

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien und Lösungen der Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Ferak (Berlin, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Pharmacia Biotech Europe (Freiburg, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), SERVA (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Alle Lösungen wurden mit 2fach destilliertem bzw. deionisiertem Wasser angesetzt. CPRG wurde von der Fa. Boehringer Mannheim, DDAB, DOPE, pNPP und HC von der Fa. Fluka, β -Gal-Standard, MES, Triton-X-100, poly-L-Lysin (9.6 kDa) und Protaminsulfat wurden von der Fa. Sigma-Aldrich erworben. Die Zellkulturmedien wurden von der Fa. Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. DOTMA war eine freundliche Gabe von R. J. Debs. DOSGA, DOCSPER und DC-Chol wurden von O. Keil (Wuppertal, Deutschland) zur Verfügung gestellt. DOTAP wurde von U. Masing (Freiburg, Deutschland), DAC-Chol, sowie die Lipide Max-1, Max-2, Max-3 und Max-4 wurden von J. Richter (Berlin, Deutschland) synthetisiert bzw. hergestellt. Die Ringerlösung wurde von der Fa. Braun-Melsungen (Melsungen, Deutschland) bezogen. Die Peptide Ncp7 und PTH wurden von der Fa. Biosynthan (Berlin, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Agarose-Gel	1.0 % Agarose	1.0 g (m/V)
	50 x TAE (pH 8.3)	2 ml
	Ethidiumbromidlösung	1 μ l
	H ₂ O	ad 100 ml
Agar-Platten	Agar in LB-Medium	1.5 % (m/V)
	Ampicillin(optional)	100 μ g/ml
	Kanamycin(optional)	50 μ g/ml
D1	NaAcetat-Puffer (pH 5.6)	20 mM
	pNPP	5 mM

	Triton X-100	0.1 %
D2	Tris-HCl (pH 8.0)	0.5 M
D3	CPRG in HBSS	1 mg/ml
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
Fixierlösung	Formaldehyd	4 %
	Glutaraldehyd	0.2 %
	PBS	ad 100 %
HBSS	NaCl	138 mM
	KCl	5 mM
	KH ₂ PO ₄	0.3 mM
	Na ₂ HPO ₄	0.3 mM
	CaCl ₂	1.25 mM
	MgSO ₄	0.08 mM
	NaHCO ₃	4 mM
	D-Glukose	5.6 mM
LB-Medium	Bacto-Trypton	1 % (m/V)
	Hefeextrakt	0.5 % (m/V)
	NaCl	1 % (m/V)
	Ampicillin (optional)	100 µg/ml
	Kanamycin (optional)	50 µg/ml
NaCl-Bicarbonat-Lösung	NaCl	150 mM
	NaHCO ₃	20 mM
P1 (Resuspensionspuffer) Lagerung bei 4 °C	Tris-Cl (pH 8.0)	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
P2 (Lysispuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1.00 %
P3 (Neutralisationspuffer)	KCH ₃ COO (pH 5.5)	3 M
PBS-Puffer (pH 7.3)	NaCl	0.130 M
	KCl	0.002 M
	KH ₂ PO ₄	0.001 M
	Na ₂ HPO ₄	0.008 M
PEG-Fällungslösung	PEG 6000	30 %
	NaCl	1.5 M

Probenpuffer (pH 6.8)	Tris	0.0625 M
	Glycerin	10 % (V/V)
	Bromphenolblau	0.004 % (m/V)
QBT (Equilibrierungspuffer)	NaCl	750 mM
	MOPS (pH 7.0)	50 mM
	Isopropanol	15.0 %
QC (Waschpuffer)	NaCl	1 M
	MOPS (pH 7.0)	50 mM
	Isopropanol	15 %
	Triton X-100	0.15 %
QF (Elutionspuffer)	NaCl	1.25 M
	Tris-HCl (pH 8.5)	50 mM
	Isopropanol	15 %
Ringerlösung nach Fa.Merck	NaCl	147 mM
	KCl	4 mM
	CaCl ₂	2.3 mM
50 x TAE-Puffer (pH 8.3)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	0.05 M
Transformationspuffer	PEG	10 % (m/V)
	MgCl ₂	30 mM
	LB-Medium	ad 100 % (V/V)
Trypsin-Lösung	Trypsin	1.25 g
	Versine/Chelaplex III	0.5 g
	KCl	0.8 g
	Na ₂ CO ₃	0.7 g
	Glucose	1 g
	NaCl	8 g
X-Gal Substratlösung	MgCl ₂ (1.1 mM)	7 ml
	K ₃ [Fe(CN) ₆] (50 mM)	0.5 ml
	K ₄ [Fe(CN) ₆] (50 mM)	0.5 ml
	X-Gal in DMF (2 %)	110 µl

2.1.3 Geräte

- Aga-Gel-Elektrophoreseapparatur von Biometra (Göttingen, Deutschland)
- Eppendorffzentrifuge 5415-C der Fa. Eppendorf (Köln, Deutschland)
- FACS-Scan der Fa. Becton-Dickenson (Erembodegem, Belgien)
- Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader BMG-Fluostar der Fa. SLT-Tecan (Crailsheim, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-70 der Fa. OLYMPUS (Hamburg, Deutschland) mit Bildauswertesystem der Fa. Hamamatsu Photonics (Herrsching, Deutschland)
- Gefriertrocknungsanlage der Fa. Christ (Deutschland)
- Geldokumentationssystem der Fa. Herolab (Wiesloch, Deutschland) mit Kamera 429-K, UV-Transilluminator UVT-28M und Software E.A.S.Y.
- Heraeus-Sepatech-Biofuge-15 der Fa. Kendro-Heraeus (Berlin, Deutschland)
- Heraeus-Sepatech-Megafuge-1.0R der Fa. Kendro-Heraeus
- Heraeus-Sepatech-Varifuge-3.0R der Fa. Kendro-Heraeus
- Ionenaustauschersäulen der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland)
- JEM-100-CX-Transmissionselektronenmikroskop
- LS-50B-Lumineszenz-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer (Überlingen, Deutschland)
- Mikrotiterplatten-Reader der Fa. SLT-Tecan (Crailsheim, Deutschland)
- MLW-Tischzentrifuge T52.1 der Fa. Janetzki (Leipzig-Engelsdorf, Deutschland)
- Photonenkorrelations-Spektrophotometer N4-PLus-MD von Coulter-Electronics (Krefeld, Deutschland)
- Sorvall-Zentrifuge RC-5B von Du Pont Instruments (Bad Homburg, Deutschland)
- Transsonic-570-Ultraschallbad der Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- UV/VIS-Spektrophotometer JASCO-V550 der Fa. Jasco Co. (Japan)
- UNIVAPO-150-H-Vakuumzentrifuge der Fa. Bachhofer (Reutlingen, Deutschland)
- VF-2-Vortexer von Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- Zetapotentialmeßgerät Delsa-440-SX der Fa. Coulter-Electronics (Krefeld, Deutschland)

Plasmid	Größe	regulatorische Sequenz, kodiertes Gen	Referenz bzw. Herkunft
pEGFPC1	4.7 kB	CMV-Promotor, GFP-Gen	Clontech (Heidelberg, Deutschland)
pUT649	6.4 kB	CMV-Promotor, tk-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)
pUT650	5.1 kB	CMV-Promotor, luc-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)
pUT651	6.5 kB	CMV-Promotor, lacZ-Gen	Cayla (Toulouse, Frankreich)

Tabelle 2.1: **Übersicht über Eigenschaften und Herkunft der in der Arbeit verwendeten Plasmide.**

2.1.4 Biologische Materialien

2.1.4.1 Plasmide

Die Plasmid-Vektoren pUT649, pUT650 und pUT651 wurden von der Fa. Cayla (Toulouse, Frankreich) erworben. Das Plasmid pEGFPC1 wurde von der Fa. Clontech (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle pUT-Plasmide tragen ein β -Lactamase-Gen zur Selektion rekombinanter Bakterien in *E.coli*. Der Vektor pEGFPC1 enthält ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion der transformierten *E.coli*. Eine Übersicht über die Expressionsvektoren und ihre Eigenschaften enthält die Tabelle 2.1.

