

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 μg Lipid zu und sank dann bei 10 μg Lipid wieder ab. Anstieg und Abfall der Trübung korrelierte mit der erreichten Reportergenexpression. Bei DAC-30-Liposomen blieb von 1.25 μg bis 5 μg Lipid die Trübung konstant und sank bei 10 μg Lipid leicht ab. Die Reportergenexpression der DAC-30/pUT651-Lipoplexe stieg dagegen von 0.06 μg Lipid bis zu 10 μg 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):

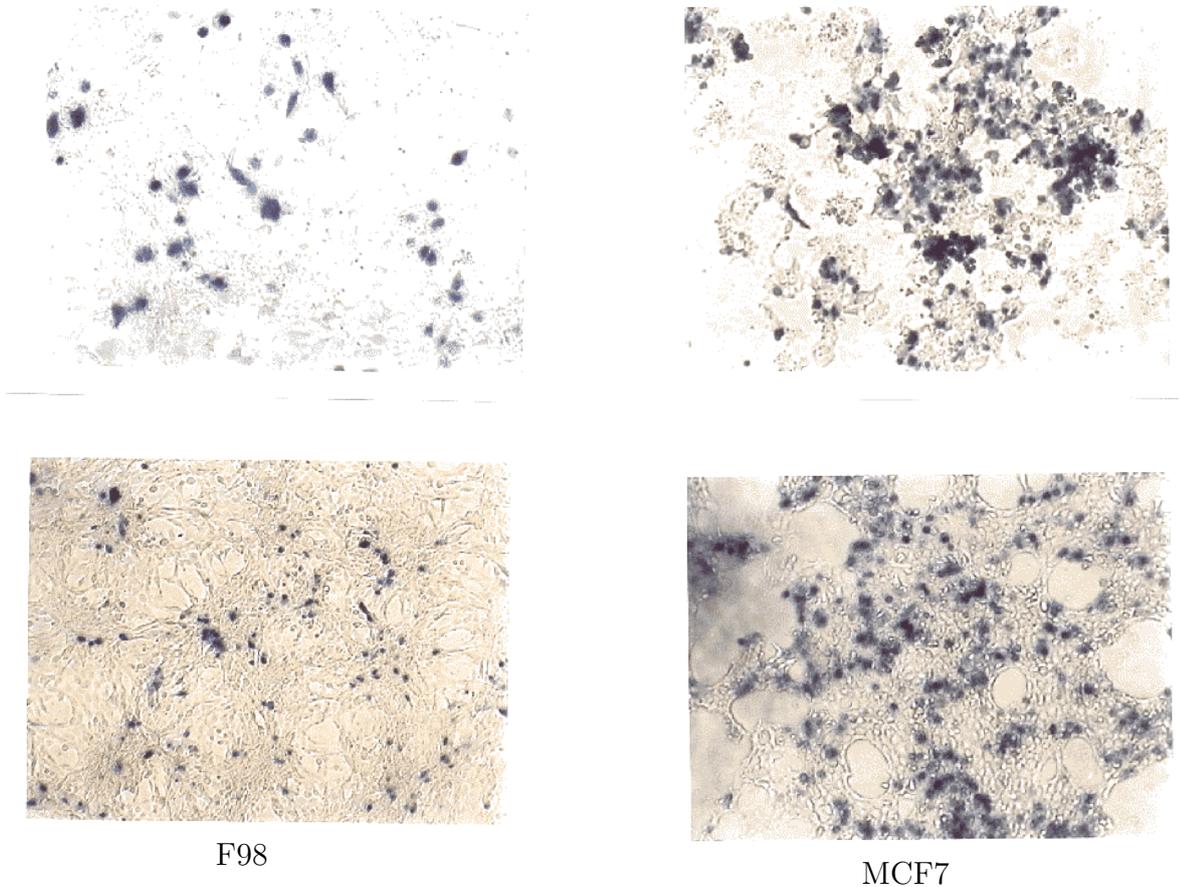


Abbildung 3.6: **X-Gal-Färbung von F98 und MCF7-Zellen nach Transfektion mit DAC-Chol-Liposomen und pUT651-Plasmid-DNA.**

48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen mittels X-Gal Färbung sichtbar gemacht.

- Doppelkettige Amphiphile: Das Etherlipid DOTMA und das Detergenz DDAB - zwei Lipide mit quarternären Stickstoffatom als kationischer Kopfgruppe; außerdem die Glycerollipide DOSGA, welches eine Guanidinokopfgruppe enthält, sowie DOCSPER mit einer Sperminkopfgruppe.
- Cholesterolderivate: Die monokationischen Lipide DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol als Lipide mit sekundärer, tertiärer bzw. quarternärer Aminogruppe; die Lipide mit veresterten Aminosäurekopfgruppen A-Chol, O-Chol und Put-Chol sowie das Cholesterolderivat Sp-Chol mit einer Sperminkopfgruppe auch bekannt unter dem Namen Lipid #67 [89].

Die Struktur des Lipides DCQ-Chol entspricht weitgehend der von DC-Chol. Es enthält jedoch eine Hydroxyethylgruppe am Stickstoffatom der kationischen Kopfgruppe statt des Wasserstoffatoms. Die kationische Kopfgruppe bei diesem Lipid ist demzufolge eine quarternäre Aminogruppe.

Aus den aufgeführten Lipiden und DOPE wurden multilamellare kationische Liposomen hergestellt. Der Anteil des kationischen Lipides an der Lipidgesamtmenge betrug

dabei entweder 100, 50 oder 20 % (w/w) und der Anteil des Helferlipides dementsprechend 0, 50 oder 80 %. Aus den Liposomen und der Plasmid-DNA wurden Lipoplexe mit 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid sowie 1, 0.3 oder 0.1 μg Plasmid-DNA pUT651 hergestellt. Mit diesen Komplexen wurden etwa 10.000 F98, N64, CC531, MCF7 oder MaTu-Zellen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die Gesamtgenexpression bestimmt. Demzufolge wurde jede Zelllinie mit 18 verschiedenen Lipid/DNA-Mischungen der entsprechenden liposomalen Formulierung transfiziert. Für die Beurteilung der Transfereigenschaften wurde für jede liposomale Formulierung die jeweils maximal erreichte Genexpression herangezogen.

Generell war die Höhe der β -Gal-Expression abhängig von der transfizierten Zelllinie. Diese folgte bei den untersuchten Zelllinien der Reihung:

MCF7 > MaTu > F98 > N64 > CC531.

D.h. die Genexpression der MCF7-Zellen war wesentlich höher als die der CC531. Die Gesamtgenexpression korrelierte gut mit den Ergebnissen, die bei einer X-Gal-Färbung der transfizierten Zellen festgestellt wurden. Die Anzahl der transfizierten Zellen betrug bei den Zelllinien MaTu und MCF7 etwa 40-80 %, bei der F98 etwa 10 bis 30 % und bei CC531 etwa 5 % (s. Abb. 3.6).

Der Einfluß der chemischen Struktur der kationischen Lipide auf die erreichten Genexpressionsraten war vergleichsweise gering (vgl. Abb. 3.7). Die meisten der untersuchten kationischen Lipide erwiesen sich prinzipiell als für den Gentransfer geeignet. So ergaben Transfektionen mit DOTMA-, DDAB-, DOSGA- und DOCSPER-Liposomen, bei einer optimalen Formulierung mit dem Helferlipid DOPE, β -Gal-Expressionen, die sich um weniger als eine Größenordnung voneinander unterschieden. Bei den untersuchten Cholesterolderivaten gab es dagegen größere Unterschiede hinsichtlich ihrer Eignung als Gentransfervektoren. So schwankte die Genexpression, die mit den Lipiden A-Chol, O-Chol und Put-Chol erzielt wurde, in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie. Die Ergebnisse der Lipide DAC-Chol und Sp-Chol waren relativ konstant, lagen jedoch bei der Zelllinie MaTu unter den Ergebnissen, die mit den doppelkettigen Amphiphilen erzielt wurden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine zellspezifische Besonderheit.

In Abbildung 3.8 sind für jede liposomale Formulierung die Werte der einzelnen Lipid/DNA-Mischungen dargestellt. Dabei sind Bereiche hoher Genexpression dunkel und Bereiche niedriger Genexpression hell dargestellt. Diese Darstellungsform ermöglicht für jede liposomale Formulierung die Auswahl der effektivsten Lipid/DNA-Konzentration. Die Ergebnisse sind sehr stark von der Art der transfizierten Zellen, der Zellkonfluenz und der Transfektionszeit abhängig. Trotz dieser Einschränkungen können Aussagen zu den Transfereigenschaften der Liposomen und zu zelltypspezifischen Besonderheiten gemacht werden.

Betrachtet man die Einzelwerte der β -Gal-Expression für jede einzelne Lipid/DNA-Mischung, so fällt auf, daß die doppelkettigen Amphiphile DOTMA, DDAB und DOCSPER nur bei höheren DNA-Konzentrationen gute Transfektionsergebnisse erzielten, während DOSGA und DAC-Chol-Liposomen auch bei niedrigen DNA-Konzentrationen von 0.1 $\mu\text{g}/\text{Well}$ noch sehr hohe Transfektionsraten erreichten. Der Bereich wirksamer Lipid/DNA-Mischungen war bei DOCSPER-, DOTMA- und DDAB-Liposomen wesentlich geringer als bei Liposomen, die mit Hilfe des kationischen Lipides DOSGA hergestellt worden waren.

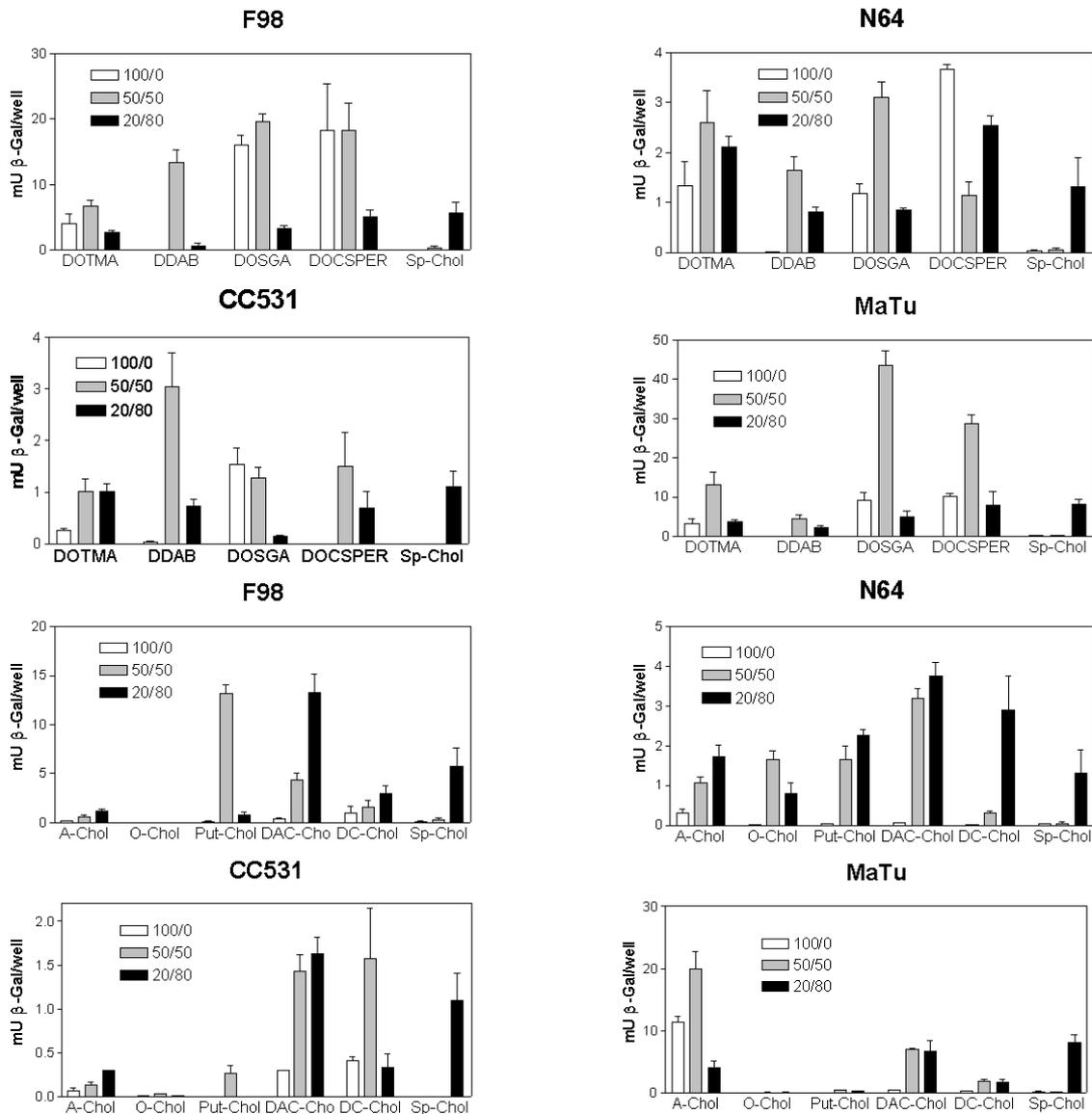


Abbildung 3.7: Einfluß der chemischen Struktur und des Anteils an Helferlipid auf die Gentransfereigenschaften von verschiedenen kationischen Lipiden.

Verschiedene Mengen an kationischen Liposomen (10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 und 0,3 μg) wurden mit verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA pUT651 (1, 0,33 oder 0,1 μg) komplexiert. Mit den Lipoplexen wurden F98, CC531, N64 und MaTu-Zellen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Das Mischungsverhältnis von kationischem Lipid zu Helferlipid betrug jeweils 100:0, 50:50 oder 20:80 (w/w). Angegeben sind jeweils die 3 maximalen β -Gal-Expressionswerte (\pm SEM).

