

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Untersuchungen zum adenoliposomalen Gentransfer an humanen Nucleus
pulposus Zellen aus degeneriertem Bandscheibengewebe“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katleen Just

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Matziolis
2. Prof. Dr. med. Buttgereit
3. Priv.-Doz. Dr. med. F. Kandziora

Datum der Promotion: 03.09.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1. KLINISCHES PROBLEM.....	5
1.2. DIE BANDSCHEIBEN (DISCI INTERVERTEBRALES)	5
1.3. DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX.....	6
1.4. DIE BANDSCHEIBENDEGENERATION	7
1.5. TISSUE ENGINEERING UND GENTHERAPIE.....	11
1.6. TECHNIKEN DES GENTRANSFERS	14
1.6.1. NICHT- VIRALER GENTRANSFER (TRANSFEKTION).....	15
1.6.2. VIRALER GENTRANSFER (TRANSDUKTION)	19
1.7. ARBEITSHYPOTHESEN	23
2. MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1. BANDSCHEIBENMATERIAL	27
2.2. PLASMID (PUT651)	27
2.3. BAKTERIENSTÄMME.....	28
2.4. ADENOLACZ- GENKONSTRUKT.....	28
2.5. ZELLINIEN.....	29
2.6. LIPOSOMEN	29
2.7. AUFARBEITUNG DES BANDSCHEIBENMATERIALS UND ANLEGEN VON PRIMÄRKULTUREN.....	31
2.8. ANLEGEN SEKUNDÄRER ZELLKULTUREN (ZELLPASSAGIERUNG)	31
2.9. ZELLZÄHLUNG MIT DER NEUBAUER- ZÄHLKAMMER.....	31
2.10. EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON NUCLEUS PULPOSUS ZELLEN	32
2.11. TRANSFEKTION UND TRANSDUKTION	32
2.11.1. NICHT- VIRALER GENTRANSFER (TRANSFEKTION)	33
2.11.2. VIRALER GENTRANSFER (TRANSDUKTION).....	38
2.11.3. VIRALER- NICHT- VIRALER GENTRANSFER.....	40
2.12. NACHWEIS DER VITALITÄT DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN (SAURE PHOSPHATASE TEST)	41
2.13. NACHWEIS DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ (β- GAL- TEST)	41
2.14. STATISTIK	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1. PROLIFERATION DER NUCLEUS PULPOSUS ZELLEN	43
3.2. GENTRANSFER	43
3.2.1. ADENOVIRALER GENTRANSFER	43
3.2.2. NICHT- VIRALER GENTRANSFER (LIPOFEKTION).....	45
3.2.3. KOMBINIERTER GENTRANSFER (LIPOADENOFEKTION).....	51
4. DISKUSSION	66
4.1. LIMITATIONEN DER ARBEIT	66
4.2. EIGNUNG DER NUCLEUS PULPOSUS ZELLEN ZUM TISSUE ENGINEERING.....	67
4.3. EIGNUNG DER NUCLEUS PULPOSUS ZELLEN ZUM IN VIVO- UND IN VITRO- GENTRANSFER.....	68
4.4. EIGNUNG DER VERWENDETEN VEKTOREN FÜR DEN GENTRANSFER AN NUCLEUS PULPOSUS ZELLEN	70
4.4.1. ADENOVIRALE VEKTOREN	70

4.4.2. LIPOSOMALE VEKTOREN	71
4.4.3. ADENOLIPOSOMALE VEKTOREN (ADENOASSOZIIERTE LIPOFEKTION, ADENOLIPOFEKTION) .	75
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>81</u>
<u>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>82</u>
<u>7. LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>84</u>
<u>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>92</u>
<u>9. DANKSAGUNG</u>	<u>93</u>
<u>10. LEBENSLAUF</u>	<u>94</u>
<u>11. ERKLÄRUNG</u>	<u>94</u>

1. Einleitung

1.1. Klinisches Problem

Patienten mit Bandscheibenproblemen stellen ein zunehmendes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar (Schochat et al., 1998). Rückenschmerzen sind inzwischen der zweithäufigste Grund, der die Patienten zum Arzt führt (Kütemeyer, 1990) und gehen oft mit einer chronischen Einnahme von Schmerzmitteln einher. Die eingeschränkte Arbeitsfähigkeit, die Ausfälle durch Krankheitstage sowie die Berufsunfähigkeit in einigen Fällen führen zusammen mit dem erhöhten Medikamentenverbrauch zu einer hohen sozioökonomischen Belastung. Aus diesem Grunde kommt der Therapie der degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen eine große Bedeutung zu. Das Problem ist, dass Bandscheiben sich nicht selbst regenerieren können und man derzeit nur die Folgen, nicht aber die Ursachen der Degeneration behandeln kann.

1.2. Die Bandscheiben (Disci intervertebrales)

Die Bandscheiben sind Bestandteil der Wirbelsäule und befinden sich zwischen den Wirbelkörpern. Sie werden daher auch als Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) bezeichnet. Die Disci intervertebrales stammen entwicklungsgeschichtlich aus Mesenchymzellen, die sich zu Chondroblasten (Knorpelvorläuferzellen) differenziert haben und durch Reifungs- und Wachstumsprozesse zu Chondrozyten umgewandelt wurden.

Die Disci intervertebrales sorgen für eine gleichmäßige Druckverteilung auf die Wirbelkörperflächen und wirken wie ein Wasserkissen als Stoßdämpfer bei vertikaler Druckbelastung auf die Wirbelsäule. Sie bestehen aus einem äußeren Faserknorpelring, dem Anulus fibrosus, und einem im Zentrum des Anulus befindlichen Gallertkern, dem Nucleus pulposus. Der Nucleus pulposus ist elastisch verformbar und spannt in Abhängigkeit seines Wassergehaltes den Anulus fibrosus. Der Anulus hat dabei unter anderem die Aufgabe, den Gallertkern in seiner Position zu halten.

Der Wassergehalt des Nucleus pulposus ist abhängig von den osmotischen und mechanischen Drücken, die auf ihn wirken: Beim Einwirken von mechanischen Kräften auf den Nucleus pulposus wird dieser abgeplattet. Die Folge ist eine Vergrößerung des Kerndurchmessers, wodurch der Anulus weiter gedehnt wird. Bei diesem Vorgang wird Flüssigkeit aus dem Nucleus pulposus herausgedrückt. Dadurch kommt es zu einer Höhenabnahme der Bandscheibe und zum Annähern der Wirbelkörper. Die Folge ist eine Verkürzung der Wirbelsäule, die bis zu 2 - 3 cm

im Laufe des Tages betragen kann. In Ruhe dagegen bewirken die hohen osmotischen Kräfte im Nucleus pulposus, die durch das Herauspressen der Flüssigkeit unter mechanischer Belastung entstanden sind, ein Einströmen von Flüssigkeit. Dadurch kommt es zum Anschwellen des Kernes und damit zu einer Höhenzunahme der Bandscheiben. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Wirbelkörper sich wieder voneinander entfernen und die Wirbelsäule sich wieder verlängert. Unterdessen vertikal einwirkende Kräfte gleichmäßig auf die Fläche der Bandscheiben verteilt werden, werden die Bandscheiben bei der Bewegungen der Wirbelsäule nach vorn, nach hinten oder zur Seite unterschiedlich beansprucht. Intakte Bandscheiben sind in der Lage, sich diesen wechselnden Belastungen anzupassen, d.h. bei Beugung des Körpers wird der Nucleus im vorderen Bereich komprimiert und weicht dabei nach hinten aus, bei der Streckung des Körpers verlagert sich der Nucleus durch die hintere Kompression nach vorn und bei seitlicher Belastung der Bandscheiben weicht der Kern zur Gegenseite aus. Durch die Verlagerung des Kernes werden jeweils die Anulusfasern der unbelasteten Seite gedehnt. Diese Mechanismen erfordern eine hohe Elastizität der Bandscheibe, die durch die Strukturbestandteile, insbesondere durch die extrazelluläre Matrix, gewährleistet wird.

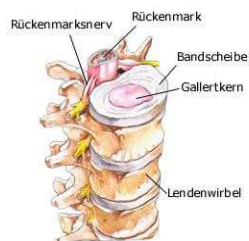


Abb.1 Aufbau der Wirbelsäule

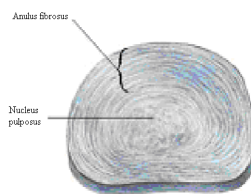


Abb. 2 Aufbau der Bandscheibe

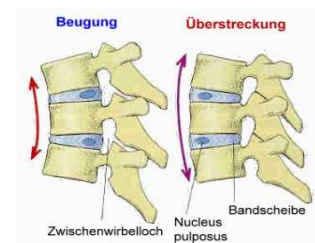


Abb.3 Nucleus pulposus bei Bewegung

1.3. Die extrazelluläre Matrix

Die Bestandteile der extrazellulären Matrix werden von Chondrozyten gebildet und an den Interzellularräum abgegeben, weshalb sie oft auch einfach nur als Interzellulärsubstanz bezeichnet wird. Sie besteht zu 80% aus Wasser und zu 20% aus Kollagen (hauptsächlich Typ II), Glukosaminoglykanen (wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat) und Proteoglykanen.

Kollagene:

Intrazellulär erfolgt zunächst die Synthese von Protokollagen. Nachdem diese durch Hydroxylasen modifiziert wurden, lagern sich jeweils 3 Protokollagenstränge helixartig zu Prokollagen zusammen und werden an den extrazellulären Raum abgegeben. Dort entstehen dann durch weitere Modifikationsprozesse Tropokollagene. Diese bilden zusammen die Protofibrillen und diese wiederum bilden die Mikrofibrillen, die sich dann zu Kollagenfibrillen zusammenlagern. Diese bilden dann die Kollagenfasern.

Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

Dazu gehören unter anderem Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Sie bestehen aus mehreren Disacchariduntereinheiten, die glykosidisch zu Polysacchariden zusammengelagert sind. Die Disaccharideinheiten bestehen aus:

D- Glucuronsäure und N- Acetyl- D- Glukosamin (Hyaluronsäure)

D- Glucuronsäure und N- Acetyl- D- Galaktosamin- Sulfat (Chondroitinsulfat)

D- Glucuronsäure und N- Acetyl- Glukosamin- Sulfat (Keratansulfat).

Die Glukosamine besitzen negativ geladene Gruppen, über die sie Wasser binden können. Dadurch erhält die Extrazelluläre Matrix eine gelartige Konsistenz. Je höher also die Ladungsdichte und der Hyaluronsäureanteil ist, desto mehr Wasser wird eingelagert und um so höher ist die elastische Verformbarkeit der Bandscheiben.

Proteoglykane

Die Glukosaminoglykane lagern sich über die Aminosäuren Serin und Threonin an ein Kernprotein an. Dadurch entstehen Proteoglykane. Diese Proteoglykane lagern sich dann über Hyaluronnektine (Glykoproteine) an die Hyaluronsäure an (Nicoll, S.B. et al., 2002; Lash, J.W., 1983). Das wichtigste Proteoglykan des Knorpels ist das Aggrecan.

1.4. Die Bandscheibendegeneration

Durch degenerative Veränderungen der Bandscheibe kommt es zum Wasserverlust der extrazellulären Matrix und damit auch zum Elastizitätsverlust. Der Nucleus pulposus verliert folglich seine Spannkraft und Verformbarkeit und kann somit nicht mehr als Stoßdämpfer dienen. Für den Anulus fibrosus bedeutet der Elastizitätsverlust, dass er spröde und rissig wird. Dadurch kann der Nucleus pulposus bei Bewegungen nicht mehr in seiner zentralen Position

gehalten werden und wird über die Fissuren des Anulus herausgepresst. Die Konsequenzen sind Protrusion (Vorwölbung der Bandscheibe bei erhaltenem Anulus fibrosus) und Prolaps (Kern tritt durch den perforierten Faserring heraus) oder Sequestration (prolabierte Anteile haben keinerlei Verbindung mehr zur Bandscheibe), wodurch die austretenden Nerven komprimiert werden können. Dies erklärt zum einen die Schmerzen, zum anderen aber auch die sensiblen und motorischen Ausfälle in den von ihnen versorgten Innervationsgebieten beim sog. Bandscheibenvorfall.

Am häufigsten ist der Bereich der Lendenwirbelsäule (LWS) davon betroffen, gefolgt von der Halswirbelsäule (HWS) und dem eher selten betroffenen Brustwirbelsäulenbereich (BWS). Unterdessen der Bandscheibenprolaps im LWS- Bereich am häufigsten zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr vorkommt, treten die HWS-Vorfälle bevorzugt zwischen dem 40. und dem 60. Lebensjahr auf. Bandscheibenprotrusionen liegen dagegen oft schon wesentlich früher vor. Im weiteren Verlauf des Lebens werden Bandscheibenvorfälle seltener, da durch den Wasserverlust der Gallertkern immer dickflüssiger und immer weniger wird, somit also nur noch erschwert vorfallen kann. Bisher konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen Alter, Degenerationsgrad und klinischen Beschwerden nachgewiesen werden.

Ursachen dieser degenerativen Veränderungen können auf der einen Seite chronische Fehlbelastungen sowie ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit sein, zum anderen beschleunigen und begünstigen auch Bewegungsmangel und eine atrophische Bauch- und Rückenmuskulatur die Degeneration der Bandscheiben, da die Matrixsynthese möglicherweise durch die Bewegung stimuliert wird. An der Degeneration sind aber auch natürliche Alterungsvorgänge beteiligt, die mit einer Abnahme von extrazellulären Matrixbestandteilen und dadurch mit einer Abnahme der Wasserspeicherkapazität verbunden sind. Der zunehmende Wasserverlust der Bandscheiben während der Degeneration führt aber nicht nur zu einem Elastizitätsverlust der Bandscheibe, sondern auch zu einer Höhenabnahme der Disci intervertebrales und damit auch des Zwischenwirbelraumes (Chondrose). Die Folgen sind eine dauerhafte Über- und Fehlbelastung der anderen Wirbelsäulenstrukturen, wodurch deren Degeneration gefördert wird. Im Bereich der **Wirbelkörper** z.B. werden die Grund- und Deckplatten durch die abgeflachte Bandscheibe mehr belastet. Der Körper reagiert darauf mit einer Knochenverdichtung in diesem Bereich (**Sklerosierung**), die röntgenologisch zu erkennen ist. Bei Fortschreiten der Höhenabnahme nähern sich die Grund- und Deckplatten benachbarter Wirbelkörper immer mehr an und bekommen schließlich Kontakt zueinander. Durch mechanische Scherkräfte, die bei der Bewegung der Wirbelsäule entstehen, kommt es zur Stimulation der Osteogenese (Sklerose) im Bereich der Kontaktstellen, die zu knöchernen

Anbauten, d.h. zur Ausbildung von **Spondylophyten**, führen. Sklerose und Spondylophyten sind Zeichen der Osteogenese. Dieser Prozess ist mit einer zunehmenden Versteifung der Wirbelsäule und einer daraus resultierenden Bewegungs- und Funktionseinschränkung verbunden. Begleitend dazu kommt es zu einer Einengung des Spinalkanals mit Schmerzen und neurologischen Ausfallerscheinungen. Auch die **Wirbelsäulenbänder**, die sich normalerweise über den Zwischenwirbelraum spannen und dafür sorgen, dass bei Bewegungen der Discus intervertebralis nicht aus dem Zwischenwirbelraum herausgedrückt wird, sind von der Höhenabnahme betroffen. Sie verlieren ihre Spannung und damit auch ihre Funktion, was nicht nur die Bandscheibenprotrusion bzw. den Bandscheibenprolaps begünstigt, sondern auch zur zunehmenden Instabilität des Wirbelsäulensegmentes führt. Die dadurch bedingte Verschiebung der Wirbelkörper gegeneinander (**Olisthese**, Wirbelkörpergleiten) hat nicht nur die Einengung des Spinalkanals mit den entsprechenden Symptomen zur Folge, sondern manchmal auch die Ausbildung einer degenerativen Skoliose. Diese veränderte Wirbelsäulenstatik führt wiederum dazu, dass sich die Muskelursprünge und -ansätze der konkaven Wirbelsäulenverkrümmung zu sehr nähern und im Laufe der Zeit verkürzen, die Muskeln der konvexen Seite dagegen zu sehr gestreckt werden und zu schmerzhaften Muskelverspannungen (Muskelhartspann, Myogelosen) führen. Beides ist mit einem Funktionsverlust der Muskulatur und einer weiter fortschreitenden Fehlstellung der Wirbelsäule verbunden. Durch die Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes liegen auch die Gelenkflächen der **Wirbelgelenke (Facetten)** nicht mehr kongruent zueinander, was zum Knorpelabrieb der Gelenkflächen und somit zur Gelenksentzündung, Kapselschwellung und -verdickung sowie zu Gelenkdeformitäten führt und das Gesamtbild einer Wirbelgelenksarthrose (**Spondylarthrose, Facettensyndrom**) darstellt.

