

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden die Resultate der Untersuchungen zur Größe und Struktur sowie zu den biophysikalischen Eigenschaften der Liposomen bzw. der aus ihnen hergestellten Gentransfervesikel vorgestellt. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Transfektionsversuche präsentiert und ihre Beziehungen zur Biophysik der Transfervesikel und zu den Versuchsbedingungen dargelegt.

### 3.1 Biophysik der Gentransfervesikel

#### 3.1.1 Eigenschaften der Liposomen

##### 3.1.1.1 Größe und Struktur der kationischen Liposomen

Nach der Lyophilisierung der in Chloroform gelösten Lipide und der Zugabe von deionisiertem Wasser entstanden nach 2-10 min starkem Schütteln multilamellare Vesikel verschiedener Größenklassen oder auch mizellare Strukturen. Die untersuchten kationischen Lipide unterschieden sich dabei in Abhängigkeit von der chemischen Struktur hinsichtlich ihrer Liposomenbildungsfähigkeit.

Wie die optische Analyse, PCS-Untersuchungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, genügte bei den meisten der untersuchten kationischen Lipide eine Formulierung mit dem Helferlipid DOPE und die Zugabe von Wasser zum getrockneten Lipidfilm, um durch starkes Schütteln multilamellare Vesikel im Größenbereich von etwa 200 bis 1000 nm herzustellen. Wurde auf den Zusatz eines Helferlipides verzichtet, bildeten die kationischen Lipide DOTAP, DCQ-Chol und DOCSPER sehr kleine Liposomen (<100 nm), das Lipid Sp-Chol dagegen mizellare Strukturen aus. Im Gegensatz dazu entstanden bei Verwendung der Lipide DOTMA und DAC-Chol Liposomen die etwa 500 bzw. fast 1000 nm groß waren. Aus den kationischen Lipiden DC-Chol und DDAB entstanden dagegen ohne den Zusatz von Helferlipiden keine stabilen Vesikel (vgl. Tab. 3.1). Diese Lipide bildeten nach dem Lyophilisieren auch keinen Lipidfilm aus. Bei DC-Chol wurde das Auftreten eines öligen Tropfens und bei dem Lipid DDAB die Bildung eines kristallinen Pulvers beobachtet. Während der Herstellung von Liposomen aus diesen beiden Lipiden wurden nach dem Schütteln des Lipidfilmes mit deionisiertem Wasser größere Präzipitate beobachtet. Diese lösten sich auch nach einer Ultraschallbehandlung nicht auf.

Zur genaueren Untersuchung der Größe der Liposomen wurde im weiteren die Mehr-

	Mol %			
	100	75	50	25
DAC-Chol	L	L	L	L
DC-Chol	P	L	L	L
DCQ-Chol	M	L	L	L
Sp-Chol	M	M	M	L
DOTMA	L	L	L	L
DOTAP	M	L	L	L
DDAB	P	P	L	L
DOCSPER	M	L	L	L

Tabelle 3.1: **Einfluß des Helferlipidanteils auf die Vesikelbildung**

L=Liposomen; P=Präzipitate; M=Mizellen. Bei Vorliegen einer schwach trüben bzw. opaleszierenden Lösung wurde davon ausgegangen, daß liposomale Strukturen, bei einer klaren Lösung mit Detergenzeigenschaften, daß Mizellen vorhanden sind. Sichtbare Agglomerate, die sich auch durch Ultraschall nicht entfernen ließen, führten zur Einstufung der Vesikelbildung als Präzipitat.

winkelanalyse der PCS angewandt. Diese Technik erlaubt die Detektion weniger großer Partikel und ein Abschätzen der Größenverteilung in einer Gesamtpopulation [132].

Bei einem Zusatz des Helferlipides DOPE zu den kationischen Lipiden nahm die Größe der aus den polykationischen Lipiden Sp-Chol oder DOCSPER präparierten Liposomen mit steigendem Gehalt an Helferlipid zu. Wenn z.B. bei Sp-Chol-Liposomen der Gehalt an Helferlipid von 50 auf 90 % (w/w) erhöht wurde, stieg die mittlere Größe der Liposomen von etwa 200 nm auf über 600 nm an (vgl. Abb. 3.1). Die Ergebnisse zeigen weiter, daß Sp-Chol-Liposomen mit 10 % (w/w) kationischem Lipid eine recht homogene Größenverteilung bei 600-800 nm haben. Bei Liposomen mit 20 % Sp-Chol hat der überwiegende Teil der Liposomen dagegen eine mittlere Größe von etwa 400-600 nm, es kommen aber auch wenige Liposomen mit 750 bis 1000 nm Durchmesser vor. Der sigmoidale Anstieg der Größenwerte für die niedrigeren Meßwinkel läßt auf einen geringen Anteil an größeren Liposomen schließen. Bei Sp-Chol-Liposomen mit 50 % Helferlipidanteil sinkt die mittlere Größe auf etwa 100 nm ab und es gibt nur wenige Liposomen die größer als 250 nm sind. Eine Formulierung des Sp-Chol's ohne Helferlipid führte dagegen zur Bildung von Mizellen die mit Hilfe der PCS-Methode nicht vermessen werden konnten.