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, daß sich die Gentransfereffizienzen der einzelnen kationischen Liposomen bei einer optimierten Formulierung und einem geeigneten Lipid/DNA-Verhältnis zumeist nur wenig unterscheiden. Lediglich die Cholesterolderivate mit Esterbindungen erwiesen sich als kaum geeignet für den Gentransfer.

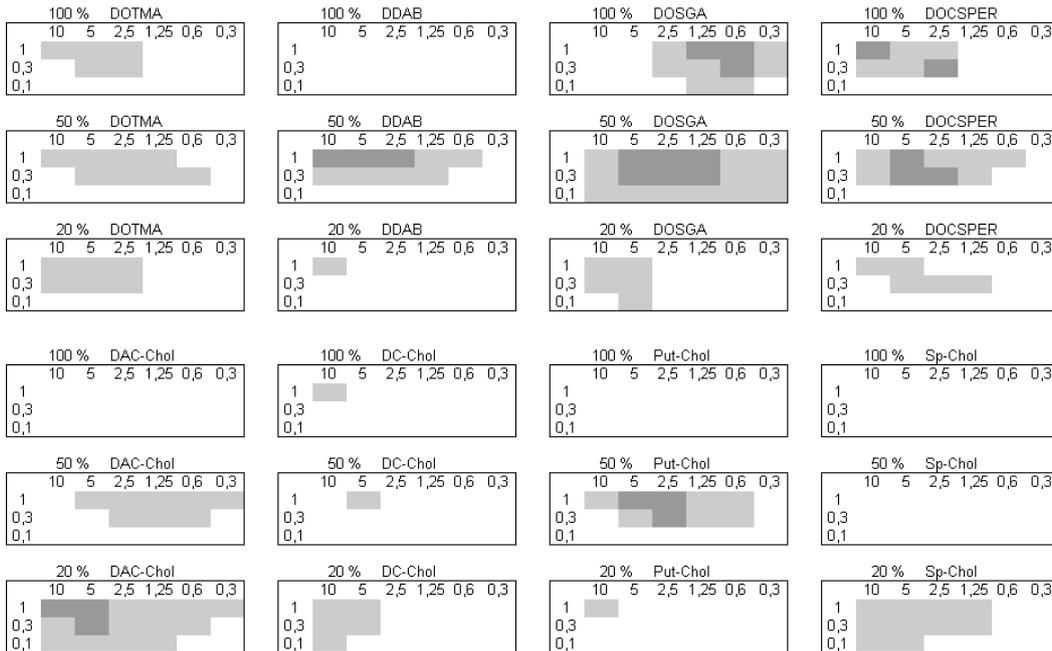
3.2.2 Einfluß des Helferlipides auf die Gentransferrate

Die Ergebnisse unserer und die Resultate anderer Arbeitsgruppen zeigen, daß eine Abhängigkeit der Gentransfereffizienz kationischer Liposomen vom Helferlipidanteil besteht. Zumeist wurde bei diesen Untersuchungen das fusogene Helferlipid DOPE verwandt, welches die Transfektionseigenschaften vieler kationischer Lipide verbessert. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß der Anteil dieses Helferlipides auf die Gentransfereigenschaften der kationischen Lipide hat und welche Mischungsverhältnisse für die verschiedenen Zelllinien geeignet sind. Auch die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnittes wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von kationischem zu Helferlipid erzielt und lassen somit ebenfalls Rückschlüsse auf eine effiziente Liposomen-Formulierung zu.

Die Untersuchungen erfolgten mit Formulierungen bestehend aus 100, 50 oder 20 % kationischem Lipid und 0, 50 oder 80 % Helferlipid. Die einzelnen Zelllinien verhielten sich unterschiedlich in Bezug auf die Menge an Helferlipid, die für eine gute Transfektion notwendig war. Es war nicht möglich eine Aussage zu einem optimalen Mischungsverhältnis von kationischem Lipid und Helferlipid zu machen da dieses, in Abhängigkeit von der Zelllinie, unterschiedlich war. DDAB sowie die Cholesterolderivate benötigen in jedem Fall den Zusatz eines Helferlipides für eine effiziente Transfektion. Wie bereits im Abschnitt 3.1.1.1 (S. 55) ausgeführt, konnten bei DDAB und DC-Chol ohne den Zusatz von Helferlipid keine stabilen Liposomen hergestellt werden. Die doppelkettigen Amphiphile DOCSPER, DOSGA und DOTMA bildeten dagegen auch ohne Helferlipid Liposomen und transfizierten teilweise besser, als bei einer Formulierung mit DOPE. So wies z.B. DOCSPER-100 bei Genapplikation in die Glioblastomzelllinien N64 und F98 wesentlich bessere Transfereigenschaften auf, als die Formulierungen DOCSPER-50 und DOCSPER-20. Diese Ergebnisse sind allerdings zellspezifisch. So war DOCSPER ohne Helferlipid bei den Rattenkolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531 nicht für den Gentransfer geeignet. Im Gegensatz dazu waren die doppelkettigen Amphiphile DOSGA, DOTMA und DDAB bei 3 von 4 Zelllinien in einer 50 zu 50 Mischung (w/w) von Helferlipid und kationischen Lipid am effektivsten.

Eine genauere Bestimmung des Optimums für die jeweilige Zelllinie erfolgte anschließend durch die Herstellung einer Anzahl weiterer liposomaler Formulierungen mit verschiedenen Verhältnissen von kationischem zu Helferlipid. Wegen der guten Transfereigenschaften und ihrer ausreichenden Verfügbarkeit wurden dazu die kationischen Lipide DOTMA, DAC-Chol, DC-Chol und DCQ-Chol ausgewählt. Es wurden liposomale Formulierungen mit 100, 75, 50 und 25 % Massenanteilen an kationischem Lipid hergestellt.

Zur Genapplikation wurden F98-, MaTu- und CC531-Zellen mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μg DNA transfiziert. Bei Transfektionsergebnissen zeigte sich eine deutliche Veränderung des optimalen Verhältnisses von kationischem Lipid und Helferlipid in Abhängigkeit von der Zelllinie und der liposomalen Formulierung. Die Abbildung 3.9



A: F98-Zellen



B: MaTu-Zellen

Abbildung 3.8: β -Gal-Expression von F98- und MaTu-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen Lipoplexpräparationen

Bereiche mit Genexpressionen kleiner als 1 mU per Well sind weiß, Bereiche zwischen 1 und 10 mU sind hellgrau, Bereiche zwischen 10 und 100 mU/Well sind dunkelgrau dargestellt. Die Lipidkonzentrationen (10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 und 0,3 μ g per Well) sind horizontal, die DNA-Konzentrationen (1, 0,3 und 0,1 μ g per Well) sind vertikal aufgetragen.

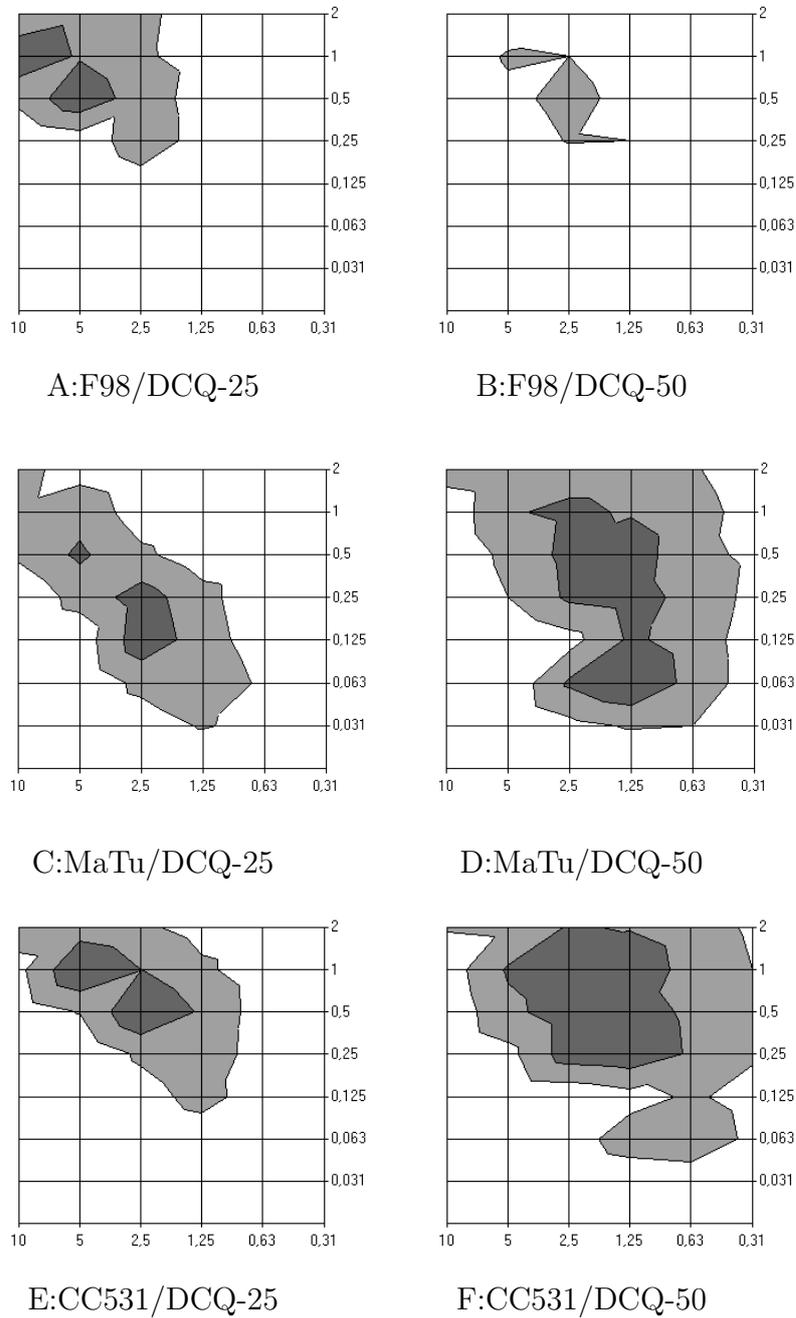


Abbildung 3.9: **Einfluß des Helferlipides auf die Transfektion mit DCQ-Chol-Liposomen**

Die Mengen an DNA sind auf der y-Achse, die Liposomenmenge auf der x-Achse aufgetragen. Dunkelgrau sind Bereiche von 66-100 %, hellgrau Bereiche von 33-66 % und weiß Bereiche mit <33 % der maximalen Genexpression dargestellt. Mit DCQ-75 und DCQ-100-Liposomen wurden nur Gentransferraten die unter 33 % des Maximalwertes lagen erreicht.

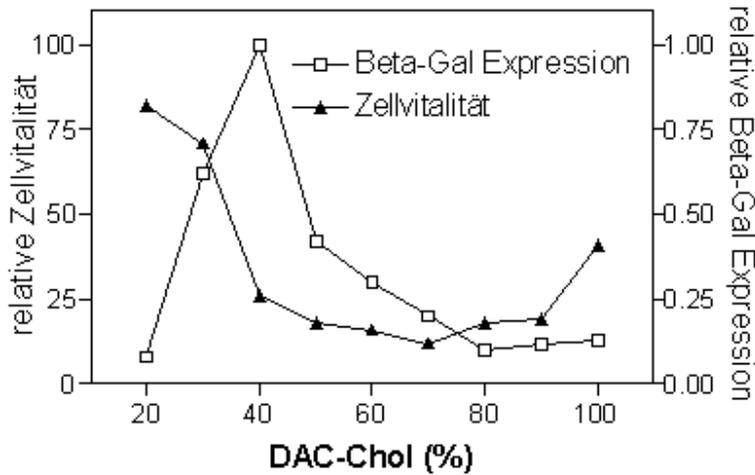


Abbildung 3.10: **Einfluß des Anteils DOPE-Anteils auf die Transfektion von F98-Zellen mit DAC-Chol-Liposomen.**

F98-Zellen in 96-Well Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DAC-Chol/DOPE-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 μg per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.3 μg per Well) transfiziert. Der Anteil an DAC-Chol in den Liposomen betrug 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte für β -Gal-Expression und Vitalität ($n=6$).

zeigt die Ergebnisse, die mit DCQ-Chol-Liposomen mit 25 und 50 % DCQ-Chol (w/w) erhalten wurden. Bei F98-Rattenglioblastomzellen waren Liposomen mit einem niedrigen Anteil an kationischem Lipid effektiver (Abb. 3.9A+B), während bei MaTu-Zellen (Abb. 3.9C+D), CC531-Zellen (Abb. 3.9E+F) und bei der Suspensionszelllinie K562 Liposomen mit höherem Anteil an kationischem Lipid besser transfizierten (nicht gezeigt). Außerdem kam es zu einer Verschiebung der optimalen Lipoplexkonzentration zu niedrigeren Werten, wenn eine größere Menge kationischen Lipides in den Lipoplexen vorhanden war. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Art des kationischen Lipides da ähnliche Ergebnisse auch mit DAC-Chol- und DC-Chol-Liposomen erzielt wurden.

In einer Reihe von weiteren Untersuchungen wurde versucht, die optimale Zusammensetzung von DAC-Chol-Liposomen für die Transfektion von F98-Zellen festzustellen. Dazu wurden Liposomen mit 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 100 % (w/w) kationischem Lipid hergestellt und die F98-Zellen mit jeweils 6 verschiedenen Lipid/DNA-Mischungen transfiziert. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.10 zeigen, war unter diesen Versuchsbedingungen ein Anteil des kationischen Lipides von 30-40 % optimal für die Transfektion der F98-Zellen. Bei einem Anteil von 20 % DAC-Chol war die Toxizität der Liposomen für die Zellen sehr gering, aber die Gentransferrate niedrig. Bei Liposomen mit ≥ 50 % DAC-Chol nahm dagegen die Toxizität der Lipoplexe zu und die Gentransferrate ab.