Da diese degenerativen Veränderungen oft gemeinsam auftreten und vielfältige Symptome machen, ist die Zuordnung der Beschwerden zu den einzelnen morphologischen Veränderungen oft sehr schwierig.

Die Problematik der Bandscheibendegeneration besteht nun darin, dass die Disci intervertebrales nicht vaskularisiert sind und daher aus bradytrophem Gewebe bestehen und die Nucleus pulposus Zellen normalerweise nicht teilungsfähig sind, so dass sie auch keine nennenswerte Potenz zur Regeneration besitzen. Hinzu kommt, dass die Bandscheiben im Inneren nicht neural innerviert werden, so dass Schäden in diesem Bereich nicht rechtzeitig durch Schmerzen wahrgenommen werden können. Die Konsequenz ist, dass Signale zum Schutz vor Über- und Fehlbelastungen ausbleiben und erst die irreversiblen Folgen (Protrusion, Prolaps) zu Symptomen führen.

Mit den derzeitigen konservativen Therapieverfahren (Thermotherapie, manuelle Therapie, Extensionstherapie zur Druckentlastung der Bandscheiben, medikamentöse Therapie, Krankengymnastik) gelingt es in einigen Fällen lediglich das Fortschreiten der Symptome und der Funktionsstörungen zu verhindern, nicht aber die Degeneration rückgängig zu machen, so dass oft nach einer erfolglosen oder rezidivreichen konservativen Therapie eine operative Entfernung der nervenkomprimierenden Bestandteile erforderlich wird. Dazu stehen heute verschiedene Verfahren zur Verfügung, unter anderem die perkutane Nukleotomie (mechanische Entfernung des Nucleus ohne vorherige enzymatische Verflüssigung), die Volumenreduktion, z.B. durch Laser, oder die Chemonukleolyse (enzymatische Verflüssigung des Nucleus pulposus). Das Einsetzen von Bandscheibenimplantaten, die die Funktion der normalen Bandscheibe imitieren sollen, oder die dynamische Stabilisierung der Wirbelsäule, bei der komprimierbare interspinale Abstandhalter zwischen die Dornfortsätze oder Pedikel implantiert werden, die die Bewegungsmöglichkeiten der Wirbelsäule zwar einschränken, aber grundsätzlich aufrecht erhalten und die normale Höhe der Bandscheibenetage wieder herstellen, sowie die Spondylodese (Versteifung) mit Verlust der Beweglichkeit sind ebenfalls geeignete Verfahren in der Wirbelsäulenchirurgie.

Nachteilig an der Bandscheibenchirurgie ist, dass Narbengewebe entstehen kann, dass durch seine mögliche raumfordernde Wirkung bzw. deren Zugwirkung Druck und Spannung auf umliegende Strukturen, insbesondere die Nerven, ausüben kann und somit ähnliche Symptome wie bei einem Bandscheibenvorfall hervorrufen kann. Diese Komplikation verschlechtert oft das Ergebnis der Bandscheibenchirurgie.

Neben den derzeit existierenden konservativen und operativen Therapiemöglichkeiten haben sich seit Anfang der neunziger Jahre auch Möglichkeiten im Bereich des Tissue Engineering, ein Verfahren zur Gewebeerneuerung, entwickelt. Dazu werden die operativ entnommenen Bandscheibenzellen in geeigneten Zellträgermaterialien (z.B. Agarose, Alginat oder Fibrin) zusammen mit gewebespezifischen Faktoren kultiviert und anschließend wieder retransplantiert. Diese autologe Bandscheibenzelltransplantation (ADCT) hat den Vorteil, dass sie ein biologischer Bandscheibenersatz sind und patienteneigene Zellen verwendet werden. Erfolgversprechende Ergebnisse erzielten damit bisher unter anderem Ganey et al., Meisel et al. und Gokorsch et al. (Ganey et al., 2002, 2003, Meisel et al, 2006; Gokorsch et al., 2003). Die reimplantierten Bandscheibenzellen haben jedoch nicht das Potential, sich in vivo weiter zu vermehren, d.h. der biologische Bandscheibenersatz ist durch die limitierte Lebensdauer der transplantierten Bandscheibenzellen zeitlich begrenzt.

Einen neuen Therapieansatz auf dem Gebiet des Tissue engineering stellt die Gentherapie dar. Hierbei wird versucht, funktionelle Gene in die Zelle einzuschleusen, mit dem Ziel, die Zellproliferation und Produktion von Matrixbausteinen zu stimulieren und somit eine Reparatur des defekten Bandscheibenmaterials zu erreichen. Dafür stehen heute verschiedene Gentransfersysteme zur Verfügung, von denen die viralen und liposomalen Methoden im Vordergrund stehen.

1.5. Tissue engineering und Gentherapie

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie ist es gelungen, sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse der Zelle auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Dadurch ist es erst möglich geworden, genetisch bedingte Erkrankungen in ihrem Ursprung, den Genen, zu erfassen und durch gezielte Genkorrektur zu therapieren. Das Einschleusen von fremden Genen zu therapeutischen Zwecken wird als Gentherapie bezeichnet. Mit der Entwicklung von Methoden zum Gentransfer in den 70er Jahren wurden die Grundlagen dafür geschaffen. Man unterscheidet bei der Gentherapie theoretisch zwischen der Stammzelltherapie, bei der Zellen der Keimbahn genetisch verändert werden, und der somatischen Gentherapie, bei der Körperzellen Ziel der genetischen Veränderung sind.

Derzeitig verfolgt man dabei verschiedene Therapieansätze: Bei der Substitutionstherapie liegt die Vorstellung zu Grunde, defekte Gene auszutauschen, dagegen versucht man bei der Insertionstherapie fehlende oder verloren gegangene Gene einzufügen. Bei der Antisense-Therapie, bei der kurze komplementäre DNA-Stränge an die RNA gebunden werden, um deren Translation zu verhindern, geht es vor allem darum, unerwünschte Gene zu blockieren.

Die therapeutischen Gene können dabei entweder direkt in die betroffenen Gewebe und Zellen des Patienten eingeschleust werden (in vivo-Gentherapie), oder aber man entnimmt dem Patienten genetisch defekte Zellen, verändert sie gentechnisch und reimplantiert die reparierten Zellen wieder in den Patienten zurück (ex vivo, in vitro).

Die ersten gentherapeutischen Versuche am Menschen fanden 1980 in Israel und Italien statt. Der US-Forscher Martin Cline stellte zu dieser Zeit in Kalifornien den Antrag, gentherapeutische Versuche am Menschen durchführen zu dürfen, bei denen er Patienten mit einer erblichen Blutkrankheit rekombinante DNA applizieren wollte. Als dieser Antrag kurz vor der Durchführung in der USA abgelehnt wurde, führte er diese Versuche geheim und ungenehmigt außerhalb den USA durch und sorgte dafür, dass die Gentherapie aus einem Minus heraus starten und aufsteigen musste. 1990 wurde dann zum ersten Mal eine genehmigte gentherapeutische

Behandlung am Menschen durchgeführt. Die 4-jährige Ashanti DeSilva litt an der Erbkrankheit ADA- SCID. Durch einen Gendefekt fehlt den weißen Blutkörperchen das Enzym Adenosin-Deaminase (ADA). Dadurch kommt es zu Störungen im Immunsystem mit tödlichem Ausgang, da die von dieser Krankheit betroffenen Kinder den Krankheitserregern schutzlos ausgeliefert sind. Die amerikanischen Wissenschaftler Anderson und Blaese entnahmen dem 4-jährigen Mädchen Immunzellen und brachten mit Hilfe eines gentechnisch veränderten Retrovirus das fehlende ADA- Gen ein, das dort die Produktion des fehlenden Enzyms übernehmen sollte (Blaese, 1995). Durch die erfolgreiche Therapie ist es A. DeSilva heute möglich ein normales Leben zu führen. Zum ersten Mal setzte man nicht an den Symptomen einer genetisch bedingten Krankheit an, sondern direkt am Ursprung - dem Defekt im Erbgut. Einige Jahre später wurde die Gentherapie erstmalig in Deutschland bei Tumorpatienten angewendet.

Nur etwa 60 Jahre nachdem Avery erkannt hatte, dass die DNA das Erbmaterial des Menschen ist (1944), und 50 Jahre nach der Entdeckung der DNA-Struktur durch Watson und Crick (1953) war 2003 die Entschlüsselung des menschlichen Genoms abgeschlossen und neue Möglichkeiten für die Gentherapie eröffnet worden. Die noch bestehenden Schwierigkeiten des Gentransfers schränken die Anwendung dieser Möglichkeiten in der Gentherapie bisher allerdings noch ein. Aus diesem Grund steht die Therapie von monogenen Erkrankungen, d.h. Krankheiten, die durch Mutationen eines Genes hervorgerufen werden, gegenwärtig im Vordergrund. Erst wenn hier ausreichende Erfolge zu beobachten sind, wird die Gentherapie sich auch auf die Behandlung von polygen bedingten Erkrankungen ausweiten können. Wenn auch dieser Durchbruch geschafft ist, ist die Gentherapie so gut wie überall einsetzbar, sofern die Mechanismen der Erkrankungen weit genug erforscht sind.

Die Forschungsschwerpunkte der Gentherapie beschränken sich inzwischen aber nicht nur auf die Erbkrankheiten, sondern auch auf die Genkorrektur anderer Erkrankungen, die auf Veränderungen von Genen beruhen. Im Vordergrund stehen hierbei unter anderem die Tumorerkrankungen. Hier versucht man z.B. sogenannte Suizidgene in die Tumorzellen einzubringen, deren synthetisierte Produkte entweder direkt oder indirekt durch Interaktion mit applizierten Pharmaka zum Tode der Tumorzellen führen. Erfolgreiche Versuche gab es bisher mit HSV- TK (Herpes simplex- Thymidinkinase), einem toxischen Genprodukt, das bei gleichzeitiger Gabe von Ganciclovir zum Abtöten der Tumorzellen führt. Ein weiterer therapeutischer Ansatz in der Tumorthherapie wäre die Manipulation von zellzyklusregulierenden Genen, die zur Hemmung des Tumorwachstums und damit zum Absterben der Tumorzellen führen. Gute Erfolge hatte man schon mit dem Einschleusen von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53- Gen) in Tumorzellen. Dessen Produkt hemmt die Teilungsaktivität der Zellen. Einen der

neuesten Ansätze stellt die Tumormimmunologie dar, deren Ziel es ist, das Immunsystem so zu modifizieren, dass es gegen den Tumor gerichtet ist. Die Komplexität der immunologischen Mechanismen verhindert allerdings bisher den durchschlagenden Erfolg. Ein weiteres Einsatzgebiet der Gentherapie ist die Entwicklung von Resistenzgenen auf dem Gebiet der viralen Infektionskrankheiten oder der Einsatz von immunregulatorischen Genen bei der Behandlung von Immunerkrankungen.

In der Diskussion um die Gentechnik und Gentherapie hat in letzter Zeit die Regeneration von Organen oder Organteilen an Bedeutung gewonnen. Diese Art der Genkorrektur wird in Zukunft immer weiter in den Vordergrund der Wissenschaft rücken, denn sollte es gelingen die Sicherheit, die Spezifität und die Effizienz des therapeutischen Gens ausreichend erhöhen zu können, wird es nicht nur möglich sein die defekten Zellen wieder zu reparieren, sondern durch ihre Anwendung im Bereich des Tissue engineering wird es möglich sein, insuffiziente Organe vollkommen neu ersetzen zu können. Das Tissue engineering ist besonders interessant für die Transplantationsmedizin, denn neben dem Mangel an Transplantaten ist besonders die Abstoßungsreaktion transplantiert Organe ein großes Problem. Hinzu kommt, dass nicht alle Organe von Fremdspendern entnommen und transplantiert werden können. Mit Hilfe des Tissue engineering könnten vom Patienten Zellen entnommen, angezchtet und wieder reimplantiert werden. Man würde damit also das Problem des Transplantatmangels und der Abstoßungsreaktion gleichzeitig lösen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht das Tissue engineering zur Regeneration von Bandscheibengewebe einzusetzen. Dazu sollten die Gentransfereigenschaften der Nucleus pulposus Zellen für den liposomalen und adenoviralen Gentransfer untersucht werden sowie der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist, durch Kombination von liposomalem und adenoviralem Gentransfer die Expression eines Markergens entscheidend zu erhöhen und die Toxizität zu senken. Zu diesem Zweck haben wir Nucleus pulposus Zellen der Disci intervertebralis mit der Kombination aus kationischen Liposomen und Adenoviren sowie dem Markergen LacZ transfiziert. Ziel war es, zum einen die Vorteile beider Transfersysteme zu vereinigen und somit die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen, zum anderen die Nachteile beider Systeme zu verringern.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten dann geeignete Gene zur Stimulierung von Regenerations-, Reparationsprozessen in Nucleus pulposus Zellen eingebracht werden, um zu erreichen, dass degenerierte Bandscheiben wieder die Fähigkeit zur Regeneration erlangen. Denkbar für den Gentransfer bei der Behandlung von Bandscheibendegeneration wären zum einen Gene für die

Expression von Rezeptoren wie CD44 und zum anderen für Wachstumsfaktoren wie BMP's und TGF- β , die den Zellzyklus und die Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile regulieren.