Bei Liposomen, die aus dem Glycerolderivat DOCSPER und den monokationischen Lipiden DAC-Chol, DC-Chol, DCQ-Chol, DOTMA, DOTAP und dem Helferlipid DOPE hergestellt worden waren, bildeten sich wie die Ergebnisse der PCS zeigten, größere Liposomen mit Durchmessern von mehreren 100 nm. Diese relativ großen Vesikel wurden durch eine 10 min Inkubation der Liposomen in einem Ultraschallbad, in Abhängigkeit von der Intensität der Beschallung, auf etwa 100 bis 200 nm, DOTAP-

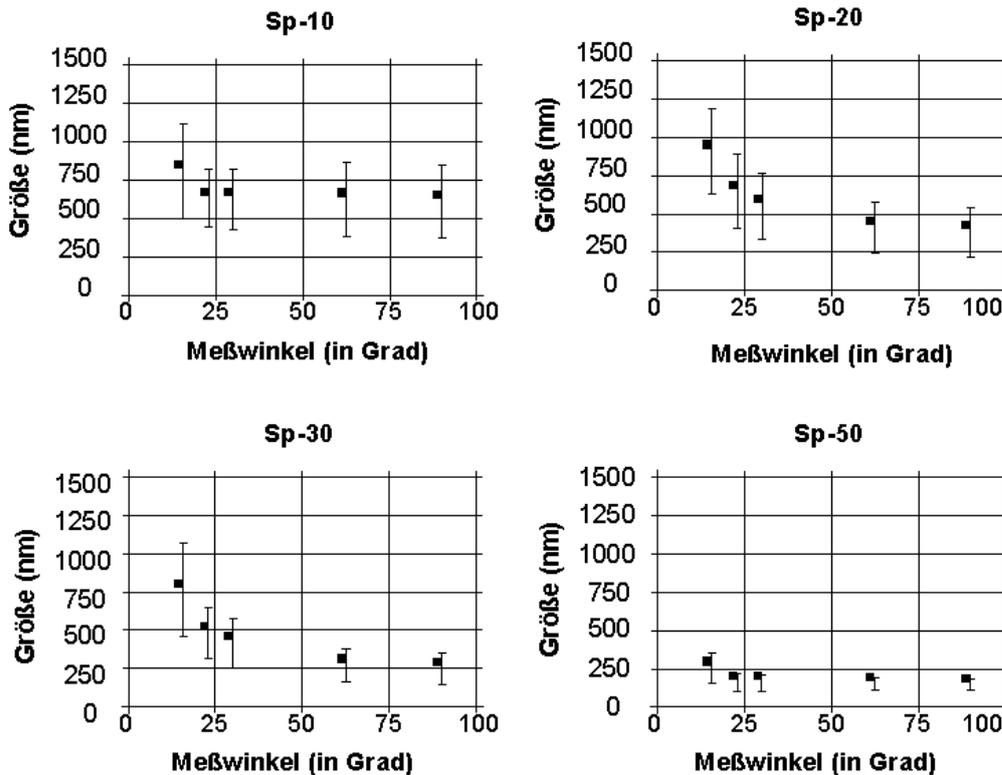


Abbildung 3.1: Einfluß des DOPE-Anteiles auf die Größe von Sp-Chol-Liposomen

Sp-Chol-Liposomen wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen von kationischem zu Helferlipid hergestellt. Die Anteile an Sp-Chol betragen 10, 20, 30 oder 50 % (w/w).

Liposomen sogar auf weniger als 100 nm, verkleinert. Nach einer mehrtägigen Lagerung der Liposomen bei 4°C wurden keine nennenswerten Größenveränderungen festgestellt.

Bei Liposomen die aus DC-Chol oder DAC-Chol sowie DOPE hergestellt wurden, nahm mit zunehmendem Anteil an Helferlipid die Liposomengröße von >1000 nm, bei DAC-Chol ohne Helferlipid, auf etwa 300-400 nm bei 25 Mol % ab. Bei der Beschallung sank die Liposomengröße bei allen untersuchten liposomalen Formulierungen dann auf etwa 125 nm. Nur DAC-Chol-Liposomen die mit 50 % Helferlipid formuliert worden waren, blieben auch nach der Ultraschallbehandlung etwa 500 nm groß.

Die exakten Größen der Liposomen schwankten erheblich in Abhängigkeit von der Stärke und Dauer der Ultraschallbehandlung bzw. des Schüttelns. Generell wurde beobachtet, daß bei höherem Energieeintrag in das System die Größe der Liposomen abnahm. Aus diesem Grunde wird an dieser Stelle auf eine Auflistung der Meßwerte der PCS-Untersuchungen für die einzelnen liposomalen Formulierungen verzichtet.

Im Gegensatz zu den anderen kationischen Liposomen bildete das doppelkettige Lipid DDAB wenn es mit DOPE hergestellt worden war, auch nach einer Ultraschallbehandlung von über 20 min keine stabilen Liposomen aus. Die sichtbaren Präzipitate verblieben auch bei intensiver Beschallung in der Suspension. Eine alternative Herstellung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, die zu einem dünneren Lipidfilm führt, ergab dagegen bei einem Masseverhältnis von 30 % DDAB und 70 % DOPE eine Formulierung ohne sichtbare Präzipitate.

Es ist festzustellen, daß es bei den polykationischen Liposomen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Helferlipidanteil und der Liposomengröße gab. Bei den Cholesterolderivaten DAC-Chol und DC-Chol nahm hingegen die Größe der Liposomen mit einem zunehmenden Anteil des Helferlipides ab. Bei den übrigen monokationischen Lipiden war hingegen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Menge an Helferlipid und der Vesikelgröße festzustellen. Die Lipide DC-Chol und insbesondere DDAB zeigten im Vergleich zu den anderen Lipiden schlechtere Liposomenbildungseigenschaften, wobei DDAB sich nur bei der Herstellung des Lipidfilmes in Rundkolben mit großer Oberfläche in liposomale Vesikel einbinden ließ.

### 3.1.1.2 Bestimmung elektrostatischer Parameter mittels 4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin

Wie die durchgeführten Untersuchungen beweisen, ist die Höhe des Verhältnisses der Lichtemission bei den Anregungswellenlängen 380 bzw. 330 nm abhängig vom pH-Wert des Dispersionsmediums (vgl. Abb. 3.2A): Je höher der pH-Wert, desto höher die Lichtemission bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Dagegen ist die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm relativ konstant. Dies entspricht dem isobestischen Punkt des Fluorophores.