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt lassen schlußfolgern, daß bei dem Detergenz DDAB sowie bei den Cholesterolderivaten der Zusatz von DOPE in allen Fällen vorteilhaft für die Transfektion der untersuchten Zelllinien ist. Bei den Lipiden DOTMA

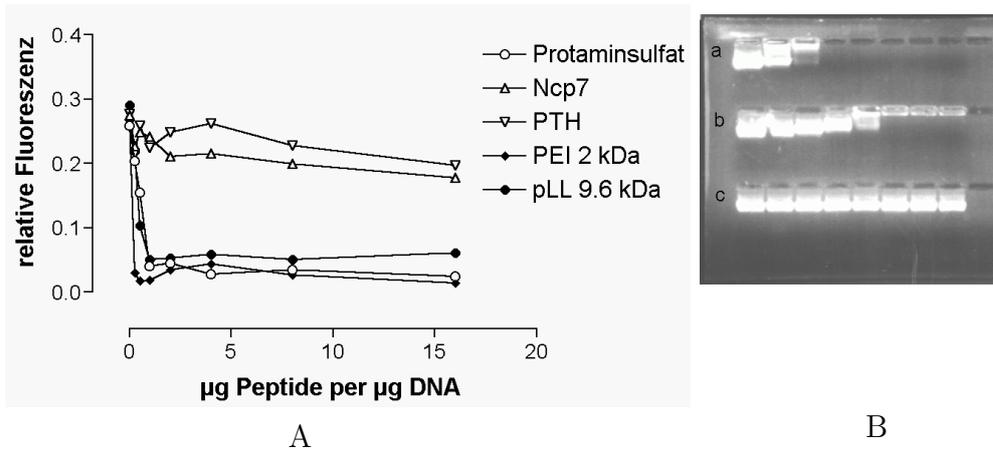


Abbildung 3.11: **Einfluß verschiedener Peptide auf die Fluoreszenz von DNA/EtBr-Komplexen bzw. auf die DNA-Mobilität im Agarose-Gel.**

Je Well einer 96er Zellkulturschale wurden $2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pUT651 in $50 \mu\text{l}$ Ringerlösung verdünnt. Anschließend wurden $0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16$ und $32 \mu\text{g}$ Peptid, verdünnt in $50 \mu\text{l}$ Ringerlösung zugesetzt. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz und die DNA-Mobilität im Agarose-Gel bestimmt.

A: Ergebnisse der EtBr-Fluoreszenzuntersuchungen

B: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese

a) Protaminsulfat/pUT651

b) Ncp7/pUT651

c) PTH/pUT651

mit jeweils $0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 \mu\text{g}$ Peptid/Protein je μg DNA.

und DOSGA führte das Helferlipid zu verbesserten Transfektionseigenschaften der Liposomen und bei den Cholesterolderivaten ist es Voraussetzung für die Generierung effektiver Gentransfervesikel. Das Optimum für das Mischungsverhältnis von kationischem Lipid und Helferlipid ist abhängig von der untersuchten Zelllinie. Die Versuchsergebnisse können deswegen nicht von einer Zelllinie auf eine andere übertragen werden.

3.2.3 Steigerung der Genexpression mit Hilfe kationischer Polymere

Ausgehend von den Untersuchungen Gao und Huang [54] werden zunehmend kationische Peptide, Proteine und Polymerverbindungen für die DNA-Komplexierung bei der Herstellung liposomaler Gentransferkomplexe eingesetzt [95, 138]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welches die optimalen Bedingungen für die Herstellung der Gentransfervesikel sind.

DNA-Bindung: Zu diesem Zwecke kamen Polyplexe, bestehend aus den Polykationen PLL, PS, Polyethylenimin (PEI), dem HIV-Kapsidprotein Ncp7 [171] oder dem neutralen Peptid Parathormon (PTH) sowie Plasmid-DNA zur Anwendung. Diese Komplexe wurden hinsichtlich ihrer Ladung in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht und die Stärke der DNA-Bindung mittels Bestimmung der DNA/EtBr-Fluoreszenz analysiert.

Wie die Abb. 3.11 zeigt, ist die Bindung der DNA durch Polykationen mit einer hohen positiven Ladung wie PS, PLL und PEI am stärksten. So war bei PLL und PS nach

Zugabe von 1 μg Polykation zu 1 μg Plasmid-DNA die DNA/EtBr-Fluoreszenz fast vollständig reduziert. Dagegen führte bei PEI bereits die Zugabe von 0.25 μg Polykation je μg DNA zu einem starken Abfall der Fluoreszenz. Ncp7 bewirkte demgegenüber nur eine schwache DNA-Bindung, d.h. nur einen geringen Abfall der Fluoreszenz und das neutrale PTH band die DNA überhaupt nicht.

PLL vs. PS: Im weiteren wurde neben den biophysikalischen Eigenschaften auch der Einfluß von PLL und PS auf die Transfektion von F98- und N64-Zellen untersucht. Dazu wurden eine konstante Menge an Plasmid-DNA mit steigenden Mengen an PS bzw. PLL komplexiert und anschließend unterschiedliche Mengen an DAC-30- bzw. DAC-40-Liposomen zugesetzt. Mit diesen Komplexen wurden danach F98- und N64-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 3.12A+B zu sehen ist, konnte durch die Komplexierung der Plasmid-DNA mit PLL oder PS in Abhängigkeit von der Lipidmenge bei F98-Zellen eine 2-3fache Steigerung der β -Gal-Expression erreicht werden. Bei Überschreiten eines PLL/DNA-Verhältnisses von 1 (Abb. 3.12B) kam es jedoch zu einem Abfall der Genexpression unter das Niveau, das ohne Vorkomplexierung mit PLL erreicht wurde. Im Vergleich dazu war der Abfall der Genexpression bei höheren Mengen an PS weniger ausgeprägt und die Genexpression blieb auch bei einem Zusatz von 16 μg PS je μg DNA über den Werten, die ohne die Zugabe von PS erreicht wurden. Bei der Zelllinie N64 war die Steigerung der Genexpression durch den Zusatz von PS höher als bei F98-Zellen. Es wurde eine mehr als 10fache Steigerung der Genexpression sowohl nach der Transfektion mit DAC-40- als auch mit DOTMA-50-Liposomen erzielt (Abb. 3.12C-F).

Neben PLL und PS wurden auch das retrovirale Kapsidprotein Ncp7 [171] sowie das neutrale PTH auf die Beeinflussung des Gentransfers untersucht. Es konnte im Falle von Ncp7 ebenfalls eine, allerdings wesentlich geringere, Steigerung der Genexpression erzielt werden. Diese nur niedrige Steigerung der Genexpression ist vermutlich auf die schwächere Komplexierung der DNA zurückzuführen zu (vgl. Abb. 3.11). Das neutrale, die DNA nicht bindende PTH beeinflusste hatte dagegen keinen Einfluß auf die Gentransferergebnisse.

Bei der Verwendung von PS konnte neben der höheren Reporterexpression auch eine etwas höhere Zellvitalität nach dem Gentransfer mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen festgestellt werden. Dies war nicht, wie von Sorgi und Mitarbeitern [138] postuliert, auf die für eine optimale Transfektion notwendige geringere Lipidkonzentration zurückzuführen. Auch bei gleichen Lipidkonzentrationen wurden etwas bessere Zellvitalitäten bestimmt. Da bei der Verwendung von PS die erreichte Genexpression geringfügig höher war als bei der Verwendung von PLL und es sich bei PS um eine klinisch zugelassene Substanz handelt, wurde in den weiteren Untersuchungen hauptsächlich PS für die Herstellung von Lipopolyplexen verwendet.

Komplexpräparation: Die Komplexierung der DNA durch das PS kann sowohl durch eine Vorinkubation der DNA mit dem Polykation als auch eines Liposomen/PS-Gemisches zur DNA erreicht werden. Es wurde untersucht, welches der beiden Verfahren günstiger für das Erreichen einer hohen Genexpression ist. Bei der Transfektion von F98- und N64-Zellen konnten etwa gleich hohe Genexpressionen mit beiden Verfahren erreicht werden. Wie aus der Abbildung 3.13 ersichtlich ist, wurde in beiden Fällen eine deutliche Erhöhung der Genexpression gegenüber Gentransferkomplexen, die ohne PS hergestellt worden waren, erreicht. Dabei war festzustellen, daß bei höheren Lipidkonzentrationen niedrige PS-Mengen und bei niedrigen Lipidmengen höhere PS-Mengen in

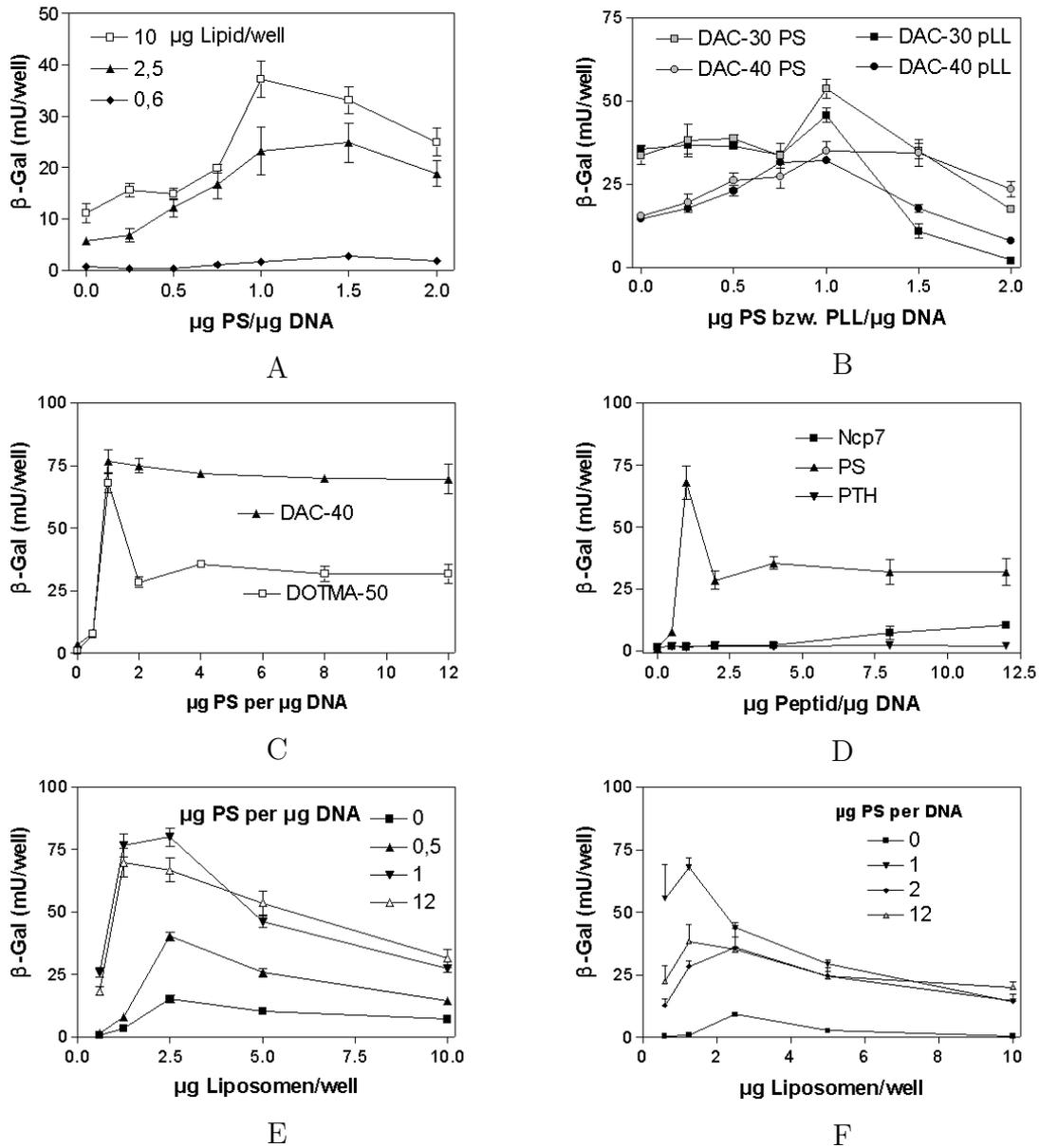


Abbildung 3.12: Einfluß von PS und PLL auf die Transfektion von F98- und N64-Zellen mit DAC-Chol- und DOTMA-Liposomen.

F98- und N64-Zellen in 96-Well-Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DOTMA-50, DAC-40 oder DAC-30-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.33 μg per Well) mit verschiedenen Mengen an PS bzw. PLL vorkomplexiert - transfiziert. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 % FKS (Abb. A+B) bzw. 10 % (Abb. C-F). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der β -Gal-Expression und der Zellvitalität ($n=3$, \pm SEM). Die Abb. zeigen:

A: Einfluß der Lipidkonzentration und der Menge an PS auf die Transfektion von F98-Zellen mit DAC-40-Liposomen. Ohne Lipid wurde keine Genexpression gemessen.

B: Vergleich von DAC-30 bzw. DAC-40-Liposomen (jeweils 5 μg Lipid) bei der Transfektion von F98-Zellen, bei DNA-Komplexierung mit PLL oder PS.

C: Einfluß von PS auf die Transfektion von N64-Zellen mit jeweils 1.25 μg DAC-40 oder DOTMA-50 Liposomen.

D: DOTMA-50-Ergebnisse mit verschiedenen Komplexierungsagentien (N64-Zellen).

E+F: Einfluß der Lipidkonzentration (E: DAC-40, F: DOTMA-50) und der PS-Menge auf die Transfektion von N64-Zellen.