Hieraus ergibt sich also, dass eine Reihe von potenten Genen zur gentherapeutischen Anwendung bei Bandscheibendefekten und -degeneration zur Verfügung stehen. Der erste Schritt wäre also gemacht. Der zweite und schwierigere Schritt besteht nun darin, diese Gene so in Nucleus pulposus Zellen einzuschleusen, dass sie auch wirklich therapeutisch genutzt werden können. Madry et al., Goomer et al. und Nishida et al. haben erste erfolgversprechende Versuche mit viralen und liposomalen Vektoren unternommen (Madry, 2000, 2002, 2003; Goomer, 2001, 2002; Nishida 1998,1999).

1.6. Techniken des Gentransfers

Unter Gentransfer versteht man das Einschleusen von fremden Genen bzw. Gensequenzen in Zielzellen. Dazu werden geeignete Transportsysteme benötigt. Werden für den Gentransfer Viren benutzt, spricht man von Transduktion, bei nicht- viralen Vektoren von Transfektion. Das auch als Transgen bezeichnete genetische Material wird dabei je nach Gentransfermethode entweder ins Wirtsgenom integriert (stabile Genexpression) oder verbleibt extrachromosomal im Zellkern als Episom (vorrübergehende oder transiente Genexpression). Bei der transienten Genübertragung wird die exogene DNA bei der Zellteilung nicht weiter vermehrt, und die Genexpression sinkt mit der Zeit immer weiter ab. Durch diesen Prozess kann keine Langzeitexpression des übertragenen Genes erreicht werden. Diese Methode ist also eher für den Gentransfer mit gewünschter begrenzter Genwirksamkeit geeignet. Bei der stabilen Genübertragung wird das Plasmid bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch eine Langzeitexpression möglich ist.

Die einfachste Form des nicht- viralen Gentransfers ist die Transfektion mit nackter DNA (Wolff et al. 1990). Die Aufnahme und Expression nackter DNA ist zwar möglich (Wolff et al., 1990), aber nicht effizient. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz sind verschiedene Vektoren entwickelt worden. Man kann die Vektoren in die zwei großen Gruppen der viralen (Transduktion) und der nicht- viralen Systeme (Transfektion) unterteilen. Der ideale Vektor, der untoxisch, sicher, hocheffizient und spezifisch ist, wurde bisher aber noch nicht gefunden. Sowohl „Gentaxi“ (Vektoren) als auch das Transgen sollten folgende Voraussetzungen erfüllen:

- 1.) Der Vektor sollte spezifisch sein, d.h. die Genexpression sollte nur in bestimmten Zelltypen erfolgen.

- 2.) Die Genexpression muss effektiv sein, d.h. es müssen einerseits therapeutisch ausreichende Mengen synthetisiert werden und andererseits dürfen sie auch nicht überexprimiert werden.
- 3.) Sowohl Vektor als auch Transgen dürfen nicht toxisch auf gesunde Zellen wirken und
- 4.) Zur Gewährleistung einer Langzeitexpression sollte das Transgen stabil ins Genom eingebaut werden.

	viraler Gentransfer	Nicht- viraler Gentransfer
Vorteile:	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Effizienz • in vivo einsetzbar 	<ul style="list-style-type: none"> • geringes Sicherheitsrisiko • nicht immunogen • einfach, kostengünstig
Nachteile:	<ul style="list-style-type: none"> • Sicherheitsrisiko • Immunantwort • Pathogenität 	<ul style="list-style-type: none"> • oft geringere Effizienz • nur begrenzt in vivo einsetzbar

Tabelle 1: Vergleich von Vor- und Nachteilen viraler und nicht- viraler Vektoren

1.6.1 Nicht- viraler Gentransfer (Transfektion)

Bei den nicht- viralen Gentransfersystemen unterscheidet man die physikalischen Verfahren von den chemischen und biologischen. Im Gegensatz zu den physikalischen Verfahren werden bei den chemischen und biologischen Verfahren Vektoren benutzt, um die DNA in die Zielzellen zu bringen. Ihre Aufgabe besteht darin, die Aufnahme der DNA in die Zielzelle zu erleichtern und die DNA vor inaktivierenden Mechanismen des Körpers zu schützen.

Nicht- virale Vektoren haben gegenüber den viralen den großen Vorteil, ein höheres Maß an Sicherheit zu zeigen, keine spezifische Immunantwort zu induzieren, auch größere Nukleinsäuresequenzen transfizieren zu können (Cartier et al., 2002) und einfacher produzierbar zu sein. Ihr Nachteil liegt in der wesentlich geringeren Transfektionseffizienz. Im folgenden Teil soll auf einige etablierte Methoden zum Gentransfer eingegangen werden.

1.6.1.1. Chemische Transfektionsmethoden

Lipofektion

Bei der Lipofektion werden Liposomen als Genfähren eingesetzt. Liposomen sind amphiphile Vesikel. Ihre Membran besteht aus einer hydrophoben (unpolarer) Phospholipiddoppelschicht,

an deren Außen- und Innenseiten sich jeweils hydrophile Anteile befinden (Felgner et al., 1987, 1997). Die Lipide werden entsprechend ihrer Ladung in anionische, neutrale oder kationische Lipide unterschieden. Je nach Anzahl der Ladungen erfolgt eine weitere Unterteilung in monokationische oder polykationische Liposomen.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich kationische Lipide verwendet worden sind, wird im folgenden Teil nur auf die kationischen Liposomen eingegangen.

Auf Grund der positiven Ladung können sie an ihrer Oberfläche die polyanionische DNA binden, so dass ein Liposom- DNA- Komplex, sog. Lipoplex (Felgner et al.1987, 1997), entsteht. Dieser ist häufig auch positiv geladen und kann daher an die negativ geladene Zellmembran binden. Die Aufnahme des DNA- Liposom- Komplexes in die Zelle erfolgt anschließend vorwiegend über Endozytose, zu einem geringen Prozentsatz auch durch Fusion mit der Zellmembran (Gao und Huang, 1995).

In den Zellen liegen die Komplexe dann in Endosomen eingeschlossen vor. Wie die DNA aus den Endosomen in den Zellkern gelangt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (Cartier et al., 2002). Man weiß aber, dass dieser Mechanismus einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat, denn die Endosomen fusionieren intrazellulär mit Lysosomen (Raff 1986), die dadurch zu Endolysosomen umgewandelt werden. In diesen Lysosomen befinden sich saure Hydrolasen, die durch ein Absinken des pH- Wertes aktiviert werden und die vesikulären Strukturen der Liposomen aufbrechen, aber auch die DNA enzymatisch spalten und somit inaktivieren können. Der zuletzt genannte Vorgang limitiert die Transfektionseffizienz.

Die Vorteile dieser Methode liegen in der einfachen Durchführung, der guten Reproduzierbarkeit, ihrer Unabhängigkeit vom Zellzyklus, der guten Transfektionseffizienz und der geringen Toxizität. Liposomen haben gegenüber dem viralen Gentransfer außerdem den Vorteil, dass sie eine größere DNA- Transportkapazität besitzen und eine höhere Sicherheit haben. Da die Liposomen einen ähnlichen Aufbau haben wie die Zellmembranen im Körper, können sie zum einen vom Körper abgebaut werden und zum anderen wirken sie nicht immunogen. Dadurch wären mehrere aufeinander folgende Behandlungen möglich.

Die Nachteile sind, dass die Optimierung kompliziert ist, die Reagenzien sehr teuer sind und ihre geringe Serumstabilität. Hinzu kommt, dass es bisher nicht möglich ist, durch den liposomalen Gentransfer eine Langzeittransgenexpression zu erreichen, da keine Integration ins Wirtsgenom stattfindet.

Polyfektion

Analog zu den kationischen Lipiden wurden nichtlipidische (hydrophile) polykationische Substanzen (z.B. DEAE- Dextran, Dendrimere und Kalziumphosphat) zum Gentransfer entwickelt. Die Komplexe aus Polykation und DNA werden Polyplexe genannt, die Transfertechnik als Polyfektion. DEAE (Diethylaminoethyl) bindet über seine positive Ladung die negativ geladene DNA. Der entstehende DNA- DEAE- Dextran- Komplex lagert sich an die ebenfalls negativ geladene Zelloberfläche an und wird anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Diese Methode ist zwar einfach durchzuführen, aber sie ist meist auch sehr ineffizient und nicht für den in vivo- Gentransfer geeignet. Dendrimere sind baumartig (dendron = griechisch für Baum; meros = griechisch für Teil) verzweigte Polymere aus repetitiven Einheiten.

Kalziumphosphat - Transfektion

Das bei dieser Methode verwendete Kalziumphosphat bindet an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNA und bildet mit ihr DNA- Kalziumphosphat-Koppräzipitate (Felgner, 1987, 1997). Diese Präzipitate werden zum Kulturmedium gegeben und inkubiert. Während der Inkubationszeit adsorbieren die Präzipitate an die Zelloberfläche und werden ebenfalls über Fusion oder Endozytose ins Zellinnere internalisiert. Wie die DNA dann aus den Phagosomen in den Zellkern gelangt, ist auch hier nicht bekannt. Die Transfektion kann zwar unter Verwendung von Chloroquin, Glycerin, DMSO gesteigert werden, aber diese Substanzen wirken auf viele Zellen auch toxisch, so dass die Verwendung auf einige widerstandsfähige Zellen beschränkt bleibt. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass die Versuchsbedingungen in sehr engen Grenzen gehalten werden müssen. Der Vorteil der Methode liegt in der Stabilität der Expression und einer geringeren Mutationsrate als bei der DEAE- Dextran- Methode.

1.6.1.2. Physikalische Transfektionsmethoden

Elektroporation:

Bei diesem Verfahren wird die Zellmembran durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse vorübergehend permeabilisiert, ohne dass dabei die Membranstruktur zerstört wird. Dabei werden die Membranporen eröffnet, über die die DNA in die Zelle hineingelangt (Matthews, 1995; Templeton, 1997). Vorteilhaft ist, dass diese Methode relativ einfach, schnell und effizient durchführbar ist, aber andererseits ist sie recht teuer und benötigt große DNA- Mengen.

Gene Gun

Hierbei wird die DNA zuvor an Trägerpartikel (z.B. Gold) gebunden und anschließend erfolgt ein Beschuss der Zellen mit den DNA- beladenen Partikeln (Godon, 1993). Ungünstig bei dieser Methode ist, dass die Partikel vom Körper nicht abgebaut werden und deshalb im Gewebe verbleiben.

Mikroinjektion

Mit Hilfe einer Mikrokapillare wird die DNA direkt in die Zelle injiziert (Pollard, 1998; Chida 1998). Diese Methode ist zwar recht erfolgreich, aber auch sehr aufwendig, da jede Zelle einzeln injiziert werden muss.

Magnetofektion

Man verwendet dafür sog. superparamagnetische Partikel, z.B. Eisenoxidpartikel (Fe_3O_4 , Fe_2O_3), die aufgrund ihrer sehr geringen Größe (10- 1000 nm) auch als Nanopartikel bezeichnet werden. Das therapeutische Gen wird entweder an die magnetischen Nanopartikel gebunden oder in ihnen verkapselt. Die entstandenen Komplexe werden auch als Magnetofektine bezeichnet. Anschließend werden die Magnetofektine durch das Anlegen eines externen magnetischen Feldes an den gewünschten Wirkungsort gebracht und angereichert. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch natürliche Transportvorgänge. Diese nanobiotechnologische Variante des Gentransfers hat den großen Vorteil, dass die Partikel zum einen in ein bestimmtes Zielgewebe geleitet werden können, zum anderen können sie dort auch angereichert werden und somit kann die erforderliche Dosis minimiert werden. Dadurch ist eine höhere Effizienz und Spezifität möglich. Durch die gezielte lokale Wirkung entstehen auch weniger Nebenwirkungen. Außerdem wird hierbei weniger Zeit bis zum Eintritt der gewünschten Wirkung benötigt als bei anderen Methoden. Ein weiterer Vorteil ist die gute Steuerbarkeit der Magnetofektionkonzentration und der Wirkungsdauer durch An- oder Abschalten des Magnetfeldes (Neuberger 2002). Das Problem des sog. Magnetic Drug Targeting sind immer noch die ungenügenden magnetischen Eigenschaften, die Inhomogenität und die schnelle Elimination der Partikel durch das Retikuloendotheliale System (Neuberger, 2002). Erfolgreiche Versuche auf diesem Gebiet erzielten Krötz et al. (3/2003, 10/2003) und Scherer et al. (2002).

1.6.1.3. Biologische Transfektionsmethoden

Rezeptor- vermittelter Gentransfer

Hierbei wird die DNA an einen Liganden gebunden. Sehr erfolgreiche Versuche wurden dabei mit Poly- L- Lysin und Transferrin durchgeführt (Koch- Brandt, 1993). Das Polylysin hat die Aufgabe, die negative Ladung der DNA auszugleichen, und das Transferrin dient in diesem System als Ligand. Der Ligand- DNA- Komplex bindet spezifisch an den Oberflächenrezeptor der Zelle und wird danach in die Zelle aufgenommen. Der entscheidende Nachteil der Methode liegt in der Größe der Komplexe. Dieser Faktor ist weniger entscheidend bei den ex vivo- Versuchen, dafür umso entscheidender bei in vivo-Versuchen, da die Komplexe auf Grund ihrer Größe die Kapillaren nicht passieren können und somit nicht zu den Zielzellen gelangen.

1.6.2. viraler Gentransfer (Transduktion)

Die Eigenschaft der Viren, ihre Information auf Wirtszellen zu übertragen, macht man sich beim viralen Gentransfer zunutze. Virale Systeme sind zwar wesentlich effektiver als nicht- virale Systeme, dafür aber auch risikoreicher: Rückmutation des apathogenen und replikationsdefizienten Vektors zum Wildtyp (Martinez und Dornburg 1996), die Immunogenität des Virus, wodurch eine wiederholte Anwendung nicht möglich ist (Adenoviren), und die Insertionsmutagenese durch die Integration der Virus- DNA in das Genom der Wirtszelle (Retroviren), die zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann (Robbins et al. 1998). Ein großer Nachteil ist auch, dass die Größe der zu transfizierenden DNA (AAV ca. 4000 Basenpaare, Retroviren ca. 10000 Basenpaare) gering ist.

Die am häufigsten verwendeten Virusvektoren sind Adenoviren, Adenoassoziierte Viren (AAV) und Retroviren. Deshalb sollen diese im nachfolgenden Teil näher beschrieben werden.

1.6.2.1. Adenovirale Vektoren

Adenoviren wurden 1953 erstmals in Tonsillengewebe (adenoides Gewebe) nachgewiesen und erhielten daraufhin 1956 ihre Bezeichnung (Hahn et al., 1999). Seitdem sind mehr als 50 verschiedene Serotypen humaner Adenoviren bekannt. Adenoviren werden aerogen durch Tröpfcheninfektion oder fäkal- oral von Mensch zu Mensch übertragen und verursachen Lokalinfectionen des Respirations-, Gastrointestinal- Urogenitaltraktes und des Auges. Meist verläuft die Infektion inapparent.