Mit Hilfe des Plasmides pEGFPC1 kann die Anzahl transfizierter, das GFP-Protein exprimierender Zellen durch eine FACS-Analyse bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden. Das Genprodukt des lacZ-Genes, die β -Galaktosidase, kann mit Hilfe von Farbreaktionen in transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die exprimierte Thymidinkinase ist ein negativer Selektionsmarker. Durch Zugabe von Ganciclovir können die transfizierten Zellen abgetötet werden.

2.1.4.2 Zelllinien

In Tabelle 2.2 sind die in den Versuchen verwendeten Zelllinien, deren Speziespezifität sowie die Herkunft aufgeführt.

2.1.4.3 Restriktionsenzyme und Puffer

Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firmen Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland), Eurogentec (Seraing, Belgien) und Fermentas (Litauen) mit den dazu gelieferten 10fach Restriktionsendonuklease-Puffern.

Zelllinie	Bemerkungen	Referenz/Herkunft
F98	Rattenglioblastomzelllinie	[80]
N64	humane Glioblastomzelllinie	[156]
U373	humane Glioblastomzelllinie	ATCC:HTB-17
K562	Erythroleukämiezelllinie	[98]
MaTu	humane Mammatumorzelllinie	[158]
MCF7	humane Mammatumorzelllinie	[139]
CC531	Rattenkolonkarzinomzelllinie	[147]
pVSM	glatte Muskelzellen des Schweins	[82]
Mewo	humane Melanomzelle	[128]

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

2.2 Methoden

Einen Überblick über die durchgeführten Prozesse gibt die Abbildung 2.1.

2.2.1 Herstellung der DNA

2.2.1.1 Transformation von E.coli-Zellen

Da die bisher verwendeten Transformationsmethoden wie die Hitzeschocktransformation [63] oder die Elektroporation [20] relativ umständlich sind, wurde durch unsere Arbeitsgruppe ein Verfahren zur chemischen Transformation von E.coli [28] modifiziert, welches eine einfache, schnelle und effiziente Transformation der Bakterien erlaubt [61].

Für die Transformation wurden E.coli-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurde frisches LB-Medium mit den Bakterien aus einer stationären ÜNK im Verhältnis 100:1 angeimpft und die Kultur anschließend etwa 1.5 bis 2 h bei hoher Schüttelfrequenz bis zu einer Zelldichte von etwa 10^8 Zellen/ml ($OD_{600} = 0.2-0.4/cm$) wachsen gelassen. Nach dem Erreichen des Titers wurden die Zellen bei $4^\circ C$ und 2200 rpm für 10 min in einer Heraeus Megafuge zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig und möglichst vollständig dekantiert und das Zellpellet in 0.1 Volumenteilen eisgekühltem Transformationspuffer mit Hilfe einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden nun für weitere 10 bis 20 min auf Eis gestellt. Diese Zellen sind kompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA.

Zur Transformation wurden 100 bis 200 μl kompetente Zellen mit der Plasmid-DNA gemischt und für 10 min in Eis, 10 min bei Raumtemperatur und erneut 10 min in Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit kommt es zum Anheften der DNA an

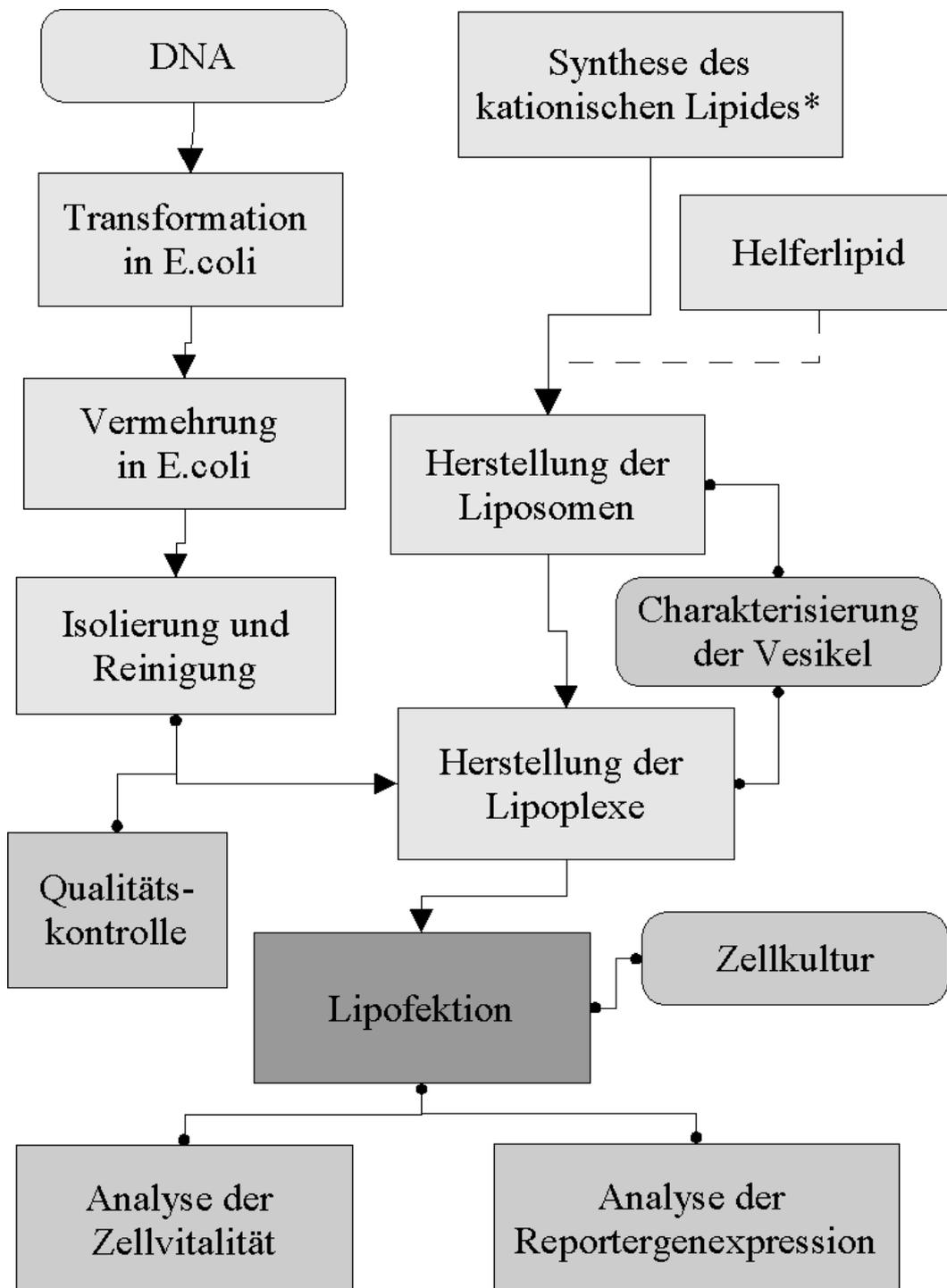


Abbildung 2.1: **Prozeßschema** der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte.