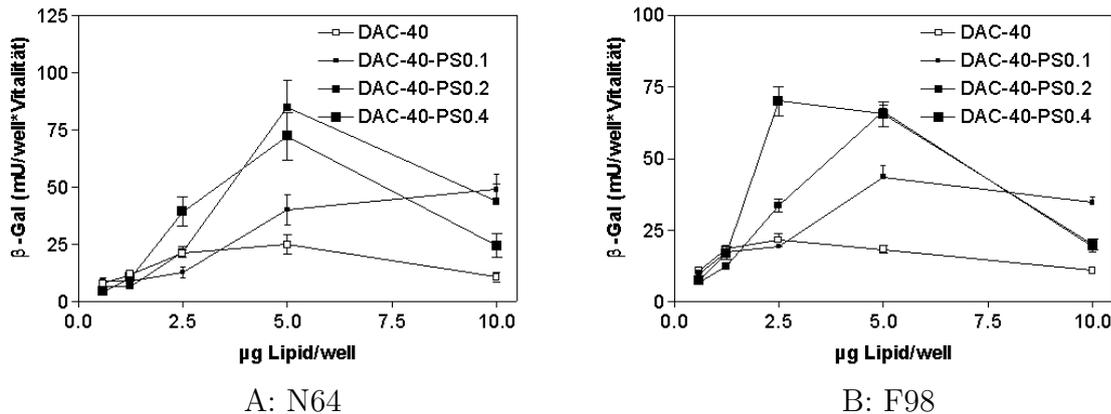


Abbildung 3.13: **Transfektion mit DAC-40/PS-Formulierungen**

Die Zellen wurden mit Gentransfersvesikeln bestehend aus DAC-40-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg per Well), PS und der Plasmid-DNA pUT651 (0.33 μg per Well) transfiziert. Dabei wurden je 0, 0.1, 0.2 oder 0.4 mg PS zu je 1 mg DAC-40-Liposomen zugesetzt*. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 % FKS. Nach 4 h wurde das Medium von den Zellen entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen anschließend für weitere 48 h bis zur Bestimmung von Vitalität und β -Gal-Expression kultiviert.

A: Einfluß des PS auf die Transfektion von N64-Zellen

B: Einfluß des PS auf die Transfektion von F98-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der β -Gal-Expression, normalisiert mit der entsprechenden Zellvitalität für 3 Einzelbestimmungen (\pm SD).

* Es bedeutet z.B. DAC-40-PS0.2 = 0.2 mg PS je mg DAC-40.

der liposomalen Formulierung notwendig waren um die Gentransfereffizienz zu steigern. Die jeweils benötigte Menge an PS je DNA blieb also etwa konstant.

Da die Transfektion von Suspensionszellen besonderes problematisch ist, sollte außerdem der Gentransfer in humane Erythroleukämiezellen der Linie K562 untersucht werden. Unsere Transfektionsexperimente mit diesen Zellen zeigen, daß Lipoplexe hergestellt aus DAC-Chol-Liposomen, PS und Plasmid-DNA auch für den Gentransfer in Suspensionszellen geeignet sind (Abb. 3.14). So betrug die Transfektionsrate der Zellen mit DAC-30-Liposomen und pEGFPC1-Plasmid-DNA, vorkomplexiert mit Protaminsulfat, etwa 15 %. Es wurde nachgewiesen, daß bei der Transfektion von Suspensionszellen wesentlich größere Zellzahlen je eingesetzter Lipoplexmenge erforderlich sind als bei der Transfektion von adhären Zellen. So mußten zur Transfektion der K562-Zellen etwa 100.000 Zellen statt der 10-20.000 bei adhären Zellen in den 96-Well-Zellkultur-schalen ausplattiert und transfiziert werden. Bei niedrigeren Zellzahlen traten toxische Effekte der Lipoplexe auf welche sich in einer verringerten Reportergenexpression niederschlugen. Wie Transfektionsexperimente mit anderen Suspensionszelllinien zeigten, gibt es große Unterschiede in der Transfizierbarkeit der verschiedenen Suspensionzelllinien: Es konnte z.B. eine hohe Reportergenexpression bei der T-Zelllinie Jurkat, eine nur niedrige bei einer B-Zelllinie aber keine bei den humanen monozytären Zellen der Linie HL-60 erreicht werden.

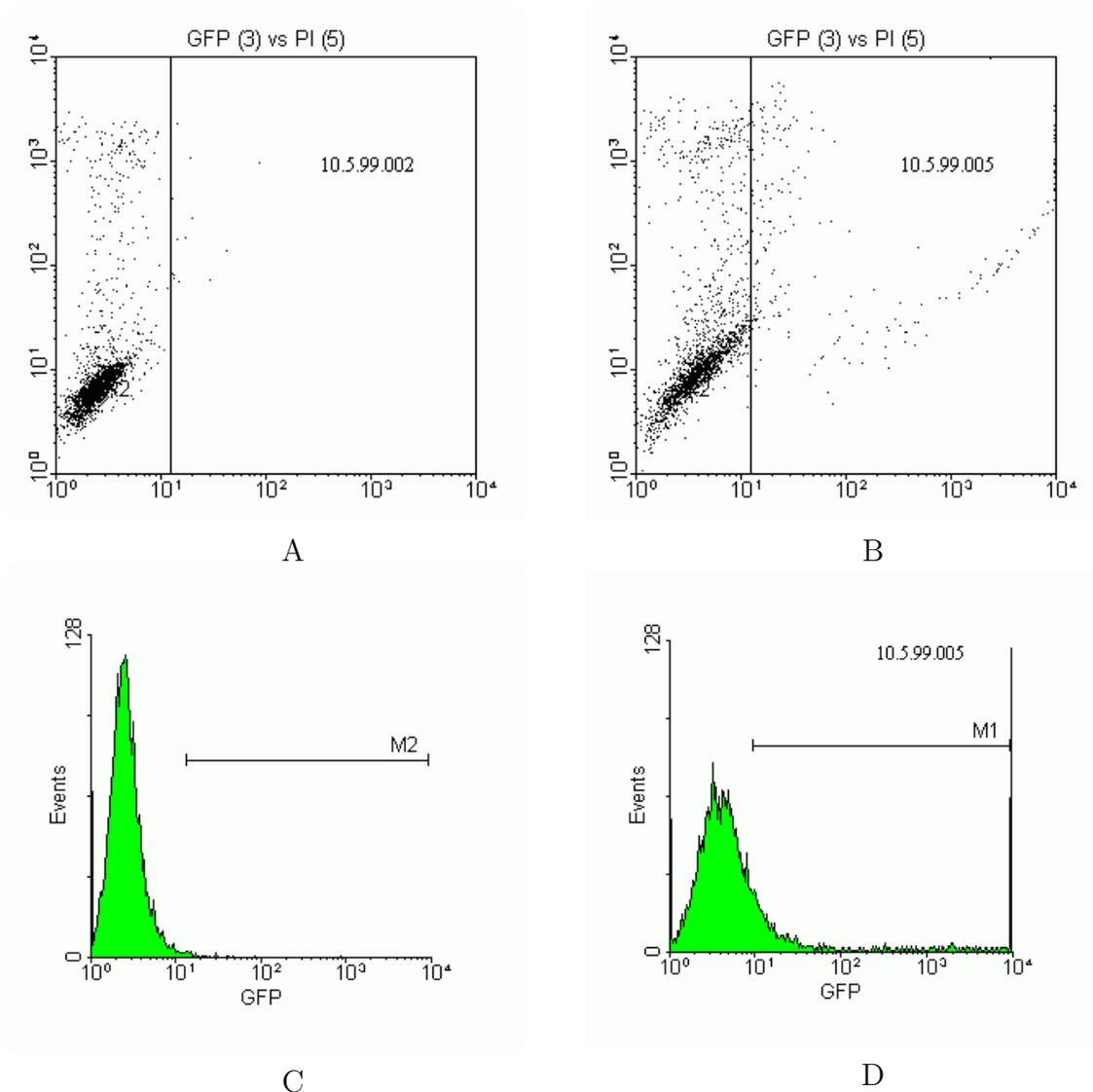


Abbildung 3.14: **FACS-Analyse von GFP-transfizierten K562-Zellen**

K562-Zellen wurden mit DAC-30/PS/pEGFPC1-Komplexen transfiziert und nach 72 h wurden Reporterexpression und Zellvitalität mit Hilfe eines Becton-Dickenson FACS-Scans analysiert.

A: DOT-Plot der Reporterexpression (x-Achse) vs. PI-Aufnahme (y-Achse) als Maß für die Toxizität der Kontrollzellen.

B: DOT-Plot der Reporterexpression (x-Achse) vs. PI-Aufnahme (y-Achse) als Maß für die Toxizität der transfizierten Zellen.

C: Histogramm der GFP-Expression für die Kontrollzellen (M2=0.8 %).

D: Histogramm der GFP-Expression für die transfizierten Zellen (M1=15 %).

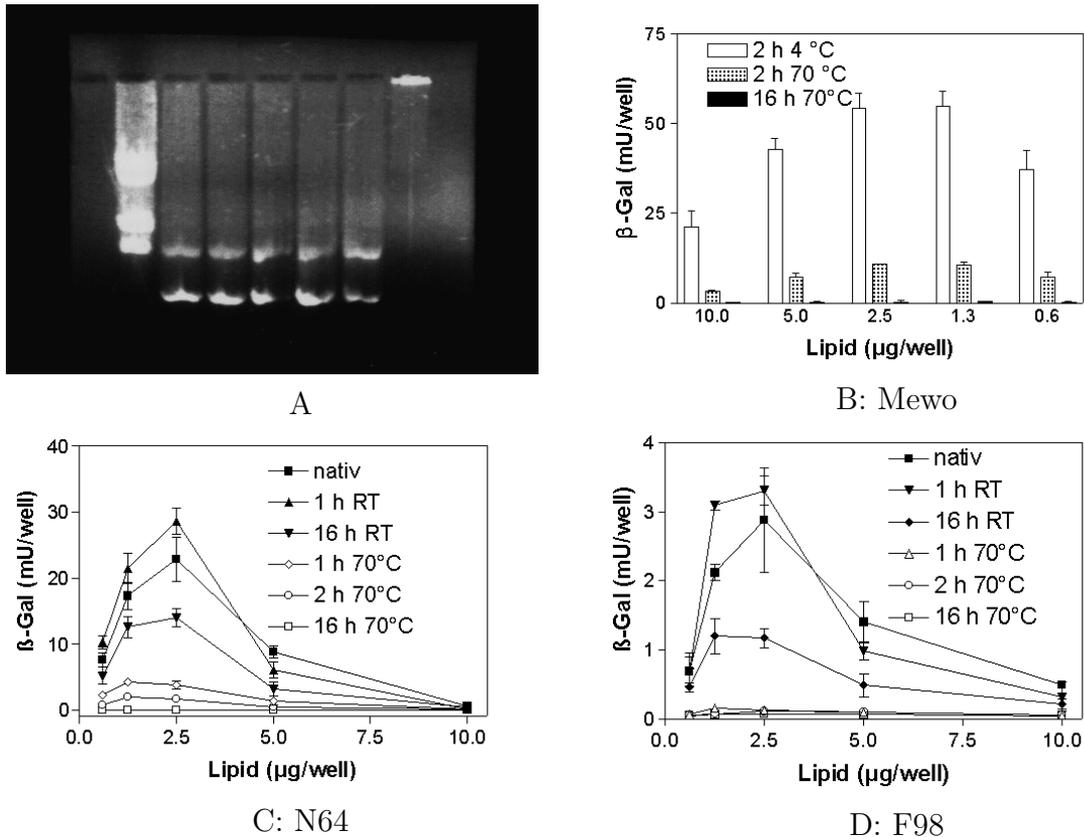


Abbildung 3.15: Einfluß der DNA-Qualität auf die Reporterexpression

Die Plasmid-DNA pUT651 wurde für 1 bis 16 h bei RT bzw. bei 70 °C inkubiert. F98 und Mewo-Zellen wurden dann mit Lipoplexen, hergestellt aus 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 µg Lipid sowie 0.25 µg von dieser DNA, transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Einzelbestimmungen für Vitalität und Reporterexpression (\pm SD).

A: Ergebniss der Agarose-Gelelektrophorese (von links nach rechts)

Bahn 1: Marker λ -DNA Hind-III-verdaut

Bahn 2: Plasmid-DNA pUT651 nativ

Bahn 3: Plasmid-DNA pUT651 nach 1 h Inkubation bei RT

Bahn 4: Plasmid-DNA pUT651 nach 16 h Inkubation bei RT

Bahn 5: Plasmid-DNA pUT651 nach 1 h Inkubation bei 70 °C

Bahn 6: Plasmid-DNA pUT651 nach 2 h Inkubation bei 70 °C

Bahn 7: Plasmid-DNA pUT651 nach 16 h Inkubation bei 70 °C

B: β -Gal-Expression von Mewo-Zellen nach Transfektion mit DAC-30-Liposomen

C: β -Gal-Expression von N64-Zellen nach Transfektion mit dem Max2-Lipid

D: β -Gal-Expression von F98-Zellen nach Transfektion mit dem Max2-Lipid

3.2.4 Einfluß der Qualität der Plasmid-DNA

Die DNA ist der wirksame Bestandteil des Gentransfervesikels, dessen Applikations in die Zelle das eigentliche Ziel der Transfektion ist. In diesem Abschnitt sollte deswegen untersucht werden, welchen Einfluß die DNA-Qualität auf das Transfektionsverfahren bzw. auf die Reporterexpression hat.

Nach der Präparation wurde die Qualität der Plasmid-DNA durch eine Restriktionsspaltung mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und auf ihre Iden-

tität sowie den Anteil an superhelikaler Plasmid-DNA untersucht. Die Kontrolle des Anteils an superhelikaler DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese ergab einen Anteil von über 90 %. Um den Einfluß der DNA-Qualität auf die zu erreichende Genexpression zu untersuchen, wurde die DNA für 1, 2 oder 16 h bei RT, bzw. für 1, 2 oder 16 h bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe bzw. ihrer Konformation aufgetrennt.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.15A zeigen, konnte anhand der Gelelektrophorese keinerlei Veränderung der DNA-Struktur festgestellt werden. Lediglich bei einer Übernachtinkubation der Plasmid-DNA war ein Gelieren der DNA und eine Immobilisierung im Agarose-Gel festzustellen. Die DNA, die für 2 h bei 70°C inkubiert worden war, unterschied sich hinsichtlich ihres Laufverhaltens im Agarosegel kaum von der Ausgangs-DNA.