Das Adenovirus ist ein nicht umhülltes Virus mit einer ikosaedrischen Form. Das Kapsid besteht aus mehreren verschiedenen Proteinen, unter anderem aus Pentonbasis, Fiber und Hexon. Das

Fiberprotein wiederum ist aufgebaut aus einem Kopf (fiber knob), Schaft und einem Endstück (Tail) und ist über die Pentonbasis mit den Ecken des Kapsidkosaeders verbunden. Mit Hilfe dieses Proteins binden die Adenoviren an die Rezeptoren der Zelloberfläche.

Während die Interaktion des Fiberproteins mit dem zellulären CAR- Rezeptor für die Anlagerung an die Zielzelle verantwortlich ist, bewirkt die Interaktion zwischen dem RGD-Motiv^{*1} der Pentonbasis und den zellulären Integrinen die Virusinternalisierung (Wickham et al. 1993).

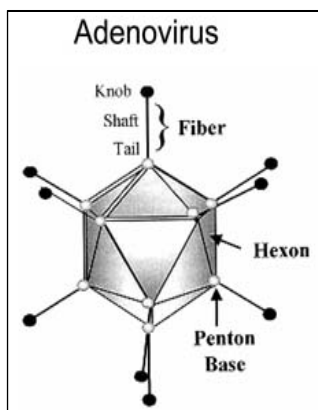


Abb. 4 Aufbau eines Adenovirus

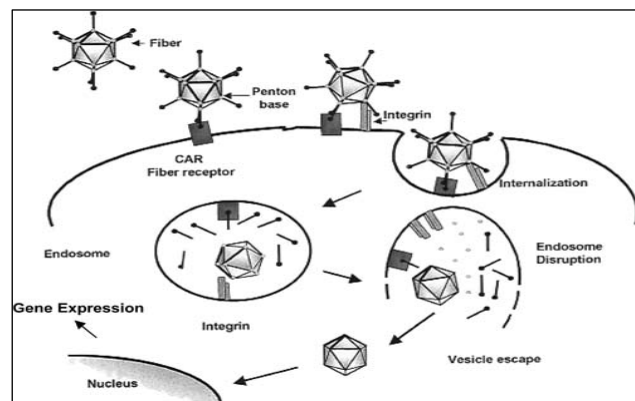


Abb.5 Aufnahme adenoviraler Vektoren in die Zelle

Adenoviren benötigen ca. 30 – 35 Stunden für einen Zyklus. Da sie sich obligat intrazellulär vermehren, benötigen sie eine Wirtszelle. Um in die Wirtszelle zu gelangen, binden sie mit ihren Fiberproteinen an die sog. CAR- Proteine (Coxsackievirus und Adenovirus- Rezeptor) auf der Wirtszelloberfläche (Bergelson et al., 1997, Kirby et al., 1999; Roelvink et al., 1999). Im Anschluss daran erfolgt über die Bindung des RGD- Motivs in der viralen Pentonbasis mit zellulären $\alpha\beta$ - Integrinen, insbesondere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Wickham et al., 1993), die Clathrin-vermittelte Endozytose und damit die Internalisierung des Virus in die Zelle. Im Zellinneren liegen sie dann in Endosomen eingeschlossen vor. Durch die Fusion mit den zytoplasmatischen Lysosomen bilden sich sog. Endolysosomen. Diese enthalten hydrolytische Enzyme, die beim Absinken des intralysosomalen pH- Wertes aktiviert werden und das eingeschlossene Material zersetzen. Dieser Mechanismus ist eigentlich ein Schutzmechanismus der Zelle, z.B. vor Erregern. Beim Gentransfer ist das ein unerwünschter Effekt. Durch viruseigene Enzyme, die während des pH- Wertabfalls früher (d.h. bei höheren pH- Werten) aktiviert werden als die lysosomalen Enzyme, gelingt es jedoch den Viren, vor der Aktivierung der virusabbauenden Enzyme die Endolysosomenmembran aufzulösen und sich aus dem Inneren der Endolysosomen

^{*1} RGD- Epitop steht für die Aminosäureabfolge Arginin (R), Glycin (G), Aspartat (D) = Integrinerkennungsmotiv

ins Zytoplasma zu befreien. Diese Fähigkeit der Viren, auf diese Weise den Schutzmechanismus der Zelle zu umgehen, wird beim viralen Gentransfer ausgenutzt. Zum einen wird das Transgen aus dem Endolysosom freigesetzt und zum anderen schützt das Virus das Transgen vor dem enzymatischen Abbau.

Nach der Freisetzung aus dem Endolysosom wird die DNA über mikrotubuläre Transportmechanismen zum Nucleus befördert.

Da das Virus zu groß ist, um problemlos in den Kern eindringen zu können und die Virus-DNA sich im Kapsid eingeschlossen befindet, muss das Virus als nächstes sein Kapsid entfernen (uncoating). Die freigelegte DNA kann dann durch die Kernmembranporen ins Innere des Kernes gelangen, wo es allerdings nicht in das Wirtszellgenom eingebaut wird, sondern als Episom erhalten bleibt (Kochanek, 1999). Anschließend erfolgen die Replikation und Transkription in chronologischer Reihenfolge.

Das adenovirale Genom ist ein lineares und doppelsträngiges DNA- Molekül von ca. 36 kb Länge. Die Enden des Genoms werden als ITRs (inverted terminal repeats, terminale Wiederholungssequenz) bezeichnet und haben eine wichtige Funktion als Startsignal für die virale Replikation.

Die Gene der adenoviralen DNA werden nach ihrem Transkriptionszeitpunkt in frühe und späte Gene unterteilt. Die frühen Regionen E₁- E₄ kodieren für die regulatorischen Proteine (Transkriptionsregulatoren) und die späten Regionen L₁- L₅ für die Strukturproteine.

Das erste virale Gen, das transkribiert wird, ist das E_{1a}. Das Protein aktiviert dann weitere Genregionen: E_{1b}- Genprodukte kodieren für Zellzyklus,- Apoptoseprozesse (der Erhalt der Wirtszelle ist zum Überleben des Virus sehr wichtig, denn es kann sich nur mit Hilfe der Wirtszelle vermehren), E_{2a/b} zur Regulation der Virusreplikation, E_{3a/b}- Proteine zur Umgehung der antiviralen Immunantwort des Wirtsorganismus gegenüber der infizierten Zelle (es verhindert die Antigenpräsentation an der Zelloberfläche, wodurch die infizierte Zelle für die zytotoxischen T- Zellen unerkannt bleibt), E_{4a/b} zur Abschaltung der Genexpression der Wirtszelle. Nachdem alle Transkriptionsfaktoren exprimiert wurden, werden die Sequenzen L₁- L₅ (späte Gene) für die Proteine der Viruspartikel synthetisiert. Am linken Ende des viralen Genoms befindet sich ein Verpackungssignal, das für die Verpackung des Virusgenoms in das Kapsid verantwortlich ist. Nach dem Zusammenbau wird das Virus durch die Zerstörung der Wirtszelle freigesetzt (lytischer Vermehrungszyklus). Unter optimalen Bedingungen werden dabei zwischen 1.000 und 10.000 infektiöse Partikel je infizierte Zelle produziert.

Als Vektor für den viralen und den kombinierten Gentransfer wurde in der vorliegenden Arbeit das Adenovirus Typ 5 benutzt. Um aus dem Wildtyp des Adenovirus einen geeigneten Vektor

für den Gentransfer zu machen, musste das adenovirale Genom allerdings verändert werden. Zum einen mussten aus Kapazitätsgründen nicht benötigte Sequenzen entfernt werden, zum anderen mussten alle störenden Gene entfernt werden. Durch die Deletion der E₁- Region, die Sequenzen für die Virusreplikation enthält, wurde das Virus replikationsdefizient gemacht. Zusätzlich wurde aus dem Virusgenom die E₃- Region entfernt, da sie für die Infektion und Replikation nicht notwendig war. Nach dem Entfernen aller überflüssigen und störenden Gene wurde das Markergen LacZ eingefügt. Mit dem entstandenen Konstrukt wurden dann Zelllinien (z.B. HEK 293) transfiziert, die die nötigen Verpackungs- und Replikationssequenzen (E₁-Region) enthielten, denen aber die viralen Sequenzen fehlten. Diese Zelllinien werden als Verpackungszelllinien bezeichnet.

Der Vorteil des Adenovirus liegt in seinem breiten Wirtsspektrum und seiner Unabhängigkeit vom Zellzyklusstadium. Das ubiquitäre Vorkommen der Rezeptoren setzt allerdings auch die Spezifität herab, was die Viren für eine systemische Behandlung unbrauchbar macht. Ein weiterer Nachteil des Adenovirus liegt in seiner immunogenen Wirkung. Es aktiviert sowohl das zelluläre als auch das humorale Immunsystem. Das hat zur Folge, dass eine erneute Applikation zu starken Immunreaktionen kommen kann und eine erneute Transfektion verhindert wird. Die Tatsache, dass ein großer Teil der Bevölkerung neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren aufweist, erschwert oft schon den ersten Gentransfer, so dass für die Anwendung nur die wenigen nicht- immunisierten Patienten in Frage kommen.

Ein weiterer Nachteil ist, dass sich das adenovirale Genom als Episom im Zellkern befindet und dadurch bei der Zellteilung nicht vermehrt wird, wodurch die Langzeitexpression limitiert ist. (Madry, 2002, 2003). In der onkologischen Gentherapie macht man sich diesen nur auf den ersten Blick erscheinenden Nachteil zum Vorteil, denn durch die kurzfristige transiente Genexpression ist es möglich, die Wirkung auf die Tumorzellen zu beschränken und umliegendes gesundes Gewebe zu schützen.

1.6.2.2. Adenoassoziiertes Virus

Eine Vektorvariante stellt das Adenoassoziierte Virus dar, ein sDNA- Virus aus der Gruppe der Parvoviridae. Es hat die vorteilhaften Eigenschaften der Retroviren und der Adenoviren in sich vereint. Zur Replikation in den Zielzellen benötigen AAV's Proteine von fremden Viren, sogenannten Helferviren, meistens aus der Gruppe der Adenoviren. Das AAV integriert sich ins Wirtsgenom, ist wenig immunogen und ist außerdem in der Lage, sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu infizieren, und zwar mit einer recht guten Effizienz. Für den Gentransfer verwendet man rekombinante AAV- Vektoren vom Typ 2 (AAV-2) (Madry, 2002). Der

entscheidende Nachteil, der die Verwendung der AAV`s als Genvektoren einschränkt, ist die geringe Verpackungskapazität. Dadurch können oft nicht alle benötigten Gene (Transgen und Vektorgen) gleichzeitig in die Zelle eingeschleust werden.

1.6.2.3. Retrovirale Vektoren

Retroviren sind umhüllte RNS- Viren. Sie lagern sich mit Hilfe der Hüllenproteine an die Wirtszelloberfläche an. Nachdem das Virus in die Wirtszelle eingedrungen ist, wird die Virus-RNA durch eine viruseigene reverse Transkriptase in eine DNA (Provirus) umgeschrieben. Die umgeschriebene DNA wird dann ins Wirtsgenom eingebaut. Da die Virus- DNA stabil ins Wirtsgenom integriert wird, kann eine Langzeitexpression erzielt werden. Für den Gentransfer werden ebenfalls replikationsdefekte Viren verwendet, die sich nicht mehr vermehren können. (Madry, 2002).

Problematisch an retroviralen Vektoren ist, dass nur in Zellteilung befindliche Zellen transduziert werden können, das bedeutet, dass ruhende Zellen erst isoliert und in Zellkultur zur Teilung gebracht werden müssen, dann transduziert, selektioniert und schließlich wieder in den Organismus reimpliziert werden müssen. (Madry, 2002).

1.7. Arbeitshypothesen

In der vorliegenden Arbeit sollten die folgenden Hypothesen überprüft werden.

- Primäre humane NPPZ aus degenerierten Bandscheiben lassen sich durch liposomalen Gentransfer transfizieren. Die Transfektionseffizienz und Toxizität hängt dabei entscheidend von den Eigenschaften des verwendeten Liposoms ab.
- Primäre humane NPPZ aus degenerierten Bandscheiben lassen sich durch adenoviralen Gentransfer transfizieren.
- Die Kombination eines liposomalen mit einem adenoviralen Gentransfer führt zu einer höheren Transfektionseffizienz bei geringerer Toxizität als die jeweiligen einzelnen Verfahren.

2. Materialien und Methoden

Aufschluss des Bandschiebengewebes:

Pronase E	Serva Heidelberg
Kollagenase NB8	Serva Heidelberg
Zellsieb (Cell Strainer 100µm)	Falcon
PBS	Eigenherstellung: 7,99 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,204 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,42 g/l Na ₂ HPO ₄

Zellkulturen:

DMEM- Ham`s F12- Kulturmedium	Gibco/ Invitrogen Karlsruhe
Glutamin	Gibco/ Invitrogen Karlsruhe
Streptomycin/ Penicillin	Gibco/ Invitrogen Karlsruhe
Amphotericin B	Gibco/ Invitrogen Karlsruhe
FBS	Biochrom AG/ Berlin
Trypsin	Eigenherstellung: 1,25 g Trypsin, 0,25 g EDTA, 0,4 g KCl, 0,35 g NaHCO ₃ , 1 g Glucose, 8g NaCl auf 1l Aqua dest.
Kulturflaschen	Techno Plastic Products/ Schweiz
PBS- Puffer	Eigenherstellung:7,99 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,204 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,42 g/l Na ₂ HPO ₄
Brutschrank	Heraeus B6000 von Heraeus Instruments GmbH, Hanau
sterile Werkbank	Heraeus

Einfrieren und Auftauen der Zellen

DMEM- Ham`s F12- Kulturmedium	Gibco/ Invitrogen Karlsruhe
DMSO (Einfriermedium)	Serva
Kryoröhrchen	Costar
Flüssiger Stickstoff	M.A.T.
Wasserbad (37°C)	Braun

Zellvitalitätsprüfung

Trypanblau	Sigma
Neubauer- Zählkammer	Cotech

Mikroskop
Plattenphotometer

Zeiss
MRX Revelation Dynex Technologies, Denkendorf

Amplifikation des pUT651- Plasmids

Transformation in E.coli :

E.coli Stamm K12 (JM19)	Promega
SOC- Medium	Promega
LB- Agarplatten	Promega
Zeocin/ Phleomycin	Cayla
Polypropylen- Kulturröhrchen	Falcon
IPTG	Promega
β- Gal	Promega
Glukose, 2M	Promega
Mg ²⁺	Promega

Isolierung des pUT651:

QIAprep [®] Miniprep	Quiagen
-------------------------------	---------

Agarosegelelektrophoreses:

DNA- Typing Grade Agarose	Life Technologies
SeaKEM GTG Agarose	FMC BioProducts
Ethidiumbromid- Stammlösung (10 mg/ ml)	Eigenherstellung
TAE- Puffer	Eigenherstellung
Probenauftragspuffer	Eigenherstellung

Wiedergewinnung der Plasmid- DNA aus Agarosegel

QIAquick Gel Extraktionskit II	Quiagen
--------------------------------	---------

Bestimmung der Viruskonzentration:

Spektrophotometer DU- 640	Beckmann Instruments
4- fach Mikroküvette aus Quarzglas	Beckmann Instruments

Amplifikation AdenoLacZ

E.coli Stamm K12 (JM19)	Promega
AdenoLacZ- Genkonstrukt	Eigenherstellung
HEK-293- Zellen	Bestand der eigenen Arbeitsgruppe

Isolierung des rekombinanten AdenoLacZ

10 mM Tris- Puffer (pH 8,0)	Quiagen GmbH/ Hilden
CsCl- Lösungen	Quiagen GmbH/ Hilden
Ultrazentrifuge Optima LE 80- K	Beckmann Instruments
Ultra- Clear- Zentrifugenröhrchen	Beckmann Instruments
Dialyseschlauch	Life Technologie

Transfektionen/ Transduktionen

96- well- Platten	Techno Plastic Products AG
DNA (pUT651)	Cayla, Toulouse, Frankreich
AdenoLacZ- Genkonstrukt (pAd5-DelE1/E3.CMV.LacZ)	eigene Arbeitsgruppe
Liposomen: DAC 30, 40, 60, 100	G.O.T. Berlin
SP 20	G.O.T. Berlin
DMRIE	Felgner/ USA
DOCSPER 50, 100	O.Keil/ Wuppertal
Lipofectin, Lipofectamin	Gibco/ Invitrogen
Transfectam	Promega GmbH/ Mannheim
DOTAP, FuGene	Roche
Superfect 50, 75, 100, Polyfect	Qiagen GmbH/ Hilden

Dualer Test

Einkanalpipetten 10µl/ 200µl/ 1000µl	Gilson „Pipetman“
8- Kanalpipette	Gilson „Pipetman“
Absaugsystem	Cotech
Reaktionsgefäße	Eppendorf
96- well Plattenreader MRX	Dynex Technologies
pNPP	Fluka
Natriumacetat	SIGMA
Triton	SIGMA

HBSS	Gibco
Natriumbicarbonat	SIGMA
Tris	ROTH
CPRG	Roche
β- Galaktosidase aus E. coli	Fluka

2.1. Bandscheibenmaterial

Das Bandscheibenmaterial wurde im Rahmen von Bandscheibenoperationen (z.B. Sequestektomie, Nucleotomien, Discektomien), Fusionsoperationen oder bei operativen Korrekturen von Skoliosen gewonnen. Das Material wurde bis zur Aufarbeitung in sterilem Medium (DMEM- Ham`s F12) oder Pufferlösung gelagert.