Außerdem ist die Höhe der HC-Protonisierung, d.h. der pH-Wert auf der Vesikeloberfläche bei physiologischem pH-Wert im Dispersionsmedium, abhängig vom Anteil des kationischen Lipides in der Membran. So stieg bei einem pH-Wert von 7.4 im Umgebungsmedium mit der Zunahme des Anteils an kationischem Lipid die Fluoreszenz bei 380 nm und damit das Verhältnis der Lichtemissionen bei einer Anregung von 380 bzw. 330 nm (im folgenden als 380/330er Wert bezeichnet) stark an (Abb. 3.2B). Bei 50 und 25 Mol % kationischem Lipid waren dabei zwischen DOTAP, DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol nur geringe Unterschiede im elektrostatischen Verhalten der Liposomen festzustellen. Bei 75 und 100 Mol % kationischem Lipid war dagegen bei DCQ-Chol-Liposomen die HC-Protonisierung besonders hoch, während sie bei DOCSPER-Liposomen bei allen Mol-Verhältnissen unter den Werten der anderen liposomalen Formulierungen lag.

In weiteren Untersuchungen wurde bei DOTAP-Liposomen mit unterschiedlichem Anteil an Helferlipid der Einfluß des pH-Wertes auf die HC-Protonisierung untersucht (Abb. 3.2C). Bei allen untersuchten Liposomen stieg der Anteil des protonisierten HC in der Membran bei einer Erhöhung des pH-Wertes im Umgebungsmediums an. Dabei erfolgte bei Liposomen mit hohem Anteil an kationischem Lipid die HC-Protonisierung bei einem niedrigeren pH-Wert als bei Liposomen mit geringerem Anteil an kationischem Lipid. So war bei Liposomen mit 100 Mol % DOTAP bei pH 7.4 das HC zu fast 100 % protonisiert, während bei DOTAP-Liposomen mit 25 Mol % und 50 Mol % DOTAP bei pH 7.4 weniger als 50 % der HC-Moleküle protonisiert waren. Die Liposomen mit 25 Mol % DOTAP erreichten erst bei einem pH-Wert von 9.2 eine vollständige Protonisierung des Fluorophores.

Weiterhin hatte auch die Art des zugesetzten Helferlipides Einfluß auf die Höhe der HC-Protonisierung. Bei DOTAP- (Abb. 3.2D) und bei DOCSPER-Liposomen (nicht gezeigt) die mit Cholesterol als Helferlipid hergestellt wurden, war der Grad der HC-Protonisierung größer als bei Liposomen die mit DOPE hergestellt worden waren.

