] Y. Saeki, N. Matsumoto, Y. Nakano, M. Mori, K. Awai und Y. Kaneda. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther*, 8(17):2133–41, 1997.
- [127] W.H. Gunzburg B. Salmons. *Genstransfer in Säugetierzellen*. Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg., 1997.
- [128] A. Schadendorf. Humane Melanomzelle Mewo. Persönliche Mitteilung.
- [129] M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P.H. Hofschneider. Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse cells by thymidin kinase gene. *Science*, 215:166–168, 1982.
- [130] K.P. Schifferli und V. Ciccarone. Optimization of cationic lipid reagent-mediated transfection for suspension cell lines. *Focus*, 18:45–47, 1996.
- [131] M. Schneider, R. Reszka, D. Groth und O. Keil. Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Genstransfer. *Deut Pat Applik 196.31.189.6.*, 1996.
- [132] D. Schutt, Schuhmann und R.H. Muller. Genauer durch Mehrwinkelanalyse. Teilchengrößenmessung im Submikronbereich. *Chemie-Technik*, S. 18–20, 1996.
- [133] B. Schwartz, C. Benoist, B. Abdallah, D. Scherman, J.P. Behr und B.A. Demeneix. Lipospermine-based gene transfer into the newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio. *Hum Gene Ther*, 6(12):1515–24, 1995.
- [134] M. Sioud, J.B. Natvig und O. Forre. Preformed ribozyme destroys tumour necrosis factor mRNA in human cells. *J Mol Biol*, 223:831–5, 1992.
- [135] S.J. Slater, M.B. Kelly, F.J. Taddeo, C. Ho, E. Rubin und C.D. Stubbs. The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J Biol Chem*, 269:4866–71, 1994.
- [136] J.G. Smith, R.L. Walzem und J.B. German. Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1154:327–40, 1993.

- [137] J.G. Smith, T. Wedeking, J.H. Vernachio, H. Way und R.W. Niven. Characterization and in vivo testing of a heterogeneous cationic lipid-DNA formulation. *Pharm Res*, 15(9):1356–63, 1998.
- [138] F.L. Sorgi, S. Bhattacharya und L. Huang. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 4(9):961–8, 1997.
- [139] H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*, 51:1409–16, 1973.
- [140] J.C. Stavridis, G. Deliconstantinos, M.C. Psallidopoulos, N.A. Armenakas, D.J. Hadjiminias und J. Hadjiminias. Construction of transferrin-coated liposomes for in vivo transport of exogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. *Exp Cell Res*, 164:568–72, 1986.
- [141] T. Stegmann und J.Y. Legendre. Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochim Biophys Acta*, 1325(1):71–9, 1997.
- [142] B. Sternberg, F.L. Sorgi und L. Huang. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett*, 356:361–366, 1994.
- [143] W.P. Swaney, F.L. Sorgi, A.B. Bahnson und J.A. Barranger. The effect of cationic liposome pretreatment and centrifugation on retrovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 4(12):1379–86, 1997.
- [144] K. Takeuchi, M. Ishihara, C. Kawaura, M. Noji, T. Furuno und M. Nakanishi. Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection. *FEBS Lett*, 397(2-3):207–9, 1996.
- [145] M.X. Tang, C.T. Redemann und F.C. Szoka FC Jr. In vitro gene delivery by degrades polyamidoamine dendrimers. *Bioconj Chem*, 7:703–714, 1996.
- [146] N.R. Taylor, B.E. Kaplan, P. Swiderski, H. Li und J. Rossi. Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo. *Nucleic Acids Res*, 20:4559–65, 1992.
- [147] C.B. Thomas, R. Osieka und K.W. Kohn. DNA cross-linking by in vivo treatment with 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea of sensitive and resistant human colon carcinoma xenografts in nude mice. *Cancer Res*, 38:2448–54, 1978.
- [148] J. Treat, A. Greenspan, D. Forst, J.A. Sanchez, V.J. Ferrans, L.A. Potkul, P.V. Woolley und A. Rahman. Antitumor activity of liposome encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer: phase II study. *J Nat Cancer Inst*, 82:1706–1710, 1990.
- [149] A. Vainstain, A. Razin, A. Graessmann und A. Loyter. Fusogenic reconstituted Sendai virus envelopes as a vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells. *Meth Enzymol*, 101:492–512, 1983.

