

4. Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Herstellung von Virosomen zu optimieren. Virosomen sollten in der Lage sein, Fremd-DNA reproduzierbar auf Zellen zu übertragen, wobei sich die hier vorgestellten Untersuchungen mit Spermien als Zielzellen befassten. Hierzu wurden Parameter der Virosomenherstellung variiert. Dies beinhaltet die Verwendung verschiedener Elternviren sowie die Variation der zugesetzten Proteinmenge, der Menge des eingesetzten Poly-L-Lysins (PLL) und der Dauer der Detergens-Extraktion. Nach Auswertung der Versuche wurde die Präparation mit der höchsten Wiederfindungsrate an Protein und dem größten Anteil lebender, fusionierter Spermien an der Gesamtzahl der lebenden Spermien für weitere Präparationen als Kontrollpräparation genutzt. Auf diese Weise sollte eine sukzessive Verbesserung der Fusionseigenschaften der Virosomen gewährleistet werden.

4.1. Optimierung der Virosomen bezüglich der Fusion mit gefrierkonservierten Bullenspermien

4.1.1. Einfluss des Elternvirus auf die Virosomen

In der Literatur wird über verschiedene Viren berichtet, die sich an Spermien binden können, unter anderem Sendai- und Influenzavirus (*Nussbaum et al., 1993*). Diese Bindung ist für beide Viren von der Spezies unabhängig, was auch an dem relativ unspezifischen Rezeptor liegen dürfte (Neuraminsäurereste auf der Oberfläche der Zielzellen).

Um festzustellen, welcher der beiden Viren für den Transfer von DNA in Spermien geeigneter ist, wurden Virosomenpräparationen 1) mit dem **Sendai Virus Z** und 2) mit dem **Influenzavirus X-31** hergestellt. Beiden Präparationen wurden 6,5 mg virales Protein, 6 mg Cholesterol, 26,4 µmol Phospholipide und 60 µg pEGFP zugesetzt. Die DNA wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit PLL inkubiert und Triton X-100 durch Inkubation mit BioBeads SM2 für dreimal 24 h extrahiert.

- Virosomen

Wie aus **Tabelle 8** ersichtlich wird, kann in den Sendai virosomen der größere Anteil des eingesetzten Materials wiedergefunden werden. Nach NA ist der pEGFP-Gehalt sowie der Proteingehalt in beiden Präparationen etwa gleich, wobei letzterer im Vergleich zu anderen Versuchen relativ niedrig ausfällt (**Abbildung 6**). Das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden liegt mit 0,68 (**Sendai**) bzw. 0,65 (**Influenza**) leicht über dem erwarteten Wert von 0,59. Dieses C/P-Verhältnis entspricht dem der exogenen Lipide.

Die im Elektronenmikroskop aufgenommenen Bilder (**Abbildung 7**) zeigen für beide Präparationen ca. vier Lipidschichten pro Vesikel, wobei sich die Größe der Virosomen zwischen den Präparationen nicht signifikant unterscheidet.

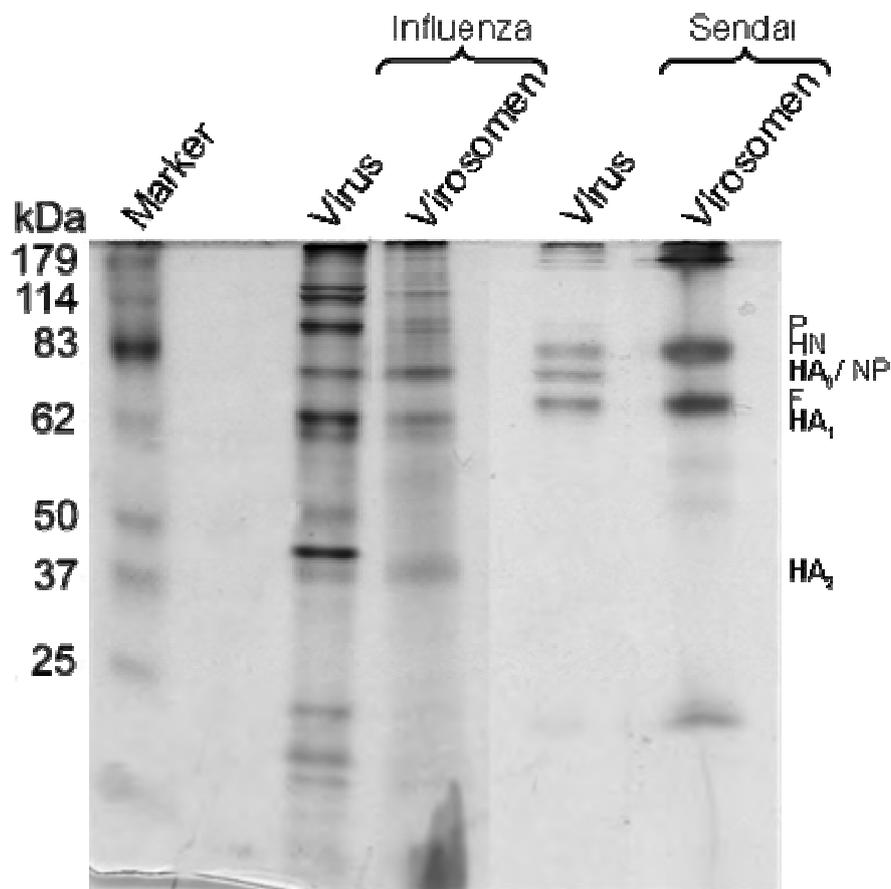


Abbildung 6: Vergleich des Proteingehaltes zwischen Influenza- und Sendai virosomen nach SDS-PAGE und Silberfärbung (Influenza Proteine: fett, Sendai Proteine: normal).

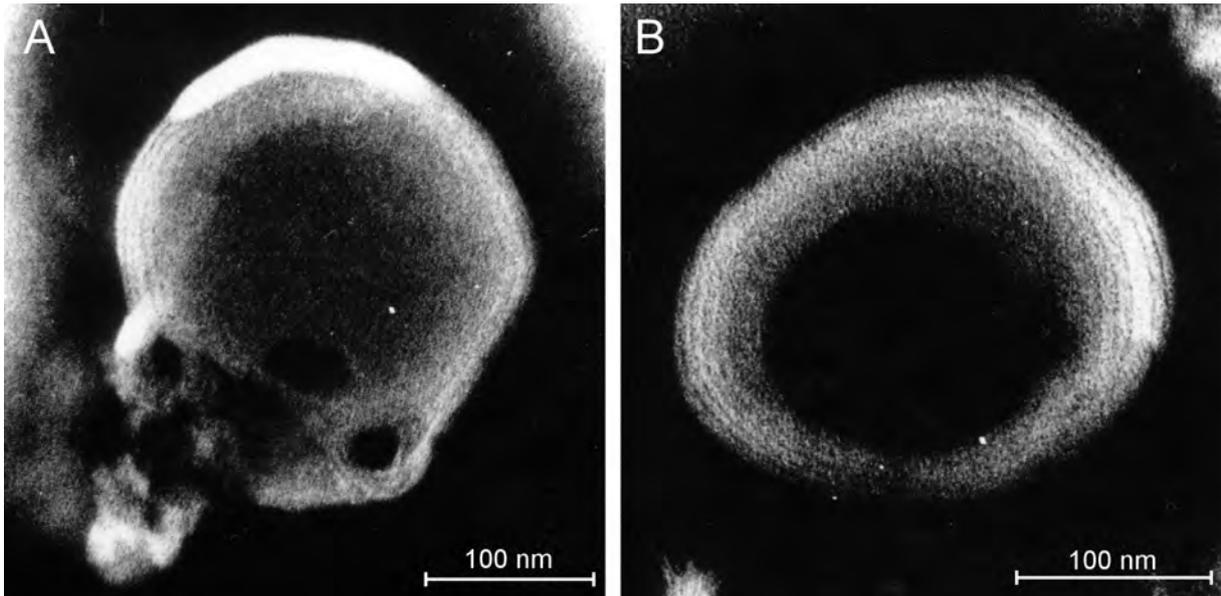


Abbildung 7: Elektronenmikroskopieaufnahme von A) Influenzavirosomen X-31 (sekundär Vergrößerung [s.V.] 157.500fach) und B) Sendaivirosomen (s.V. 157.500fach), Negativ-Kontrastierung.

- Spermien

Um nachzuweisen, dass die Virosomen das Potential haben, mit Spermienmembranen zu fusionieren und dass die Spermien nach dieser Prozedur noch leben, wurde der Lipidmischung ein Fluoreszenz-markiertes Lipid (Rh-PE) zugesetzt und die Spermien nach der Ansäuerung mit Hoechst 33258 inkubiert. Nach Fusion der Virosomen mit den Spermien konnte festgestellt werden, dass die Influenzavirosomen den Sendaivirosomen sowohl im Anteil der lebenden Spermien, dem Anteil der lebenden, fusionierten Spermien und im Gehalt an pEGFP vor NA-Verdau pro μl Spermien suspension überlegen waren (s. auch **Tabelle 8**).

Insgesamt wurde in den Sendaivirosomen mehr exogenes Lipid und Protein eingebaut als in den Influenzavirosomen. Im Gegensatz dazu waren die Influenzavirosomen bei der Fusion mit Spermien überlegen, insbesondere der Anteil der lebenden und der fusionierten Spermien. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mit den Influenzavirosomen weitergearbeitet.

Tabelle 8: Vergleich des Gehaltes von Protein, DNA und Lipiden in Virosomen mit unterschiedlichem Elternvirus, sowie der Fusionseffizienz der Virosomen mit kryokonservierten Bullenspermien.

	Virus	
	Sendai	X-31
n	1	1
Proteingehalt, red. [ng/μl], (% eingesetztes Protein)	1174,2 (12,3)	126,9 (1,4)
pEGFP in Virosomen vor DNase Verdau [μg], (Anteil des eingesetzten pEGFP [%])	7,4 (12,3)	21,5 (35,8)
pEGFP in Virosomen nach DNase Verdau [μg] (Anteil des eingesetzten pEGFP [%])	2,1 (3,5)	2,0 (3,4)
Cholesterolgehalt in Virosomen [μMol] (Anteil am eingesetzten Cholesterol [%])	17,3 (111,2)	13,4 (86,2)
Phospholipidgehalt Virosomen [μMol] (Anteil am eingesetzten Phospholipid [%])	25,2 (95,4)	20,7 (78,3)
Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis	0,68	0,65
Anteil Lebende Spermien [%]	19,8	36,9
Spermien fusioniert von Lebend [%]	0	15,6
Spermien gebunden von Lebend [%]	34,9	8,9
Spermien nicht gebunden von Lebend [%]	65,2	75,6

4.1.2. Abhängigkeit der Fusion der Virosomen mit den Spermien von der Anwesenheit des Influenzahämagglutinins

Der Mechanismus der Infektion von Zielzellen durch Influenzaviren wurde bereits unter **1.1.3.** beschrieben. Mit Hilfe von in Lipidmembranen rekonstituiertem Influenzahämagglutinins sollte die Hämagglutinins-vermittelte Membranfusion für den Transfer von Fremd-DNA in Spermien genutzt werden.