* Wird im Rahmen dieser Untersuchungen nicht beschrieben.

die bakterielle Zellwand und zur Aufnahme in die Bakterien. Zur Expression des transformierten Plasmides wurden die Zellen nach Zugabe von 0.8-0.9 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100-500 μ l dieser Suspensionskultur auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wuchsen nur die gegen das Antibiotikum resistenten transformierten Bakterien.

2.2.1.2 Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse und die Reinigung mit Ionenaustauschersäulen der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland). Zur Freisetzung der DNA wurde die Zellwand der Bakterienzellen zunächst im alkalischen Milieu lysiert. Die Proteine sowie die chromosomale DNA der Bakterien wurden danach durch eine Natriumacetatfällung von der Plasmid-DNA abgetrennt. Die Reinigung der Plasmid-DNA von der bakteriellen RNA und dem restlichen Protein erfolgte anschließend über die Anionenaustauschersäule.

Zur Plasmidamplifikation wurde der Bakterienstamm DH5- α [63] verwendet. Die nachfolgenden Angaben gelten für eine Präparation der DNA aus 500 ml Bakterienkultur bei Verwendung einer Qiagen-Ionenaustauschersäule mit der Kapazität für 500 μ g DNA (Maxi-Säule). Bei Verwendung von Säulen mit einer anderen Kapazität wurden die Mengen der eingesetzten Puffer und Kulturlösungen entsprechend den Herstellerangaben angepaßt.

In einem Kulturröhrchen wurden 5 ml LB-Selektivmedium (100 μ g/ml Ampicillin) mit einer plasmidhaltigen *E. coli* Kolonie von der Agarplatte beimpft (vgl. den vorherigen Abschnitt) und unter Schütteln bei 37°C für 4 bis 16 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml eines LB-Selektivmediums (100 μ g/ml Ampicillin) im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zum stationären Wachstum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde danach 10 min auf Eis gestellt, bei 4000 rpm und 4°C für 10 min in einer Sorvall-Zentrifuge mit dem Rotor SLA-3000 zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und für 10 min bei RT stehengelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte dann durch die Zugabe von 10 ml alkalischer SDS-Lösung (Puffer P2) - und 5 minütiger Inkubation bei RT. Nach der Zugabe von 10 ml eiskalter, saurer Natriumacetatlösung (Puffer P3) wurde die Suspension 30 min auf Eis gehalten und zur Abtrennung des Zelldebris bei 6000 rpm und 4°C für 30 min in einer Sorvall Zentrifuge (SS34-Rotor) zentrifugiert. Zur Entfernung nicht sedimentierter Zelltrümmer wurden diese anschließend mit Hilfe eines autoklavierten Kaffeefilters abgetrennt.

Das Filtrat wurde nun auf eine zuvor mit 10 ml QBT equilibrierte Ionenaustauschersäule gegeben, welche die Plasmid-DNA bindet. Danach erfolgte die Waschung der Säule mit 2 x 50 ml QC zur Entfernung der restlichen RNA und der Proteine. Die DNA wurde anschließend durch die Zugabe von 10 ml QF, einem schwach alkalischen und höherionigen Elutionspuffer, von der Säule eluiert.

Die Fällung der Plasmid-DNA aus dem Eluat erfolgte in einem nächsten Schritt durch die Zugabe von 0.7 Volumenteilen Isopropanol. Nach einer Fällungszeit von 30 min bei RT wurde die gefällte DNA bei 12.000 rpm, 4°C für 30 min (Rotor SS34) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig (!) dekantiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und dann für wenigen Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend erfolgte die Lösung der DNA in 0.5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) über Nacht

bei 4°C.

Alternativ wurde die DNA aus dem Elutionspuffer mit 0.5 Volumenteilen einer PEG-Fällungslösung und einer 1 h Inkubation auf Eis präzipitiert. Die Sedimentierung, Waschung und Resuspension der DNA erfolgte wie bei der Isopropanolfällung angegeben.

Die DNA-Konzentration wurde danach durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm, unter der Annahme das 50 µg/ml DNA eine Absorption von 1 OD/cm [159] haben, ermittelt. Zur Kontrolle auf eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen wurde außerdem die Absorption bei 280 nm gemessen. Die im Verlaufe der Untersuchungen präparierte DNA sollte ein Verhältnis der Absorptionswerte bei 260/280 nm zwischen 1.8 und 2.0 haben.

2.2.1.3 Restriktionsanalytische Kontrolle von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Identität der präparierten Plasmid-DNA wurde diese durch Restriktionsspaltungen untersucht. Eingesetzt wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die abhängig vom Restriktionsenzym innerhalb definierter DNA-Erkennungssequenzen die DNA an einer bestimmten Stelle schneiden.

Spaltansatz:

steriles, destilliertes Wasser	17 µl
Spaltpuffer (10fach)	2 µl
Plasmid-DNA (1.0 µg/µl)	1 µl
Restriktionsenzym (3-20 U/µl)	0.1 µl

Beim Herstellen des Restriktionsspaltansatzes wurde zuerst das Wasser, dann die DNA und der Spaltpuffer sowie zuletzt das Restriktionsenzym zugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C wurden 4 µl Ladepuffer zu den Spaltansätzen zugegeben und es erfolgte die Kontrolle der Spaltung durch eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA-Moleküle wandern in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Gleichspannungsfeld. Durch paralleles Auftragen von DNA-Fragmenten bekannter Länge (Marker) ist ein Abschätzen der Basenpaaranzahl eines DNA-Moleküls möglich. Die DNA-Banden werden durch den Zusatz von Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. Diese Substanz interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung durch UV-Strahlung.

Die in 1 x TAE-Puffer suspendierte Agarose wurde auf einer Heizplatte geschmolzen und auf 60°C abgekühlt. Danach wurde EtBr-Lösung zugesetzt (0.5 µg/ml EtBr im Gel) und die Agarose-Lösung blasenfrei in die vorbereitete Elektrophorese-Gelkammer gegossen. Nach 30 bis 60 min bei RT wurde der Gelkamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA wurde anschließend mit 0.2 Volumenteilen Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Zur Abschätzung der Basenzahl wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Dazu wurden die Produkte der Restriktionsspaltung des Enzyms Hind III mit der DNA des Lambda-Phagen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von etwa 10 V/cm (60-100 V).

Lipid	Molmasse*	Kopfgruppe	Ladung	Ankergruppe
DOTMA	676	Trimethylamin	1	Dioleylether
DDAB	631	quarternäres Amin	1	Diocetylgruppe
DOSGA	770	Guanidin	1	Dioleoylglycerol
DOCSPER	1191	T-Spermin	3	Dioleoyloxyglycerol
A-Chol	494	Alanin	1	Cholesterol
O-Chol	610	Ornithin	1	Cholesterol
Put-Chol	537	Putrescin	2	Cholesterol
DAC-Chol	537	Dimethylamin	1	Cholesterol
DC-Chol	537	Trimethylamin	1	Cholesterol
DCQ-Chol	626	Hydroxyethyl-dimethylamin	1	Cholesterol
Sp-Chol	721	T-Spermin	3	Cholesterol
<i>Neutrallipide</i>				
DOPE	744		0	DOPE
Chol	387		0	Cholesterol

Tabelle 2.3: **Übersicht über die zur Liposomenformulierung verwandten Lipide**

*inklusive Gegenion

Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mit Hilfe eines Herolab Geldokumentationssystems und eines UV-Tisches bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 312 nm.