Trotz des gleichen Trennungsmusters der verschiedenen DNA-Proben im Agarose-Gel zeigten die Ergebnisse der Transfektionsversuche, daß sich die Reporterexpression in Abhängigkeit von der Länge der Inkubation und der Höhe der Inkubationstemperatur, stark unterscheidet. So nahm bei einer Inkubation der DNA bei RT die Reporterexpression langsam ab und betrug nach 16 h nur noch etwa 1/3 der Expression, die mit der originalen, unbehandelten Plasmid-DNA erreicht wurde. Bei einer 70°C-Inkubation war die Abnahme der β -Gal-Expression noch stärker. Bereits nach 1 h sank sie auf unter 10 % im Vergleich zur Reporterexpression der Kontroll-DNA und nach einer 2 h-Inkubation war fast keine Reporterexpression in den Zellen mehr nachweisbar.

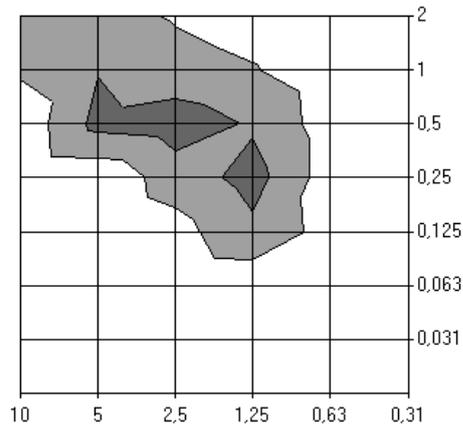
Die Inkubation der DNA bei RT bzw. bei 70°C führt offenbar zu strukturellen Veränderungen, welche mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nicht nachweisbar sind. Diese Veränderungen wirkten sich jedoch stark auf die Reporterexpression aus.

3.2.5 Einfluß des Lipid/DNA-Verhältnisses

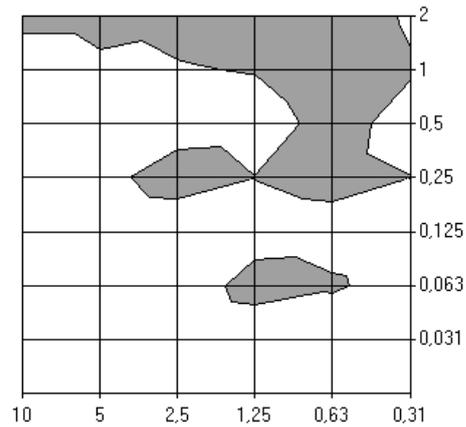
Wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, ist für die Gentransfereffizienz neben der Menge an Lipid und DNA auch das Mischungsverhältnis beider Komponenten von Bedeutung. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden F98, MaTu und CC531-Zellen mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μ g Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μ g DNA transfiziert. Als Liposomen wurden dabei DOCSPER-100, DOCSPER-75, DOCSPER-50 und DOCSPER-25 sowie DAC-50, DAC-25, DC-50 und DC-25-Liposomen verwandt.

Bei den Ergebnissen war festzustellen, daß sich das optimale L/D-Verhältnis in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, der chemischen Struktur des kationischen Lipides, der Dauer der Inkubation und der Menge an Helferlipid unterschied. Bei Liposomen mit polykationischen Lipiden wie DOCSPER-100, war außerdem das verwendete Medium von großer Bedeutung für eine optimale Lipoplex-Formulierung. So war der Bereich wirksamer L/D-Verhältnisse bei Medien ohne Natriumbicarbonatzusatz wesentlich kleiner als bei Medien, die diese Puffersubstanz enthielten. Auf diese Untersuchungen wird in einem späteren Teil der Arbeit noch ausführlich eingegangen werden.

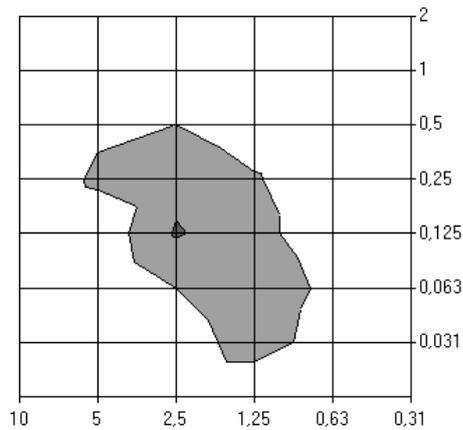
Bei der Transfektion von CC531- und MaTu-Zellen ließ sich zum Beispiel feststellen, daß bei Liposomen mit einem niedrigem Anteil an Helferlipid das optimale L/D-Verhältnis größer war als bei Liposomen mit einem hohem Helferlipidanteil (Abb. 3.16).



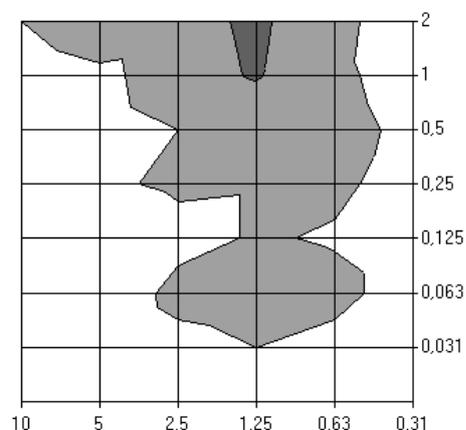
A: DC-25/CC531



B: DC-50/CC531



C: DC-25/MaTu



D: DC-50/MaTu

Abbildung 3.16: **Einfluß des L/D-Verhältnisses auf den Gentransfer mit DC-Chol-Liposomen**

MaTu- und CC531-Zellen wurden mit Lipoplexen bestehend aus 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 oder 0.3 μg Lipid und 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 und 0.03 μg DNA transfiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der β -Gal-Expressionen für DC-25 und DC-50-Liposomen. Die Mengen an DNA sind auf der y-Achse, die Menge an Liposomen auf der x-Achse aufgetragen. Dunkelgrau sind Bereiche von 66-100 %, hellgrau Bereiche von 33-66 % und weiß Bereiche <33 % der maximalen Genexpression dargestellt.

So betrug bei DC-25-Liposomen dieses L/D-Verhältnis bei der Transfektion von CC531-Zellen etwa 5:1 bis 10:1, während es bei DC-50-Liposomen zu niedrigeren Verhältnissen von etwa 2:1 bis 1:1 verschoben war. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Transfektion von MaTu-Zellen und auch mit den anderen Liposomen erzielt.

Wie die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, kann neben dem Zusatz von PS auch ein höherer Anteil des kationischen Lipides in den Liposomen zu einer Verschiebung des optimalen L/D-Verhältnisses zu niedrigeren Werten führen. Dieses Verhältnis ist aber außerdem von Einflußfaktoren wie der Art des verwendeten Lipides, der transfizierten Zelllinie, dem verwendeten Komplexierungsmedium oder der Inkubationszeit abhängig.

3.2.6 Einfluß des Komplexierungsmediums

Die enorm schwankenden Ergebnisse, die mit dem kommerziell erhältlichen kationischem Lipid DOSPERTM und den von uns hergestellten DOCSPER-Liposomen bei der Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien für die Herstellung der Lipoplexe erzielt wurden, warfen die Frage nach dem Einfluß der Zusammensetzung des Mediums auf die Effektivität der Lipoplexbildung auf. Da Untersuchungen in ausreichendem Umfang mit DOSPERTM nicht durchführbar waren, wurde hierzu das chemisch verwandte Lipid DOCSPER verwendet. Dieses enthält nur drei mögliche positive Ladungen statt der vier bei DOSPERTM, zeigte jedoch vergleichbare oder etwas höhere Transfektionsraten.

In einer ersten Versuchsreihe wurden Lipoplexe aus DOCSPER-100-Liposomen und der Plasmid-DNA pUT651 in Medien mit unterschiedlicher Ionenstärke von 0 bis 200 mM NaCl oder in DMEM hergestellt. Bei den Lipoplexen wurden sowohl Lichtstreuung, EtBr-Ausschluß, Wanderungsverhalten im Agarose-Gel und Transfektionseigenschaften untersucht.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.17 zeigen, nahm bei DOCSPER-100-Liposomen mit zunehmender NaCl-Konzentration sowohl die Trübung der Lipoplexe als auch die β -Gal-Expression zu. Insbesondere verbreiterte sich die Spannweite geeigneter L/D-Verhältnisse bei der Erhöhung der Ionenkonzentration. Wurden dagegen DOCSPER-50 Liposomen verwendet, war der Einfluß des Komplexierungsmediums weniger drastisch. Noch besser geeignet für die Generierung effizienter Gentransferkomplexe als 200 mM NaCl erwies sich das Zellkulturmedium DMEM. Wie die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese und des EtBr-Ausschlusses zeigten, kam es in diesem Medium zu einer verringerten Bindung der DNA an die Liposomen. Den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach zu urteilen veränderten sich die Liposomen in Abhängigkeit von dem Medium in dem sie verdünnt wurden (Abb. 3.18). So wurden in Wasser sehr kleine Liposomen beobachtet, während es in DMEM offenbar in Folge von elektrostatischen und osmotischen Veränderungen zu einer erheblichen Vergrößerung der Liposomen kam.

Da es sich bei DMEM-Medium um ein sehr komplexes Gemisch von verschiedenen Komponenten wie Salzen, Aminosäuren, Vitaminen, Glukose und Puffersubstanzen handelt, wurde im weiteren untersucht, welche Bestandteile des Mediums für die verbesserten Gentransfereigenschaften und die verringerte Bindung der DNA an die Liposomen verantwortlich sind.

Dazu wurden DOCSPER/DNA-Lipoplexe in Wasser, Ringerlösung oder in NaCl/Bicarbonatlösung hergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die Größe der in Bicar-

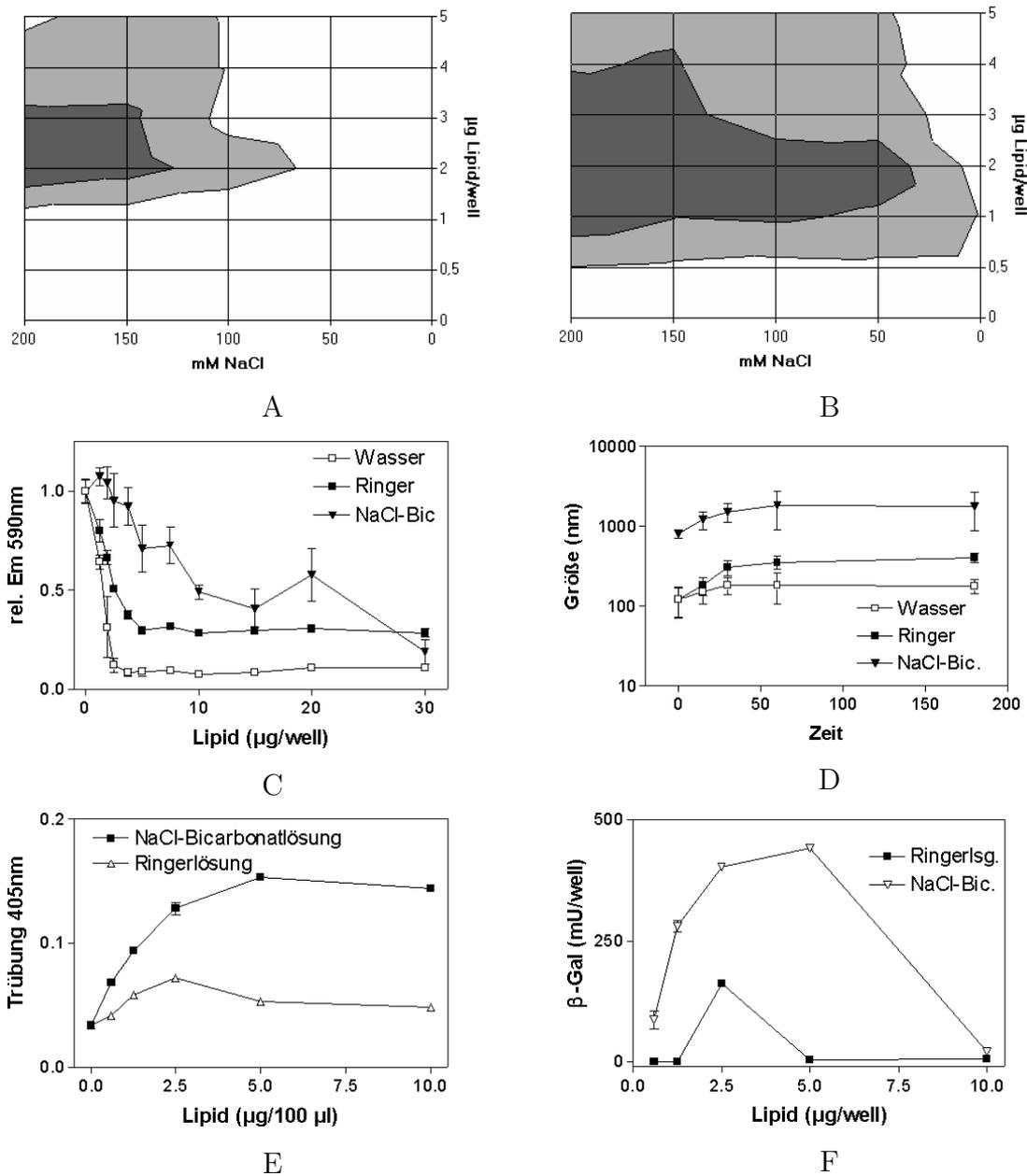


Abbildung 3.17: Einfluß des Mediums auf die biophysikalischen Eigenschaften und die Transfektion mit DOCSPER-100/DNA-Lipoplexen.