Um nachzuweisen, ob die Fusion der künstlichen Lipidvesikel mit Spermien durch Hämagglutinins vermittelt ist, wurden:

- 1) Virosomen ohne Zugabe von viralem Protein präpariert (**ohne Protein**),

4. Ergebnisse

2) Virosomen vor Zugabe zu den Spermien für 10 min angesäuert, um die irreversible Konformationsänderung des HA zu induzieren (*Hughson FM, 1995*) (**Virosomen pH**),

3) Spermien vor Zugabe der Virosomen drei Stunden mit Neuraminidase verdaut, um endständige Neuraminsäurereste, die als Rezeptoren für das Influenzahämagglutinin dienen, von der Spermienoberfläche zu entfernen (**Spermien NA**).

Alle Präparationen wurden mit 1 mg Virusprotein (Ausnahme: Präparation **ohne Protein**), 6 mg Cholesterol, 13,2 μmol Phospholipiden und 60 μg pEGFP hergestellt. Die DNA wurde für 2 h mit PLL inkubiert und Triton X-100 durch Inkubation mit BioBeads SM2 für dreimal 2 h bei Raumtemperatur extrahiert.

Tabelle 9: Vergleich der Fusionseffizienz von Kontrollvirosomen mit Virosomen, bei denen Influenzahämagglutinin entweder weggelassen oder in seiner Funktion beeinflusst wurde. n ist die Anzahl Fusionsexperimente, * bezeichnet die Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,05$). Hierbei ist zu beachten, dass die statistische Analyse nur zwischen den Kontrollfusionsexperimenten und den Experimenten, bei denen die Spermien vor Zugabe der Virosomen mit NA inkubiert wurden, erfolgte (Klammerwerte entsprechen den Wahrscheinlichkeiten nach dem U-Test nach Mann-Whitney).

	Kontrolle	ohne Protein	Virosomen pH	Spermien NA
n	8	1	1	3
Anteil lebender Spermien von Gesamt [%]	$55,9 \pm 20,7^*$ ($p = 0,012$)	43,3	40,9	$28,5 \pm 8,1^*$
Spermien fusioniert von Lebend [%]	$79,4 \pm 16,2^*$ ($p = 0,012$)	6,4	10,6	$11,8 \pm 5,1^*$
Spermien gebunden von Lebend [%]	$8,9 \pm 11,4$ ($p = 0,630$)	5,1	4,3	$7,9 \pm 2,9$
Spermien nicht gebunden von Lebend [%]	$11,7 \pm 8,8^*$ ($p = 0,012$)	88,5	85,1	$80,3 \pm 7,6^*$

Aus dem Vergleich von Kontrollfusionsexperimenten und den Experimenten, bei denen die Spermien vor Zugabe der Virosomen mit NA verdaut wurden, ergeben sich deutliche Unterschiede bereits im Anteil der lebenden Spermien, was jedoch nicht eintritt, wenn die Spermien mit Proteinfreien oder angesäuerten Virosomen inkubiert wurden. Auch konnte bei allen drei Experimenten ein stark verringerter Anteil fusionierter Spermien beobachtet

werden, während der Anteil der gebundenen Spermien an der Gesamtheit der lebenden Spermien sich sowohl in den Kontroll- als auch in den Fusionsexperimenten nicht veränderte.

4.1.3. Einfluss der Cholesterolmenge auf die Virosomen

Zur Überprüfung, ob die Fusion durch die Veränderung des Anteils an Cholesterol beeinflusst wird, wurde bei diesem Versuch die Cholesterolzugabe schrittweise von 6 mg auf 0 mg bei 25,15 mg Gesamtlipid reduziert. Dabei wurde die Reduktion des Cholesterols durch Zugabe von Phospholipiden ausgeglichen. Das Verhältnis der verschiedenen Phospholipide zueinander blieb gleich.

Zur Virosomenherstellung wurden jeweils 2,5 mg virales Protein und 30 µg PLL-kondensiertes pEGFP verwendet. Nach Inkubation der Proteine, Lipide und DNA für 30 min wurde das Triton X-100 durch dreimalige BioBead-Zugabe im Abstand von 24 h entzogen und die Virosomen zweimal gewaschen.

- Virosomen

Bei der Virosomenpräparation unter Zugabe verschiedener Mengen Cholesterol konnte festgestellt werden, dass mehr Protein in den Virosomen wiederzufinden war, wenn kein Cholesterol zugegeben wurde. Die sonstigen Wiederfindungsraten waren für alle Virosomenpräparationen etwa gleich. Nur bei den **6 mg**-Virosomen konnte relativ mehr Cholesterol und Phospholipid in den Virosomen aufgefunden werden (**Tabelle 10**). Ohne Cholesterol-Zugabe konnten in den Virosomen noch 0,8 µmol Cholesterol, die aus endogenen viralen Lipiden stammten, nachgewiesen werden.

Virosomen, denen **6 mg** Cholesterol zugegeben wurden, hatten eine ähnliche Größe wie Influenzaviren. Sie waren mehrschichtig mit zum Teil sehr gut zu erkennenden Schichten, von denen nicht alle geschlossen waren. Mit Abnahme des Cholesterols waren die Lipidmembranen weniger gut zu unterscheiden. Bei **0 mg**-Virosomen waren hauptsächlich wolkige Gebilde sichtbar und nur vereinzelt geschlossene Vesikel (s. **Abbildung 8**).

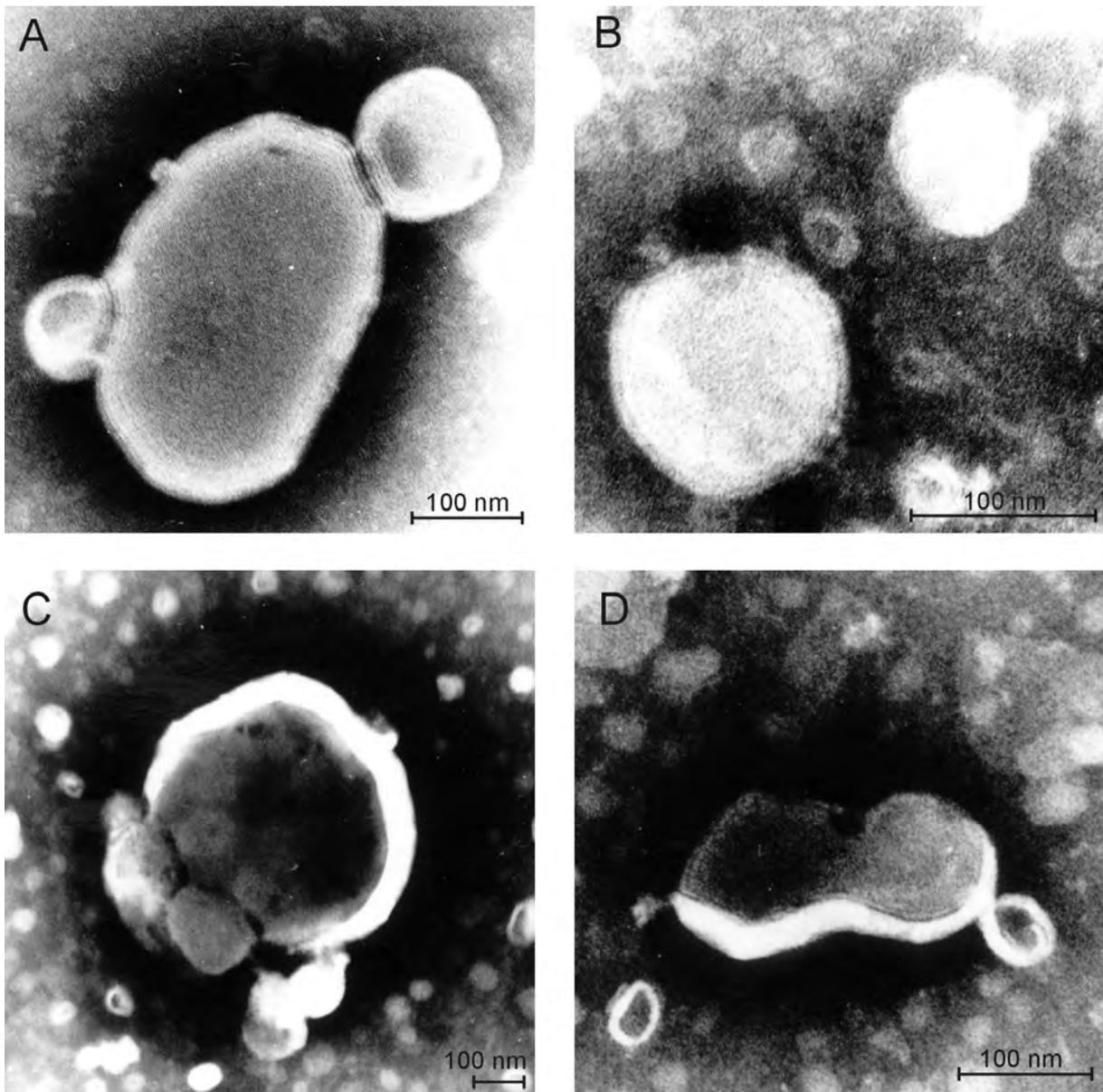


Abbildung 8: Elektronenmikroskopieaufnahmen von Influenzavirosomen, die unter Zugabe unterschiedlicher Cholesterolmengen präpariert wurden. Zugabe von A) **6 mg** (s.V. 157.500fach); B) **3 mg** (s.V. 157.500fach); C) **1,5 mg** (s.V. 48.000fach) und D) **0 mg** (s.V. 76.500fach), Negativ Kontrastierung.

- Spermien

Wurden kryokonservierte Bullenspermien mit Virosomen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt fusioniert, so blieb der Anteil der lebenden Spermien nach der Fusion annähernd gleich. Der Anteil lebender Spermien, mit denen Virosomen fusioniert hatten, nahm mit sinkendem Cholesterolgehalt der Virosomen ab. Bei den **6 mg**-Virosomen konnten bei 94,1 % der lebenden Spermien homogen rot gefärbte Membranregionen beobachtet

werden. Bei den **0 mg**-Virosomen waren es nur 2,3% der lebenden Spermien (s. **Tabelle 10**). Demnach ist der Zusatz von Cholesterol bei der Rekonstitution der Liposomen essentiell, wenn deren fusogene Eigenschaften erhalten bleiben sollen.