Um den Einfluß der Ionenkonzentration und des Puffersystems auf die HC-Pro-

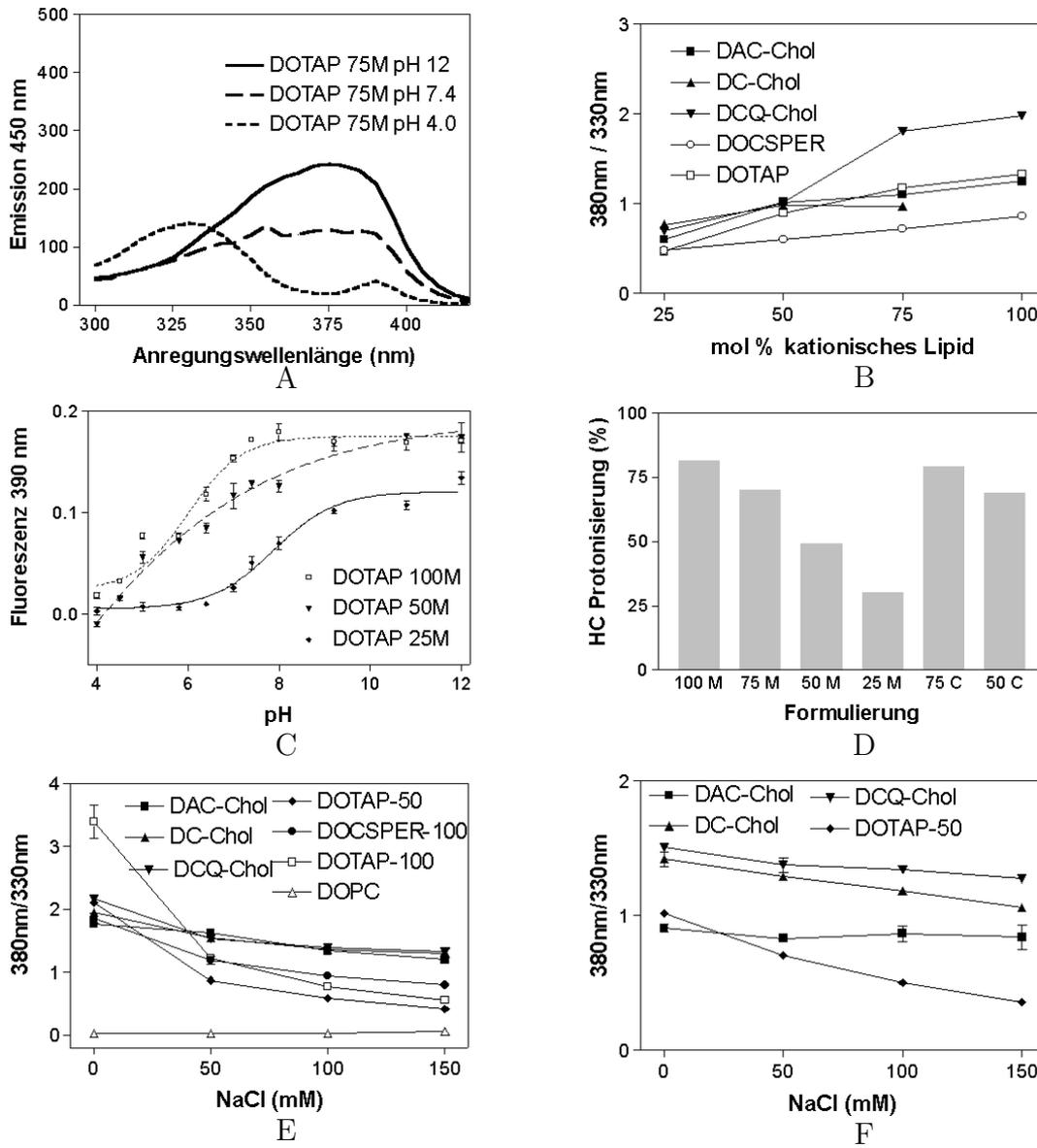


Abbildung 3.2: Elektrostatische Eigenschaften von HC-markierten kationischen Liposomen

A) Spektrum der Anregungswellenlänge für DOTAP-75M-Liposomen markiert mit HC bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm und bei verschiedenen pH-Werten.

B) Verhältnis der Lichtemission (450 nm) bei Anregungswellenlängen von 380 und 330 nm verschiedener kationischer Liposomen mit 100, 75, 50 und 25 Mol % Helferlipidanteil (pH 7.4).

C) Lichtemission von DOTAP-Liposomen mit unterschiedlichem Anteil an Helferlipid bei verschiedenen pH-Werten. Die Anregungswellenlänge betrug 390 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm.

D) Anteil an protonisiertem HC in DOTAP-Liposomen in Abhängigkeit von Anteil und Art des Helferlipides berechnet nach Gleichung (1) (Seite 48) bei pH 7.4.

E+F) Einfluß der NaCl-Ionenkonzentration und des Mediums (E: 0.02 M HEPES-Puffer; F: 0.02 M Phosphatpuffer, jeweils pH 7.4) auf die HC-Protonisierung an der Liposomenoberfläche der verschiedenen Liposomen. Die Cholesterolderivate enthielten 50 Mol % kationisches Lipid.

tonisierung zu untersuchen, wurden anschließend die Fluoreszenzuntersuchungen in verschiedenen Medien durchgeführt. Dazu wurde 0.02 M Phosphat- oder HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 0, 50, 100 oder 150 mM NaCl verwandt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.2E+F zeigen, nahm mit zunehmender Ionenkonzentration der Grad der gemessenen Protonisierung des Fluorophores bei allen untersuchten Liposomen ab. Dieser Abfall war besonders ausgeprägt bei DOTAP-100-Liposomen, welche z.B. in 20 mM HEPES-Puffer ohne NaCl den höchsten Wert des 380/330-Verhältnisses aufwiesen. Mit der Erhöhung der NaCl-Konzentration jedoch sank dieser Wert unter den der anderen Liposomen ab. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit DOTAP-50-Liposomen erzielt. Die Cholesterolderivate unterschieden sich in HEPES-Puffer voneinander kaum in ihrem Protonisierungsprofil. In Phosphatpuffer dagegen war eine deutliche Abstufung der Fluorophor-Protonisierung in der Reihung DCQ-Chol>DC-Chol>DAC-Chol zu beobachten. Die HC-Protonisierung von DOCSPER-100-Liposomen lag auch in HEPES-Puffer niedriger als die der Cholesterolderivate.

Zusammenfassend ist aus den vorliegenden Ergebnissen zu schlußfolgern, daß die Höhe der HC-Protonisierung abhängig ist von der Struktur des kationischen Lipides, von der Art und der Menge des zugesetzten Helferlipides, der Ionenkonzentration und der Art der Gegenionen im Dispersionsmedium sowie von dessen pH-Wert. Cholesterol als Helferlipid bzw. als lipophiler Anker des kationischen Lipides erhöht, eine große Menge an Helferlipid sowie eine hohe Ionenkonzentration im Medium dagegen verringern die Protonisierung der HC-Moleküle.

### 3.1.2 Eigenschaften der Lipoplexe

#### 3.1.2.1 Größe, Trübung und Stabilität

Der Verlauf der Lipoplexbildung nach dem Mischen von DNA und Liposomen kann durch die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung oder durch das photometrische Messen der Trübung, d.h. der statischen Lichtstreuung, verfolgt werden. Neben der Analyse der Größenveränderungen, welche mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht wurden, erfolgten auch PCS-Messungen, die eine exaktere Bestimmung der Vesikelgrößen erlauben.

Für die Untersuchung der Lichtstreuung wurden die Lipoplexe wie im Abschnitt 2.2.3 (S. 44) beschrieben in 96-Well-Zellkulturschalen hergestellt und anschließend die Lichtstreuung an einem Spectra-Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Dabei wurde ein konstanter Betrag an DNA mit steigenden Mengen an kationischen Liposomen gemischt.

*Chemie und Zusammensetzung:* In Abhängigkeit von der chemischen Struktur und dem Mischungsverhältnis zwischen kationischem Lipid und Helferlipid zeigten die liposomalen Formulierungen ein unterschiedliches Trübungsverhalten. DOCSPER-100-Liposomen verursachten hingegen ohne den Zusatz von DNA wegen ihrer geringen Größe keine Streuung des Lichtes im sichtbaren Bereich. Wenn DNA zugesetzt wurde war eine starke Zunahme der Lichtstreuung bei der Lipoplexbildung zu beobachten. Dies läßt auf eine erhebliche Größenveränderung der Vesikel nach der Zugabe der DNA schließen (vgl. Abb. 3.3).