2.2. Plasmid (pUT651)

Plasmide sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA- Moleküle. Durch ihre Fähigkeit, sich autonom vervielfältigen zu können, liegen sie oft in mehreren Kopien vor und sind für den Gentransfer gut geeignet.

Für die Transfektionsversuche dieser Arbeit ist das Plasmid pUT651 verwendet worden. Es enthält das Markergen LacZ, das für die β- Galaktosidase codiert und natürlicherweise im Genom des E. coli enthalten ist. Das Lac- Operon des E.coli besteht aus mehreren Untereinheiten, wie LacA (Transacetylase), LacY (Permease) und LacZ (Galaktosidase). Zur Herstellung des Plasmids pUT651 wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen das LacZ- Gen aus dem Bakteriengenom isoliert und mit einem geeigneten CMV- Promotor, der die Expression des LacZ- Genes reguliert, verknüpft. Anschließend wurde das CMV/LacZ- Genkonstrukt als Markergen ins Plasmid eingebaut. Dafür wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Sma I* das ringförmige E.coli- Plasmid an einer spezifischen Sequenz der MCS- Region** (Noc I) durchtrennt und somit linearisiert (Restriktion). Damit sich die beiden Plasmidenden nicht wieder zusammenlagern, wurden die Phosphatgruppen an den 5`- Enden durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Nach der Linearisierung wurden die Enden des Fremdgens LacZ mit den Enden der Plasmid- DNA durch entsprechende DNA- Ligasen verknüpft (Ligation), wodurch das Plasmid seine ursprüngliche ringförmige Struktur

* Der Name des Restriktionsenzym ist eine Abkürzung für den Namen des Bakteriums, aus dem es isoliert wurde. Sma I z.B. wurde isoliert aus *Streptococcus hindustanus*.

** Multiple cloning site

zurück erhalten hat. Das entstandene Plasmid wird als rekombinantes Plasmid (pUT651) bezeichnet.

Das eingebaute LacZ- Gen codiert die β - Galaktosidase, die natürlicherweise das Disaccharid Laktose in Glukose und Galaktose spaltet und dem E.coli als Energiequelle dient. Es kann aber auch das synthetische Substrat 5- Brom- 4- Chlor- 3- Indolyl- β - D- Galaktosid (= β - Gal) zu einem Indigofarbstoff spalten. Dadurch eignet es sich als Indikator für die erfolgreiche Übertragung des Fremdgens.

Das rekombinante Plasmid pUT651 enthält neben dem Markergen LacZ, ein sogenanntes Selektionsmarkergen (Antibiotikaresistenzgen, Sh ble- Gen, Zeocinresistenzgen^{*}), eine Replikationsstartsequenz (ori = origin of replication), mit der es sich unabhängig vom bakteriellen Chromosom vermehren kann, und eine MCS- Region (= multiple cloning site), die eine Reihe von spezifischen Restriktionsschnittstellen enthält.

2.3. Bakterienstämme

Zur Herstellung und Vermehrung der Plasmide wurden E.coli- K12 (JM109) verwendet. Die Bakterien wurden in LB- (Luria- Bertani) Medien (1% Tryptophan, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) bei 37°C kultiviert. Feste Medien enthielten zusätzlich 2% Agar. Das Medium wurde autoklaviert und auf 50 °C abgekühlt.

2.4. AdenoLacZ- Genkonstrukt

Für den viralen und den kombinierten (viral- nichtviralen) Gentransfer wurde das LacZ- tragende Plasmid in das Genom eines Adenovirus Typ 5 eingebaut. Es ermöglicht durch seine rezeptorvermittelte Endozytose die Einschleusung des Markergens in die Zelle, schützt die DNA vor dem Abbau durch lysosomale Nukleasen und sorgt für die Freisetzung der DNA aus den Endolysosomen. Um aus dem adenoviralen Wildtyp einen geeigneten Vektor für den Gentransfer zu machen, wurde das Adenovirus zuvor modifiziert:

Da Adenoviren potentiell pathogen sind, wurde das Virus durch die Deletion der E₁- Region replikationsinkompetent gemacht. Aus Kapazitätsgründen ist zusätzlich die E₃- Region entfernt worden. Nach der Deletion der E₁/ E₃- Region wurde das Markergen eingefügt. Als Markergen wurde, wie bei der liposomalen Transfektion, das LacZ- Gen (pUT 651) des E.coli verwendet. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen ist die LacZ- Region aus dem Bakteriumgenom herausgeschnitten und zusammen mit einem CMV- Promotor ins adenovirale Genom eingefügt

^{*} Zeocin gehört zu den Antibiotika der Bleomycin/Phleomycin Familie. Das Resistenzgen dafür wurde laut dem Hersteller aus Streptomyces verticillus gewonnen

worden. Mit dem entstandenen Konstrukt wurden dann Zelllinien (HEK 293^{*}) transfiziert, die die nötigen Verpackungs- und Replikationssequenzen (E₁- Region) enthalten. Durch die Komplementierung der E₁- Deletion im viralen Vektor kommt es zur Replikation des rekombinanten Adenovirus in HEK 293- Zellen. Die Herstellung dieses AdenoLacZ- Genkonstruktes erfolgte im Rahmen anderer Arbeiten der Arbeitsgruppe.

2.5. Zelllinien

Die Zelllinie HEK 293 wird sowohl für die Herstellung als auch für die Vermehrung des AdenoLacZ- Genkonstruktes benötigt. Zu diesem Zweck wurden die HEK 293- Zellkulturen mit DMEM, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ ml Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum (FBS) kultiviert. Nicht benötigte Zellen wurden suspendiert, zentrifugiert und der Überstand bis auf wenige µl über dem Zellsediment abpipettiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung und die Herstellung einer Zellsuspension von 1×10^6 Zellen/ ml. 1 ml des Aliquotes wurde anschließend in ein Kryoröhrchen (2 ml) mit DMSO pipettiert, in einem Styroporbehälter langsam bis auf -80°C heruntergekühlt, nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt und bei -150°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Reagenzglas pipettiert, 10 ml DMEM hinzugegeben und 5 min. bei 600g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml DMEM 10% resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen in 75 cm^2 Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, bis eine Konfluenz von $> 70\%$ erreicht war.

2.6. Liposomen

Liposomen sind Vesikel, deren Membran aus einer hydrophoben Phospholipiddoppelschicht und hydrophilen Anteilen an der Außen- und Innenseite der Vesikelmembran besteht. Moleküle, die sowohl aus hydrophoben als auch aus hydrophilen Anteilen bestehen, werden als amphiphil bezeichnet.

Nach Gao und Huang (1995) sind die Lipide der kationischen Liposomen aus einer positiv geladenen, hydrophilen (bzw. lipophoben) Kopfgruppe, einer hydrophoben (bzw. lipophilen) Ankergruppe und einem Verbindungsstück (Spacer), das die Kopfgruppe mit der Ankergruppe verbindet, aufgebaut (Groth, 1999):

* embryonale humane Nierenzelllinie (human epithelial kidney)

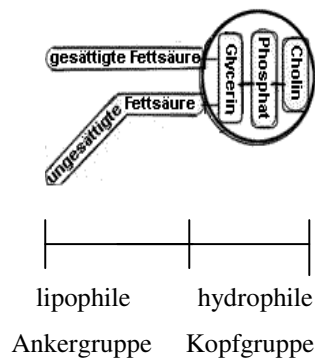
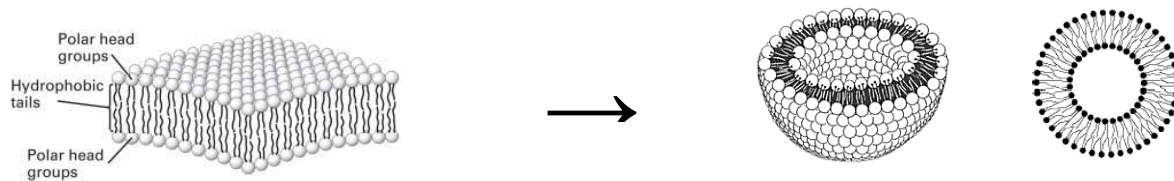


Abb.6 Aufbau eines Lipides

Im wässrigen Milieu verursachen intramembranäre Abstoßungskräfte eine Krümmung der Membran zu einem Vesikel. Je nach dem wie viele Doppelschichten an der Vesikelbildung beteiligt sind, entstehen unilamellare und multilamellare Vesikeln (Ross et al., 1998; Zhao et al., 1997). In vesikulärer Form stellen sie ein potentes Verpackungssystem für DNA oder pharmakologische Wirksubstanzen (z.B. Zytostatika) dar und eignen sich daher gut für den Gentransfer.

Schematische Darstellung zur Bildung eines unilamellären Liposoms (Abb.7):



Entsprechend der Ladung der Kopfgruppen spricht man von kationischen, neutralen oder anionischen Liposomen.

Für die Transfektionsversuche dieser Arbeit wurden ausschließlich kationische Liposomen verwendet. Sie bestehen aus einem amphiphilen, kationischen Lipid und in den meisten Fällen einem neutral geladenen „Helferlipid“ wie DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin). Durch ihre positive Ladung ist es ihnen möglich, die anionische DNA zu komplexieren und an die ebenfalls negative geladene Zelloberfläche zu binden. Nach Bindung an die Zelloberfläche erfolgt die Aufnahme des DNA- Liposomenkomplexes wie in der Einleitung beschrieben.

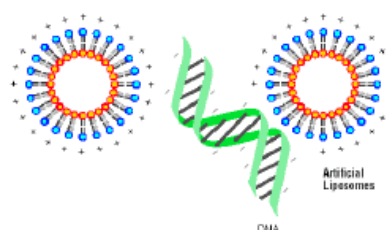


Abb. 8 Lipoplexbildung

2.7. Aufarbeitung des Bandscheibenmaterials und Anlegen von Primärkulturen

Primärkulturen wurden aus dem Organ direkt hergestellt. Um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen, wurde das Material nach mehrmaligem Waschen mit PBS für 1 h mit Pronase E und 12 h lang mit Kollagenase auf einem Magnetrührer mit langsamer Rührbewegung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ vorbehandelt. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde anschließend mit Hilfe eines Zellsiebes filtriert, zentrifugiert und mehrmals mit sterilem PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer- Zählkammer wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 10⁶ Zellen/ ml eingestellt, in Kulturflaschen (75 cm²) überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis ein einschichtiger Zellrasen (Monolayer) entstanden war. Für die Anzucht verwendeten wir DMEM/ Ham`s F12 als Medium mit Zusatz von Glutamin (200mM), 10% FBS (fetales Kälberserum), Streptomycin (10.000 µg/ ml), Penicillin G (10.000 E/ ml) und Amphotericin B (25µg/ ml). Zur pH- Wert- Stabilisierung enthielt das Kulturmedium NaHCO₃. Zur pH- Wert- Überwachung diente Phenolrot als Indikator, der sich mit sinkendem pH- Wert nach gelb verfärbte. Alle 2- 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, da einerseits Nährstoffe verbraucht wurden und andererseits Abbauprodukte der Zellen ins Medium abgegeben wurden, wodurch die Kulturbedingungen ungünstig beeinflusst worden wären.

2.8. Anlegen sekundärer Zellkulturen (Zellpassagierung)

Da durch die Kontaktinhibition die Wachstums- und Proliferationsrate mit Zunahme der Zelldichte abnimmt, wurden die Zellkulturen bei einer Konfluenz von 80% passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min. bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank mit 1,5 ml Trypsin (0,25%) inkubiert. Nach Ablösen der Zellen vom Zellboden wurden 10 ml komplettes Medium dazugegeben und resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde auf 10⁶ Zellen/ 75 cm² Kulturflasche eingestellt und in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Die weitere Kultivierung erfolgte wieder bei 37°C und 5% CO₂.

2.9. Zellzählung mit der Neubauer- Zählkammer

Zur Zählung der vitalen Zellen wurde als erstes eine Zellsuspension hergestellt. 100µl der Zellsuspension wurden dann mit 100µl Trypanblau- Lösung (0,4%) gemischt (Verdünnung 1:2) und für 5 Sekunden inkubiert. Während der Inkubationszeit diffundiert der Farbstoff durch die defekte Zellmembran beschädigter Zellen und färbt diese blau an. Vitale Zellen dagegen nehmen keinen Farbstoff auf, da ihre intakte Membran eine Barriere für den Farbstoff darstellt.

Anschließend wurden unter dem Mikroskop die nicht angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl/ ml berechnet.