- [150] I.M. Verma und N. Somia. Gene Therapy - Promises, Problems and Prospects. *Nature*, 389:239–42, 1997.
- [151] R.G. Vile, J.A. Nelson, S. Castleden, H. Chong und I.R. Hart. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res*, 54(23):6228–34, 1994.
- [152] L. Vitiello, A. Chonn, J.D. Wasserman, C. Duff und R.G. Worton. Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells. *Gene Ther*, 3(5):396–404, 1996.
- [153] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten und M.L. Birnstiel. 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 USA*, 89(17):7934–8, 1992.
- [154] J. Wagner, H. Madry und R. Reszka. In Vivo Gene Transfer: Focus on the Kidney. *Nephrol Dial Transplant*, S. 1801–1807, 1995.
- [155] R. Wattiaux, M. Jadot, M.T. Warnier-Pirotte und S. Wattiaux de Coninck. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett*, 417:99–202, 1997.
- [156] M. Westphal, M. Haesel, R. Kunzmann und F. Hoelzel. Karyotype analysis of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir*, 126:17–26, 1993.
- [157] C.J. Wheeler, L. Sukhu, G. Yang, Y. Tsai, C. Bustamente, P. Felgner, J. Norman, und M. Manthorpe. Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytofectin complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1280(1):1–11, 1996.
- [158] R. Widmaier, G.P. Wildner, G. Papsdorf und I. Graffi. A new infinite cell line, MaTu, of human mammary tumor-cells. *Arch Geschwulstforsch*, 44:1–10, 1974.
- [159] S. Wirsel. *Gentechnische Methoden*, Ausbeutebestimmung und analytische Überprüfung der DNA, S. 118–119. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. Bertam und H. G. Gassen (Hrsg), 1991.
- [160] N. Wivel. Human gene transfer trials. *Adv Drug Del Rev*, 17:211–212, 1995.
- [161] J.A. Wolff, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Ascadi, A. Jani und P.L. Felgner. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247:1465–1468, 1990.
- [162] Y. Xu und F.C. Szoka Jr. Mechanism of DNA release form cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 35:5616–5623.1996.
- [163] J.P. Yang und L. Huang. Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. *Gene Ther*, 5(3):380–7, 1998.



- [164] K. Yang, G.L. Clifton und R.L. Hayes. Gene therapy for central nervous system injury: the use of cationic liposomes: an invited review. *J Neurotrauma*, 14(5):281–97, 1997.
- [165] N.S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell und D. McCabe. In vivo and in vitro gene transfer of mammalian somatic cells by particle bombardement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9568–9572, 1990.
- [166] Y. Yoshikawa, N. Emi, T. Kanbe, K. Yoshikawa und H. Saito. Folding and aggregation of DNA chains induced by complexation with lipospermine formation of a nucleosome-like structure and network assembly. *FEBS Lett*, 397:207–209.1996.
- [167] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K. Poellinger und M.J. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 270:18997–19007, 1995.
- [168] O. Zelphati und F.C. Szoka Jr. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res*, 13:367–1372, 1997.
- [169] O. Zelphati, C. Nguyen, M. Ferrari, J. Felgner, Y. Tsai und P.L. Felgner. Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther*, 5(9):1272–82, 1998.
- [170] X. Zhou und L. Huang. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.*, 1189(2):195–203, 1994.
- [171] J. Zhu, L. Zhang und R. Reszka. Zinc finger motif nucleocapsid protein-facilitated gene transfer with lipoplexes and polyplexes. *submitted*,1999.
- [172] N.J. Zuidam und Y. Barenholz. Electrostatic parameters of cationic liposomes commonly used for gene delivery as determined by 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin [published erratum appears in *Biochem Biophys Acta* 1998 Jun 24;1372(1):151]. *Biochim Biophys Acta*, 1329(2):211–22, 1997.

## Liste der in Zusammenhang mit dieser Arbeit erschienenen Publikationen, Patente und der publizierten Posterabstracts

### *Publikationen*

1. Groth, D., Reszka, R. and Schenk, J.A.,(1996). PEG mediated transformation of *E. coli* is increased by room temperature incubation, *Anal Bioch* 240: 302-304.
2. Groth, D., Keil, O., Lehmann, C., Schneider, M., Rudolph, M., Reszka, R. (1998). Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *Int J Pharm* 162: 143-157.
3. Groth, D., Lehmann, C., Keil, O., Schneider, M., Reszka, R.. (1998). Preparation and characterisation of cationic liposomes for gene transfer. In J.E. Diederichs, R.H. Müller (Eds), *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, medpharm GmbH Scientific Publishers and CRC Press, Stuttgart, pp 132-139.
4. Groth, D., Keil, O., Schneider, M., Reszka, R. (1998). Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal Bioch* 258: 141-143.
5. Lehmann, C., Groth, D., Keil, O., Schneider, M., Rudolph, M. and Reszka, R., Characterization of gene transfer vesicle by electron microscopy in Diederichs, J.E., Müller, R.H. (Eds), *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, medpharm GmbH Scientific Publishers and CRC Press, Stuttgart, 1998, pp 140-145.

### *Patente*

1. Schneider, M., Reszka, R., Groth, D., Keil, O. (1996). Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Gentransfer; *Deut Pat Applik* 196 31 189.6.
2. Groth, D., Reszka, R., (1997). Verfahren zur dualen Bestimmung von Zellvitalität und Effizienz nach Gentransfer in eukaryontische Zellen (eingereicht am 7.11.1997) *Patent Nr.* 197 50 790.