Mit zunehmender Lipidmenge nahm die Lichtstreuung der Lipoplexe zu, erreichte dann bei etwa 5  $\mu\text{g}$  Lipid je  $\mu\text{g}$  DNA ein Maximum und nahm bei 10  $\mu\text{g}$  Lipid je  $\mu\text{g}$  DNA

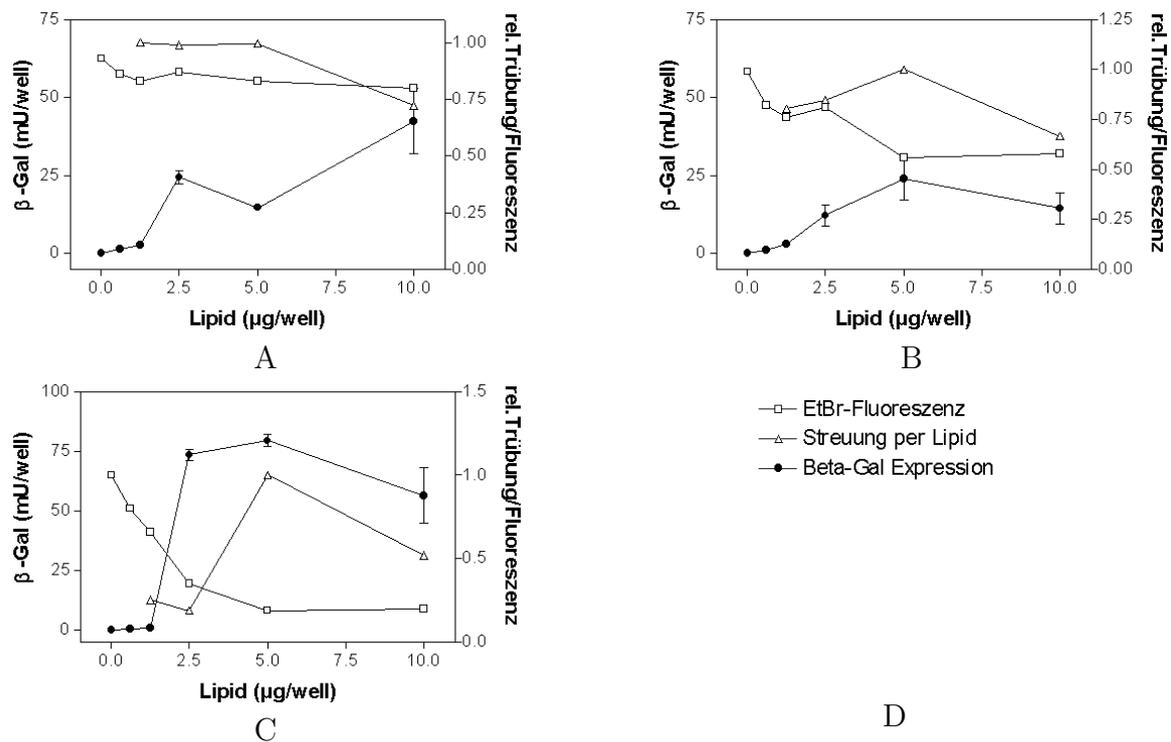


Abbildung 3.3: Einfluß der Lipidkonzentration auf den EtBr-Ausschluß, die Licht-Streuung und die  $\beta$ -Gal-Expression.

Von unterschiedlichen liposomalen Formulierungen wurde der EtBr/DNA-Ausschluß, die Streuung und die Gentransfereffizienz von F98-Zellen bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte von 2-3 Bestimmungen ( $\pm$  SD). **A:** DAC-30-Liposomen; **B:** DAC-40-Liposomen; **C:** DOCSPER-100-Liposomen

wiederum ab. Somit scheinen die Lipoplexe bei einem Überschuß an kationischem Lipid wieder kleiner zu werden. Diese Beobachtungen wurden in geringerem Umfang auch für DAC-30 und DAC-40-Liposomen gemacht. Bei diesen Liposomen, die auch ohne den Zusatz von DNA wegen ihrer Größe über eine starke Eigenstreuung verfügen, war keine bzw. nur eine schwache Zunahme der Trübung festzustellen. So blieb bei DAC-30-Liposomen die Trübung der Lipoplexe zwischen 1,25 und 5  $\mu$ g Lipid je  $\mu$ g DNA konstant und sank dann bei 10  $\mu$ g Lipid leicht ab, während bei DAC-40-Liposomen die Trübung nur leicht anstieg und bei 5  $\mu$ g Lipid je  $\mu$ g DNA der höchste Wert der Lichtstreuung bezogen auf die Gesamtmenge an Lipid beobachtet wurde.

*Konzentration:* Größe und Stabilität der hergestellten Lipoplexe waren außerdem abhängig von der Konzentration der Einzelkomponenten, dem Mengenverhältnis zwischen den kationischen Liposomen und der DNA sowie der Art des Mediums, in dem die Herstellung der Komplexe erfolgte.

Es wurde festgestellt, daß die Größe von Lipoplexen, die bei hoher Konzentration und neutralen Mischungsverhältnissen zwischen Liposomen und DNA hergestellt worden waren, sehr rasch zunahm und Präzipitate zu beobachten waren. Somit war die Stabilität unter diesen Bedingungen sehr gering. Im Gegensatz dazu war die Vesikelgröße bei Lipoplexen mit stark positiven Mischungsverhältnissen und einer niedrigen Konzentration der Einzelkomponenten geringer und die Stabilität größer. So kam es bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 (w/w) bei DAC-30/DNA-Komplexen mit Lipidkon-