2.10. Einfrieren und Auftauen von Nucleus pulposus Zellen

Sind die Zellen nicht sofort benötigt worden, wurde nach dem Trypsinieren der adhärenen Zellen eine Zellsuspension von 10^6 Zellen pro ml hergestellt. Nach dem Zentrifugieren wurden 9 ml frisches Kulturmedium und 1 ml DMSO^{*3} (Einfriermedium) tröpfchenweise dazugegeben, in Kryoröhrchen portioniert und auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben in einer speziellen Einfrierbox schrittweise heruntergekühlt ($1^\circ\text{C}/\text{min.}$) und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Das langsame Herunterkühlen ist wichtig für den Erhalt der Zellvitalität, denn anders als beim Schockfrieren haben die Zellen beim schrittweisen Herunterkühlen die Möglichkeit sich anzupassen. Somit ist es ein schonenderes Verfahren zum Einfrieren der Zellen als das Schockfrieren.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Kryoröhrchen ins Wasserbad bei 37°C gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmten Kulturmedium gemischt, in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert.

2.11. Transfektion und Transduktion

Um den Transfektions- bzw. Transduktionserfolg messen zu können, werden Plasmide mit sog. Markergenen (oder Reportergenen) verwendet, die in den Zielzellen exprimiert werden und deren Genprodukte technisch messbar sind. Durch die Quantifizierung des Genproduktes können dann indirekt Rückschlüsse auf die erfolgreich transfizierte Genmenge gezogen werden. Für die Versuche dieser Arbeit wurde das Markergen LacZ (pUT 651) verwendet, das für die β -Galaktosidase codiert. Dieses Enzym spaltet das Disaccharid Lactose in Glukose und Galaktose, deren weiterer Abbau unter anderem zur Energiegewinnung der Zelle dient. Es kann aber auch das synthetische Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (= β -Gal) zu einem Indigofarbstoff spalten, und eignet sich deshalb auch als Indikator für die erfolgreiche Übertragung des Fremdgens LacZ. Durch die photometrische Messung des Farbstoffes kann dann auf die transfizierte/ transduzierte Menge an LacZ geschlussfolgert werden. Für die Transfektion, d.h. die nicht-virale Genübertragung, wurden kationische Lipide/ Lipidgemische verwendet, für die Transduktion Adenoviren.

^{*3} DMSO ist ein Frostschutzmittel für Zellen und schützt die Zellen vor Dehydrierung, osmotisch bedingten Defekten der Zellmembran und vor der intrazellulären Eiskristallbildung während des Einfrierens, die zu mechanischen Schäden an den Zellorganellen und der Zellmembran führen würden.

2.11.1. Nicht- viraler Gentransfer (Transfektion)

Da über die Transfizierbarkeit von Nucleus pulposus Zellen wenig bekannt ist, transfizierten wir die Nucleus pulposus Zellkulturen mit verschiedenen Liposomen unterschiedlicher Konzentration (5µg, 2,5µg, 1,25µg, 0,6µg, 0,3µg) und 0,5 µg DNA. In weiteren Versuchen wurde die DNA-Menge auf 1 µg erhöht, um den Einfluss der DNA-Menge auf die Transfektionseffizienz und Toxizität zu untersuchen.

Für die liposomale Transfektion sind folgende Teilschritte notwendig:

- a.) Herstellung der Liposomen aus kationischen Lipiden
- b.) Herstellung und Klonierung der Plasmid-DNA (pUT651)
- c.) Bildung von Lipoplexen aus Plasmid- DNA und Liposomen
- d.) Transfektion der Nucleus pulposus Zellkulturen mit den hergestellten Lipoplexen
- e.) Nachweis der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität im Dualen Test

a.) Liposomenherstellung

Für die Transfektionsversuche dieser Arbeit wurden ausschließlich kationische Liposomen verwendet. Sie bestehen aus einem amphiphilen kationischen Lipid und in den meisten Fällen einem neutral geladenen „Helferlipid“ wie DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin). Durch ihre positive Ladung ist es ihnen möglich, die anionische DNA zu komplexieren und an die ebenfalls negative geladene Zelloberfläche zu binden.

Der erste Schritt zur Herstellung der Liposomen ist die Bildung eines Lipidfilmes. Hierzu werden die in Lösungsmittel gelösten Lipide in einen Glaskolben gegeben und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer vollständig entfernt, so dass an der Wand des Glaskolbens ein dünner Lipidfilm entsteht. Durch Zugabe von Wasser werden die Lipide rehydratisiert und der Film von der Kolbenwand abgelöst. Während der Rehydratation entstehen zunächst multilamellare Liposomen, d.h. Liposomen mit mehr als einer Lipiddoppelschicht. Durch Beschallung der Dispersion werden die multilamellaren Vesikel in unilamellare Liposomen umgewandelt (Regelin, 2000). Die für diese Arbeit verwendeten Liposomen DMRIE, DOCSPER, Transfektin, Transfektam, Lipofectin, Lipofectamin, DOTAP, FuGene, und Sperfectin wurden käuflich erworben und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. DAC- Chol stammt aus der Eigenherstellung der Arbeitsgruppe.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Lipide/ Lipidgemische bzw. die verwendeten Liposomen mit ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Ladung und dem jeweils enthaltenen Helferlipid.

Name	chemische Bezeichnung	monokationisch/ polykationisch	Ladung	kationische Kopfgruppe	hydrophobe Ankergruppe	Helferlipid
kationische Lipide/ Lipidgemische						
DAC 30, 40, 60, 100	3b(N-(N,N'-Dimethyl- aminoethan)-carbamoyl) cholesterol	monokationisch	1	Dimethylamin	Cholesterol	DOPE
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl -3-methylhydroxy- ethylammoniumbromid	monokationisch	1	Hydroxyethyl- dimethylamin	Etherlipid	-
Lipofectin (DOTMA+DOPE)	N-[1-(2,3- dioleoyloxy)pro- pyl]- N,N,N-trimethylam- moniumchlorid	monokationisch	1	Methylamin	Phospholipid	DOPE
Sperfectin 20, 50, 100		polykationisch	3	Spermin	Cholesterol	unbekannt
DOCSPER 50, 100	1,3-dioleoyl-oxy-2-(N5- carbamoyl-spermine)- propane	polykationisch	3	Spermin	Cholesterol	DOPE
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3- (trimethyl-ammonium) propan	polykationisch	?	Trimethylamin	Glycerollipid	-
LipofectAMIN (DOSPA+ DOPE)	2,3-Dioleoyloxy-N [2(sper- mincaboxamido)ethyl]- N, N-dimethyl-1-propan- ammoniumtrifluoroacetat	polykationisch	?	Spermin	Phospholipid	DOPE
Transfectam (DOGS)	Diocadecylamidoglycyl- spermin	polykationisch	?	Spermin	aliph. CH- Ketten	-
FuGene	unbekannt	polykationisch	?	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Lipide/ Lipidgemische bzw. die verwendeten Liposomen

* Die Zahl hinter der Bezeichnung des Lipides steht für seinen Anteil im Komplex, z.B. bedeutet

DAC 30: 30% Lipid und 70% Helferlipid (DOPE)

DAC 40: 40% Lipid und 60% Helferlipid (DOPE)

DAC 100: 100% Lipid und 0% Helferlipid (DOPE).

** Über die Zusammensetzung von FuGene wurden vom Hersteller keine Angaben gemacht. Es ist eine polykationische Lipidmischung unbekannter Zusammensetzung, die neben Lipiden auch andere nicht- lipidische Komponenten enthält.

Aus den aufgeführten Lipiden und der Plasmid-DNA wurden Lipoplexe mit 5µg, 2,5µg, 1,25µg, 0,6µg und 0,3µg Lipid und 0,5µg bzw. 1µg DNA pro well hergestellt.

b.) Klonierung des Plasmids (Amplifikation)

Um genügend Plasmid für die Versuche zu erhalten, musste es zunächst durch Klonierung vermehrt werden. Unter Klonierung versteht man die Vermehrung von DNA in Wirtszellen. Da alle Nachkommen genetisch identisch sind, spricht man von einem Klon.

Durch die Fähigkeit der Plasmide, sich unabhängig vom bakteriellen Genom vermehren zu können, können sie in der Gentechnik als Klonierungsvektoren benutzt werden, um bestimmte Gene zu vervielfältigen. Dafür wird das jeweilige Fremdgen ins Plasmid eingebaut und bei der Teilung mit vermehrt. Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid wurde z.T. innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellt und z.T. gebrauchsfertig erworben.

Um das rekombinante Plasmid zu vermehren (Amplifikation), wurde es durch Transformation^{*1} auf E.coli- Bakterien übertragen. Hiefür wurden, wie für die Herstellung des Plasmids, E.coli K12 (JM- 109)- Stämme verwendet. Da E.coli- Bakterien keine natürliche Transformationskompetenz besitzen, mussten sie durch chemische und physikalische Methoden kompetent gemacht werden. Es existieren verschiedene Methoden, um E.coli-Bakterien für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bakterien für Transformationen entweder bereits kompetent vom Hersteller bezogen oder nach der Methode von Hanahan kompetent gemacht. Das Prinzip beruht auf einer hitzevermittelten Permeabilitätserhöhung der Zellwand, die zur Aufnahme der freien DNA führt (Hanahan, 1983), wobei der genaue Mechanismus der Transformation bisher noch nicht eindeutig bekannt ist.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden E.coli- Bakterien suspensiert und mit Plasmid-DNA 30 min. lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C mit Calciumchlorid- Lösung behandelt. Nach einem Hitzeschock von 1 min. bei 42°C in einem Wasserbad wurde der Ansatz für 2 min. auf Eis abgekühlt. Nach Angaben des Herstellers entstehen bei der Transformation zwischen 10^6 - 10^8 Transformanten je μg DNA.

Trotz der chemischen Vorbehandlung der Zellen nimmt allerdings nur eines von etwa 10.000 Bakterien die DNA auf. Deshalb müssen nach der Transformation die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, von den nicht- transformierten Bakterien unterschieden werden (Selektion). Da das verwendete Plasmid das Antibiotikaresistenzgen und das Markergen LacZ enthielt, erfolgte die Selektionierung durch die Anzucht auf einem Agarnährboden, der das Antibiotikum Zeocin und das Substrat β - Gal enthielt. Dafür wurde zum Ansatz 4°C kaltes SOC-Medium hinzugegeben, unter Schütteln (225 rpm) für 1h bei 37°C inkubiert, auf einer LB-Agarmediumplatte^{*2} ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Während der Kultivierung

^{*1} In der Gentechnik versteht man unter Transformation die Übertragung von freier DNA auf ein Empfängerbakterium.

^{*2} (= LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar und Zeocin)

erfolgte dann die Selektionierung: Bakterien, die das Antibiotikaresistenzgen enthielten, waren in der Lage, das im Nährboden enthaltene Antibiotikum zu inaktivieren und sich zu vermehren. Bakterien, denen dieses Gen fehlte, konnten nicht auf dem Nährboden wachsen. Bakterien, die das LacZ- Gen aufgenommen haben und exprimierten, spalteten das im Nährboden enthaltene farblose β -Gal zu einem Indigofarbstoff, der in den Bakterien ausfällt und als blaue Kolonien auf dem Nährboden zu erkennen war. IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid), das ebenfalls im Nährboden enthalten war, diente dabei als Induktor für die Expression des LacZ- Gens. Bakterien, die kein LacZ exprimierten, haben das Plasmid nicht aufgenommen und bildeten weiße Kolonien.

Die plasmidtragenden Bakterien wurden entweder zur Kryokonservierung in LB- Medium mit 7% DMSO bei -80°C gelagert oder für die Isolierung weiterverarbeitet.

Die Isolierung der amplifizierten Plasmid- DNA wurde mit Hilfe des Quiagen- Plasmidkits durchgeführt: Zunächst wurde eine Bakteriensuspension hergestellt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment resuspendiert. Nach alkalischer Lyse der Bakterien mit NaOH/ SDS kam es zur Freisetzung und Denaturierung von bakteriellen Proteinen, chromosomaler DNA und Plasmid- DNA. Nach Neutralisierung des alkalischen Lysates mit Na- Acetat renaturiert die Plasmid- DNA, und alle anderen Bestandteile bleiben denaturiert und fallen als Präzipitate aus. Anschließend wurde die renaturierte Plasmid- DNA über eine Anionenaustauschersäule von den anderen Substanzen, die bei der Lyse entstanden sind (ausgefallene Proteinen, Zellwandreste, chromosomale DNA usw.) getrennt. Durch Zugabe von Isopropanol und anschließender Zentrifugation wurde die DNA präzipitiert. Zur Aufreinigung der Plasmid- DNA erfolgte eine Gelelektrophorese. Sie ermöglicht die Auftrennung unterschiedlich großer DNA- Fragmente aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld. Das in der Agaroselösung enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und emittiert nach Anregung mit UV- Strahlung Licht im sichtbaren Bereich. Nach Identifizierung der gesuchten DNA wurde sie mit einem Skalpell unter UV- Licht herausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit II der Firma Quiagen aus dem Gel isoliert.

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion einer DNA- Lösung bei 260 nm gemessen. Eine $\text{OD}_{260}^* = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Reinheitsbestimmung wurde eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Reste von Proteinen.

* optische Dichte

Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein E_{260}/E_{280} -Verhältnis im Bereich von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung (z.B. mit Proteinen) hin.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration} = 62,9 \times \text{OD}_{260} - 36,0 \times \text{OD}_{280} [\mu\text{g/ml}]$$

c.) Herstellung der Lipoplexe

Lipoplexe bestehen aus DNA und kationischen Liposomen. Die Herstellung der Lipoplexe für die Transfektion der Zellen erfolgte nach einem von Felgner und Mitarbeitern entwickelten Schema. Dafür wurde die Plasmid- DNA zunächst mit Prothaminsulfat in Ringerlösung vorkomplexiert. Um die DNA - Lipid- Komplexe herzustellen, wurden 5 μg , 2,5 μg , 1,25 μg , 0,6 μg und 0,3 μg pro well des jeweiligen Lipids mit 0,5 μg bzw. 1 μg DNA/ well vermischt und für 15- 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit findet die Komplexierung von DNA und Liposomen statt. Mit diesen Komplexen wurden anschließend die Zellen in den 96- well- Platten transfiziert.

d.) Transfektion

Zur Vorbereitung der Transfektionsversuche wurden Nucleus pulposus Zellen in 96-well Platten kultiviert. Bei einer Konfluenz von mehr als 80% wurden die Zellen transfiziert.

Die vorbereiteten DNA-Lipid-Komplexe (Lipoplexe) wurden dafür zur Zellkultur der 96-well-Platte gegeben und 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Kultivierung während der Transfektionsinkubationszeit wurde ausschließlich serumfreies Medium benutzt, damit die im serumhaltigen Medium befindlichen Serumproteine, die kationischen Liposomen nicht binden können und die Transfektion behindern.

In einem ersten Versuch wurden für die Transfektionen verschiedene Liposomen und Liposomenkonzentrationen bei gleichbleibender DNA- Menge (0,5 μg /well) verwendet. Ziel dabei war es herauszufinden, welche Liposomen und - mengen für eine erfolgreiche Transfektion am Besten geeignet sind.

Im zweiten Versuch wurde die DNA- Menge auf 1 μg /well erhöht, um zu sehen, ob die Steigerung der DNA- Menge zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz führt. Da dies nicht der Fall war, wurden alle weiteren Transfektionsversuche mit 0,5 μg DNA/well durchgeführt.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche konnte keine eindeutige Aussage über die Eignung der Lipide für die Transfektion der Nucleus pulposus Zellen abgeleitet werden. Aus diesem Grunde

wurden die Lipide für die weiteren Transfektionsversuche so ausgewählt, dass monokationische, polykationische Lipide und Lipidgemische vertreten waren.