Im Gegensatz zum Anteil der fusionierten Spermien stieg der Anteil gebundener Spermien mit sinkender Cholesterolzugabe. Dies lässt den Schluss zu, dass Cholesterol für die Fusion der Virosomen mit den Spermien essentiell ist, nicht jedoch für die Bindung.

Tabelle 10: Protein-, DNA- und Lipidgehalt in Virosomen, die mit unterschiedlichen Cholesterolmengen präpariert wurden, sowie Unterschiede in der Fusionseffizienz dieser Virosomen mit kryokonservierten Bullenspermien.

	Cholesterol [mg]			
	6	3	1,5	0
n	2	1	1	1
Proteingehalt, red. [ng/μl], (% eingesetztes Protein)	136,4 (3,8)	124,9 (3,5)	96,6 (2,7)	255,5 (7,2)
pEGFP in Virosomen vor DNase Verdau [μg], (Anteil des eingesetzten pEGFP [%])	12,3 (40,8)	n.d.	n.d.	n.d.
pEGFP in Virosomen nach DNase Verdau [μg] (Anteil des eingesetzten pEGFP [%])	6,9 (23,0)	n.d.	n.d.	n.d.
Cholesterolgehalt in Virosomen [μMol] (Anteil am eingesetzten Cholesterol [%])	7,9 (51,2)	2,8 (36,6)	1,5 (38,3)	0,8
Phospholipidgehalt Virosomen [μMol] (Anteil am eingesetzten Phospholipid [%])	11,5 (43,5)	8,4 (27,7)	7,8 (23,9)	5,2 (15,0)
Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis	0,70	0,34	0,19	0,16
Anteil lebender Spermien von Gesamt [%]	90,3	80,6	72,6	80,4
Spermien fusioniert von Lebend [%]	94,1	80,5	81,8	2,3
Spermien gebunden von Lebend [%]	3,9	12,6	15,6	82,6
Spermien nicht gebunden von Lebend [%]	2,0	6,9	2,6	15,1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die **6 mg** Cholesterol-Präparation den drei anderen Präparationsarten aufgrund ihres Gehaltes an Ausgangsmaterial und ihren Fusionseigenschaften vorzuziehen ist. Hierbei scheint es so zu sein, dass die verringerte

Menge an Cholesterol zwar keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Virosomen besitzt, aber die Fusion der virosomalen Membran mit der Spermienmembran verhindert. Zudem konnten ohne Zugabe von Cholesterol keine geschlossenen Vesikel mehr gefunden werden, was sich negativ auf die Gentransferrate auswirken dürfte.

4.1.4. Einfluss der Plasmidmenge auf Virosomen

Um die Effizienz des Einbaus des EGFP-Plasmids in die Virosomen zu testen, wurden Präparationen unter Zugabe verschiedener Plasmidmengen hergestellt. Die pEGFP-Mengen variierten von 30 µg bis 180 µg.

Zur Virosomenherstellung wurden jeweils 2,5 mg Protein, 3 mg Cholesterol und 13,2 µmol Phospholipide (dies entspricht der Hälfte der Standardlipidmischung) verwendet. Das in der Lösung enthaltene Triton X-100 wurde auf zwei unterschiedliche Arten mit Hilfe von BioBeads SM2 extrahiert: 1) Durch dreimalige Inkubation für 24 Stunden bei 4°C und 2) durch Inkubation einmal für 4 h und einmal für 16 h bei Raumtemperatur.

- Virosomen

Bei der Analyse der Virosomen zeigte sich, dass durch Erhöhung der zugesetzten pEGFP-Menge nicht zwangsläufig der Gehalt des Plasmids in den Virosomen erhöht war. Der höchste Hämagglutinin-Gehalt konnte in den 3x24 h-Virosomen, denen 90 µg DNA zugesetzt worden war, beobachtet werden, während der höchste Anteil der eingesetzten DNA vor DNase-Verdau in den Virosomen, denen 60 µg DNA zugesetzt worden war (3x24 h), gefunden werden konnten. Der in den Virosomen wiedergefundene Lipidanteil war jedoch in den 4 h/16 h Virosomen höher als in den 3x24 h Virosomen, unterschied sich allerdings kaum bei der Betrachtung der verschiedenen zugesetzten DNA-Mengen (s. **Tabelle 11**). Zwischen den verschiedenen Virosomenpräparationen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, was den Gehalt des Ausgangsmaterials in den Virosomen betraf. Jedoch fiel auf, dass sich die pEGFP-Gehalte in den Virosomen vor DNase-Verdau signifikant ($p=0,032$, Mann-Whitney-Test) unterschieden.

Bei der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen war festzustellen, dass mit steigender DNA-Zugabe die Anzahl der Lipidschichten sowie der Anteil der geschlossenen Virosomen ab nahm.

Tabelle 11: Protein-, pEGFP- und Lipidgehalt in Virosomen, die mit unterschiedlichen Plasmidmengen präpariert wurden (Unterscheidung zwischen zwei Tritonextraktionsmethoden).

		Einsatzmenge pEGFP [μg] bzw. Tritonextraktion				
		4h/16 h, RT	3x24 h, 4°C			
pEGFP [μg]		30	60	90	180	
n		1	2	2	1	
Proteingehalt, reduzierende		514,6 (14,4)	378,8 \pm	235,1 (5,8)	301,9 \pm 37,3	231,8 \pm 148,4 (4,2)
Bedingungen [ng/ μl], (%)			111,4 (10,8 \pm 3,1)	(8,0 \pm 1,7)	107,5 (6,0 \pm 2,3)	
pEGFP in 700 μl Virosomen vor		22,4 (74,5)	17,9 \pm 9,2	4,7 (15,6)	10,6 \pm 8,1	13,9 \pm 19,2
DNase Verdau [μg], (%)			(29,8 \pm 15,3)	(17,6 \pm 13,5)	(15,5 \pm 21,4)	0,8 (0,4)
pEGFP in 700 μl Virosomen nach	n.d.		6,8 \pm 7,8	0,1 (0,3)	4,3 \pm 6,0	3,0 \pm 3,9
DNase-Verdau [μg], (%)			(11,4 \pm 13,0)	(7,2 \pm 10,1)	(3,4 \pm 4,3)	
Cholesterolgehalt in 700 μl		7,5 (96,1)	7,1 \pm 1,7	8,0 (77,5)	7,1 \pm 1,4	7,4 \pm 1,3
Virosomen [$\mu\text{mol/ml}$], (Prozent			(91,5 \pm	(78,1 \pm 0,1)	(82,3 \pm 2,4)	
des eingesetzten Cholesterols, %)			22,4)			
Phospholipidgehalt in 700 μl		10,5 (79,4)	12,3 \pm 2,6	13,9 (78,8)	11,1 \pm 4,0	12,2 \pm 1,9
Virosomen [μmol] (Prozent des			(93,0 \pm	(71,1 \pm	(79,4 \pm 3,7)	
eingesetzten Phospholipids [%])			19,8)	11,4)		
Cholesterol/Phospholipid-		0,71	0,59 \pm 0,15	0,58	0,65 \pm 0,1	0,61 \pm 0,01
Verhältnis						0,55

- Spermien

Der Anteil der lebenden Spermien sank mit steigender zugegebener DNA-Menge bei den **3x24 h**-Virosomen, wie auch der Anteil der lebenden fusionierten Spermien. Wurde den Virosomen mehr als 60 µg pEGFP zugegeben, konnten keine lebenden fusionierten Spermien beobachtet werden (s. auch **Tabelle 12**); bei den 90 µg Virosomen waren zwar noch gebundene Spermien zu beobachten, doch verschwanden auch diese bei Zugabe von 180 µg DNA. Die Werte unterschieden sich nicht wesentlich vor und nach Neuraminidase-Verdau, wobei auch der Anteil der gebundenen Spermien gleich blieb. In der Realtime PCR konnten für die **90 µg, 3x24 h** Virosomen 269.150,0 fg/µl pEGFP nach Neuraminidase-Verdau in der Spermien suspension nachgewiesen werden.

Wurden die einzelnen Präparationsarten miteinander verglichen, so waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu detektieren. Wurde jedoch die Tritonextraktionsmethode außer Acht gelassen, so konnte festgestellt werden, dass der Anteil der fusionierten Spermien an der Gesamtpopulation der lebenden Spermien sich bei Zugabe von 60 µg DNA zu der Virosomenpräparation signifikant von denen der 90 µg und der 180 µg Präparationen unterschied ($p=0,036$, Mann-Whitney Test). Der Anteil der gebundenen Spermien unterschied sich nur zwischen den 60 µg Präparationen und den 90 µg Präparationen ($p=0,036$, Mann-Whitney Test). Dies könnte bedeuten, dass durch Zugabe von gesteigerten Plasmidmengen zu den Virosomenpräparationen die Fusion der Virosomen mit den Spermien gestört wird. Hier ist jedoch darauf hinzuweisen, dass keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Virosomenpräparationen selbst beobachtet werden konnten, lediglich die Tritonextraktionsmethode schien hier einen signifikanten Unterschied auszulösen (s. o.). Der pEGFP-Gehalt in den Spermien nach NA-Verdau unterschied sich signifikant ($p=0,048$, Mann-Whitney Test) zwischen den verschiedenen Tritonextraktionsmethoden, unabhängig von der Menge der initial den Virosomen zugegebenen Plasmid-DNA.

Tabelle 12: Unterschiede in der Fusionseffizienz von Virosomenpräparationen, mit denen unterschiedliche Mengen an pEGFP zugegeben worden waren und denen das Detergens gemäß verschiedener Protokolle entzogen wurde. (kryokonservierte Bullenspermien).

		4h/16 h, RT			3x24 h, 4°C			
		30	60	7	2	2	3	2
pEGFP [µg]		30	60	180	90	60	90	180
n		1	7	2	2	3	2	2
Lebende Spermien [%]		59,3	61,8 ± 14,1	92,6 ± 9,6	86,1 ± 19,7	79,2 ± 9,2	58,0 ± 4,9	
Lebend, fusioniert [%]		42,5	57,0 ± 18,1	86,0 ± 1,6	62,3 ± 24,0	0	0	
Lebend, gebunden [%]		31,3	25,1 ± 11,8	9,8 ± 4,8	26,1 ± 14,2	93,4 ± 8,4	31,3 ± 44,2	
Lebend, nicht gebunden [%]		26,3	17,9 ± 12,3	4,2 ± 3,2	11,6 ± 9,7	6,6 ± 8,4	68,8 ± 44,2	
Lebende Spermien nach NA [%]		68,1	56,1 ± 13,4	n.d.	80,8	n.d.	n.d.	
Lebend, fusioniert nach NA [%]		26,5	56,1 ± 8,4	n.d.	57,6	n.d.	n.d.	
Lebend, gebunden nach NA [%]		32,7	22,5 ± 13,5	n.d.	26,3	n.d.	n.d.	
Lebend, nicht gebunden nach NA [%]		40,8	21,4 ± 12,0	n.d.	16,1	n.d.	n.d.	
pEGFP in Spermien [fg/µl]		196,5	34,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
pEGFP in Spermien nach NA-Verdau [fg/µl]		137,4	4172,0 ± 8061,6	n.d.	59765,3 ± 82073,5	269.150,0	n.d.	