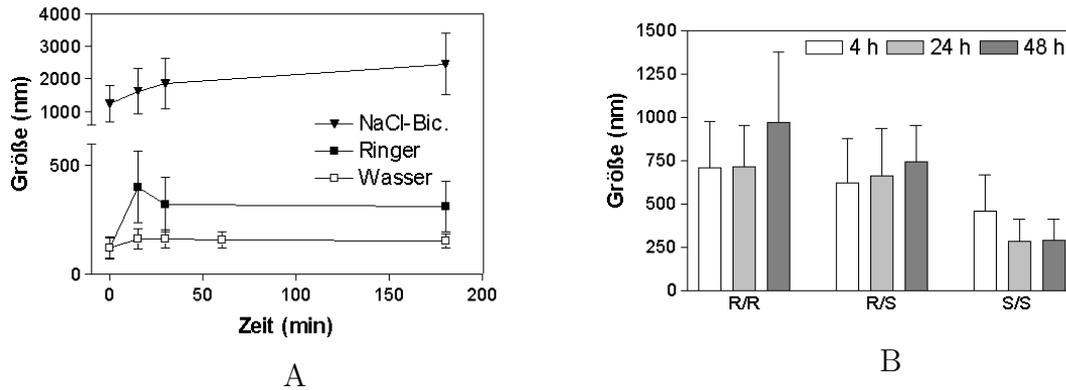


Abbildung 3.4: Einfluß des Mediums auf die Lipoplexgröße

**A:** 100  $\mu\text{l}$  DOCSPER-100-Liposomen wurden in 3 ml Wasser, Ringerlösung oder 150 mM NaCl/20 mM  $\text{NaHCO}_3$  verdünnt. Die Größenbestimmung erfolgte mittels PCS am N4-Plus bei einem Meßwinkel von 90 Grad. Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmung bei Annahme einer unimodalen Verteilung ( $\pm$  SD). Nach der ersten Messung wurden 10  $\mu\text{g}$  DNA zugegeben und die Messungen wurden nach 5, 10, 30 und 180 min wiederholt.

**B:** 500  $\mu\text{g}$  DAC-40-Liposomen und 100  $\mu\text{g}$  PS wurden in 500  $\mu\text{l}$  Ringerlösung (R) oder Saccharose (S) verdünnt und mit 50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA pUT651, verdünnt in 500  $\mu\text{l}$  Ringerlösung oder Saccharose, gemischt und für 4, 24 oder 48 h bei RT inkubiert. Die Untersuchung der Größenverteilung erfolgte wie unter Abb. A beschrieben.

zentrationen von 1mg/ml innerhalb weniger Minuten zum Präzipitieren der Komplexe, während Lipoplexe mit einem Mischungsverhältnis von 10:1 bei gleicher Lipidkonzentration über einen Zeitraum von mehreren Tagen stabil blieben.

*Medium:* In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß des Mediums auf die Größenveränderung von DOCSPER-100/DNA- und DAC-30/PS/DNA-Komplexen über eine Zeit von wenigen Minuten bis zu 48 h analysiert. Dazu wurden die Liposomen in Medien mit hoher Ionenkonzentration, wie Ringerlösung bzw. isotonischer NaCl-Lösung mit Bicarbonatpuffer, oder in Medien ohne zugesetzte Ionen, wie Wasser bzw. 10 %-Saccharoselösung, mit der Plasmid-DNA gemischt.

*Kurzzeitstabilität:* Bei den Kurzzeitstabilitätsuntersuchungen mit DOCSPER-100/DNA-Lipoplexen wurde festgestellt, daß diese bei der Verwendung von Wasser über einen Zeitraum von 3 h mit etwa 150-200 nm sehr klein blieben. Wurde Ringerlösung für die Komplexherstellung verwandt, stieg die Größe sehr schnell auf etwa 300 nm an, blieb dann aber konstant. Wenn hingegen 20 mM Bicarbonat zum Medium hinzugesetzt wurden, waren die Liposomen ohne DNA mehrere hundert nm bis zu 1  $\mu\text{m}$  groß und bei der DNA-Zugabe stieg die Lipoplexgröße kontinuierlich auf mehrere  $\mu\text{m}$  an (vgl. Abb. 3.4A).

*Langzeitstabilität:* Auch bei Langzeitstabilitäts-Untersuchungen mit DAC-30/PS/DNA-Komplexen zeigte sich, daß bei der Verwendung von Medien mit einer hohen Ionenkonzentration die Größe der Lipoplexe ständig zunimmt, während bei der Verwendung von Medien ohne zugesetzte Ionen, wie Saccharoselösung, die Komplexgröße über mehr als 48 h konstant blieb (vgl. Abb. 3.4B). So betrug die Größe von DAC-30/PS/DNA-Komplexen anfänglich etwa 750 nm und stieg innerhalb von 48 h auf 1000 nm an. Das optische Erscheinungsbild der Lipoplexe veränderte sich dabei von opaleszierend zu trüb, was ebenfalls auf eine Größenzunahme schließen ließ. Teilweise wurden