2.2.2 Herstellung der Liposomen

2.2.2.1 Herstellung des Lipidfilms

Einen Überblick über die Bezeichnung und die Struktur der zur Herstellung der kationischen Liposomen verwandten Lipide gibt die Tabelle 2.3. Die kationischen Lipide und die Helferlipide wurden in Chloroform oder in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1/2; v/v) gelöst. Die Lipidkonzentration betrug 10 mg/ml. Zur Präparation des Lipidfilms wurden Helferlipid und kationisches Lipid in verschiedenen Verhältnissen gemischt und in ein 2 ml Glasprobenröhrchen überführt. Danach wurden die Proben in eine auf -20°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage überführt und dort für etwa 10 min zur Abkühlung belassen. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte anschließend über Nacht bei -20°C und einem Druck von 0.94 mBar. Am darauffolgenden Tag wurden die Probenröhrchen nach der vorsichtigen Belüftung der Gefriertrocknungsanlage entnommen und unter einer Laminarbox für etwa 10 min getrocknet. Die verschlossenen Probenröhrchen wurden dann bis zur Herstellung der Liposomen bei -20°C gelagert.

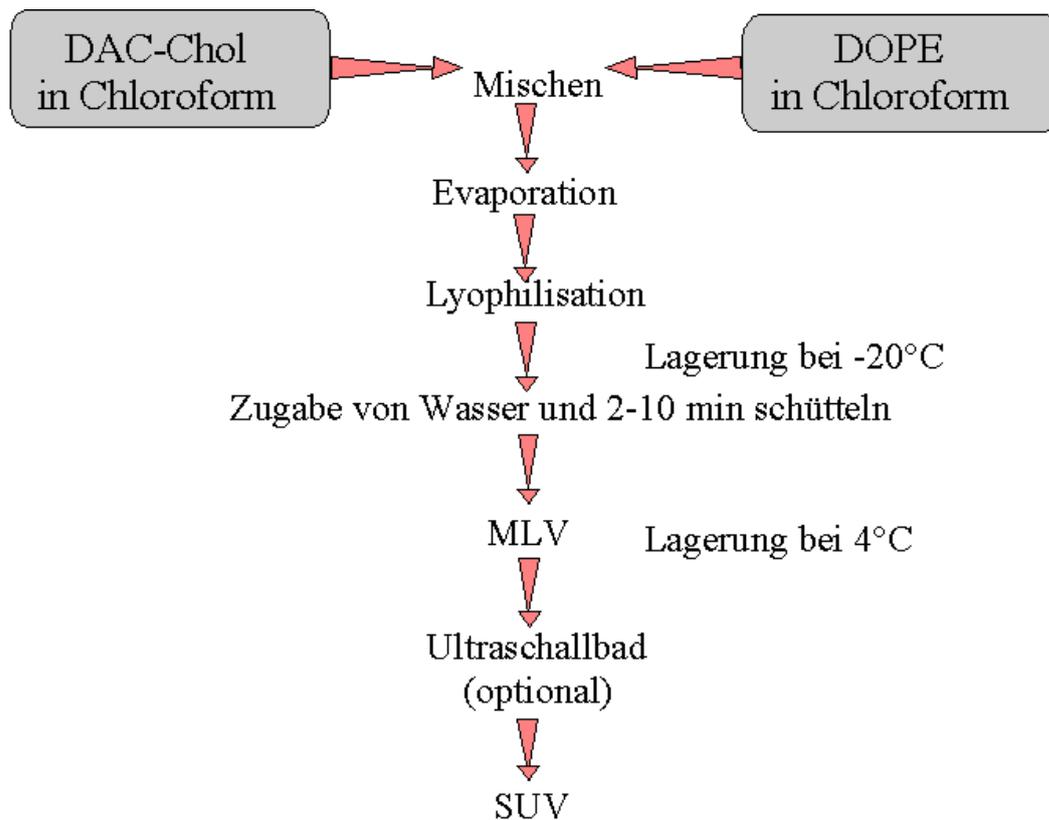


Abbildung 2.2: Schema zur Herstellung von DAC-Chol-Liposomen

2.2.2.2 Herstellung der Liposomen aus dem Lipidfilm

Zur Herstellung von Multischichtliposomen (MLV's) wurde deionisiertes Wasser zu den Lipidfilmen gegeben, die Glasprobenröhrchen fest verschlossen und die Vesikelbildung durch starkes Schütteln für 2 bis 10 min auf einem VF-2-Vortexer eingeleitet. Die Vesikelbildung wurde anhand des Vorhandenseins einer homogenen teilweise leicht opaleszierenden oder getrübbten Lösung und der vollständigen Emulgierung des Lipides bei Fehlen des Lipidfilmes beurteilt. Das Schütteln auf dem Vortexer erfolgte mindestens für 2, maximal für 10 min. Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV's) wurden die Liposomen anschließend für 10 min in einem Transsonic-570-Ultraschallbad bei 35 kHz inkubiert. Zum Ablauf der Liposomenbildung vergleiche auch die Abbildung 2.2.

Es wurden verschiedene liposomale Formulierungen jedes einzelnen kationischen Lipides hergestellt. Dabei wurden unterschiedliche Verhältnisse von kationischem Lipid und Helferlipid verwandt. Die Bezeichnung der Liposomen in der vorliegenden Arbeit folgt dabei der folgenden Regel:

Lipidkürzel^{*1}-Mengenanteil des kat. Lipides^{*2}-Helferlipidart/Mengenart^{*3} ¹

Dabei ist:

*1 der Kurzname des kationischen Lipides

¹Bsp.:

DAC-30 bedeutet 30 % DAC-Chol, 70 % DOPE (w/w),
 DOTAP-75M bedeutet 75 % Mol % DOTAP, 25 % Mol % DOPE und
 DOTAP-75C ist 75 % Mol % DOTAP und 25 % Mol % Cholesterol.

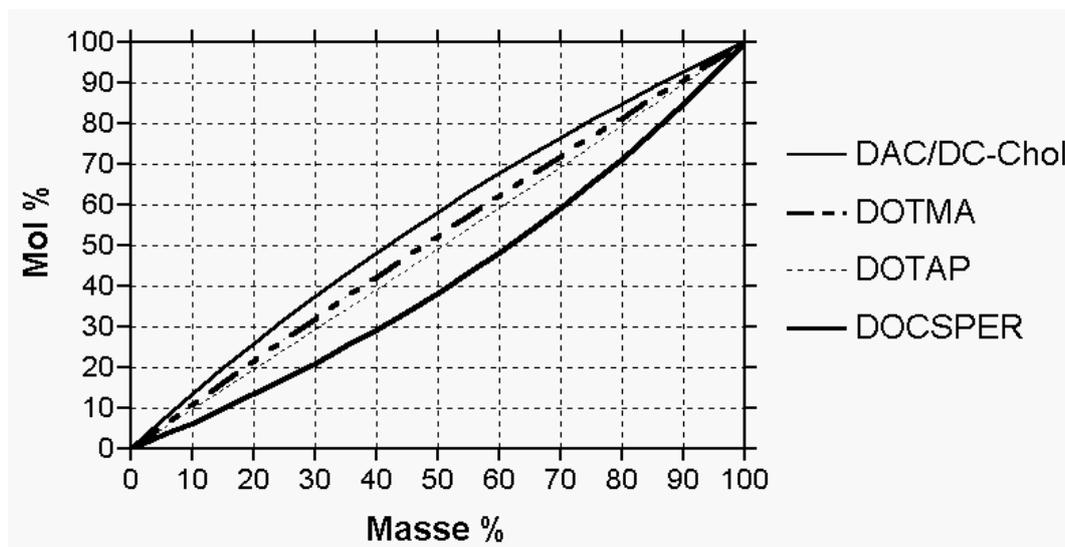


Abbildung 2.3: Zusammenhang von Masse und Mol % bei DAC-Chol- bzw. DC-Chol-(MW=537), DCQ-Chol-(MW=626), DOTMA-(MW=676) und DOCSPER-(MW=1191)Liposomen.