Ein Vergleich aller Ergebnisse ergibt, dass die Präparationen, denen 30 µg bzw. 60 µg DNA zugegeben wurden, zu bevorzugen sind. Sie sind den anderen Präparationen im Protein-, Lipid- und pEGFP-Gehalt sowie im Anteil der fusionierten Spermien an der Gesamtheit der lebenden Spermien überlegen, wobei besonders in Letzteren die 60 µg Virosomen hervorstechen.

4.1.5. Einfluss der Tritonextraktionsmethode auf die Virosomen

Verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden zur Entfernung des Detergens aus der Suspension wurden angewandt und die jeweils erhaltenen Virosomen untersucht: Nachdem Protein, Lipide und DNA zusammen inkubiert worden waren,

1) wurde jeweils ein Drittel der benötigten BioBead-Menge im Abstand von 24 h zugegeben (**3x24 h**; *Markgraf et al., 2001*);

2) wurden die BioBeads im Abstand von 2 h zugegeben (**3x2 h**; *Baljinnyam, 2003*), davon zweimal ein Viertel der benötigten Menge, beim dritten Mal die Hälfte;

3) wurden je die Hälfte der BioBeads zugegeben und die Virosomen vier bzw. sechzehn h mit ihnen inkubiert (**4h/16 h**; *Vainstein et al., 1984*).

4) wurde bei der Dialyse ein vorher gequollener Dialyseschlauch mit der Virosomensuspension gefüllt und 72 h in 500 ml PBS inkubiert (**Dialyse**; *Mukhlis et al., 1984*).

Die Virosomen wurden wie im Methodenteil beschrieben weiter behandelt.

Für alle Präparationen wurden 2,5 mg virales Protein, 3 mg Cholesterol, 13,2 µmol Phospholipide und 60 µg EGFP-Plasmid verwendet. Das Plasmid wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin inkubiert.

- **Virosomen**

Die Virosomen, bei denen Triton X-100 durch **Dialyse** entfernt worden war, unterschieden sich bezüglich des eingebauten Proteingehaltes deutlich von den anderen Präparationen. Hier konnte nur 1,6% des eingesetzten Influenzaproteins in den Virosomen wiedergefunden werden. (s. auch **Tabelle 13**). Die Gehalte an pEGFP, Phospholipid, Cholesterol und Hämagglutinin waren bei allen vier Präparationen vergleichbar. Für alle vier Präparationsarten wurde der Tritongehalt in den Virosomen bestimmt. Nach Anwendung der

3x24 h Extraktionsmethode war der Triton X-100-Rest in den Virosomen am niedrigsten (0,017%).

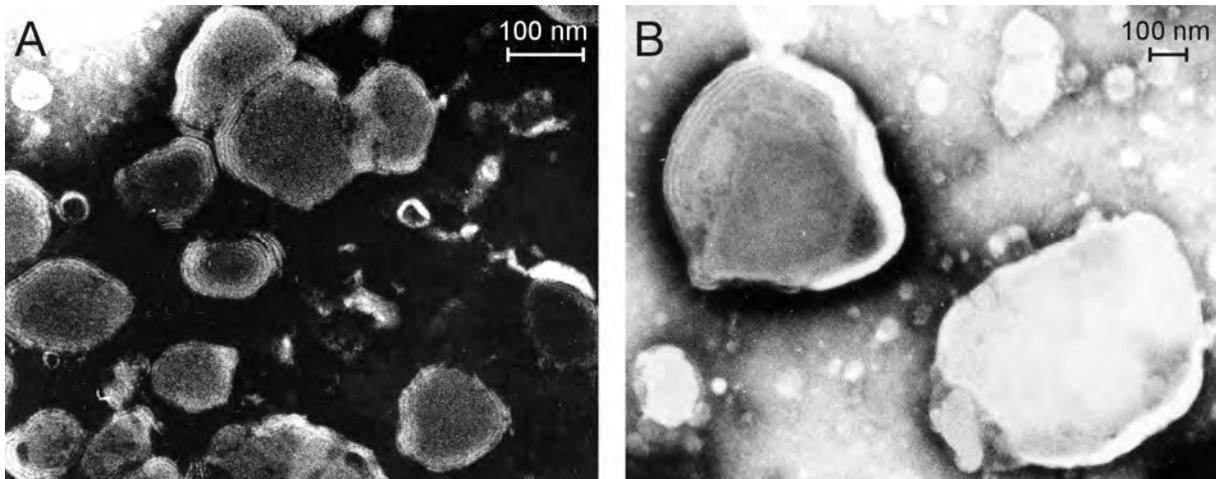


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von **3x24h** Virosomen. Während in Präparation **A** die Virosomen von relativ einheitlicher Größe sind, sind in Präparation **B** die Virosomen deutlich unterschiedlich groß. Negativ Kontrastierung, **A**) s.V. 99.000; **B**) s.V. 48.000

Die **3x24 h**-Virosomen wiesen in der Elektronenmikroskopie eine sehr inhomogene (**Abbildung 9**) Morphologie auf, einige Virosomen ähnelten stark Influenzaviren, während andere mehrschichtigen Lipidkonglomeraten ähnelten. Gemeinsam war ihnen, dass die Lipidschichten schlecht zu differenzieren waren. Wurde das Detergens durch **Dialyse** extrahiert, kamen Lipidvesikel mit bis zu acht Lipidschichten vor. Die geringste Ähnlichkeit mit Virosomen bzw. Viren war bei **4 h/16 h** Virosomen festzustellen, hier war vornehmlich eine annähernd homogene Suspension mit gelegentlichen, vesikelähnlichen Gebilden zu beobachten. Bei Entzug des Detergens in **3x2 h** Schritten waren in der Elektronenmikroskopie Virosomen unterschiedlicher Größe mit einer variablen Anzahl von Lipidschichten zu erkennen. Beim Vergleich der Größe der Virosomen wurde festgestellt, dass die **3x24 h**-Virosomen größer waren als die der anderen Präparationen.

4. Ergebnisse

Tabelle 13: Protein-, pEGFP- und Lipidgehalt in Virosomen, bei denen das enthaltene Detergens mit unterschiedlichen Methoden extrahiert wurde.

	Methode der Tritonextraktion			
	3x24h, 4°C	Dialyse	4h/16h, RT	3x2h, RT
n	1	1	5	4
Proteingehalt, reduzierende Bedingungen [ng/μl], (%)	328,3 (9,2)	58,1 (1,6)	386,3 ± 149,1 (11,1 ± 4,1)	273,9 ± 47,6 (8,0 ± 1,4)
Größe der Virosomen [nm], (n)	142,8 ± 80,1 (199)	n.d.	129,9 ± 45,3 (451)	134,9 ± 61,8 (544)
pEGFP in 700μl Virosomen vor DNase-Verdau [μg], (% eingesetztes pEGFP)	16,3 (27,2)	n.d.	22,4 ± 6,8 (37,4 ± 11,4)	9,3 ± 9,1 (15,5 ± 15,2)
pEGFP in 700μl Virosomen nach DNase-Verdau [μg], (% eingesetztes pEGFP)	8,6 (14,3)	9,9 (16,6)	10,2 ± 7,2 (11,4 ± 13,0)	4,8 ± 3,4 (15,2 ± 15,0)
Cholesterolgehalt in Virosomen [μmol], (% eingesetzt)	6,1 (78,2)	7,2 (93,1)	7,1 ± 1,7 (91,5 ± 22,4)	7,3 ± 1,6 (94,4 ± 21,1)
Phospholipidgehalt in Virosomen [μmol], (% eingesetzt)	8,3 (63,2)	14,5 (110,0)	12,3 ± 2,6 (93,0 ± 19,8)	14,0 ± 3,9 (106,3 ± 29,7)
Cholesterol/Phosphat-Verhältnis	0,73	0,5	0,59 ± 0,15	0,57 ± 0,28
Triton in Virosomen [%]	0,017	0,058	0,068	0,159

- **Spermien**

Die Anteile lebender Spermien nach Fusion mit Virosomen unterschieden sich zwischen den vier Präparationsarten kaum. Hingegen waren die Anteile der lebenden, fusionierten Spermien deutlich unterschiedlich. Der größte Anteil konnte bei Spermien beobachtet werden, die mit **3x2 h**-Virosomen fusioniert wurden (s. **Tabelle 14**). Der Anteil der mit Virosomen fusionierten Spermien unterschied sich bei den **3x2 h**- und **4 h/16 h**-Präparationsart signifikant (Mann-Whitney U-Test, p=0,022). Nach Neuraminidase-Verdau konnte in den

Spermien, die mit den **3x24 h**-Virosomen fusioniert worden waren, der größte Anteil lebender Spermien beobachtet werden, während die meisten fusionierten Spermien unter den Lebenden wiederum bei den **3x2 h**-Virosomen beobachtet wurden. Der pEGFP-Gehalt in den Spermien nach NA war am höchsten, wenn diese mit den **dialysierten** Virosomen inkubiert worden waren. Bei den anderen Präparationsarten zeigten die **4 h/16 h**-Virosomen die höchsten Werte, bei diesen war auch der höchste Einzelwert zu beobachten.

Tabelle 14: Unterschiede in der Fusionseffizienz von Virosomenpräparationen, bei denen das Detergens durch verschiedene Methoden extrahiert wurde (kryokonservierte Bullenspermien). Die Tritonextraktionsmethoden **4h/16h** und **3x2h** unterscheiden sich bezüglich ihres Anteils fusionierter Spermien an der Gesamtpopulation der lebenden Spermien signifikant (* p=0,022, Mann-Whitney Test).