Zum Nachweis des Transfektionserfolges und der Zytotoxizität erfolgte die Durchführung des Dualen Testes.

2.11.2. viraler Gentransfer (Transduktion)

Für die Transduktion wurde ein adenoviraler Vektor verwendet, der anstelle des therapeutischen Genes das Reporter-gen LacZ (β -Galaktosidase) unter CMV- Promotorkontrolle enthielt.

Für die virale Transduktion von Nucleus pulposus Zellkulturen sind folgende Teilschritte notwendig:

- a.) Herstellung des adenoviralen Vektors
- b.) Vermehrung des adenoviralen Vektors (Amplifikation)
- c.) Transduktion der Nucleus pulposus Zellkulturen mit dem AdenoLacZ- Genkonstrukt
- d.) Nachweis der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität im Dualen Test

a.) Herstellung des AdenoLacZ- Genkonstruktes

Die Herstellung des verwendeten Genkonstruktes erfolgte wie unter 2.4. beschrieben in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe, so dass für die vorliegende Arbeit dieses Genkonstrukt nur noch vermehrt werden musste.

b.) Amplifikation des AdenoLacZ- Genkonstruktes

Um für die Versuche eine ausreichende Menge an rekombinanten Adenoviren zur Verfügung zu haben, wurde das Virus vermehrt (Amplifikation). Dafür wurden HEK 293- Zellen in einer 24- well- Platte ausgesät und eine Virussuspension mit serumfreiem Medium hergestellt. Nachdem eine Konfluenz von 70- 80% erreicht wurde, wurde das Medium der HEK 293- Zellkultur abgesaugt, die Virussuspension auf den Monolayer gegeben, und die Zellen 90 min. lang bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Anschließend wurde DMEM 5% zugegeben, gemischt und bei 37°C und 5% CO₂ wieder inkubiert, bis ein CPE* eintrat (ca. nach 5- 10 Tagen). Um die Adenoviren aus den Verpackungszellen freizusetzen, wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff (20 min. bei -196°C) und Auftauen bei 37°C (20 min.) lysiert. Nach der Lyse lagen die Viren frei in der Lösung vor. Zum Schluss wurden die Viren durch 10- minütiges

* zytopathischer Effekt, erkennbar an der Abkuglung und Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturplatte.

Zentrifugieren bei 4°C und 1200 rpm von den übrigen Lyseprodukten (z.B. Zelltrümmer) grob getrennt und der virushaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Da in der Virussuspension neben den infektiösen viralen Partikeln auch defekte virale Partikel und Reste von Zelltrümmern vorhanden sind, müssen die infektiösen Partikel isoliert werden. Dies erfolgte über einen CsCl-Gradienten (Caesium- Chlorid- Gradient) und Ultrazentrifugation. Dafür wurde die Virussuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, anschließend erst die leichtere CsCl-Lösung (Dichte 1,2 g/ cm³), danach die schwerere CsCl- Lösung (Dichte 1,4 g/ cm³) hinzugegeben und für 90 min. bei 4°C und 100.000 rpm zentrifugiert. Dabei bildeten sich verschiedene Phasen. Die Phase der infektiösen Viruspartikel wurde eluiert, erneut mit CsCl behandelt und 24 h bei 4°C und 100.000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung des CsCl wurden die Zellen in einem Dialysepuffer dialysiert. Nach dieser Prozedur lag das rekombinante Virus in gereinigter Form vor.

Die Virustiterbestimmung erfolgte durch die photometrische Extinktionsmessung. Dabei entspricht die Extinktion von 1 OD_{260nm} = 1,1x 10¹¹ Viren/ml. Der Virustiter berechnete sich nach der Formel:

$$\text{Titer in Viruseinheiten/ ml} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{11} / \text{ml}$$

Nach Abschluss der Dialyse konnten die Viren aliquotiert und bei -80°C gelagert oder für die Transduktion verwendet werden.

Aufgrund der geltenden Sicherheitsbestimmungen mussten die viralen Arbeiten in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 durchgeführt werden. Alle Materialien und Lösungen wurden auf 4°C vorgekühlt und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

c.) virale Transduktion

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren bei einer Konfluenz von mindestens 80 % mit den rekombinanten Adenoviren infiziert. Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Viruskonzentration und Transduktionseffizienz bzw. Zytotoxizität wurden verschiedene Virusverdünnungen hergestellt und eingesetzt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit finden die Virusadsorption, Penetration und das Uncoating statt. Die Kontrollen wurden nur mit serumfreiem Medium behandelt. Nach den Inkubation wurde die Viruslösung entfernt und durch serumhaltiges Medium ersetzt. Zum Nachweis des Transfektionserfolges und der Zytotoxizität erfolgte die Durchführung des Dualen Testes.

2.11.3. Viraler- nicht- viraler Gentransfer

Für die adenoviral- liposomale Transfektion von Nucleus pulposus Zellkulturen sind folgende Teilschritte notwendig:

- a.) Herstellung der nicht- viralen Vektoren (Liposomen aus kationischen Lipiden bzw. FuGene)
- b.) Herstellung und Klonierung der zu transfizierenden Plasmid- DNA pUT 651
- c.) Herstellung und Vermehrung des AdenoLacZ- Genkonstruktes (Ad5.CMV.LacZ)
- d.) Herstellung des adenoviralen- liposomalen Transfektionsgemisches
- e.) Übertragung des hergestellten viral- liposomalen Vektorgemisches auf Zellkulturen
- f.) Nachweis der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität im Dualen Test

Die Herstellung der Liposomen und die Vermehrung der Plasmid- DNA pUT651 bzw. des Ad5.CMV.LacZ- Vektors erfolgte wie bei der einfachen liposomalen Transfektion bzw. viralen Transduktion.

Transduktion:

Zur Vorbereitung der Transfektionsversuche wurden Zellkulturen in einer 96-well- Platte angelegt und bis zu einer Konfluenz von mehr als 80% im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Sie war in der Regel nach 24- 48 h erreicht.

Um später eine Aussage über die Transfektionseffizienz im Verhältnis zur Viruskonzentration machen zu können, wurden vor dem Versuch unterschiedliche Viruskonzentrationen (10⁵, 10⁴, 10³, 10²) hergestellt. Zum Erreichen der einzelnen Verdünnungsstufen wurde DMEM- F12- Kulturmedium ohne Serum verwendet. Danach wurde das AdenoLacZ- Genkonstrukt mit Liposomen vermischt und 20- 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der 96- well- Platte mit PBS gewaschen und mit dem Virus- Liposomengemisch transfiziert. Als Liposomen wurden DAC 30, 40, 60, 100, Sperfectin 20, 50, 100, DMRIE, DOTAP, DOCSPER 50, 100, Lipofectin, LipofectAMIN, FuGene und Transfektam gewählt. Nach einer Inkubationszeit von 4- 48 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um die nicht aufgenommenen Virus- Liposomenkomplexe zu entfernen. Anschließend wurde serumhaltiges Medium hinzugegeben und erneut 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte dann die Auswertung der Transfektionseffizienz und der Toxizität.

Einen Tag vor der Transduktion wurden die Nucleus pulposus Zellen in 96 well- Platten kultiviert und die einzelnen Virusverdünnungen hergestellt. Am Tag der Transduktion wurde das Medium steril abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde das Virus in unterschiedlicher Konzentration dazugegeben.

2.12. Nachweis der Vitalität der transfizierten Zellen (Saure Phosphatase Test)

Sie wird durch die Messung der sauren Phosphatase in den Zellen beurteilt und erfolgt 72 h nach Transfektion. Dazu wird das Medium der transfizierten Zellkultur mit Hilfe der Absaugpumpe entfernt. Anschließend werden die Zellen jeder Vertiefung mit 100µl HBSS- Lösung gewaschen. Nach Entfernen der HBSS- Lösung werden 80µl des Phosphatase- Puffers in jedes well pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Substrat für die Reaktion dient das p-Nitrophenylphosphat (pNPP), das während der Inkubationszeit durch die saure Phosphatase zu p-Nitrophenol umgewandelt wird. Um die Reaktion abzustoppen wird nach Ablauf der Inkubationszeit 20µl Tris- HCL in jede Vertiefung gegeben und anschließend photometrisch bei 405 nm gemessen. Im Anschluss an diesen Test wird der β - Gal- Test zur Messung der Transfektionseffizienz (Prozentsatz transfizierter Zellen) durchgeführt.

2.13. Nachweis der Transfektionseffizienz (β - Gal- Test)

Dieser Test wird im Anschluss an den Saure Phosphatase- Test in derselben 96- well- Platte durchgeführt. Deshalb wird der Test auch als Dualer Test bezeichnet.

Zum Nachweis des erfolgreichen Gentransfers werden sog. Markergene verwendet, deren Produkte entweder fluoreszieren oder enzymatische Aktivität aufweisen, die dann gemessen wird. Da wir als Markergen LacZ benutzten, wurde zum Nachweis der Transfektionseffizienz die enzymatische Aktivität der exprimierten β - Galaktosidase in den Zellen gemessen. Dafür wurden in jede Vertiefung der 96- well- Platte 50µl CPRG- Lösung pipettiert und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. War die Transfektion erfolgreich, wird während der Inkubationszeit das Substrat CPRG durch die β - Galaktosidase zu einem roten Farbkomplex (Chlorphenolrot- β - Galaktopyranosid) gespalten, deren Intensität photometrisch bei 540 nm gemessen wurde. Bei jeder Messung wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die photometrische Auswertung erfolgt.

Die Intensität ist dabei proportional zur umgesetzten Substratmenge und somit ein guter Indikator dafür, wie viel von dem Markergen in die Zellen transfiziert wurde.

Die Gentransfereffizienz wird als Prozentsatz der Zellen ausgedrückt, die das Transgen exprimieren. Sie ist vom Zelltyp und vom verwendeten Transfersystem abhängig und kann durch

Optimierung der Transfektionsbedingungen erhöht werden (Madry, 2002). Die Messung der β -Galaktosidase (Transfektionseffizienz) und der sauren Phosphatase (Vitalität) erfolgte zwar in mU/ well, aber die Angaben in der Grafik beziehen sich auf %- Zahlen, da sie auf die Kontrolle (= unbehandelte Zellen) bezogen wurden, um Messungenauigkeiten auszugleichen. Für die Transfektion wurde das Ergebnis der Kontrolle auf 0% gesetzt, und die Aktivitäten der transfizierten Zellen ins Verhältnis dazu gesetzt.

Da auch die unbehandelten Zellen einen Zellverlust aufwiesen, wurden die Toxizitäten der unbehandelten Zellen gleich 100% gesetzt und die Toxizitäten der transfizierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse wurden jeweils in % angegeben.

Bei der Auswertung der Diagramme zu den Toxizitäten ist zu beachten, dass jeweils die Vitalitäten angegeben sind, da die Messung der sauren Phosphatase bei lebenden Zellen stattfindet. Die Toxizität ergibt sich demnach aus der Differenz zwischen der 100% Vitalität unbehandelter Zellen und der Vitalität behandelter Zellen.

2.14. Statistik

Zu den unterschiedlichen Daten werden jeweils die Mittelwerte (aus mindestens sechs, höchstens zehn Proben verschiedener Patienten) und Standardabweichungen angegeben und wo es sinnvoll erscheint graphisch dargestellt. Auf Gruppenunterschiede wurde mittels Wilcoxon Test für verbundene, nicht-parametrische Stichproben auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ getestet.

3. Ergebnisse

3.1. Proliferation der Nucleus pulposus Zellen

Bei der Kultivierung in Monolayerkulturen zeigten die Nucleus pulposus Zellen trotz ihrer degenerativen Veränderungen ein gutes Wachstumsverhalten, was die Grundvoraussetzung für die Versuche war. Auffällig war allerdings, dass mit zunehmender Kultivierungsdauer und Zellpassagierung auch eine zunehmende morphologische Entdifferenzierung der Nucleus pulposus Zellen zu Fibroblasten eintrat. Die in situ runden bis ovalen Nucleus pulposus Zellen bildeten nach der Aussaat in Kulturflaschen zytoplasmatische Ausläufer und traten dadurch nach und nach untereinander in Kontakt. Diese Zellkulturen wurden für die vorliegende Arbeit nicht weiter benutzt.

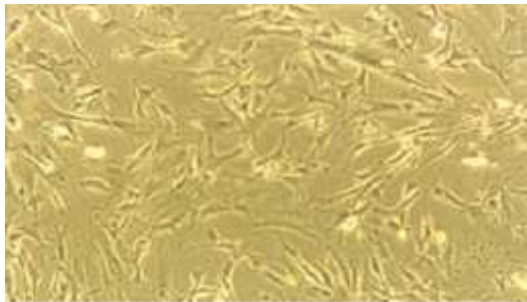


Abb. 9 differenzierte Chondrozyten



Abb. 10 entdifferenzierte Chondrozyten

3.2. Gentransfer

3.2.1. Adenoviraler Gentransfer

In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der **Virusexpositionsdauer** und Transduktionseffizienz bzw. Zytotoxizität untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Inkubationszeiten (15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min.) gewählt. Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass mit jeder Messung in den ersten 60 Minuten sowohl die Transduktionseffizienz als auch die Toxizität anstieg, wobei die Effizienzsteigerung stärker ausgeprägt war als der Anstieg der Toxizität. Nach 60 Minuten erreichte die Effizienzkurve ihr Maximum bei gleichbleibenden Toxizitätswerten. In den weiteren 30 Minuten kam es zu einem diskreten Abfall der Transfektionseffizienz und einem mäßigen Vitalitätsverlust. Wurde die Virusexposition auf mehr als 90 Minuten erhöht, fielen die Effizienzen und die Vitalitäten sprunghaft ab, erreichten jedoch nicht den Nullpunkt. Es zeigte sich, dass die Adenoviren die Nucleus pulposus Zellen zwar sehr effizient transduzieren können, aber im Vergleich zu den Liposomen eine höhere Toxizität aufwiesen. So betrug die

Toxizitäten der Liposomen maximal 30% (Diagramme 3,5,7) und die der Adenoviren bis zu 51% (Diagramm 1). Dafür lagen die liposomalen Effizienzen mit maximal 22% (Diagramme 4,6,8) deutlich unter denen der Adenoviren, die bis zu 72% erreichten. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen des adenoliposomalen Gentransfers, so fällt auf, dass die Toxizitäten bei der Adenolipofektion etwas geringer ausfielen als beim alleinigen adenoviralen Gentransfer (Diagramme 18 – 32) (p max. 0,04). Die Effizienzen des gekoppelten Gentransfers (Diagramme 9 – 17) lagen jedoch deutlich unter denen des adenoviralen Vektors (Diagramm 2). Das bedeutet, dass es durch die Kopplung des Adenovirus an Liposomen zwar nicht gelungen ist, die Effizienzen zu steigern, dafür aber die Toxizität zu senken. Die Toxizitätsunterschiede sind jedoch zu gering, um den kombinierten Vektor erfolgreich einsetzen zu können.