A: Relative Streuung von Lipoplexen, hergestellt aus DOCSPER-100-Liposomen und der Plasmid-DNA pUT651 in Medien mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Bereiche hoher Lichtstreuung sind dunkel, Bereiche niedriger Lichtstreuung hell dargestellt. Die Lichtstreuung wurde auf die Menge an Lipid normalisiert.

B: Relative Werte der β -Gal-Expressionen dieser Lipoplexe bei Transfektion von F98-Zellen.

C: EtBr-Ausschluß bei DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen in Abhängigkeit von dem verwendeten Komplexierungsmedium. 3 μ g DNA wurden mit unterschiedlichen Mengen an DOCSPER-100-Liposomen komplexiert. Nach etwa 10 min wurde die EtBr/DNA-Fluoreszenz bestimmt.

D: Ergebnisse der Größenbestimmung von DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen, bestehend aus 100 μ g DOCSPER und 10 μ g DNA, hergestellt in verschiedenen Komplexierungsmedien.

E: Relative Lichtstreuung von DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexen mit 0.33 μ g Plasmid-DNA und 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μ g Lipid je 100 μ g Medium. Die Lipoplexe wurden in Ringerlösung oder in 150 mM NaCl mit 20 mM Bicarbonat hergestellt.

F: β -Gal-Expression der entsprechenden DOCSPER-100/pUT651-Lipoplexe 48 h nach der Transfektion von F98-Zellen.

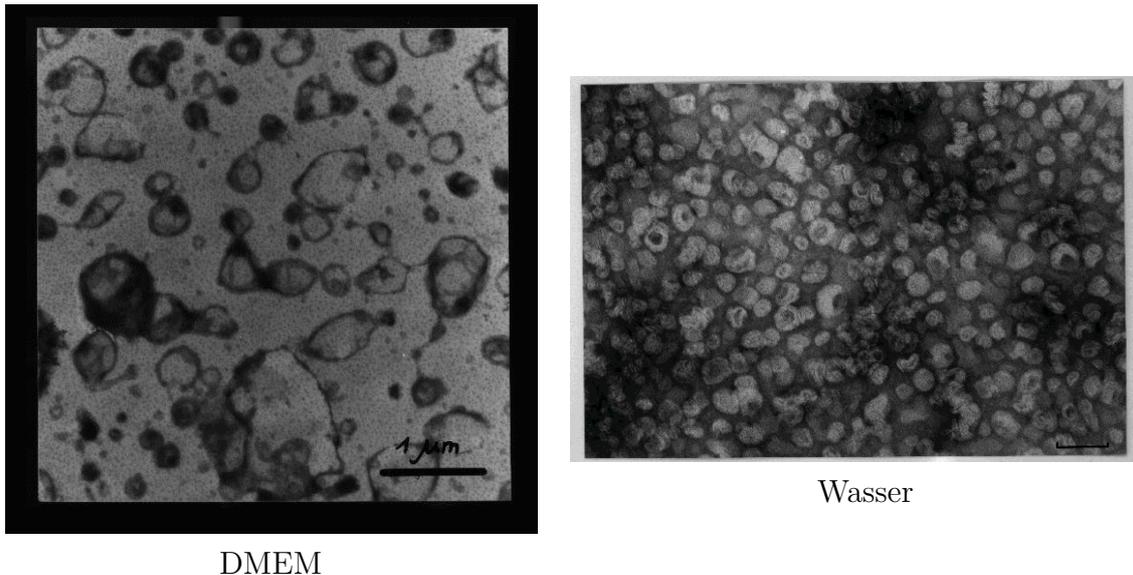


Abbildung 3.18: **Einfluß des Mediums auf Größe und Beschaffenheit von DOCSPER-100-Liposomen**

DOCSPER-100-Liposomen wurden in DMEM oder in Wasser verdünnt und mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Ein Balken entspricht 1000 (links) bzw. 100 nm.

bonatmedium formulierten Lipoplexe gegenüber in Wasser oder in Ringerlösung hergestellten, zunahm und das die DOCSPER-100/DNA-Bindung in Bicarbonatlösung schwächer wurde (Abb. 3.17C-E). Weiterhin konnte durch den Zusatz des Bicarbonats die Transfektionsrate erheblich erhöht werden. Dabei war festzustellen, daß sich das relativ schmale Fenster des optimalen L/D-Verhältnisses, bei dem die Lipoplexe gentransferaktiv sind, verbreiterte (Abb. 3.17F). Im Gegensatz zu DOCSPER- und auch zu LipofectAMINETM-Liposomen war bei monokationischen Liposomen, die das Helferlipid DOPE enthielten, wie z.B. bei LipofectinTM, keine Steigerung sondern teilweise sogar eine Verminderung der Genexpression zu beobachten, wenn die Lipoplexe in bicarbonathaltigem Medium hergestellt wurden (vgl. Abb. 3.19).

Es ist festzustellen, daß das Medium, in dem die Herstellung der Gentransfervesikel erfolgt, einen sehr großen Einfluß auf das Erscheinungsbild und die Effizienz der Vesikel hat. Für Liposomen, die aus polykationischen Lipiden hergestellt werden, ist die Verwendung von bicarbonathaltigen Medien wie DMEM oder NaCl-Lösung mit Bicarbonat günstig für das Erreichen hoher Gentransfereffizienzen in *in vitro* Untersuchungen. Dagegen war bei Liposomen die aus monokationischen Lipiden formuliert worden waren, eher ein hemmender Einfluß des Bicarbonats auf die Gentransfereffizienz festzustellen.

3.2.7 Einfluß der Komplexbildungszeit auf die Stabilität der Vesikel

Für eine klinisch sichere Anwendung von kationischen Liposomen ist die zeitliche Stabilität der hergestellten Gentransfervesikel von besonderer Bedeutung. Deswegen wurden Untersuchungen zu Stabilität, Lagerbarkeit und zum Einfrieren bzw. Lyophilisieren der Komplexe durchgeführt.

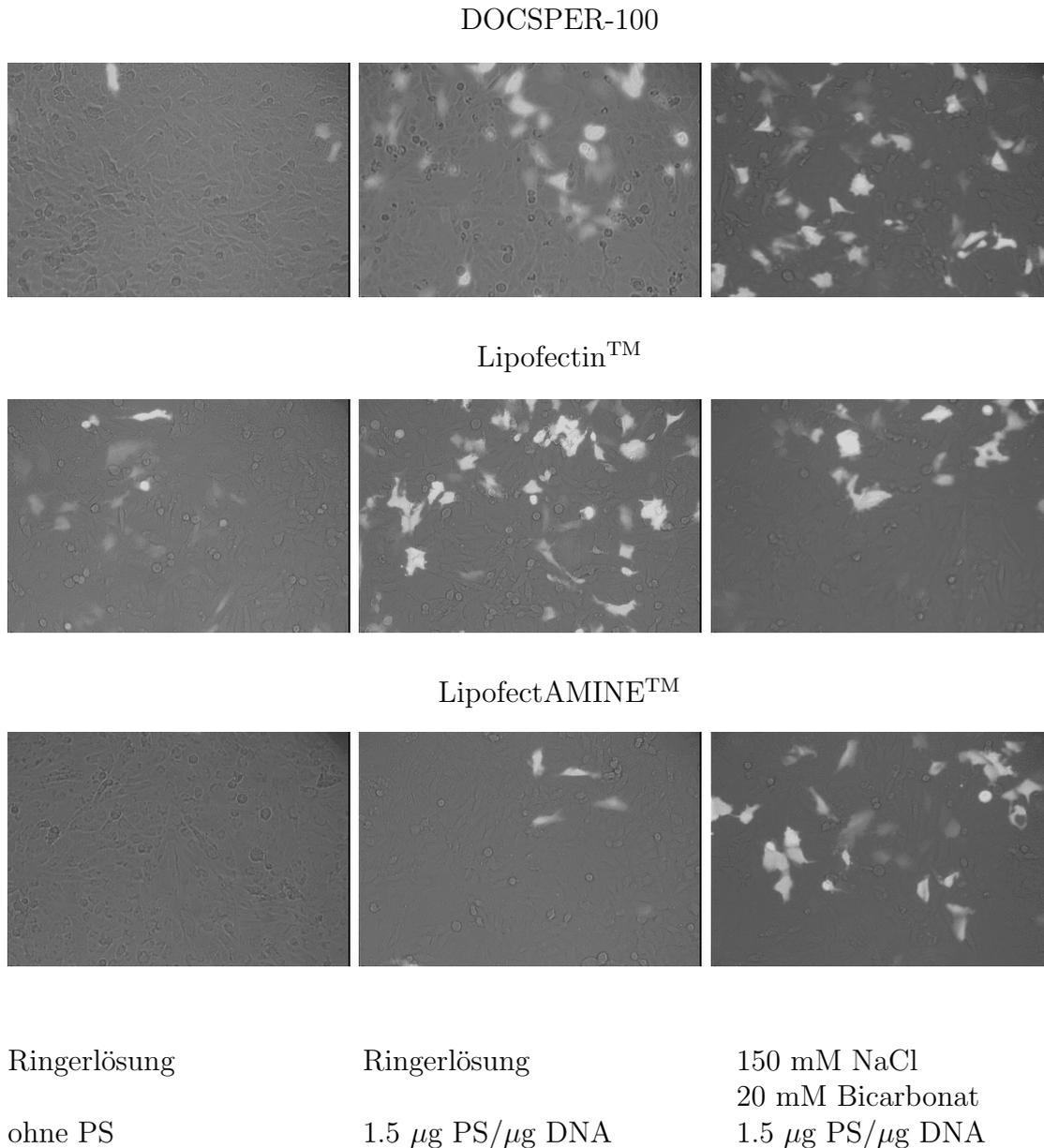


Abbildung 3.19: Einfluß von Medium und PS auf die Effizienz der Lipoplexherstellung

Transfiziert wurden N64-Zellen mit Lipoplexen, hergestellt aus 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 µg Lipid sowie 0.3 µg DNA (1/5 pEGFPC1, 4/5 pUT651) - teilweise vorkomplexiert mit 1.5 µg PS je µg DNA. Die Lipoplexe wurden in 100 µl Ringerlösung bzw. 150 mM NaCl mit 20 mM Bicarbonat hergestellt, die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 %. 4 h nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurde frisches Medium hinzugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes auf die Expression des GFP's untersucht. Dargestellt sind die Wells mit der für das jeweilige Lipid maximalen Anzahl transfizierter Zellen.

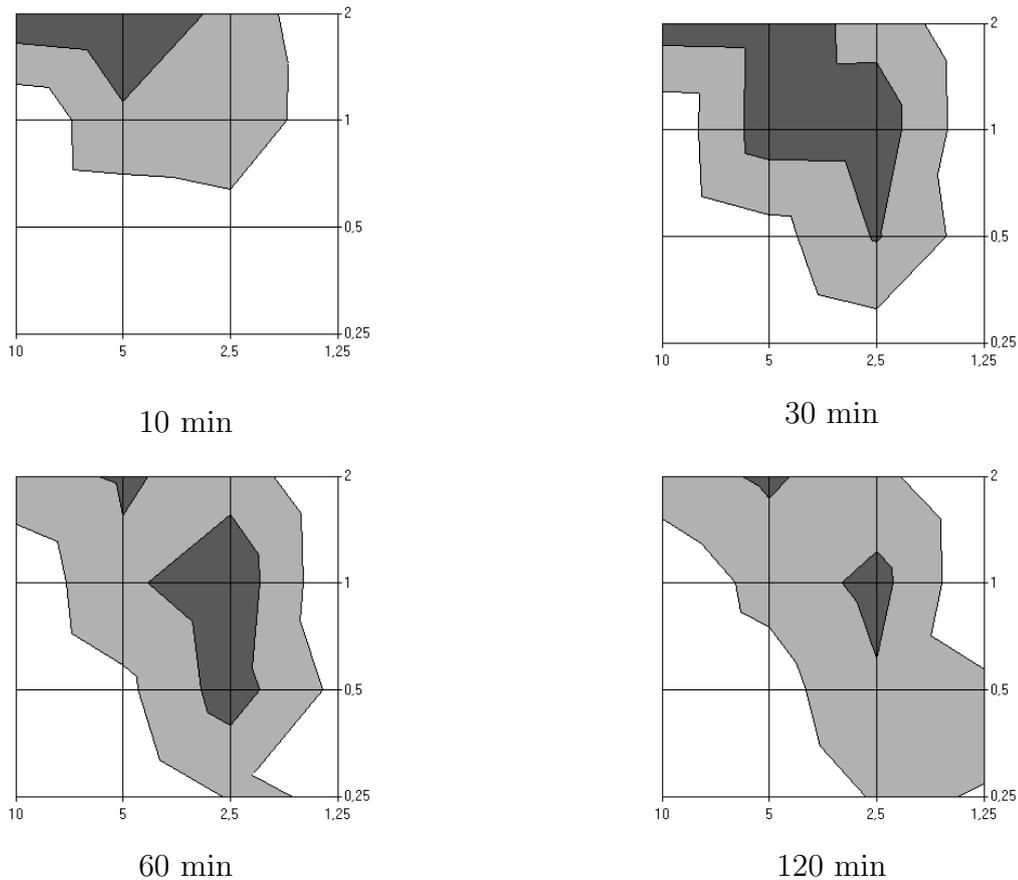


Abbildung 3.20: **Einfluß der Komplexbildungszeit auf den Gentransfer mit DOCSPER-50-Liposomen**

DOCSPER-50/pUT651-DNA-Lipoplexe wurden in 100 µl serumfreiem DMEM-Medium hergestellt. Die Liposomenmengen betragen 10, 5, 2,5 und 1,25 µg, die DNA-Mengen betragen 2, 1, 0,5 und 0,25 µg. Nach 10, 30, 60 und 120 min wurden die Lipoplexe auf MaTu-Zellen pipettiert und für 4 h zur Transfektion auf den Zellen belassen. Anschließend erfolgte die Zugabe frischen Zellkulturmediums und nach weiteren 44 h die Bestimmung der Reportergenexpression.