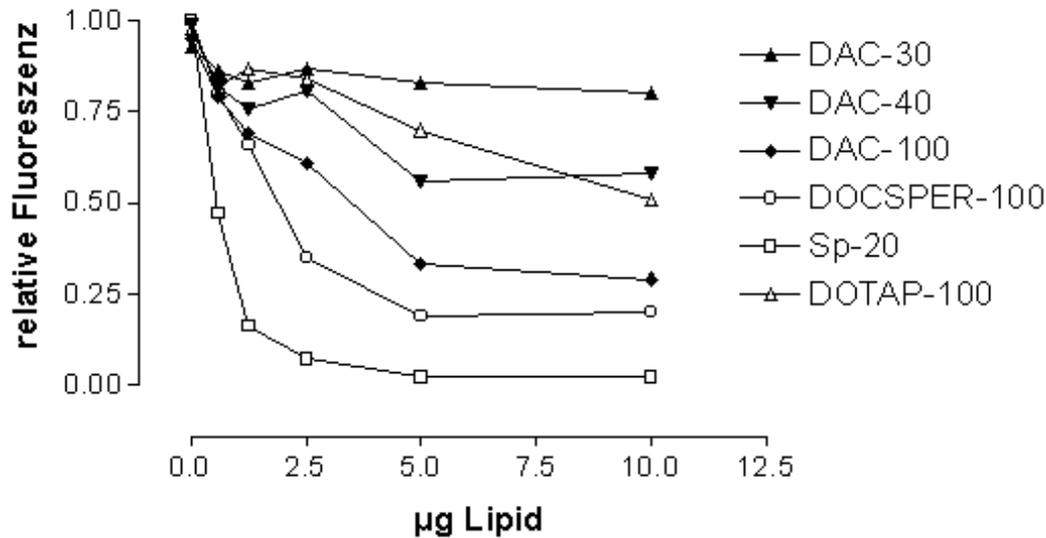


Abbildung 3.5: Einfluß der Lipidmenge auf die Fluoreszenz von EtBr/DNA-Komplexen

Die Lipoplexe wurden in isotonischer NaCl-Lösung aus 0,6, 1,25, 2,5, 5 oder 10  $\mu\text{g}$  Lipid und 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA hergestellt. Nach etwa 30 min erfolgte die Zugabe von EtBr zu einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Anschließend wurde bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm die Fluoreszenz bestimmt.

nach 48 h auch kleine Präzipitate in der Suspension beobachtet. Demgegenüber wurden bei Komplexen die in Saccharoselösung bzw. Wasser hergestellt worden waren, keine Größen- bzw. Strukturveränderungen beobachtet. Wurden die Lipopolyplexe in einem Gemisch von Ringerlösung und Saccharoselösung hergestellt, d.h. 50 % Ringerlösung und 5 % Saccharose, so lagen das Erscheinungsbild und die Größe der entstehenden Lipoplexe zwischen der Größe der in Ringerlösung bzw. 10 % Saccharose hergestellten Vesikel.

Die Größe der Lipoplexe und deren Stabilität wird somit maßgeblich vom Mischungsverhältnis des kationischen Lipides und Helferlipides, von der Konzentration der Einzelkomponenten, also der Liposomen und der DNA, sowie von der Ionenkonzentration des umgebenden Mediums bestimmt. Eine hohe Ionen- bzw. Komponentenkonzentration und ein neutrales Ladungsverhältnis zwischen den kationischen Liposomen und der DNA beeinflussen die Lipoplexstabilität negativ, während niedrige Ionen- und Komponentenkonzentrationen und ein stark positives Ladungsverhältnis die Stabilität der Lipoplexe vergrößern.

### 3.1.2.2 Elektrophoretische Mobilität und DNA/EtBr-Interkalation

Eine weitere Möglichkeit die Lipid/DNA-Komplexe zu charakterisieren, besteht in der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität bzw. in der Untersuchung des EtBr-Ausschlusses auf DNA-Ebene nach der Zugabe der kationischen Liposomen zur DNA. Nach Zusatz des fluoreszierenden EtBr-Moleküls interkaliert dieses in die DNA-Doppelhelix (ein EtBr-Molekül je 4-5 DNA-Basenpaaren). Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von etwa 500 bis 540 nm, wird im Bereich von ca. 590 bis 610 nm längerwelliges Licht emittiert. Die Fluoreszenz des interkalierten EtBr-Moleküles ist dabei 20-30fach

höher als die Fluoreszenz des freien EtBr [66].

Nach der Zugabe der kationischen Liposomen korreliert der Grad der Packung der DNA [55, 162] mit der Abschirmung gegen das interkalierende EtBr. Je geringer die Fluoreszenz, desto stärker die Packung der DNA bzw. die Ummantelung durch das Lipid.

*Lipoplexe:* Für die Fluoreszenzstudien wurden Lipoplexe in isotonischer NaCl-Lösung durch Mischen von unterschiedlichen Mengen kationischer Liposomen mit einer konstanten Menge DNA hergestellt. Etwa 30 min nach dem Mischen der kationischen Liposomen mit der DNA wurde EtBr zugesetzt und die Fluoreszenz bestimmt.

Bei den untersuchten DAC-30, DAC-40, DAC-100, DOCSPER-100, Sp-20 und DOTAP-100-Liposomen nahm mit einer zunehmenden Menge an Liposomen die EtBr/DNA-Fluoreszenz ab (vgl. Abb. 3.5). Dieser Abfall der Fluoreszenz war besonders ausgeprägt bei Liposomen die polykationische Lipide enthielten. So sank bei Sp-20-Liposomen die Fluoreszenz auf weniger als 10 % des Ausgangswertes ab wenn  $\geq 2.5 \mu\text{g}$  Lipid zu  $1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA zugesetzt wurden. Bei DOCSPER-Liposomen sank die Fluoreszenz auf weniger als 25 % des Ausgangswertes ab wenn  $\geq 5 \mu\text{g}$  Lipid verwandt wurden. Sowohl bei Sp-20- als auch bei DOCSPER-100-Liposomen sank die EtBr-Fluoreszenz bei einer Lipidmenge von mehr als  $5 \mu\text{g}$  per  $\mu\text{g}$  DNA nicht weiter ab.

Bei DOCSPER-100-Liposomen wurde außerdem der Grad der Mobilität der Lipoplexe in einem Agarose-Gel untersucht. Dabei war festzustellen, daß mit einer zunehmenden Lipidmenge die DNA immobilisiert wurde, bzw. es zu einem vollständigen Auslöschen der Fluoreszenz kam und die DNA nicht mehr beobachtet werden konnte. Der Grad dieser Immobilisierung war weiterhin von der Art des Mediums, in dem die Lipoplexe hergestellt wurden, abhängig: In DMEM-Medium war die Immobilisierung am schwächsten, in Wasser oder in niedrigioniger Kochsalzlösung stärker.