Methode der Tritonextraktion

	3x24h, 4°C	Dialyse	4h/16h, RT	3x2h, RT
n	1	1	8	6
Lebende Spermien [%]	72,1	79,3	58,8 ± 5,5	67,9 ± 3,2
Lebend, fusioniert [%]	45,4	30,4	58 ± 6,0*	76,9 ± 2,6*
Lebend, gebunden [%]	36,1	47,8	26,3 ± 4,1	14,1 ± 2,5
Lebend, nicht gebunden [%]	18,5	21,7	15,7 ± 4,6	9,0 ± 2,4
Lebende Spermien, nach NA [%]	80,8	n.d.	53,0 ± 6,2	65,2 ± 1,4
Lebend, fusioniert, nach NA [%]	57,6	n.d.	55,1 ± 2,4	65,9 ± 3,1
Lebend, gebunden, nach NA [%]	26,3	n.d.	25,2 ± 5,4	10,2 ± 2,9
Lebend, nicht gebunden, nach NA [%]	16,1	n.d.	19,7 ± 5,4	23,9 ± 4,8
pEGFP in Spermien nach NA [fg/μl]	1.730,5	5.150,0	4.172,0 ± 3.605,3	1.528,1 ± 1.261,7

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die **3x2 h** Präparationsart den anderen Präparationsarten vorzuziehen war. Mithilfe dieser Präparationsart konnte ein befriedigender Anteil des eingesetzten Proteins in Form von Hämagglutinin in den Virosomen wiedergefunden werden, ein großer Teil des eingesetzten pEGFP lag in den Virosomen vor DNase-Verdau geschützt vor und das Cholesterol/Phosphat-Verhältnis war dem erwarteten

Wert ausreichend ähnlich. In der Fusion mit den Spermien waren diese Virosomen allen anderen überlegen, und auch die Gentransferrate war ausreichend hoch. Ein Argument für die weitere Verwendung der 3x24h Präparationsmethode ist der deutlich niedrigere Tritongehalt in der Virosomensuspension, dieser könnte jedoch bei den anderen Präparationsmethoden evtl. durch Einsatz einer größeren Menge BioBeads in der 3x2h Virosomenpräparation reduziert werden. Nichtsdestotrotz konnten bei höherem Tritongehalt bessere Fusionsergebnisse mit den 3x2h Virosomen erzielt werden.

4.1.6. Einfluss der Proteinmenge auf die Virosomen

Um zu ermitteln, welche Proteinmenge optimal für die Fusion der Virosomen mit Spermien war, wurden Virosomen mit unterschiedlichen Mengen viralen Proteins präpariert (**0 mg; 1,0 mg; 2,4 mg**). Zu allen Präparationen wurden jeweils 3 mg Cholesterol, 13,2 μmol Phospholipide und 60 μg PLL-kondensierte DNA zugegeben. Das enthaltene Triton X-100 wurde durch BioBeads entzogen, und die so entstandenen Virosomen durch zweimalige Zentrifugation und Resuspendierung des Sediments in je 500 μl PBS gewaschen.

Vor der Präparation der Virosomen wurde die Aufreinigung des Influenzahämagglutinins überprüft. Hierzu wurden die aus embryonierten Hühnereiern gewonnenen Viren für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 2% Triton X-100 inkubiert und dann zentrifugiert. Während der Aufreinigung des Influenzahämagglutinins erfolgte eine mehrfache Probenentnahme vom intakten Virus (**Virus**), aus dem Überstand (**Glykoproteine**), aus dem Sediment (**Nukleokapsid**) nach Inkubation mit Triton X-100 und Zentrifugation, aus der Suspension nach Extraktion des Triton X-100 durch BioBeads SM2 (**Überstand nach BioBead**) und von den fertiggestellten Virosomen (**Virosomen**). Die Proben wurden im SDS-Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend gefärbt.

- **Ergebnis der Hämagglutinin-Aufreinigung**

Nach der Inkubation der Viren mit Detergens und Zentrifugation der Virussuspension war zu beobachten, dass in den Virosomen fast ausschließlich Influenza Hämagglutinin vorhanden war (s. **Abbildung 10**), das sich in Form von HA₀, HA₁ und HA₂ manifestierte. Die Hämagglutinin-Banden wurden densitometrisch vermessen und damit der Anteil des Hämagglutinins am eingesetzten Protein ermittelt.

In den **Virosomen** konnten $287,9 \pm 175,5$ ng/ μ l HA-Protein (n= 31 verschiedene Präparationen) nachgewiesen werden, dies entsprach $10,5 \pm 8,9$ % des gesamten, eingesetzten viralen Proteins. Hiermit konnte gezeigt werden, dass der Großteil des in den Viren enthaltenen Influenzahämagglutinin in die Virosomen eingebaut wurde. Gut zu sehen war im SDS-Gel auch, dass die mit dem Nukleokapsid assoziierten Proteine (M1, M2, NP, PB1, PB2, PA) nicht mehr in den Virosomen darstellbar waren.

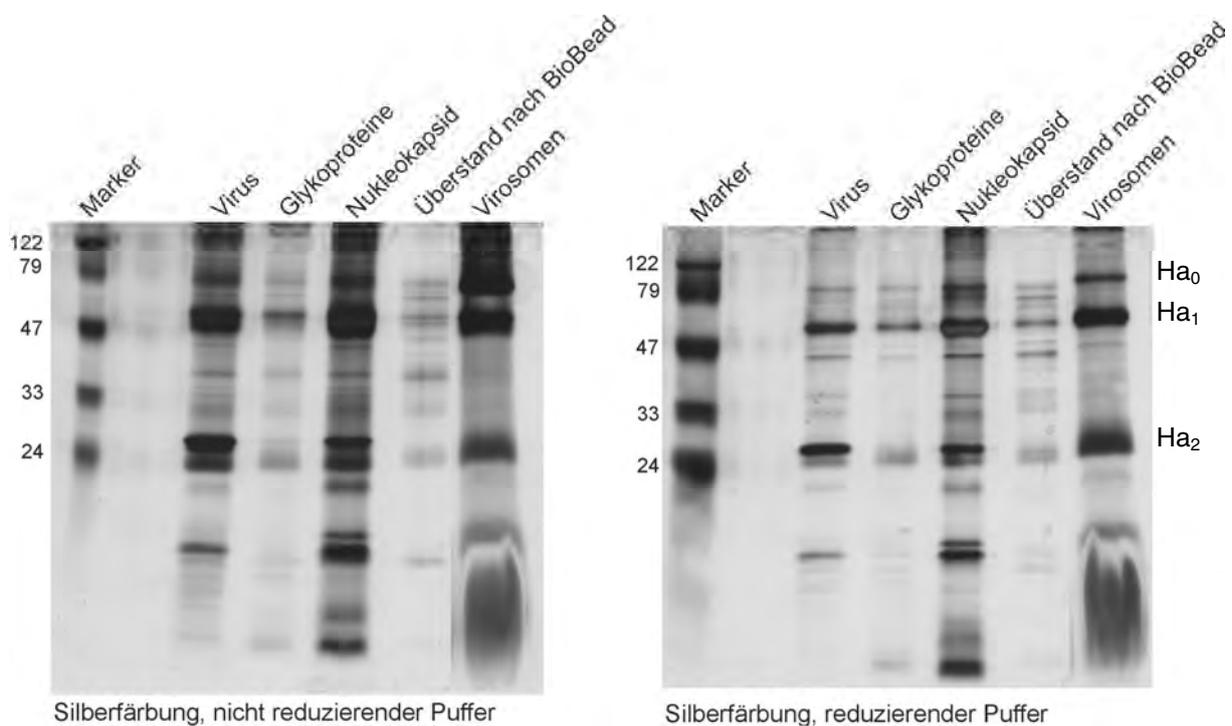


Abbildung 10: Proteingehalt der Proben nach Auftrennung im SDS-Gel. Das Virus wurde zur besseren Darstellung der Proteine 1:5 mit PBS verdünnt. (SDS-PAGE mit Silberfärbung).

- **Virosomen**

Im SDS-Gel konnte weder unter reduzierenden Bedingungen noch unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Proteinbande bei den **0 mg** Virosomen beobachtet werden (s. **Tabelle 15**). Die für die Virosomen typische Lipidfront war am unteren Ende des SDS-Gels vorhanden. Der Proteingehalt der beiden anderen Virosomenpräparationen wurde densitometrisch bestimmt.

Die **1 mg** Virosomenpräparation unterschied sich signifikant von der **2,4 mg** Virosomenpräparation (zweiseitiger Kruskal-Wallis-Test, Signifikanzniveau von $p=0,05$) im Anteil des in den Virosomen wiedergefundenen Hämagglutinins in Abhängigkeit von der

4. Ergebnisse

Menge des eingesetzten Proteins. Während bei den **1 mg** Virosomen $28,0 \pm 7,8$ % des eingesetzten Proteins in den Virosomen wiedergefunden werden konnte, waren es bei den **2,4 mg** Virosomen $10,3 \pm 4,8$ %.

Der Gehalt an pEGFP war in den Virosomen, denen kein Protein zugesetzt worden war, sowohl vor als auch nach DNase-Verdau am höchsten (s. **Tabelle 15**). Die Lipidgehalte in den drei unterschiedlichen Virosomenpräparationen sind nahezu gleich, wobei in der 2,4 mg Präparation tendenziell etwas weniger Lipid in den Virosomen wiedergefunden werden konnte als in den anderen Präparationen.

Tabelle 15: Gehalt von Protein, pEGFP und Lipiden in Virosomen die mit unterschiedlichen Proteinmengen hergestellt wurden.

	Virusprotein/Präparation (mg)		
	0	1,02	2,4
n	1	3	4
Proteingehalt, red. [ng/ μ l], (% eingesetztes Protein)	keine Banden sichtbar	$407,7 \pm 113,2$ ($28,0 \pm 7,8$)	$359,8 \pm 176,1$ ($10,3 \pm 4,8$)
Größe der Virosomen [nm] (N)	nicht ermittelt	$124,3 \pm 47,5$ (948)	$129,0 \pm 53,3$ (525)
pEGFP-Gehalt in 700 μ l Virosomen vor DNase-Verdau [μ g], (% des eingesetzten pEGFP)	38,8 (64,7)	$15,7 \pm 1,6$ ($26,1 \pm 12,4 \pm 8,4$ 3,9)	$20,7 \pm 14,1$
pEGFP-Gehalt in 700 μ l Virosomen nach DNase-Verdau [μ g], (% des eingesetzten pEGFP)	18,6 (31,0)	$7,8 \pm 9,9$ ($13,0 \pm 16,5$)	$3,2 \pm 3,7$ ($5,37 \pm 6,1$)
Cholesterolgehalt der Virosomen [μ mol], (% des eingesetzten Cholesterols)	8,3 (106,9)	$7,8 \pm 1,3$ ($100,5 \pm 16,7$)	$6,9 \pm 1,5$ ($89,0 \pm 19,5$)
Phospholipidgehalt der Virosomen [μ mol], (% des eingesetzten Phospholipids)	13,1 (99,3)	$15,8 \pm 4,1$ ($119,4 \pm 31,3$)	$11,6 \pm 3,2$ ($88,0 \pm 24,0$)
Cholesterol/Phosphat-Verhältnis	0,6	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$

Bei jeweils zwei der Virosomenpräparationen, die sich lediglich im Proteingehalt unterschieden, wurde die Größe der Virosomen bestimmt. Für beide Präparationsarten war

festzustellen, dass die Größe der Virosomen normalverteilt war (Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, $p=0,05$). Die **2,4 mg** Virosomen hatten eine mittlere Größe von 128,98 nm mit einer Standardabweichung von $\pm 53,34$ nm, wobei 948 Virosomen ausgewertet wurden. Die **1 mg** Virosomen waren im Durchschnitt etwa 124,26 nm groß mit einer Standardabweichung von $\pm 47,45$ nm, hier wurden 525 Virosomen untersucht.