Lipoplexe, hergestellt aus unterschiedlichen Mengen an DOCSPER-50- und DOCSPER-100-Liposomen sowie Plasmid-DNA, wurden 10, 30, 60 und 120 min nach dem Mischen der Einzelkomponenten auf die Zellen gegeben. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluß der Komplexkonzentration auf die Vesikelstabilität. Höher konzentrierte Komplexe mit 100 µg Lipid und 20 µg DNA erreichten schon nach 10 Minuten Inkubation ihre maximale Gentransferaktivität, wogegen weniger konzentrierte Lipoplexe diese erst später erreichten (vgl. Abb. 3.20). Dagegen nahm die Transfereffizienz der höher konzentrierten Lipoplexe nach 60 min schon wieder leicht ab. Auch bei Sp-Chol-Liposomen nahm die Gentransferaktivität der aus ihnen hergestellten Lipoplexe nach etwa 30 min Inkubation langsam ab, während monokationische Lipide wie DOTMA und DAC-Chol Komplexe ausbildeten die über längere Zeit stabil blieben (vgl. Abb. 3.21).

DAC-Chol wurde wegen der guten Kurzzeitstabilität der mit diesem Lipid hergestellten Lipoplexe als Modell-Lipid für die Präparation langfristig stabiler, hochkonzentrierter Lipoplexe ausgewählt. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität, wurden

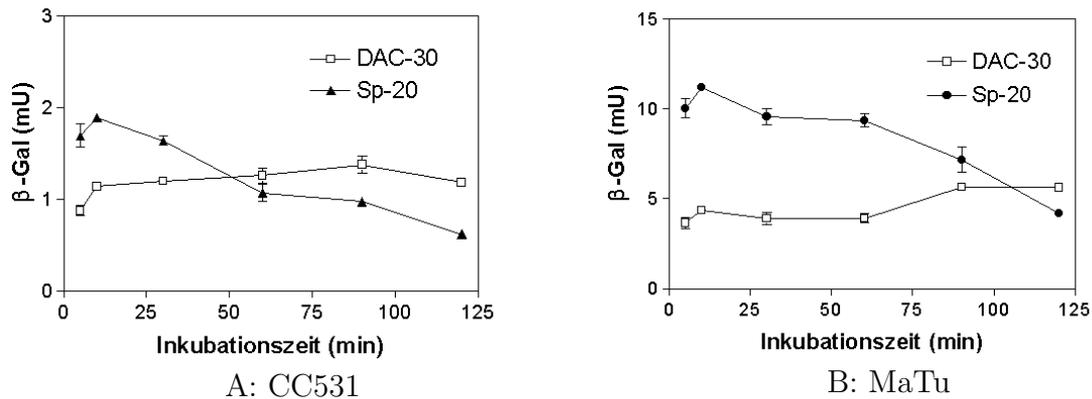


Abbildung 3.21: **Kurzzeitstabilität von DAC-30/pUT651- und Sp-20/pUT651-Komplexen.**

50.000 CC531 und MaTu-Zellen je 24-Well Schale, in 500 μ l Medium kultiviert, wurden mit Lipoplexen bestehend aus 10 μ g Lipid und 2 μ g Plasmid-DNA pUT651, hergestellt in 100 μ l Opti-MEM-Medium, nach 5, 10, 30, 60 und 120 min Inkubation transfiziert. 44 h nach der Zugabe der Lipoplexe wurden die Zellen auf ihre β -Gal Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen (\pm SD).

unterschiedliche Mengen an DAC-Chol-Liposomen, mit oder ohne PS-Zusatz, mit verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA pUT651 in Ringerlösung komplexiert. 1, 24, 48 und 72 h nach der Herstellung wurden mit diesen Lipoplexen F98 und N64-Zellen transfiziert. Wie die Abbildung 3.22 zeigt, sank die Transferaktivität der Vesikel bei der Rattenglioblastomzelllinie F98 schneller als bei der humanen Glioblastomzelllinie N64 ab. Nach 72 h Komplexinkubation betrug die Gentransfereffektivität bei der N64-Zelllinie noch etwa 50 % der Ausgangsaktivität, während es bei der F98-Zelllinie nur noch etwa 1/3 bei DAC-40/DNA-Lipoplexen bzw. weniger als 10 % bei DAC-40/PS/DNA-Komplexen waren. Bei den DAC-40/DNA-Lipoplexen war schon nach wenigen Stunden das Auftreten von kleineren Präzipitaten zu beobachten. Im Gegensatz dazu traten Präzipitate bei Komplexen die mit PS hergestellt worden waren, erst nach mehr als 24 h auf. Diese Präzipitate und die Uneinheitlichkeit der Lipoplexe in Größe und Struktur führten häufig zu stark schwankenden Ergebnissen bei der Transfektion bzw. bei der Reportergenexpression.

Die geringere Präzipitatbildung der Gentransferkomplexe, die mit PS hergestellt worden waren, führte offenbar auch zu einer verlängerten Transferfähigkeit der Vesikel. So verloren bei Untersuchungen zur Stabilität von DAC-40/DNA- und DAC-40/PS/DNA-Komplexen letztere nach Inkubation bei 37°C in einem Zeitraum von 72 h nur etwa 50 % ihrer Gentransferaktivität (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu sank bei DAC-40/DNA-Komplexen, die ohne PS hergestellt worden waren, die Gentransferaktivität von einem niedrigeren Ausgangsniveau ausgehend wesentlich stärker ab.

Es wurde weiterhin versucht durch die Variation der Mediumbeschaffenheit eine längere Stabilität der Lipoplexe zu erreichen. Wie die Ergebnisse der PCS-Messungen im Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt haben, waren die in Saccharose gebildeten Gentransferkomplexe besonders stabil und veränderten ihre Größe auch über einen Zeitraum von 48 h kaum. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.23 zeigen, waren aber in Ringerlösung hergestellte Lipoplexe wesentlich gentransferaktiver als Komplexe, die in Saccharose-Lösung oder Wasser hergestellt worden waren. Komplexe, die in Mischungen aus Rin-

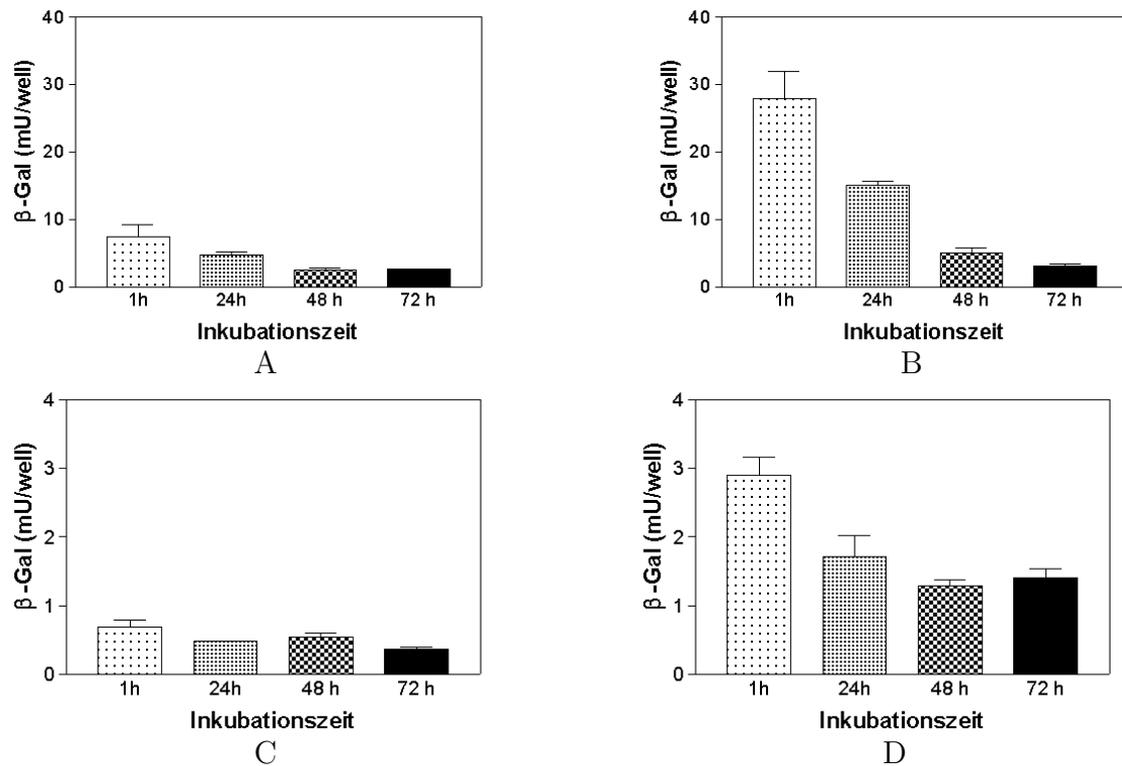


Abbildung 3.22: Langzeitstabilität von DAC-40/DNA und DAC-40/PS/DNA-Komplexen

In einem Glasröhrchen wurden Lipoplexe in einem Volumen von 3 ml Ringerlösung, bestehend aus 100 μg DAC-40-Liposomen mit oder ohne 20 μg PS und 20 μg pUT651-Plasmid-DNA hergestellt. Nach 1, 24, 48 und 72 h wurden 50 μl der Komplexe auf F98- und N64-Zellen in ein Well einer 96er Zellkulturplatte pipettiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach 72 h wurde die Reporterexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 3 Bestimmungen (\pm SD) für:

- A: F98-Zellen transfiziert mit DAC-40/DNA-Komplexen
- B: F98-Zellen transfiziert mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen
- C: N64-Zellen transfiziert mit DAC-40/DNA-Komplexen
- D: N64-Zellen transfiziert mit DAC-40/PS/DNA-Komplexen.

gerlösung und Saccharose-Lösung oder Wasser hergestellt worden waren, waren nur etwas weniger gentransferaktiv als die in 100 % Ringerlösung hergestellten Vesikel. Wie Untersuchungen zur Lyophilisierbarkeit der fertig formulierten Gentransfervesikel zeigten, war für eine Langzeitlagerung der Zusatz von mindestens 2 % Saccharose notwendig um beim Wiederauflösen ein Präzipitieren der Komplexe zu vermeiden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß aus DAC-Chol-Liposomen, PS und Plasmid-DNA Komplexe hergestellt werden können, die über mehrere Tage einen Großteil ihrer Gentransferaktivität behalten. Dabei erwies sich Ringerlösung als ein geeignetes Komplexierungsmedium wenn eine hohe Gentransferrate als Beurteilungsparameter herangezogen wurde. In Medien mit Saccharose waren die Vesikel zwar stabiler und auch wesentlich kleiner, wie die Ergebnisse im Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt haben, aber ihre Gentransferaktivität lag erheblich unter den Lipoplexen, die in Medien mit einem 50 oder 100 % Anteil an Ringerlösung hergestellt worden waren.

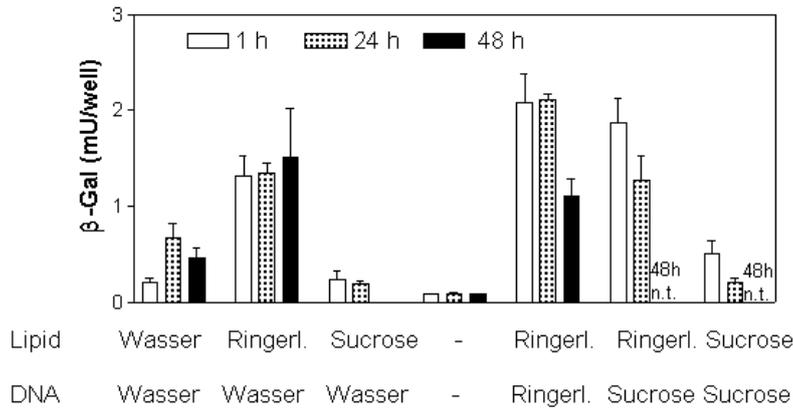


Abbildung 3.23: **Einfluß des Mediums auf die Stabilität von DAC-30/PS/DNA-Komplexen**

Lipoplexe bestehend aus 500 μg DAC-30-Liposomen mit 100 μg PS und 50 μg Plasmid-DNA, separat verdünnt in jeweils 500 μl Wasser, Ringerlösung oder 10 %-Saccharose und anschließend gemischt wurden zur Transfektion von F98-Zellen eingesetzt. Nach einer Inkubationzeit von 1, 24 oder 48 h wurden 5 μl der Lipoplexe, verdünnt in 50 μl serumfreiem Medium auf die Zellen in 96er MTP pipettiert. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 h wurden β -Gal-Expression und Zellvitalität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3-5 Einzelbestimmungen (\pm SD).

3.2.8 Einfluß der Serumkonzentration

Für eine Vielzahl von kationischen Liposomen wurde beschrieben, daß die Anwesenheit von Serumproteinen während der Transfektion die Effektivität des Transfers der DNA in die Zielzellen bzw. die Transfektionsrate stark verringert. Wir untersuchten daher den Einfluß von Serumproteinen auf die Transfektion von DAC-40 und von DOTMA-50-Liposomen. Wie die Ergebnisse der Abbildung 3.24 zeigen, waren DAC-40/PS/DNA-Lipoplexe resistent gegen die Anwesenheit von Serumproteinen während der Transfektion. Es war keine Verringerung der Genexpression zu beobachten wenn die Serumkonzentration von 5 auf 20 % erhöht wurde. Bei der humanen Glioblastomzelllinie N64 wurde bei einer Erhöhung der FKS-Konzentration sogar eine leichte Steigerung der Genexpression festgestellt. Wie die Abbildung 3.24E+F zeigt, ist dies vor allem auf die dadurch erhöhte Zellvitalität zurückzuführen. Während bei einer Konzentration von 20 % FKS die Zellvitalität nicht unter 90 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen sank, verringerte sich bei einer Anwesenheit von nur 5 % Serum bei einigen Lipopolyplexformulierungen die Vitalität der Zellen auf unter 75 %.