Als Helferlipid zur Liposomenformulierung wurde DOPE (MW=744) verwendet. Das Diagramm ist wie folgt zu interpretieren: wenn z.B. DAC-30-Liposomen mit 30 Masse % DAC-Chol (x-Achse) und 70 Masse % DOPE hergestellt werden, betragen die molaren Verhältnisse etwa 37 % DAC-Chol (y-Achse) und 63 % DOPE.

*² der Anteil am Gesamtlipid in %.

*³ (optional) Zusatz bei Verwendung molarer Verhältnisse (M), bzw. bei Einsatz von Cholesterin (C) als Helferlipid.

Zum Zusammenhang von Masse und Mol % bei der Herstellung der unterschiedlichen Mischungen von kationischem und Helferlipid vergleiche auch die Abbildung 2.3.

2.2.3 Herstellung der Lipoplexe

Beim Mischen von DNA und kationischen Liposomen im wässrigen Medium entstehen aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen spontan Komplexe zwischen der infolge der Phosphatbrücken negativ geladenen DNA und den durch die Aminogruppen positiv geladenen Liposomen.

Die Herstellung der Lipoplexe für die Transfektion der Zellen erfolgte nach einem von Felgner und Mitarbeitern [44] entwickelten Verfahren zur Testung kationischer Liposomen auf ihre Gentransfereigenschaften (vgl. Abb. 2.4). Sowohl die Liposomen als auch die DNA wurden dazu separat in zwei 96er Zellkulturschalen verdünnt. Die Standardkonzentrationen waren dabei 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 und 0,3 μg Lipid je 50 μl Verdünnungsmedium sowie 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06, 0,3 oder 0 μg DNA je 50 μl Verdünnungsmedium. Als Verdünnungsmedium wurde dabei entweder serum- und antibiotikafreies Zellkulturmedium oder Ringerlösung oder isotonische NaCl-Lösung verwendet. Nach der Verdünnung von Liposomen und DNA wurde die DNA-Lösung zu den Liposomen gegeben und die Mischung zur Lipoplexbildung für 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Abweichungen zu den hier beschriebenen Standardbedingungen wird im Ergebnisteil hingewiesen.

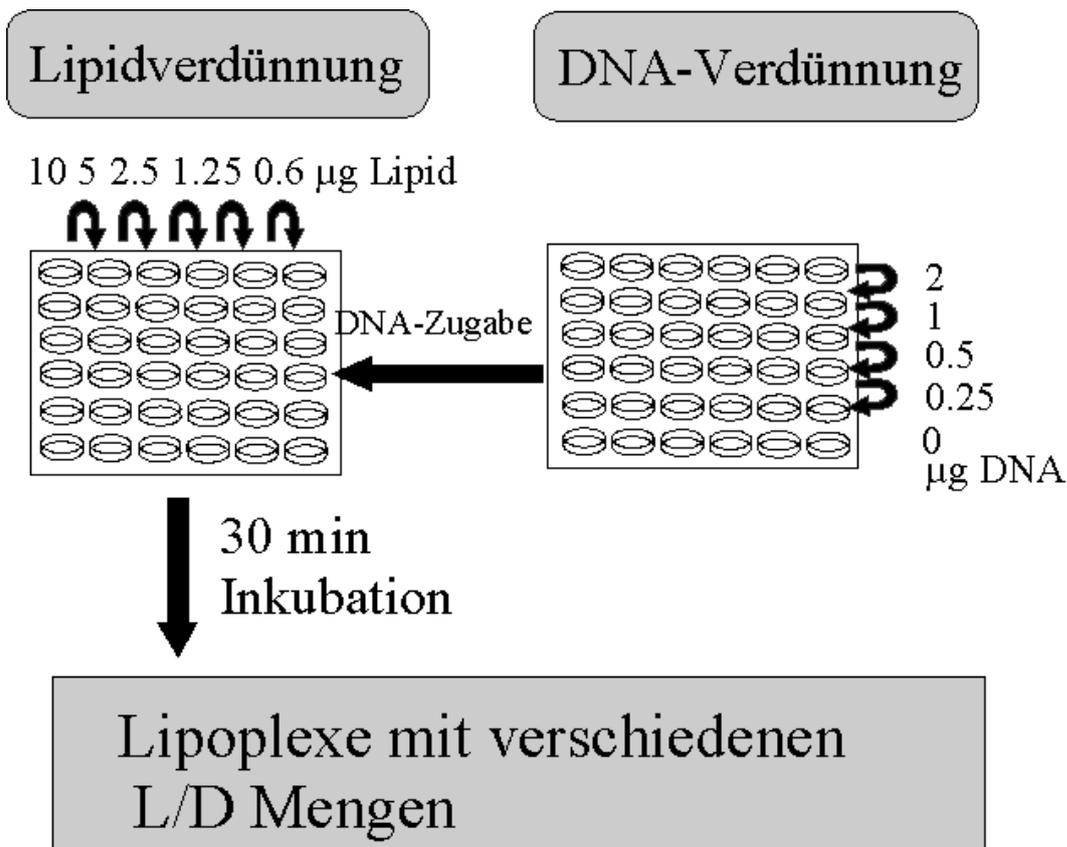


Abbildung 2.4: Schema zur Herstellung von Lipoplexen

2.2.4 Herstellung der Lipopolyplexe

Die Komplexierung der DNA vor der Liposomenzugabe mit Polykationen wie PS und PLL führt zur Bildung von Vesikeln, die auch als Lipid-Polykation-DNA-Partikel (LPD-Partikel) bezeichnet werden. In dieser Arbeit werden diese Gentransfervesikel in Anlehnung an die von Felgner und Mitarbeitern [45] vorgeschlagenen Nomenklatur auch als Lipopolyplexe bezeichnet (vgl. Abb. 1.2).

Zur Herstellung solcher Vesikel wurde die DNA in Ringerlösung auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und anschließend mit dem ebenfalls in Ringerlösung auf Konzentrationen von 2.5 bis 160 µg/ml verdünnten PS oder PLL vermischt. Nach 5-10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe der Polyplexe zu den bereits vorher in Medium verdünnten Liposomen. Zur Bildung der Lipopolyplexe wurde die Mischung weitere 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Biophysikalische Untersuchungen

2.2.5.1 Bestimmung der statischen und der dynamischen Lichtstreuung

Die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung mit Hilfe der Photonenkorrelationspektroskopie dient der Größenbestimmung und der Analyse der Größenverteilung von Partikeln [30, 31]. Das Meßprinzip beruht auf der Tatsache, daß kleinere Partikeln schneller als größere diffundieren. Dies führt bei kleineren Partikel zu kürzeren zeitlichen Abständen bei der Veränderung des Streulichtes eines durch die Probe gehenden

Laserstrahles als bei größeren Partikeln. Diese Schwankungen der Streulichtintensität werden zur Bestimmung der Teilchengröße herangezogen. Die statische Lichtstreuung charakterisiert demgegenüber die nicht zeitabhängige Lichtstreuung (Trübung). Diese kann eingeschränkt zur Abschätzung der Größe von Partikeln bzw. zur Detektion von Größenveränderungen, z.B. nach der Zugabe von DNA, genutzt werden. Die Trübung des Mediums durch die Liposomen bzw. die entstehenden Lipoplexe deutet auf die Anwesenheit von Partikeln mit Durchmessern im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes hin. Eine Zunahme der Trübung des Komplexierungsmediums ist daher ein Hinweis auf eine Vergrößerung des Anteils an Gentransfervesikeln im Größenbereich von mehreren hundert nm.