- Spermien

Das Ziel dieser Arbeit, fusionsfähige Virosomen herzustellen, erforderte es, den Anteil sowohl der nicht gebundenen als auch den der gebundenen Spermien möglichst niedrig zu halten. Diese Vorgabe erfüllten am besten die Virosomen mit einem Proteinzusatz von **1 mg**. Hier konnte der höchste Anteil lebender Spermien, sowie lebend fusionierter Spermien vor und nach Neuraminidase-Verdau detektiert werden (s. **Tabelle 16**).

Es konnte nicht für alle Spermienproben der pEGFP-Gehalt bestimmt werden, so war z. B. für die Gruppe der Spermien mit **1 mg** Virosomen nur ein Ergebnis vorhanden (37 fg/ μ l nach NA-Verdau). Dahingegen unterschieden sich die Gehalte bei den Virosomen ohne Protein (205 fg/ μ l) und mit 2,4mg Protein ($216,56 \pm 237,3$ fg/ μ l) nur unerheblich (s. **Tabelle 16**).

Tabelle 16: Unterschiede in der Fusionseffizienz von Virosomenpräparationen mit unterschiedlichen Proteingehalten.

	Virusprotein/Präparation		
	0	1	2,4
n	1	3	6
Lebende Spermien [%]	43,3	$66,5 \pm 18,2$	$63,1 \pm 12,8$
Lebend, fusioniert [%]	6,4	$84,6 \pm 15,5$	$78,2 \pm 7,8$
Lebend, gebunden [%]	5,1	$9,2 \pm 8,8$	$12,2 \pm 5,8$
Lebend, nicht gebunden [%]	88,5	$6,2 \pm 6,8$	$9,5 \pm 5,2$
Lebende Spermien, nach NA [%]	67,4	$64,9 \pm 31,3$	$69,4 \pm 9,6$
Lebend, fusioniert, nach NA [%]	1,5	$86,1 \pm 9,6$	$70,5 \pm 11,5$
Lebend, gebunden, nach NA [%]	8,5	$7,3 \pm 5,9$	$9,0 \pm 5,6$
Lebend, nicht gebunden, nach NA [%]	90,0	$6,6 \pm 4,0$	$20,5 \pm 11,4$
pEGFP in Spermien nach NA [fg/ μ l]	205,0	37	$216,6 \pm 237,3$

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Influenzahämagglutinin für die Bindung und die Fusion der Virosomenmembranen mit den Spermien notwendig ist. Vergleicht man die zwei Präparationsarten, so sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen, auch wenn bei Zugabe von **1 mg** viralem Protein relativ gesehen etwas mehr Protein wiederzufinden ist. Beide Präparationen sind jedoch ausreichend für die Fusion mit Spermien.

4.1.7. Einfluss verschiedener Poly-L-Lysin-Kondensationszeiten auf Virosomen

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass mit steigender Inkubationszeit der DNA mit Poly-L-Lysin die Stabilität der gebildeten Komplexe zunimmt. Um zu ermitteln, ob dies auch Relevanz für die Internalisierung der DNA in die Virosomen bzw. auf den Transfer der internalisierten DNA in die Spermien hat, wurden Virosomen präpariert, denen 60µg DNA zugesetzt wurde, die für 10 min, 30 min oder 120 min vor Zugabe der Proteine und Lipide mit PLL inkubiert wurden.

Den Virosomen wurden 1 mg virales Protein, 3 mg Cholesterol und 13,2 µmol Phospholipide zugesetzt und das in der Suspension enthaltene Triton X-100 durch dreimalige Inkubation mit BioBeads SM2 für zwei Stunden bei Raumtemperatur entzogen.

- **Virosomen**

Der höchste Proteingehalt war in den Virosomen festzustellen, bei denen die DNA vor Zugabe der restlichen Komponenten für **120 min** mit PLL inkubiert worden war. Zwar konnte vor DNase-Verdau der höchste pEGFP-Gehalt in den Virosomen gefunden werden, bei denen die DNA für **10 min** mit PLL inkubiert worden war, jedoch war nach dem DNase-Verdau mit 13% der pEGFP-Gehalt in den **120 min** Virosomen am höchsten. Der DNA-Gehalt vor DNase-Verdau unterschied sich signifikant zwischen den **10 min** und den **120 min** Virosomen (one-way ANOVA, $p=0,009$). Auch die Lipidgehalte in den **120 min** Virosomen waren höher als bei den anderen Präparationen, dabei blieb das Cholesterol/Phosphat-Verhältnis in der Nähe des erwarteten Wertes (s. **Tabelle 17** und **Abbildung 21**).

Die Virosomen der **30 min**-Präparation waren signifikant größer als die der zwei anderen Präparationen (s. **Tabelle 17**; $p = 0,005$, Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 17: Protein-, pEGFP- und Lipidgehalt in Virosomen, deren DNA unterschiedlich lange mit PLL inkubiert wurde.

	PLL-Inkubationszeit		
	10 min	30 min	120 min
n	1	1	2
Proteingehalt, reduzierende Bedingungen [ng/ μ l], (%)	617,5 (17,3)	205,3 (14,1)	472,7 (32,4)
Größe der Virosomen [nm], (N)	126,5 \pm 50,6 (404)	144,3 \pm 52,5 (559)	124,3 \pm 47,5 (525)
pEGFP in 700 μ l Virosomen vor DNase-Verdau [μ g], (% eingesetztes pEGFP)	18,8 (31,3)	n.d.	15,7 (26,1)
pEGFP in 700 μ l Virosomen nach DNase-Verdau [μ g], (% eingesetztes pEGFP)	0,02 (0,04)	1,2 (2,0)	7,8 (13,0)
Cholesterolgehalt in Virosomen [μ mol], (% eingesetzt)	6,6 (85,4)	5,9 (75,6)	7,2 (93,1)
Phospholipidgehalt in Virosomen [μ mol], (% eingesetzt)	8,8 (66,9)	11,1 (83,9)	15,6 (118,3)
Cholesterol/Phosphat-Verhältnis	0,75	0,53	0,48

- **Spermien**

Der Anteil der lebenden Spermien war bei der **30 min** Präparation ebenso wie der Anteil der lebenden fusionierten Spermien am höchsten, jedoch unterschieden sich hier alle drei Präparationen nur geringfügig voneinander.

Die DNA-Transferrate in diesem Versuch war relativ niedrig und konnte nur für zwei Präparationsarten bestimmt werden, wobei sich die Werte nur gering voneinander unterschieden (s. **Tabelle 18**).

Zusammenfassend lässt sich anmerken, dass die **120 min** Virosomen zu bevorzugen sind, obwohl die **30 min** Virosomen signifikant größer waren, als die Virosomen der zwei anderen Präparationsarten und der Anteil der lebenden und der Anteil der lebenden fusionierten

4. Ergebnisse

Spermien vor Neuraminidase-Verdau größer war als bei den beiden anderen Präparationsarten. Sie sind nach Neuraminidase-Verdau den **30 min** Virosomen in der Überlebensrate der Spermien und im Anteil der nach NA lebenden, fusionierten Spermien sowie in nahezu allen Parametern, die den Gehalt von Ausgangssubstanzen in den Virosomen betreffen, überlegen.

Tabelle 18: Unterschiede in der Fusionseffizienz von Virosomenpräparationen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten der DNA mit Poly-L-Lysin, kryokonservierte Bullenspermien.

	PLL-Inkubationszeit		
	10 min	30 min	120 min
n	1	1	2
Lebende Spermien [%]	42,1	100,0	75,7
Lebend, fusioniert [%]	87,5	89,7	84,5
Lebend, gebunden [%]	8,3	10,3	8,8
Lebend, nicht gebunden [%]	4,2	0,0	6,8
Lebende Spermien nach NA-Verdau [%]	86,0	75,7	82,2
Lebend, fusioniert nach NA-Verdau [%]	88,8	87,2	91,7
Lebend, gebunden nach NA-Verdau [%]	4,6	4,5	3,9
Lebend, nicht gebunden nach NA-Verdau [%]	6,6	8,3	4,4
pEGFP in Spermien nach NA-Verdau [fg/μl]	n.d.	54,0	37,0

4.2. Variabilität der Fusionsergebnisse bei Verwendung einer Virosomenpräparation

Um zu untersuchen, wie variabel die Fusionsergebnisse einer Virosomenpräparation mit Spermien sind, wurden bei zwei Präparationen jeweils drei Experimente durchgeführt. Die Präparation der hierfür verwendeten Virosomen wurde bereits unter Punkt **4.1.5.** dargestellt.

Bei dem Vergleich der beiden Präparationen fällt auf, dass diese sich nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$, Mann-Whitney Test), dass aber die Standardabweichung bei der **3x2 h** Präparationsmethode etwas geringer ist. Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass trotz

Verwendung der gleichen Virosomenpräparation und der gleichen Charge kryokonservierter Bullenspermien die prozentualen Anteile fusionierter, lebender Spermien an der Gesamtpopulation der lebenden Spermien um etwa 20% (zwischen 43,2 % und 66,4 %, **4 h/16 h**) variieren kann. Jedoch zeigt dieser Versuch, dass solche Variationen nicht immer auftreten müssen. So variiert der Anteil der lebenden, fusionierten Spermien bei der Verwendung der **3x2h** Präparation zwischen 70,4 % bis 75,7 %, also etwa um 5%. Ähnlich variable Ergebnisse können auch bei den anderen spezifischen Populationen beobachtet werden (s. **Tabelle 19**). Nachdem die Spermien mit Neuraminidase inkubiert wurden, fällt auf, dass die Variabilität sinkt. Einzige Ausnahme ist hier der Anteil der nicht gebundenen Spermien an der Gesamtheit der lebenden Spermien (**3x2 h**-Präparation). Hier kann weiterhin eine Standardabweichung von 14,1 % beobachtet werden.

Tabelle 19: Unterschiede in der Fusionseffizienz bei Verwendung der gleichen Virosomenpräparation. Dargestellt für zwei unterschiedliche Präparationsmethoden.