Im Gegensatz zu den bei Verwendung von DAC-40-Liposomen erzielten Ergebnissen, die eher einen positiven Einfluß des Serums auf den Verlauf der Transfektion zeigten, war bei der Transfektion mit DOTMA-50-Liposomen ein negativer Einfluß der Serumkonzentration auf die Gentransferrate festzustellen. So sank bei DOTMA-50-Liposomen mit der Erhöhung der Serumkonzentration im Zellkulturmedium sowohl bei der Zelllinie N64 (Abb. 3.24B) als auch bei der humanen Melanomzelllinie Mewo (Abb. 3.24D) die Genexpression stark ab. Die bei 20 % Serumkonzentration erreichte maximale Genexpression betrug nur noch etwa 1/3 der bei 5 % erreichten Genexpression.

Die Versuchsergebnisse lassen schlußfolgern, daß es zwischen den einzelnen kationischen Liposomen Unterschiede in der Serumstabilität der aus ihnen hergestellten

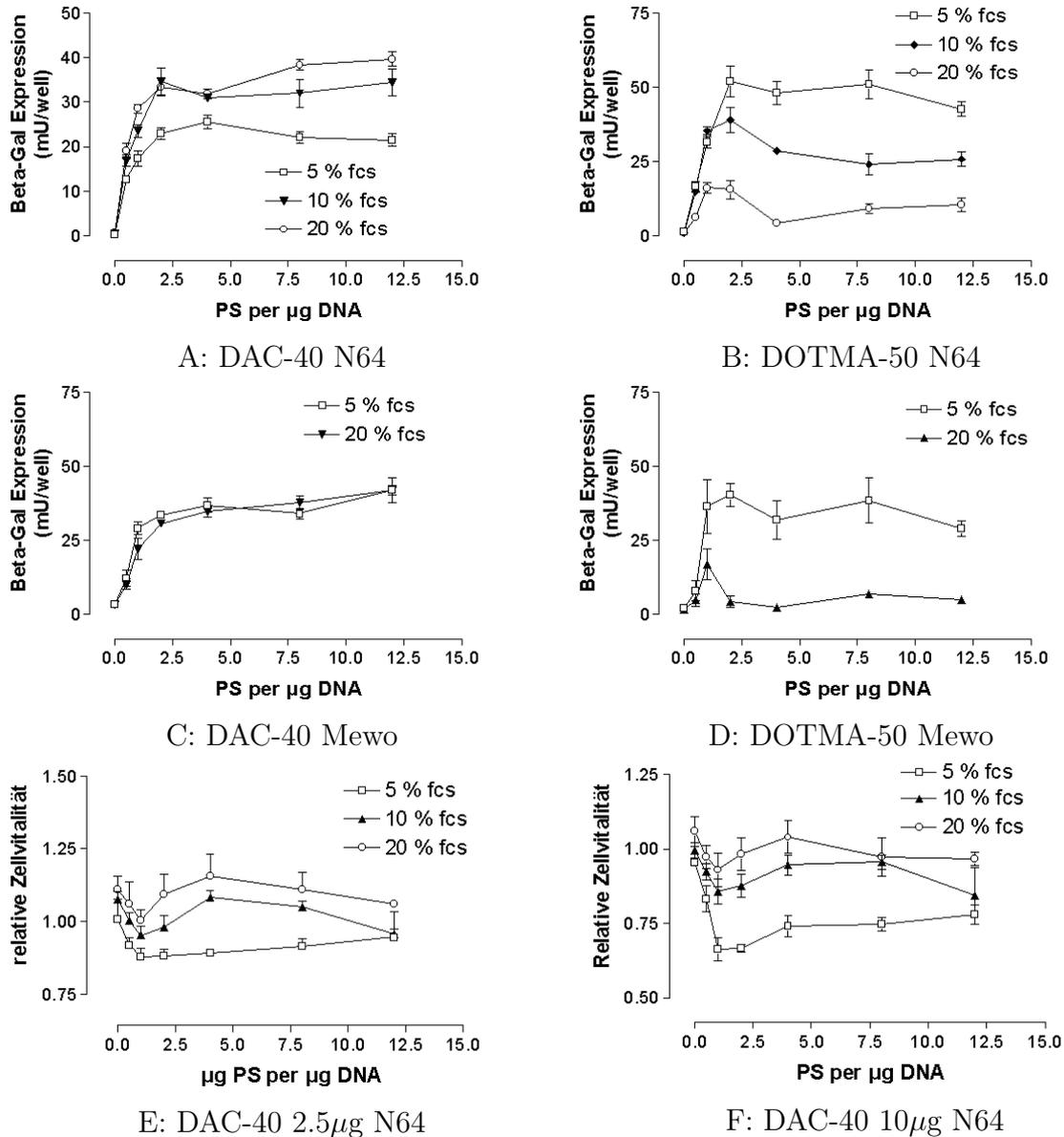


Abbildung 3.24: Einfluß von Serum und PS auf die β -Gal Expression und die Zellvitalität

N64- und Mewo-Zellen in 96-Well-Zellkulturschalen wurden mit Komplexen aus DAC-40 bzw. DOTMA-50-Liposomen (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg per Well) und der Plasmid-DNA pUT651 (0.3 μg per Well), mit verschiedenen Mengen an PS vorkomplexiert, transfiziert. Die Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5, 10 oder 20 % FKS. Nach 4 h wurde das Medium von den Zellen entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für weitere 48 h zur Expression des Reportergens kultiviert. Dargestellt sind die β -Gal-Expressionen ($n=3 \pm \text{SD}$) der als optimal gefundenen Lipidkonzentration (2.5 μg DOTMA, 5 μg DAC per Well für die N64 bzw. 1.25 μg DOTMA und 2.5 μg und für die Zelllinie Mewo).

Gentransfervesikel gibt. Bei den Vesikeln, die aus DAC-Chol-Liposomen hergestellt wurden, kam es durch die Anwesenheit von Serum zu keiner Verminderung der Reporterexpression während Gentransferkomplexe, die aus DOTMA-Liposomen hergestellt wurden, bei höherer Serumkonzentration deutlich schlechter transfizierten.

3.2.9 Einfluß von Transfektionszeit, Zelldichte und Lipoplexkonzentration

Neben den Einflußfaktoren welche die direkten Bestandteile der Gentransfervesikel wie DNA, kationisches Lipid, Helferlipid sowie Polykation betreffen und den Faktoren, die die Komplexherstellung beeinflussen, bestimmt auch das methodische Vorgehen bei der Transfektion den Erfolg des Gentransfers. So sind z.B. die Dauer der Inkubation der Lipoplexe auf den Zellen, die Zelldichte und die verwendete Lipoplexkonzentration von großer Bedeutung für die Vitalität und die Reporterexpression der transfizierten Zellen.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden F98-Zellen mit verschiedenen Lipoplexmischungen aus DAC-30-Liposomen sowie der Plasmid-DNA pUT651 für 1, 2, 4 und 16 h inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel zur Entfernung der Lipoplexe vorgenommen. Nach weiteren 48 h erfolgte die Bestimmung der Toxizität und der Reporterexpression.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.25¹ zeigen, war die Genexpression bei einer kurzzeitigen Inkubation bei größeren Lipoplexkonzentrationen am höchsten, bei längeren Inkubationen verlagerte sich dieses Expressionsmaximum zu niedrigeren Konzentrationen.

Eine Ursache für diesen Befund ist die verringerte Zellvitalität bei einer längeren Inkubation mit hohen Lipoplexkonzentrationen. Die Zellvitalität sank z.B. bei 10 μg DAC-30 und 2 μg Plasmid-DNA bereits nach 2 h Inkubation auf unter 50 % ab, während bei 2.5 μg Lipid und 0.5 μg Plasmid-DNA erst nach 16 h eine Zellvitalität von unter 50 % gemessen wurde. Dementsprechend verlagerte sich die maximale β -Gal-Expression zu niedrigeren Lipoplexkonzentrationen, da im Bereich höherer Konzentrationen die Zellvitalität deutlich zurückging.

Der beobachtete Einfluß der Inkubationszeit war außerdem abhängig von den Zellzahlen, die in die Wells der Zellkulturschalen ausgesät worden waren. Bei niedrigeren Zellzahlen, bzw. weniger konfluenten Kulturen, trat die Toxizität eher und bei niedrigeren Lipoplexkonzentrationen auf. Dementsprechend verringerte sich auch die β -Gal-Expression bereits nach kürzeren Transfektionszeiten (Daten nicht gezeigt).

Die Konzentration der Lipoplexe, die Zelldichte und die optimale Transfektionszeit stehen demzufolge in direktem Zusammenhang mit der Höhe der Genexpression.

¹Text zur Abb. 3.25, S. 91:

F98-Zellen wurden mit DAC-30/pUT651-Lipoplexen in 96er Zellkulturschalen transfiziert. Die Mengen an DNA (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 und 0 μg) sind auf der y-Achse, die Mengen an DAC-30 (10, 5, 2.5, 1.25 und 0.6 μg) auf der x-Achse dargestellt. 1, 2, 4 und 16 h nach der Zugabe der Lipoplexe zu den Zellen wurde das Medium entfernt und durch 150 μl frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen auf die Reporterexpression und die Zellvitalität untersucht. Die Graustufungen bei der β -Gal-Expression bedeuten:

weiß=0-25 %, hellgrau=25-50 %, grau=50-75 %, dunkelgrau=75-100 % der maximalen Expression; bei der Zellvitalität hellgrau=0-50 %, grau=50-100 %, dunkelgrau=>100 % der Zellvitalität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.)

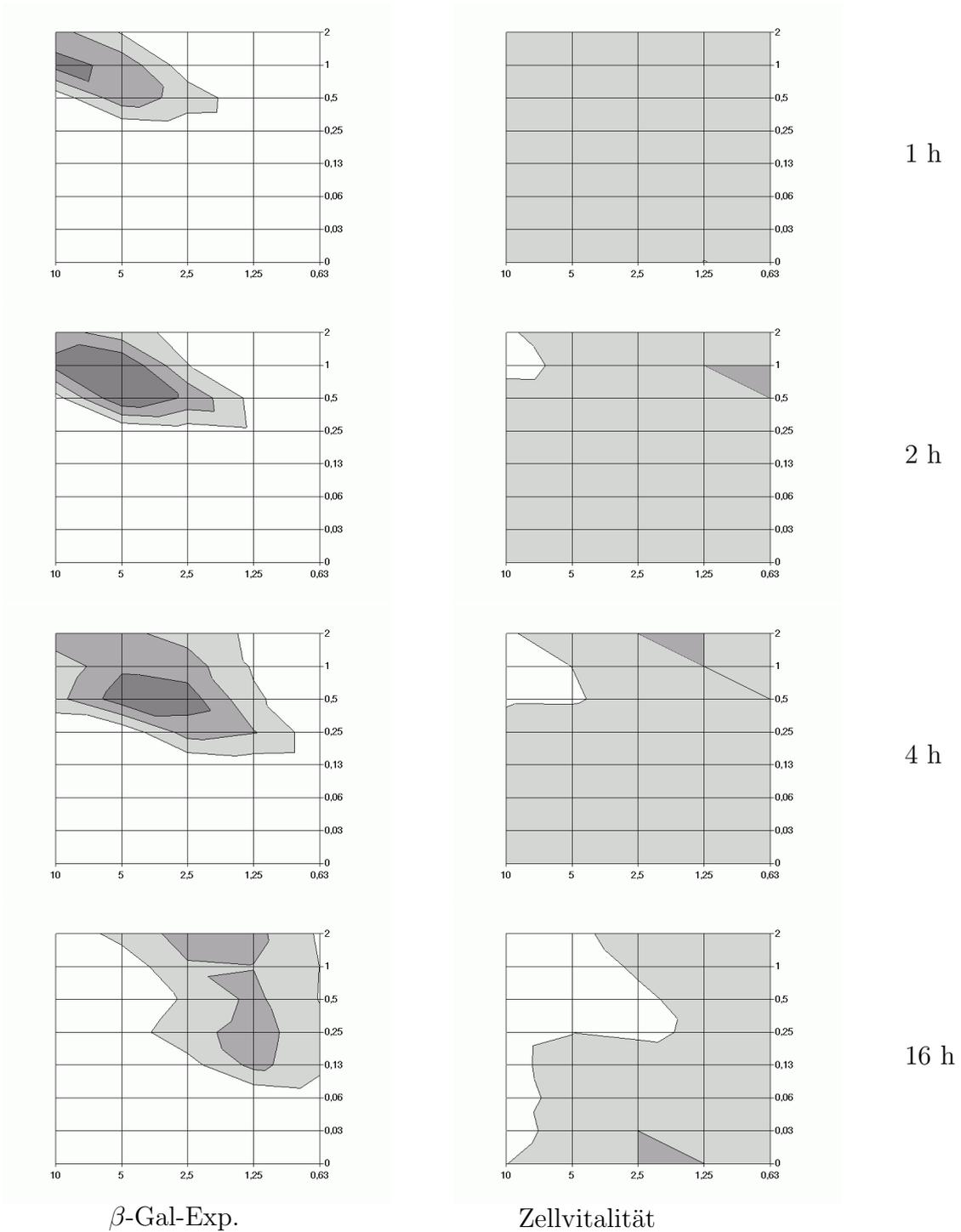


Abbildung 3.25: Einfluß der Inkubationszeit auf Reportergenexpression und Zellvitalität.

Bildunterschrift vgl. vorhergehende Seite.

Bei einer höheren Zellzahl ist der Einsatz von höheren Lipoplexkonzentration bzw. eine längere Inkubationszeit günstig, während bei geringerer Zelldichte niedrige Lipoplexkonzentrationen oder eine verkürzte Transfektionszeit vorteilhaft für das Erreichen einer hohen Genexpression sind.