Für die Bestimmung der Trübung, d.h. der statischen Lichtstreuung wurde der Mikrotiterplatten-Reader der Fa. SLT-Tecan verwendet. Die Liposomen wurden in Ringerlösung verdünnt und in eine 96-MTP-Platte pipettiert. Die Bestimmung der Lichtstreuung erfolgte bei Wellenlängen von 405 und 690 nm. Auch die Bildung der Lipoplexe und der Lipopolyplexe wurde direkt in den Wells der 96er-Mikrotiterplatte vor und nach der Mischung der Komponenten durch Messen der Lichtstreuung bei 405 oder 690 nm kontrolliert. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung zur Größencharakterisierung erfolgte an einem N4-Plus-Partikelmeßgerät der Fa. Coulter-Electronics. Dazu wurden die Liposomen in einer 3 ml Küvette mit 1.7 ml sterilem, filtriertem Wasser soweit verdünnt, daß das Meßsignal zwischen 0.5×10^4 und 1×10^6 Partikeln/s betrug. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Partikelgrößen mit Hilfe der Mehrwinkelanalyse. Es wurde jede Probe zweifach vermessen um Meßungenauigkeiten durch Systeminstabilitäten auszuschließen. Die Messung erfolgte für 2×120 s bei Meßwinkeln von 15, 23, 30, 61 und 90 Grad. Der Wert für den Meßwinkel von 90 Grad, der bei Annahme einer unimodalen Verteilung errechnet wurde, wurde als ein relatives Maß für die durchschnittliche Größe aller Liposomen der Gesamtpopulation gewertet. Bei kleineren Meßwinkeln dominiert dagegen das Streulichtsignal der größeren Partikel. Aus der Differenz der Meßwerte bei den verschiedenen Meßwinkeln, lassen sich Rückschlüsse über die Anteile und die Breite der Verteilung der einzelnen Liposomengrößen ziehen [132].

2.2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese der Lipoplexe

Die Darstellung der Oberflächenladung der Lipoplexe erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der Ladung bzw. dem Komplexierungsgrad durch die Liposomen, wandert die DNA im elektrischen Feld. Die Lipoplexe wurden in isotonischer NaCl-Lösung präpariert (vgl. Abschnitt 2.2.3). Ein konstanter Betrag an Plasmid-DNA wurde dabei mit verschiedenen Mengen an kationischen Liposomen gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0.2 Volumenteile Ladepuffer hinzugegeben und die Ansätze gemischt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Analyse der Lipoplexe in einem 1 % Agarose-Gel mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ EtBr in TAE-Puffer. Die EtBr markierte DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators und des Geldokumentationssystems der Fa. Herolab sichtbar gemacht und dokumentiert.

pH	0.2 M CH ₃ COOH	0.2 M NaCH ₃ COO	0.2 M Na ₂ HPO ₄	0.2 M NaH ₂ PO ₄	0.1 M NaHCO ₃	0.1 M Na ₂ CO ₃	0.2 M NaOH
4	90	10					
4.5	57	43					
5	30	70					
5.5	12	88					
6			12	88			
6.5			30	70			
7			60	40			
7.4			80	20			
8			94	6			
9.2					10	90	
10					60	40	
10.8					90	10	
12							100

Tabelle 2.4: **Mischungsschema zur Herstellung der verschiedenen Stammpuffer für die HC-Fluoreszenzuntersuchungen**

(nach Müller [111]) Bsp.: Zur Herstellung von 1 l eines 0.02 M NaAcetat-Puffers (pH 4.5) wurden 57 ml 0.2 M CH₃COOH und 43 ml NaCH₃COO gemischt und anschließend mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

2.2.5.3 Fluoreszenzuntersuchungen mit Hilfe des pH-abhängigen Fluorophores 4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Liposomeneigenschaften erfolgte mit Hilfe des pH-sensitiven Fluorophores HC. Dieses wird in die Liposomenmembran eingelagert und erlaubt die Bestimmung von Liposomeneigenschaften der Membranoberfläche [172]. Es handelt sich bei der fluoreszierenden Kopfgruppe des HC's, dem Hydroxycoumarin, um eine schwache Base. Bei pH-Werten unter dem pKa-Wert der Kopfgruppe beträgt die maximale Anregungswellenlänge etwa 320 nm, bei pH-Werten die größer als der pKa-Wert sind, ist das Anregungsmaximum auf 380 nm verschoben. Die Anregungswellenlänge von etwa 330 nm ist der sogenannte isobestische Punkt an welchem

die Fluoreszenz unabhängig vom pH-Wert ist. Der Wert repräsentiert demzufolge die absolute Menge an Fluorophor in der Membran und kann zur Normierung der Messung genutzt werden. Die elektrostatischen Eigenschaften des Fluorophores erlauben es, den Dissoziationsgrad des in der Liposomenmembran inserierten HC's anhand des Verhältnisses der Lichtemission bei Anregungswellenlängen von 380 und 330 nm zu bestimmen und aus diesen Daten können Rückschlüsse auf den pH-Wert an der Liposomenoberfläche gezogen werden.

Die Formulierung der Liposomen erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2 (S. 42ff) beschrieben. Zu den in Chloroform gelösten Lipiden wurde jedoch vor der Evaporation bzw. Lyophilisation des Lösungsmittels außerdem 1×10^{-8} M HC, gelöst ebenfalls in Chloroform, zu je 10^{-6} M Gesamtlipid hinzugegeben.

Nach der Herstellung der Liposomen durch Zugabe von 1 ml deionisiertem Wasser wurden sie in 20 mM Pufferlösung (pH 3.7-12.0; vgl. Tab. 2.4) auf eine Lipid-Konzentration von 1×10^{-13} M verdünnt. Nach 20 min Inkubation erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz des in die Membran inserierten Fluorophores bei Anregungswellenlängen von 330 und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Dazu wurden 15 μ l des Lipides in 3 ml Puffer verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Dann erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz am LS-50B-Lumineszenz-Spektrometer. Der Anteil an protonisiertem HC wurde näherungsweise durch die Bestimmung des Verhältnisses der Emissionen bei den unterschiedlichen pH-Werten nach folgender Formel bestimmt.

$$P = \frac{Em_{pH12}}{Em_{pH7.4}} \quad (1)$$

Dabei drückt „P“ die HC-Protonisierung in % aus und „Em“ das Verhältnis der Lichtemissionen bei den Anregungswellenlängen 380 und 330 nm. Der pH-Wert auf der Liposomenoberfläche wurde näherungsweise durch den Vergleich mit der HC-Protonisierung von neutralen DOPC-Liposomen bei verschiedenen pH-Werten bestimmt.

2.2.5.4 Messung des Ausschlusses von Ethidiumbromid

Die Komplexierung der DNA durch kationische Liposomen bzw. kationische Polymere verhindert das Interkalieren des Fluoreszenzmarkers EtBr in den DNA-Doppelstrang. Das Messen der EtBr/DNA-Fluoreszenz kann daher als Maß der DNA-Komplexierung bzw. zur Bestimmung der Stärke der Interaktion zwischen DNA und dem kationischen Komplexierungsagents genutzt werden.