	Methode der Tritonextraktion	
	4h/16h, RT	3x2h, RT
N	3	3
Lebende Spermien [%]	61,2 ± 19,5	63,5 ± 6,6
Lebend, fusioniert [%]	58,3 ± 13,1	72,5 ± 2,8
Lebend, gebunden [%]	18,5 ± 3,0	15,2 ± 6,1
Lebend, nicht gebunden [%]	23,2 ± 15,3	12,3 ± 6,1
Lebende Spermien, nach NA [%]	60,1 ± 6,5	63,4 ± 1,8
Lebend, fusioniert, nach NA [%]	54,9 ± 5,1	61,3 ± 4,4
Lebend, gebunden, nach NA [%]	11,4 ± 1,6	10,4 ± 9,7
Lebend, nicht gebunden, nach NA [%]	33,7 ± 5,0	28,4 ± 14,1
pEGFP in Spermien nach NA [fg/μl]	739,9 ± 784,7	402,8 ± 170,8

4.3. Transfer von Fluoreszein-markierter DNA aus Virosomen in Spermien

Zur Kontrolle, ob die exogene DNA mit den Spermien assoziiert blieb oder ob lediglich die Reste der DNA in der Lösung gemessen wurden, wurde pEGFP kovalent mit Fluoreszein

4. Ergebnisse

markiert und dieses für die Herstellung von Virosomen verwendet. Die Fusion der Virosomen mit den Spermien erfolgte wie bereits beschrieben. Durch die mikroskopische Analyse der Spermien konnten die Stellen gezeigt werden, an denen die Fluoreszein-markierte DNA an die Spermien assoziiert war (s. **Abbildung 11**). Mit Hilfe dieser Methode war auszuschließen, dass es sich bei der in der Realtime-PCR determinierten DNA um DNA handelt, die aus frei in der Lösung vorliegenden Virosomen stammt.

• Virosomen

Von dem initial eingesetzten viralen Protein konnten 10% in den Virosomen nachgewiesen werden. Vor DNase-Verdau wurden 0,002% der eingesetzten DNA in den Virosomen detektiert, was auf einen für diese Virosomenpräparation sehr niedrigen DNA-Gehalt sowie auf niedrige Cholesterol- und Phospholipidgehalte der Virosomen hinweist. Dabei blieb jedoch das C/P-Verhältnis gewahrt (s. **Tabelle 20**).

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern waren runde bis ovale Lipidvesikel mit bis zu vier Lipidschichten zu sehen, die nur zum Teil geschlossen waren. Die Bestimmung der Größe der Virosomen ergab, dass diese einen Durchmesser von $116,9 \pm 50,8$ nm (N=106) aufwiesen (s. **Abbildung 12**).

Tabelle 20: Protein-, pEGFP- und Lipidgehalt in Virosomen, die mit Fluoreszein-markiertem EGFP-Plasmid hergestellt worden waren.

	Fluoreszein-markierte DNA
pEGFP eingesetzt [μ g]	25
Proteingehalt, reduzierende Bedingungen [μ g], (%)	341,8 (10,0)
Größe der Virosomen [nm], (N)	$116,9 \pm 50,8$ (106)
pEGFP in 700 μ l Virosomen, vor DNase [μ g], (%)	$4,69 \times 10^4$ (0,0019)
Cholesterolgehalt in 700 μ l Virosomen [μ mol], (%)	4,8 (61,8)
Phospholipidgehalt in 700 μ l Virosomen [μ mol], (%)	8,2 (62,3)
Cholesterol/Phosphat-Verhältnis (erwartet)	0,59 (0,59)

- **Assoziation von Fluoreszein-markierter DNA an Spermien**

Der Verzicht auf fluoreszenzmarkierte Lipide ließ lediglich die Unterscheidung zwischen lebenden Spermien zu und ob fluoreszein-markierte DNA assoziiert bzw. inkorporiert war.

Sowohl vor als auch nach Neuraminidase-Verdau konnte bei dem größten Teil der lebenden Spermien eine Assoziation von fluoreszein-markierter DNA beobachtet werden (s. **Tabelle 21**). Es fiel jedoch auf, dass in beiden Fällen der Anteil der lebenden Spermien relativ niedrig war.

Tabelle 21: Ergebnisse der Fusion von Influenzavirosomen beladen mit Fluoreszein-markiertem pEGFP mit kryokonservierten Bullenspermien.

	Fluoreszein-markierte DNA
Lebende Spermien [%]	65,7
Lebend, mit markierter DNA [%]	89,2
Lebend, ohne markierte DNA [%]	10,8
Lebende Spermien nach NA [%]	40,4
Lebend, mit markierter DNA, nach NA [%]	89,5
Lebend, ohne markierte DNA, nach NA [%]	10,5

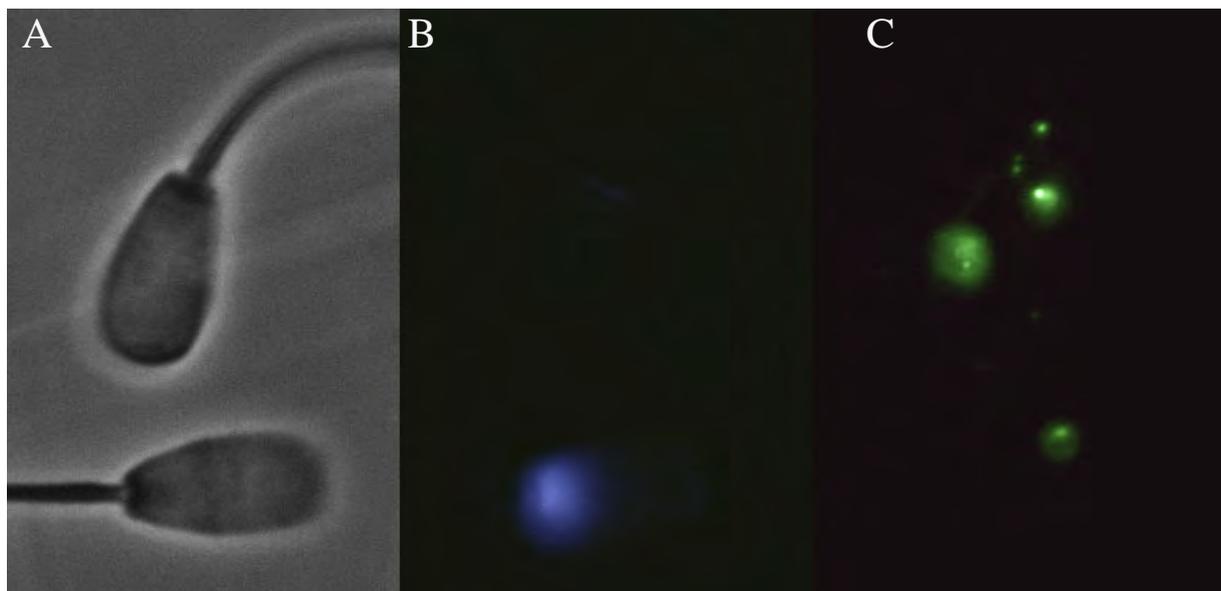


Abbildung 11: Lokalisation von Fluoreszein markierter DNA an den Spermienköpfen kryokonservierter Bullenspermien. A) Phasenkontrastaufnahme; B) Lebend-Tot-Färbung mittels Hoechst 33258; C) Fluoreszein-markierte DNA (gelb-grün), Vergrößerung 100x.

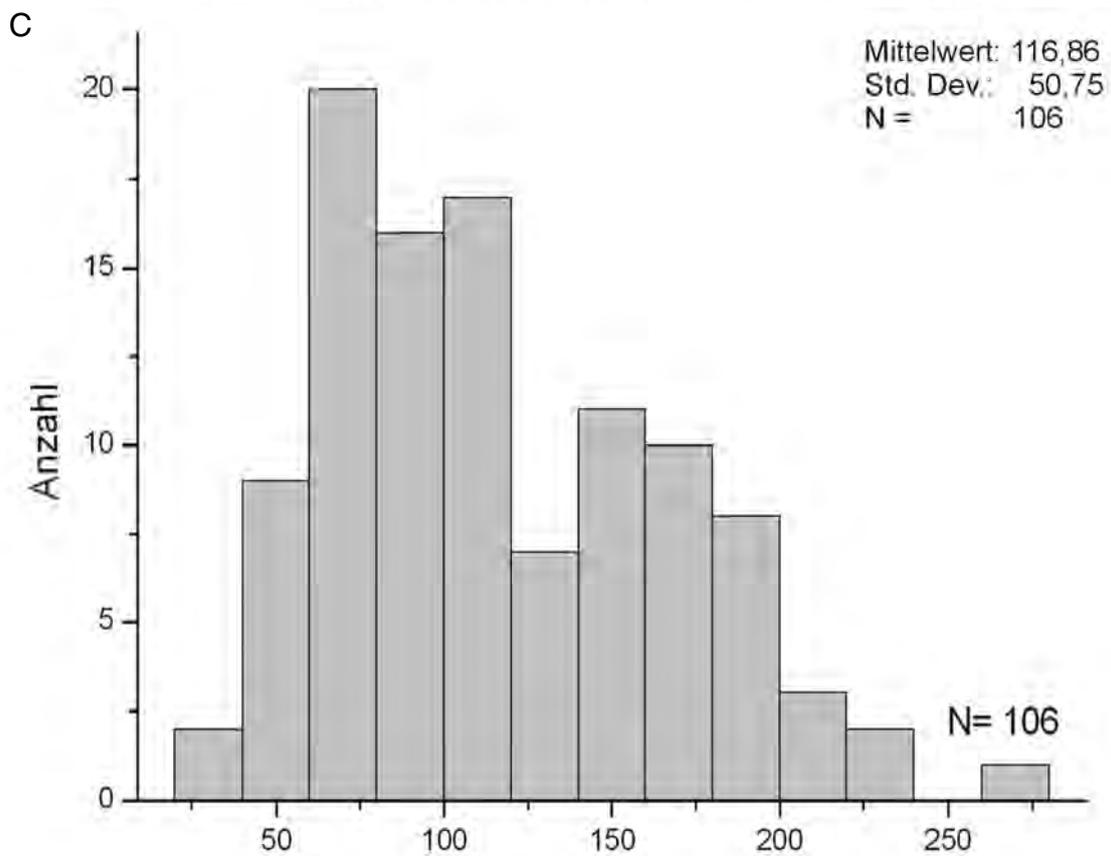
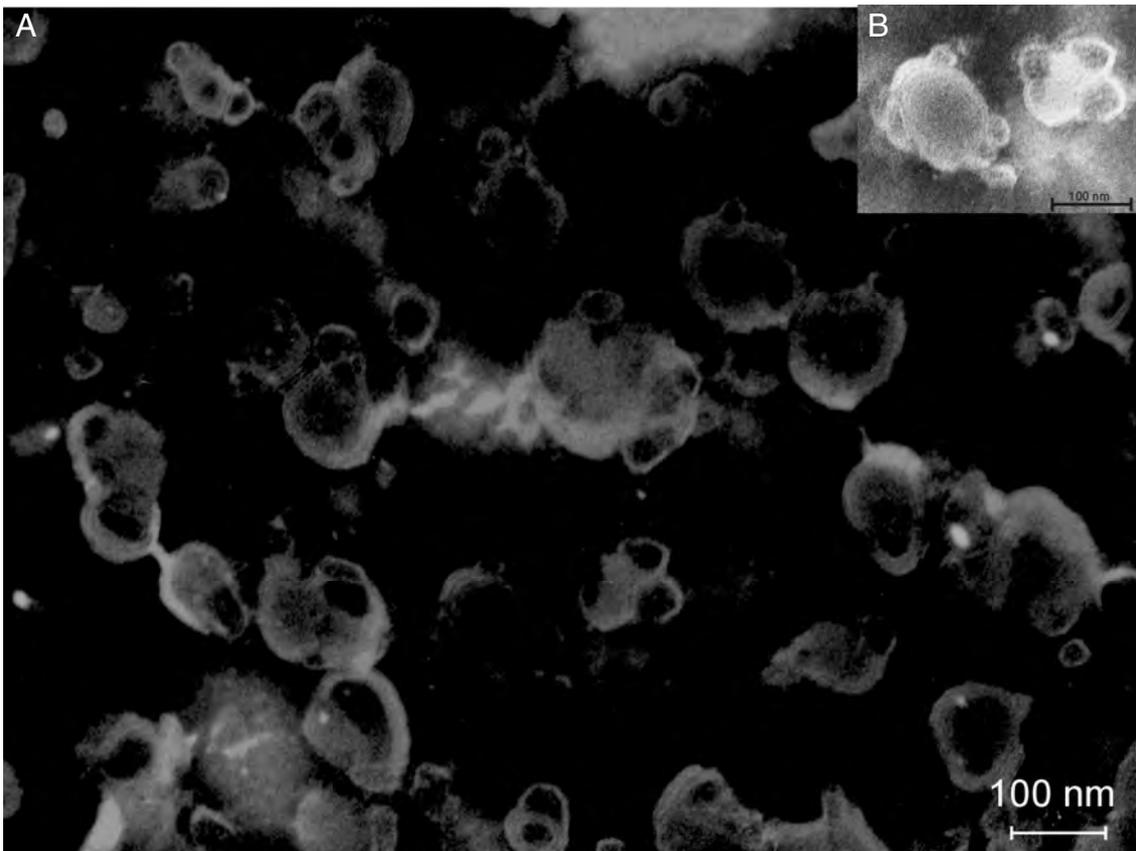