*Posterabstracts (nur Erstautorschaften aufgeführt)*

1. Groth, D., Keil, O., Lehmann, C., Zhu, J., Zang, L., Schneider, M. and Reszka, R. (1997). Cationic lipid-mediated gene transfer of cytokine and marker genes into rat and human glioblastoma cells. *J Mol Med* 75: B30.
2. Groth, D., Lehmann, K., Keil, O., Schneider, M. and Reszka, R. (1998). Influence of ionic strength on lipoplex formation. *J Mol Med* 76: B55.
3. Groth, D., Zhang, L., Lehmann, C., Zhu, J., Diederichs, J., E., Reszka, R., (1998). DAC-Chol liposomes as efficient vehicles for gene transfer in vitro and in vivo. *J Lipos Res* 8: 60-61.



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Burghardt Wittig für die Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau. Dr. Regina Reszka möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit am MDC-Berlin-Buch, die wissenschaftlichen Anregungen und die Hilfestellung bei der Arbeit an der Promotion herzlichst danken.

Prof. Manfred Schneider und Dr. Oliver Keil vom Fachbereich Chemie der Universität Wuppertal möchte für die wirklich interessante und fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit bei der Herstellung und Untersuchung der verschiedenen kationischen Lipide auf diesem Wege von ganzem Herzen danken.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe Drug Targeting möchte ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die stets kooperative Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Jana Richter für die fachliche Unterstützung bei der Liposomenformulierung, Frau Bärbel Pohl für die Hilfe bei der Kultur und der Transfektion der Zellen. Frau Ingrid Berger danke ich für die analytische Betreuung bei der Herstellung der Liposomen und der Lipidanalyse, Frau Dr. Julia Diederichs für die hilfreichen Anmerkungen bei der Anfertigung der Dissertation und für die Ermutigungen und Hinweise bei den biophysikalischen Untersuchungen. Stefanie Seemann danke ich für die interessanten Diskussionen und Hinweise zu Fragen der DNA-Aufreinigung und Klonierung und Frau Antje Berndt sowie Herrn Oliver Braun für die tierexperimentellen Hinweise und Kommentare.

Ausdrücklich danken möchte ich auch Frau Sinaida Rink für die abschließende Korrektur der Arbeit und Herrn Felix Engel für die Hilfe bei der Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen. Herrn Dr. Reiner Zeisig danke ich für die Hilfestellungen bei der Durchführung der PCS-Messungen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Frau, Julia Stoy, deren große Geduld und Hilfe eine unerläßliche Voraussetzung für die Erstellung der Arbeit gewesen sind.

## LEBENS LAUF

### Angaben zur Person

Name	Detlef Groth
geb.	26. 06. 1965 in Berlin-Weissensee
wohnhaft in	Neue Scheune 5, 14548 Ferch
Beruf	Dipl. Biochemiker und Chemielaborant
Familienstand	ledig
Lebenspartnerin	seit 1992 Dr. Julia Stoy, tätig als Ärztin
Kinder	Paul Stoy, geb. 24.01.1997

### Schulbildung

1972-1982	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Berlin-Weißensee
1982	Abschluß der 10. Klasse mit dem Prädikat „mit Auszeichnung“

### Beruf

1982-1985	Absolvierung der Berufsausbildung zum Chemielaboranten mit Abitur an der Berufsschule des VEB-Berlin-Chemie in Berlin-Treptow
Reifeprüfung	abgelegt 1985 mit dem Prädikat „sehr gut“
Facharbeiterprüfg.	abgelegt 1985 mit dem Prädikat „gut“
1985-1989	Wehrdienst bei der NVA

### Studium

1989-1994	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin, Fachbereich Biochemie
1992-1993	Tätigkeit als Tutor im Fachbereich Ökologie der Humboldt-Universität zu Berlin
1993-1994	Anfertigung und Verteidigung der Diplomarbeit zum Thema : „Einfluß des Nef-Proteins von HIV auf die Stimulierung des Haupt-HCMV-Promotors durch Cytokine“ am Institut für Medizinische Virologie der Charite, Berlin
1994	Diplomprüfung mit dem Prädikat „gut“ bestanden

## **Beruf**

- 1.1.95-30.6.95 Tätigkeit als Gastwissenschaftler in der Arbeitsgruppe Drug Targeting am Max-Delbrück-Centrum (MDC) in Berlin-Buch
- 1.7.95-30.6.98 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Drug Targeting am MDC im Rahmen des DFG geförderten Sonderforschungsbereiches 507: „Die Bedeutung nichtneuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen“
- 1.7.98-30.10.99 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Drug Targeting“ am MDC im Rahmen des von der Fa.Schering geförderten Forschungsvorhabens „Liposomale in vivo Gentherapie des malignen Glioblastoms mit dem HSVtk-Gen-Ganciclovir System“
- 1.11.99 -15.8.2000 Weiterbildung am Institut für Managementberatung GmbH Potsdam zum IT-Consultant durch die Firma Future Information Systems GmbH
- seit 16.8.2000 Tätigkeit als Programmierer bei der Firma Mediacs AG in Potsdam-Babelsberg