Zur Untersuchung des EtBr-Ausschlusses wurde nach der Herstellung der Lipoplexe ein Aliquot (100 μ l Medium mit 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 und 0 μ g Lipid bzw. 1, 0.33 und 0.1 μ g DNA) mit jeweils 100 μ l EtBr-Lösung (1 μ g/ml EtBr in 150 mM NaCl) gemischt. Etwa 20 min später wurde die Fluoreszenz an dem BMG-Fluostar der Fa. SLT-Tecan bei einer Wellenlänge von 590 nm (Anregungswellenlänge 540 nm; Anregungstärke 100) bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der SLT-Software EASY-BASE.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Cathleen Lehmann, einer Doktorandin in unserer Gruppe, durchgeführt. Die Liposomen bzw. die Lipoplexe wurden

auf ein mit Kohle beschichtetes Kupfergitter aufgetropft, für etwa 15 Minuten getrocknet und anschließend durch Zugabe von 2 % wässriger Uranylacetatlösung fixiert. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Proben an einem JEM-100-CX-Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

2.2.7 Zellkultur

Die Zellen wurden in Medien kultiviert, welche Salze, Aminosäuren, Vitamine und Kohlenhydrate entsprechend den extrazellulären physiologischen Bedingungen enthielten. Die pH-Wert-Stabilisierung der Zellkultur erfolgte durch ein HEPES- oder ein Karbonatpuffersystem. Als Quelle von Wachstumsfaktoren wurde fötales Kälberserum (FKS) und zur Vermeidung bakterieller Infektionen wurden Antibiotika zugesetzt. Mewo, MCF7, K562 und CC531-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, MaTu, F98-Zellen in DMEM sowie N64-Zellen in MEM kultiviert. Alle Medien enthielten 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycinsulfat und 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin. Die Zellen wurden bei 5 % $\text{CO}_2/95$ % Luft und 37°C im Zellkulturinkubator kultiviert. Zur Subkultivierung adhärent wachsender Zellen wurden diese mit PBS-Puffer gewaschen und mit 0.05 % Trypsin-Medium für 2-5 min bedeckt. Danach wurde die Trypsin-Lösung abgegossen, frisches Medium zugegeben und die sich langsam ablösenden Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Anschließend wurde frisches Medium mit 10 % FKS zugesetzt. Die nicht adhärent wachsenden K562-Zellen wurden aller 2-3 Tage in einem 15 ml Polypropylenröhrchen bei 800 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge sedimentiert und in frischem RPMI-Medium aufgenommen.

Nach der Trypsinierung, bzw. der Zentrifugation und Resuspendierung, wurde ein Aliquot der Zellen mit 0.1 Volumenteilen Trypanblau-Lösung versetzt und die lebenden, nicht blau gefärbten Zellen, unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden anschließend auf eine Zellzahl von etwa 0.1 Mio/ml, bzw. 0.5 Mio/ml bei K562-Zellen, verdünnt und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Alternativ erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch eine Trübungsmessung am SLT-MTP-Photometer bei 690 nm (vgl. [110]). Dazu wurden 300 μl der Zellsuspension in ein Well einer 96er MTP pipetiert und die Lichtstreuung gemessen. Nach Abzug des Blindwertes wurden die Zellen auf eine optische Dichte von 0.02 per 300 μl und Well verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche umgesetzt.

2.2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dabei gibt es zwei prinzipielle Formen: Bei der *transienten* Transfektion wird das Plasmid in den Zellkern gebracht und dort extrachromosomal transkribiert. Nach 24 bis 72 h wird die Genaktivität bestimmt. Die Plasmid-DNA wird bei der Zellteilung nicht vermehrt und deswegen sinkt die Genexpression des applizierten Genes kontinuierlich. Bei einer *stabilen* Transfektion hingegen wird das Plasmid in das Wirtsgenom integriert bzw. im Zellkern episomal vermehrt und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Die transfizierten Zellen können hierbei auch über ein Resistenzgen selektiert werden.

Die Höhe bzw. die Regulierung der Genexpression nach einem Gentransfer kann am einfachsten durch die Kopplung von Promotoren bzw. Enhancern mit sogenann-

ten Reporterengen, deren Expressionsrate leicht zu bestimmen ist, untersucht werden. Außerdem ist es möglich durch Färbungsreaktionen bzw. durch die Expression fluoreszierender Proteine die transfizierten Zellen und damit die Transfektionsrate zu bestimmen.

Für die Gentransferuntersuchungen wurden 96-Well-Flachbodenzellkulturplatten genutzt. Am Tag 0 wurden etwa 10.000 bis 20.000 Zellen in 100 μl Medium mit 10 % FKS je Well ausgesät. Am Tag 1 erfolgte die Präparation der Lipoplexe entsprechend dem Mischungsschema von Felgner und Mitarbeitern [44]: Das Lipid wurde in einer separaten Platte in serumfreiem Medium zweifach verdünnt; von 10 μl Lipid per Well beginnend bis zu 0.31 μg Lipid per Well in einem Gesamtvolumen von 50 μl . Anschließend wurde die DNA separat auf einer anderen 96-Well-Platte ebenfalls zweifach verdünnt; von 2 bis zu 0.03 μg in 50 μl serumfreiem Medium (vgl. Abb. 2.4). Nach der Zugabe der DNA zu den Liposomen wurde das Gemisch für etwa 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Komplexe zu den Zellen. Die resultierende Serumkonzentration während der Transfektion betrug 5 %. Nach einer Inkubation von 3 bis 5 h wurden entweder 100 μl Medium mit 20 % FKS zugegeben oder es erfolgte ein Mediumwechsel durch das Entfernen des Transfektionsmediums und die Zugabe frischen 10 % FKS enthaltenden Mediums. Danach wurden die Zellen für 24 bis 72 h zur Expression des applizierten Gens im Brutschrank inkubiert. Der schematische Ablauf der Transfektion und der nachfolgenden Bestimmung von Reporterengenexpression und Zellvitalität ist in der Abb. 2.5 dargestellt.

2.2.9 Bestimmung von Reporterengenaktivität und Zellvitalität

Die meisten Methoden der Genapplikation sind von Schädigungen der Zielzellen begleitet. Die bisher für die Untersuchung des Gentransfers eingesetzten Verfahren erlaubten entweder die Bestimmung der Toxizität der Transfektionsmethode oder die Bestimmung der Effizienz der Transfektion durch das Messen der Reporterengenexpression. Mit Hilfe eines in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Testverfahrens [60, 59] konnte die Bestimmung der Zellvitalität und die Bestimmung der Reporterengenexpression nacheinander direkt in der Zellkulturschale durchgeführt werden. Die Zellvitalität wurde anhand der in der Zelle vorhandenen sauren Phosphatase und die Reporterengenexpression anhand der Aktivität des nach der Transfektion exprimierten β -Gal-Enzymes bestimmt. Dabei wurde das unterschiedliche Absorptionsspektrum der Reaktionsprodukte der Enzymreaktionen, p-Nitrophenol (gelb) und Chlorphenolrot (rot) genutzt.