Abbildung 12: Elektronenmikroskopieaufnahmen von Influenza-Virosomen, die mit Fluoreszein-markierter DNA beladen wurden. Negativ Kontrastierung A) s.V. 52.000x, B) 135.000x. C) Größenverteilung der Virosomen in nm.

4.4. Fusion von Virosomen mit Nebenhodenschwanzspermien (Rind)

Die meisten Versuche zum Spermien-vermittelten Gentransfer wurden mit Nebenhodenschwanzspermien von Mäusen durchgeführt (s. Einführung, **Tabelle 2**). Es wurde diskutiert, ob im Seminalplasma vorhandene Proteine die Bindung der DNA an die Spermien verhindern (*Zani et al., 1995*). Zur Abklärung dieser Frage sollte untersucht werden, ob sich die fusogenen Eigenschaften der Virosomen bei Nebenhodenschwanzspermien von denen der ejakulierten, kryokonservierten Bullenspermien unterscheiden.

Verwendet wurden für diesen Versuch Virosomen, die bereits unter Punkt **4.1.3** besprochen worden sind. Hierbei handelt es sich um Virosomen, bei denen unter Beibehaltung der zugegebenen Proteinmenge (2,5 mg virales Protein) die zugesetzte Cholesterolmenge schrittweise verringert wurde. Diese Reduktion der absoluten Lipidmenge wurde ausgeglichen, indem die Menge des Phospholipidgemisches entsprechend erhöht wurde.

Tabelle 22: Ergebnisse der Fusion von Virosomen, die mit unterschiedlichen Cholesterolgehalten produziert wurden, mit bovinen Nebenhodenschwanzspermien.

	Cholesterol [mg]			
	6	3	1,5	0
n	1	1	1	1
Lebende Spermien [%]	84,7	89,2	80,3	68,0
Lebend, fusioniert [%]	73,4	86,0	30,9	3,5
Lebend, gebunden [%]	7,5	11,2	37,2	64,7
Lebend, nicht gebunden [%]	19,2	2,8	31,9	31,8

Der Anteil der lebenden Nebenhodenschwanzspermien nach Fusion mit Influenzavirosomen variierte zwischen 68 % und 89 %, wobei bis zu 86% der lebenden Spermien mit Influenzavirosomen fusioniert waren. Im Gegensatz zu kryokonservierten Bullenspermien schien jedoch nicht die Lipidmischung mit 6 mg Cholesterol und 26,4 μmol Phospholipiden ideal für die Fusion zu sein, sondern die Lipidmischung mit 3 mg Cholesterol und 30,4 μmol Phospholipiden. Wurden diese Virosomen verwendet, war sowohl der Anteil der lebenden

Spermien als auch der Anteil der lebend, fusionierten Spermien höher und der Anteil der nicht gebundenen, lebenden Spermien sehr niedrig (s. **Tabelle 22**).

In den Untersuchungen konnten nur bei zwei Präparationen die pEGFP-Gehalte in den Nebenhodenschwanzspermien nach Fusion mit Virosomen bestimmt werden. Während bei Zugabe der **1,5 mg** Cholesterolvirosomen 10.235,0 fg/ μ l pEGFP in den Virosomen nachgewiesen werden konnte, waren es bei Zugabe der **0 mg** Cholesterolvirosomen lediglich 4.849,5 fg/ μ l.

4.5. Fusion von Virosomen mit kryokonservierten Spermien verschiedener Individuen

Es ist beschrieben, dass bei Inkubation mit nackter DNA nicht die Spermien aller Individuen in der Lage sind, diese aufzunehmen (*Lavitrano et al., 2002*). Um dies für die Virosomen auszuschließen, wurden Virosomen mit kryokonservierten Spermien von verschiedenen Bullen fusioniert. Die Morphologie der hierfür verwendeten Virosomen wurde bereits unter **4.1.7** besprochen, es handelt sich hierbei um Virosomen, denen 1 mg virales Protein, 3 mg Cholesterol und 13,2 μ mol Phospholipide zugesetzt wurden. Das EGFP-Plasmid wurde vor Zugabe zu den anderen Lösungen für 2 h mit PLL inkubiert und das in der Suspension enthaltenen Triton wurde durch Inkubation mit BioBeads für 3 x 2 h extrahiert. Im Weiteren soll nur noch auf die fusogenen Eigenschaften der Virosomen mit den unterschiedlichen Spermien eingegangen werden.

Der Anteil der lebenden Spermien an der Gesamtheit aller Spermien variierte vor Neuraminidase-Verdau zwischen 36,4% und 84,6%, wobei die meisten lebenden Spermien bei dem Bullen **Warp** ($66,5 \pm 18,2\%$) zu verzeichnen waren. Nachdem die gebundenen Virosomen mit Hilfe von Neuraminidase entfernt worden waren, konnten 30,5-91,6% lebende Spermien beobachtet werden, hier konnte der größte Anteil lebender Spermien bei dem Bullen **Blacki** (73,2%) beobachtet werden. Bei allen untersuchten Bullen konnten fusionierte Spermien beobachtet werden (s. **Tabelle 23**).

Der höchste pEGFP-Gehalt konnte mit 407,7 fg/ μ l bei dem Bullen **Mercanto** festgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Spermien aller getesteter Individuen sowohl die Inkubation mit den Virosomen als auch die Ansäuerung des Mediums zum größten Teil

überlebten und dass die Virosomen in der Lage waren, mit den Spermien der verschiedenen Individuen zu fusionieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Fremd-DNA in Spermien aller Individuen nachweisbar war, wenn auch in unterschiedlichen Mengen.

Tabelle 23: Unterschiede in der Fusionseffizienz von Virosomen mit Spermien verschiedener Bullen.

	Bulle			
	Warp	Mercanto	Advokat	Blacki
n	3	1	1	1
Lebende Spermien [%]	66,5 ± 18,2	55,8	36,4	46,7
Lebend, fusioniert [%]	84,6 ± 15,5	83,6	62,7	71,4
Lebend, gebunden [%]	9,2 ± 8,8	3,0	25,4	7,1
Lebend, nicht gebunden [%]	6,2 ± 6,8	13,4	11,9	21,4
Lebende Spermien, nach NA [%]	64,9 ± 31,3	58,7	30,8	73,2
Lebend, fusioniert, nach NA [%]	86,1 ± 9,6	79,1	67,6	88,8
Lebend, gebunden, nach NA [%]	7,3 ± 5,9	7,8	10,8	6,9
Lebend, nicht gebunden, nach NA [%]	6,6 ± 4,0	13,0	21,6	4,3
pEGFP in Spermien, nach NA [fg/μl]	37,0	407,7	17,5	15
pEGFP pro Spermium [fg/Zelle]	0,002	0,040	0,001	0,001

4.6. Fusion von Virosomen mit flüssigkonservierten Eberspermien

Zur Feststellung, ob die Fusion der Virosomen auch mit Spermien einer anderen Spezies möglich ist, wurde flüssigkonserviertes Ebersperma von zwei unterschiedlichen Donoren verwendet. Die Fusion mit den Virosomen wurde wie beschrieben durchgeführt. Die Spermien wurden 45 min inkubiert, da lebende Eberspermien sich nicht gut durch Aufschwimmen von den nicht-motilen Spermien trennen lassen.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass der größte Teil der Eberspermien nach der Fusion mit den Virosomen lebte (s. **Tabelle 24**). Auch konnten hohe Anteile von fusionierten Spermien beobachtet werden. Nachteilig war jedoch, dass die Spermien nach der Fusion mit den Virosomen stark agglutinierten und eine exakte Auswertung damit erschwert wurde. Für die

4. Ergebnisse

Bestimmung der hier präsentierten Daten wurden jedoch solitär liegende Spermien ausgewählt, deren Einordnung möglich war.

Bei einer Spermienpräparation wurde der pEGFP-Gehalt in den Spermien nach Neuraminidase-Inkubation determiniert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Fremd-DNA in den Spermien wiederzufinden war.

Tabelle 24: Vergleich der Fusionseffizienz von Virosomen mit Spermien verschiedener Spezies.

	Mikro	Kalfakter
n	2	2
Lebende Spermien [%]	60,71 ± 32,0	100,0 ± 0,0
Lebend, fusioniert [%]	65,0 ± 21,2	37,7 ± 33,1
Lebend, gebunden [%]	22,1 ± 21,8	40,9 ± 2,8
Lebend, nicht gebunden [%]	12,9 ± 0,6	21,4 ± 30,3
pEGFP in Spermien nach NA-Verdau [fg/μl]	16927,5	n.d.