Bei der DNA-Komplexierung mittels DAC-Chol-Liposomen war die EtBr/DNA-Fluoreszenz sowohl von der Menge an Liposomen als auch vom Anteil des DAC-Chol's in den Liposomen abhängig. War der Anteil des kationischen Lipides in den Liposomen gering, wie z.B. bei DAC-30-Liposomen, wurde das EtBr nicht oder kaum ausgeschlossen. Im Vergleich dazu sank bei DAC-40- und DAC-100-Liposomen die Fluoreszenz in stärkerem Maße ab. Die Fluoreszenz verringerte sich hier bis zu einer Menge von  $5 \mu\text{g}$  Lipid je  $\mu\text{g}$  DNA etwa proportional mit der Menge an zugesetzten Liposomen. Trotz seiner quarternären Aminokopfgruppe war die Stärke der Komplexierung der DNA durch das monokationische Lipid DOTAP niedriger als bei den DAC-100-Liposomen.

*Polykationen:* Im weiteren wurde auch der Einfluß von Polykationen wie PS und PLL auf die DNA-Komplexierung untersucht. Bei der Vorkomplexierung der DNA mit diesen Polykationen kam es bei Überschreiten eines bestimmten Peptid/DNA-Verhältnisses zu einem vollständigen Abfall der Fluoreszenz. Auf diese Ergebnisse wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden (vgl. Abschnitt 3.2.3, S. 73).

*Trübung, EtBr-Ausschluß und Gentransfer:* Im Zusammenhang mit der Möglichkeit die Gentransfereffizienz von kationischen Liposomen durch den Zusatz von Polykationen zu erhöhen, wurde auch versucht den Grad der Packung der DNA mit der Trübung der Lipoplexe und diese mit den erzielten Gentransferresultaten zu korrelieren (vgl. Abb. 3.3). Dazu wurde die EtBr/DNA-Fluoreszenz mit dem Grad der Trübung je Lipideinheit und der  $\beta$ -Gal-Expression verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß sowohl Lipide, die die DNA fast vollständig gegen EtBr abschirmen (DOCSPER-100), als auch Liposomen mit nur schwach komplexierenden Eigenschaften (DAC-30,

DAC-40) *in vitro* wirksame Gentransfersysteme darstellen. Somit scheint eine starke Komplexierung keine notwendige Voraussetzung für den Gentransfer *in vitro* zu sein.

Bei der Bestimmung der Lipoplextrübung ließ sich hingegen ein Zusammenhang zur Gentransfereffizienz herstellen. Die auf die Menge an Liposomen normierte Trübung von DOCSPER-100 und DAC-40-Liposomen nahm mit der Lipidmenge bis 5  $\mu\text{g}$  Lipid zu und sank dann bei 10  $\mu\text{g}$  Lipid wieder ab. Anstieg und Abfall der Trübung korrelierte mit der erreichten Reportergenexpression. Bei DAC-30-Liposomen blieb von 1.25  $\mu\text{g}$  bis 5  $\mu\text{g}$  Lipid die Trübung konstant und sank bei 10  $\mu\text{g}$  Lipid leicht ab. Die Reportergenexpression der DAC-30/pUT651-Lipoplexe stieg dagegen von 0.06  $\mu\text{g}$  Lipid bis zu 10  $\mu\text{g}$  Lipid kontinuierlich an. Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die Lichtstreuung der Lipoplexe die Fluoreszenz der EtBr/DNA-Komplexe schwächt. Die erhaltenen Daten sind deswegen nur unter Vorbehalt zu interpretieren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Grad der DNA-Komplexierung wesentlich von der Ladung der kationischen Kopfgruppe, vom Anteil des Helferlipides in den kationischen Liposomen und vom Medium in dem die Lipoplexherstellung erfolgt abhängt. In Medien mit hoher Ionenkonzentration kam es zu einer schwächeren Komplexierung der DNA, während in deionisiertem Wasser die stärkste Komplexierung erreicht wurde.

## 3.2 Transfektionsergebnisse

In diesem Abschnitt werden zuerst die Gentransfereigenschaften der verschiedenen kationischen Lipide miteinander verglichen und anschließend wird der Einfluß der Komplexbestandteile, wie des Helferlipides, der DNA-Qualität und des Zusatzes von Polykationen auf die Generierung effizienter Gentransfervesikel untersucht. Im weiteren werden die Faktoren, welche die Komplexbildung beeinflussen wie Komplexkonzentration und Medium untersucht. Abschließend werden einige der Einflußfaktoren die zum Transfektionsverfahren gehören analysiert.

### 3.2.1 Gentransfereigenschaften verschiedener kationischer Lipide

Untersucht werden sollte zuerst, inwiefern sich die Gentransfereffizienzen der verschiedenen kationischen Lipide auf den Zelllinien unterscheiden und ob bestimmte chemische Strukturen für den Gentransfer besonders geeignet sind.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Gentransfereffizienz der Lipoplexe von der chemischen Struktur des kationischen Amphiphiles wurden die Rattenglioblastomzelllinie F98, die Rattenkolonkarzinomzelllinie CC531, die humane Mammatumorzelllinie MaTu und MCF7 sowie die humane Glioblastomzelllinie N64 mit verschiedenen liposomalen Formulierungen und der Plasmid-DNA pUT651 transfiziert. Verwendet wurden dabei verschiedene liposomale Formulierungen eines jeden kationischen Lipides mit dem Helferlipid DOPE, aber auch Liposomen, die ohne Helferlipid hergestellt worden waren. Folgende Lipide wurden für die Herstellung der kationischen Liposomen verwandt (vgl. auch Tab. 2.3, S. 42 sowie Abb. 1.4, S. 22):