24 bis 72 h nach Transfektion des lacZ-Reportergenkonstruktes erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität bzw. der Toxizität der Lipoplexe sowie der Reporterengenexpression. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen wurden nachfolgend einmalig mit 100 μl HBSS-Lösung gewaschen. Danach wurden 80 μl des sauren Phosphatase-Testpuffers (D1), mit dem Substrat pNPP und mit dem Detergenz Triton X-100 für die Zell-Lyse, hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die saure Phosphatasereaktion durch die Zugabe von 20 μl schwach basischem Puffer D2 abgestoppt. Die Zellzahl wurde dann im Vergleich von transfizierten und nicht transfizierten Kontrollzellen anhand der p-Nitrophenolabsorption bei 405 nm kalkuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl des β -Gal-Testpuffers (D3) mit dem Substrat CPRG. 2 min bis 24 h nach der Zugabe des Puffers D3, je nach Höhe der Genexpression, wurde die β -Gal-Expression mit Hilfe der Messung der optischen Ab-

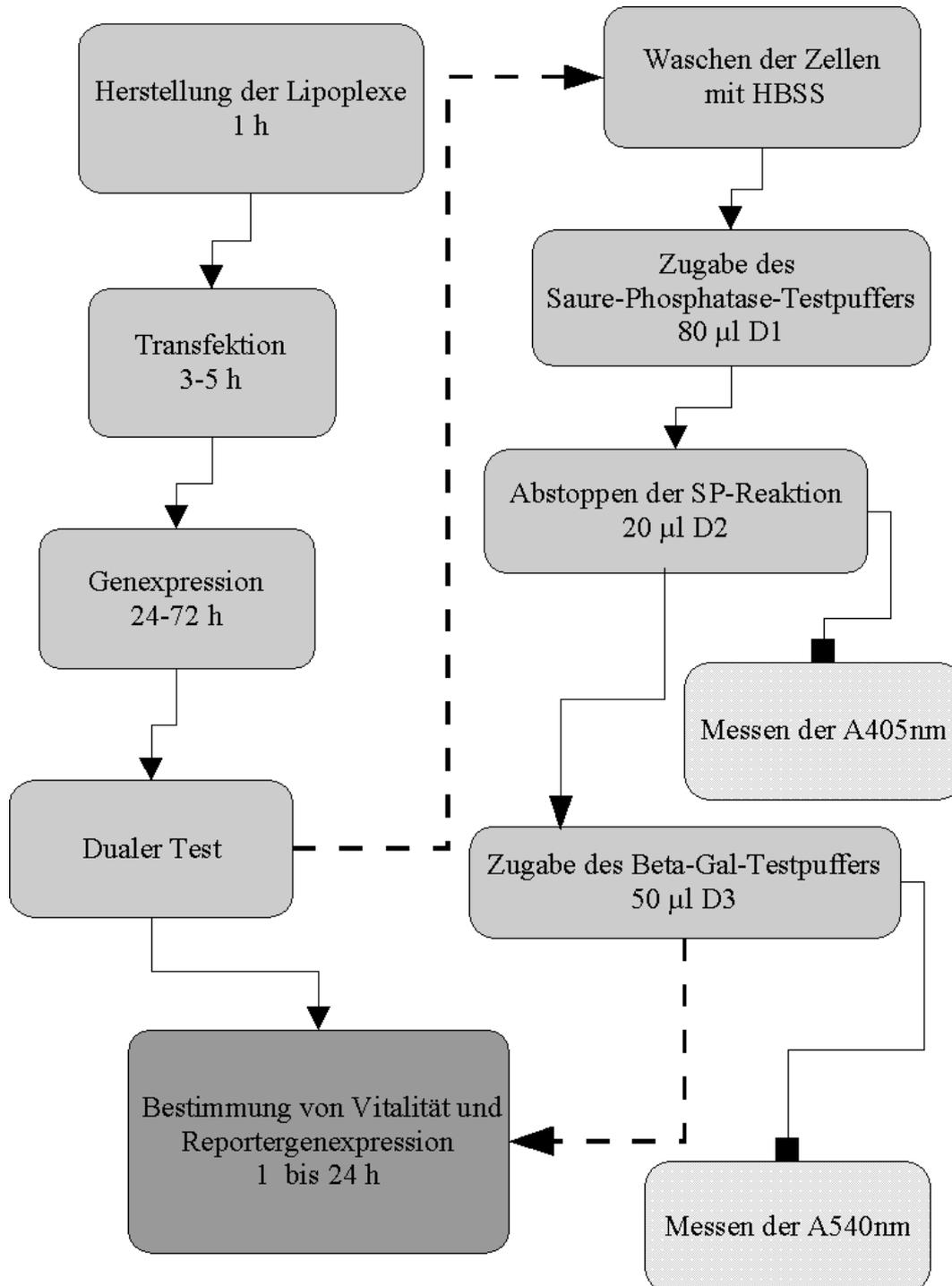


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Transfektionsverfahrens und des dualen Testes zur Bestimmung von Reporterexpression und Zellvitalität

sorption bei 540 nm bestimmt. Die Gesamthöhe der Expression wurde auf Werte einer β -Gal-Eichkurve bezogen, welche in der gleichen Weise wie die Zellen behandelt worden waren. Eine schematische Darstellung des Ablaufes des Assays ist im rechten Teil der Abbildung 2.5 dargestellt.

2.2.10 Bestimmung der Anzahl der transfizierten Zellen

2.2.10.1 X-Gal-Färbemethode

Die Expression des Enzymes β -Gal kann auch zum Sichtbarmachen einzelner transfizierter Zellen durch eine Färbereaktion ausgenutzt werden. Das Substrat X-Gal wird dabei innerhalb der Zelle durch das Expressionsprodukt des lacZ-Reportergens, β -Gal, in ein wasserunlösliches, blaugefärbtes Produkt umgewandelt.

Etwa 48 bis 72 h nach der Transfektion des pUT651-Plasmides wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Fixierlösung überschichtet und für 4 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und die X-Gal-Substratlösung hinzugegeben. Nach etwa 2-3 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf ihre β -Gal-Expression untersucht. Zur Ermittlung der Transfektionsrate wurden sowohl die transfizierten als auch die nicht transfizierten Zellen in 3 bis 5 zufällig ausgewählten Feldern ausgezählt. Um die Zellen für eine längere Zeit aufzubewahren, wurde danach die Substratlösung entfernt und die Zellen in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.10.2 Analyse der GFP-Reportergenexpression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die Expression des Reportergens für das grün-fluoreszierende Protein kann zur Sichtbarmachung transfizierter Zellen ohne den Zusatz von Substraten mittels der Analyse der Zellfluoreszenz direkt in der Zellkulturschale genutzt werden.

Etwa 48 bis 72 h nach der Transfektion des pEGFPC1-Plasmides wurde zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und darin bis zur Analyse der Genexpression aufbewahrt. Die Bestimmung der Transfektionsrate erfolgte an einem Olympus IX-70-Fluoreszenzmikroskop. Zur Anregung der Grünfluoreszenz wurde blaues Licht verwendet. Die Ermittlung der Anzahl der transfizierten Zellen erfolgte durch die Auszählung sowohl von transfizierten als auch von nicht transfizierten Zellen in 3 bis 5 zufällig ausgewählten Feldern.

2.2.10.3 Untersuchung der GFP-Reportergenexpression mit Hilfe der FACS-Analyse

Etwa 500.000 K562-Zellen wurden mit Lipoplexen bestehend aus der Plasmid-DNA pEGFPC1 und verschiedenen liposomalen Formulierungen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die K562-Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 800 rpm in der Varifuge-3.0R bei 150 g sedimentiert und anschließend zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300 μ l PBS aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und bis zur Analyse der Reportergenexpression auf Eis gelagert.

Für die FACS-Analyse wurden 200 μl der Zellen mit 200 μl einer FACS-Rinse-Lösung der Fa. Becton-Dickenson verdünnt und es wurde 1 μl Propidiumiodid-Lösung (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Analyse der Zellvitalität zugesetzt. Nach einer einminütigen Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen am FACS-Scan auf ihre Lichtstreuung sowie auf die GFP- und die PI-Fluoreszenz untersucht. Die Analyse der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der FACS-Software WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, <http://scripps.edu/>).