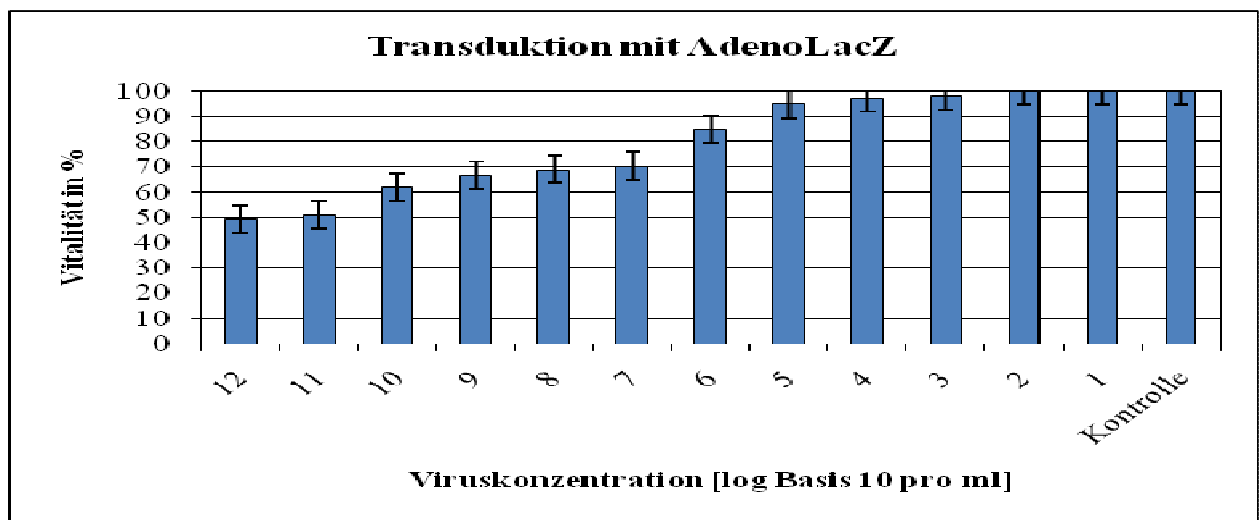


Diagramm 1: Vitalität nach Transduktion mit dem viralen Vektor AdenoLacZ

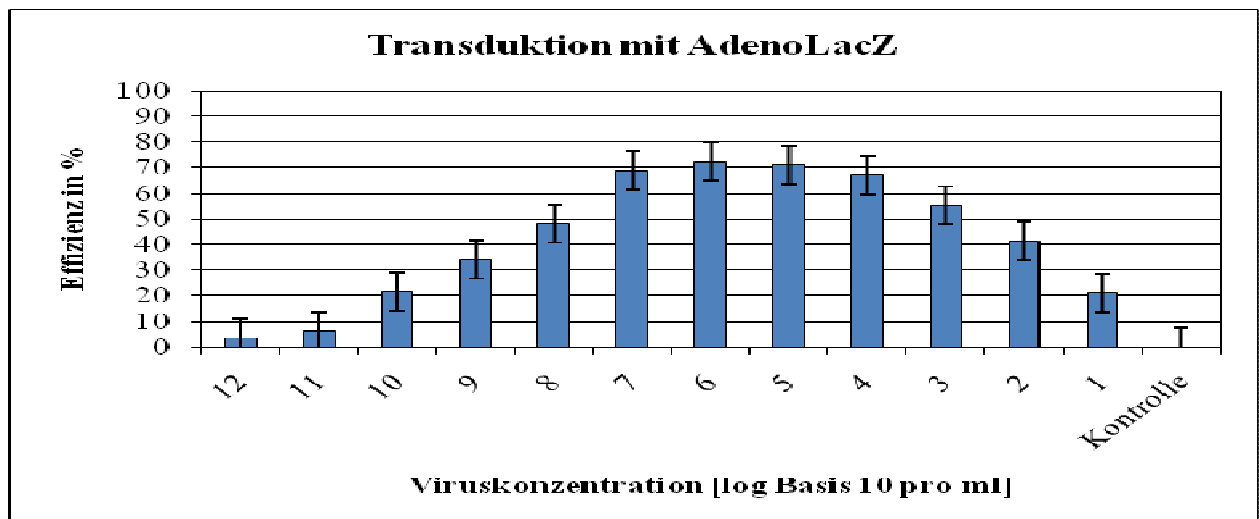


Diagramm 2: Transduktionseffizienz nach Transduktion mit dem viralen Vektor AdenoLacZ

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es zwischen **Viruskonzentration**, Transduktionseffizienz und Toxizität einen direkten Zusammenhang gibt:

Zunächst stieg die Transduktionseffizienz parallel zur Viruskonzentration an. Die Vitalitäten nahmen dagegen mit steigender Viruskonzentration ab, jedoch nicht in dem gleichen Maße, wie die Transfektionseffizienzen stiegen, d.h. die Toxizitäten stiegen langsamer an als die Transfektionseffizienzen. Ab einer Konzentration von 10^5 änderten sich die Verhältnisse. Unterdessen die Transduktionseffizienz weiter anstieg, fiel die Vitalität der Zellen von 95% auf 85% sprunghaft ab, d.h. die Toxizitäten nahmen mit 10% deutlich zu. Bei einer Viruskonzentration von 10^6 konnte dann zwar die maximale Transduktionseffizienz von 72% erreicht werden, gleichzeitig stieg die Toxizität weiter an. Dabei verlief der Anstieg der Toxizität steiler als die Zunahme der Effizienz.

Nachdem die optimale Viruskonzentration sowohl für die Effizienz (10^6) als auch für die Toxizität (10^5) überschritten wurde, verhielt sich die Viruskonzentration gegensinnig zur Effizienz, d.h. mit jeder weiter steigenden Konzentrationsstufe fiel die Transduktionseffizienz weiter ab. Die Toxizität nahm dagegen weiter zu. Auffällig war, dass der Abfall der Effizienzen und der Anstieg der Toxizitäten nach Erreichen der optimalen Virusmenge stärker ausgeprägt waren als der Anstieg der Effizienz und der Toxizität vor Erreichen des Optimums. Der zytotoxische Effekt zeigte sich dabei nicht nur in der Abnahme der sauren Phosphatase-Aktivität (als Zeichen einer verminderten Zellvitalität), sondern auch in der verminderten β -Galaktosidaseaktivität (als Zeichen der vorzeitigen Elimination des transduzierten LacZ-Gens). Demzufolge ist die Beurteilung der tatsächlichen Transduktionsrate, insbesondere bei sehr hohen Viruskonzentrationen, nur eingeschränkt möglich.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass bis zu einer Viruskonzentration von 10^5 die Transduktionseffizienzen kontinuierlich zunahmen, unterdessen die Toxizitäten weitestgehend konstant blieben. Bei einer Konzentration von 10^6 Viruseinheiten nahm die Toxizität sprunghaft zu, unterdessen die Transduktionseffizienzen bei dieser Konzentration ihr Maximum erreichten. Ab 10^7 Viruseinheiten fielen die Transduktionseffizienzen und die Vitalitäten stetig ab. Bis zum Erreichen des jeweiligen Optimums stiegen Toxizität und Effizienz weniger stark an, als die Effizienzen und Vitalitäten nach dem Erreichen des Optimums abfielen, d.h. die Differenzen zwischen den einzelnen Viruskonzentrationsstufen wurden immer größer (Diagramm 1,2).

3.2.2. nicht- viraler Gentransfer (Lipofektion)

Da die Gentransferbedingungen an Nucleus pulposus Zellen bisher wenig untersucht worden sind, wurden in Vorversuchen die **Inkubationszeit**, die **Lipoplexmengen** und die **Zelldichten** untersucht, um die Transfektionsbedingungen zu optimieren. Dabei zeigte sich, dass bei zunehmender Inkubationszeit weniger Lipoplexmengen benötigt wurden und mit zunehmender

Lipoplexkonzentration kürzere Inkubationszeiten nötig waren, um die maximale Genexpression zu erreichen. Mit der Erhöhung der Lipoplexmenge und Verlängerung der Inkubationszeit erhöhten sich jedoch parallel dazu auch die Zelltoxizitäten. Die Toxizitäten und die Effizienzen des liposomalen Gentransfers sind demnach dosis- und zeitabhängig. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei geringeren Zelldichten (<70%) die Toxizität schon bei kürzeren Inkubationszeiten und geringeren Lipoplexmengen auftraten als bei höheren Zelldichten (>70%). Aus diesem Grunde wurde die Konfluenzmenge, bei der die Zellen transfiziert wurden, auf mindestens 80% festgelegt. Die ermittelten Lipoplexmengen, Inkubationszeiten und Zelldichten wurden anschließend für alle Hauptversuche so standardisiert, dass möglichst hohe Effizienzen bei möglichst geringen Toxizitäten erreicht wurden, um Schwankungen, die durch diese Einflussfaktoren verursacht werden, zu verhindern.

Um das Transfektionsverhalten der Liposomen und der Nucleus pulposus Zellen zu analysieren, wurden die Zellkulturen mit mehreren unterschiedlichen Liposomen transfiziert. Zur Untersuchung, welchen Einfluss die **Lipidmenge** auf die Transfektionseffizienz und die Zytotoxizität hat, wurden bei der Lipoplexbildung verschiedene Lipidkonzentrationen (5µg, 2,5µg, 1,25µg, 0,6µg, 0,3µg pro well) und eine gleichbleibende **DNA- Menge** von 0,5 µg/well eingesetzt. In weiteren Versuchen wurde die Lipidmenge konstant gehalten (1,25 µg/well) und die DNA- Konzentration von 0,5 µg/well auf 1µg/well erhöht, um den Einfluss der DNA-Menge auf den Gentransfer zu untersuchen. Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, bei denen sowohl die DNA- als auch die Lipidkonzentration erhöht wurden. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Verdoppelung der Plasmidkonzentration als auch die Erhöhung der Lipidmenge zu keiner signifikanten Transfektionssteigerung oder Toxizitätsminderung geführt hat (p max. 0,06 und 0,07). Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass auch die gleichzeitige Erhöhung von Lipid- und Plasmidmenge weder das Transfektionsergebnis noch die Toxizität signifikant beeinflusste (p= 0,063 und 0,065). Demnach scheinen sich die unterschiedlichen Lipid- und DNA-Konzentrationen nicht wesentlich auf den Gentransfer bei Nucleus pulposus Zellen auszuwirken. Aus Übersichtsgründen sind deshalb im folgenden Teil nur die Versuche mit unterschiedlichen Lipidkonzentrationen und gleichbleibender DNA- Menge graphisch dargestellt worden (Diagramme 3 -8).

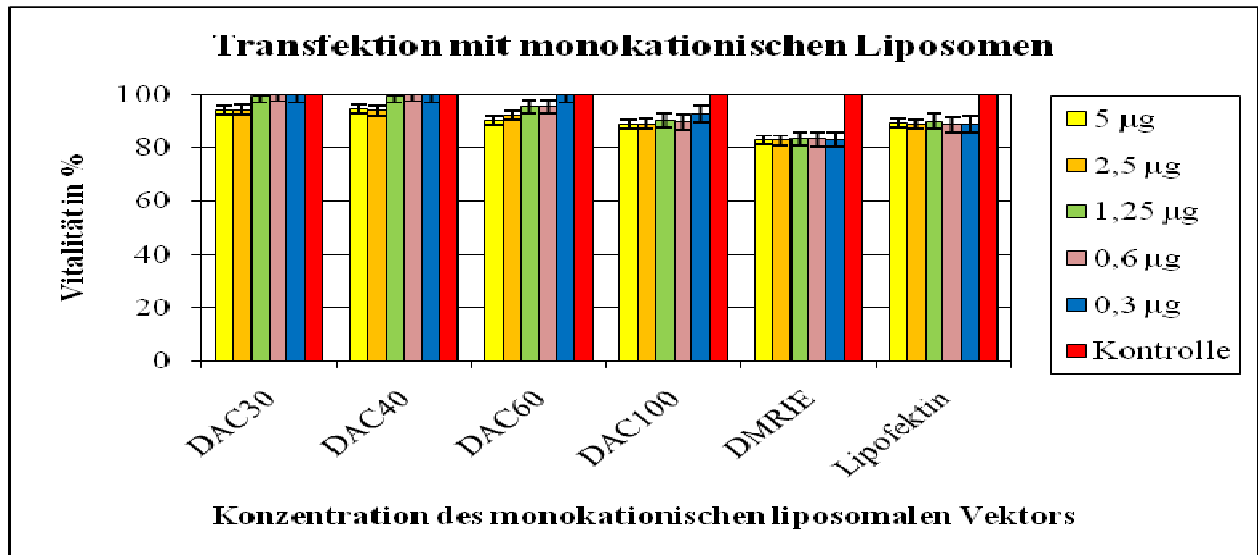


Diagramm 3: Vitalität nach Transfektion mit verschiedenen monokationischen Liposomen

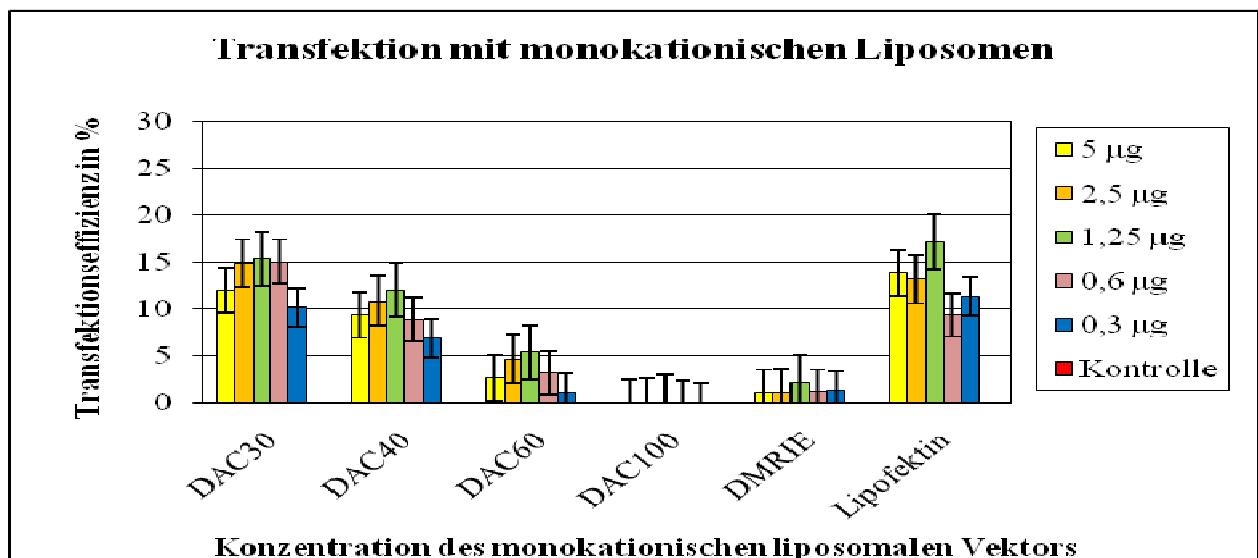


Diagramm 4: Transfektionseffizienz nach Transfektion mit monokationischen Liposomen

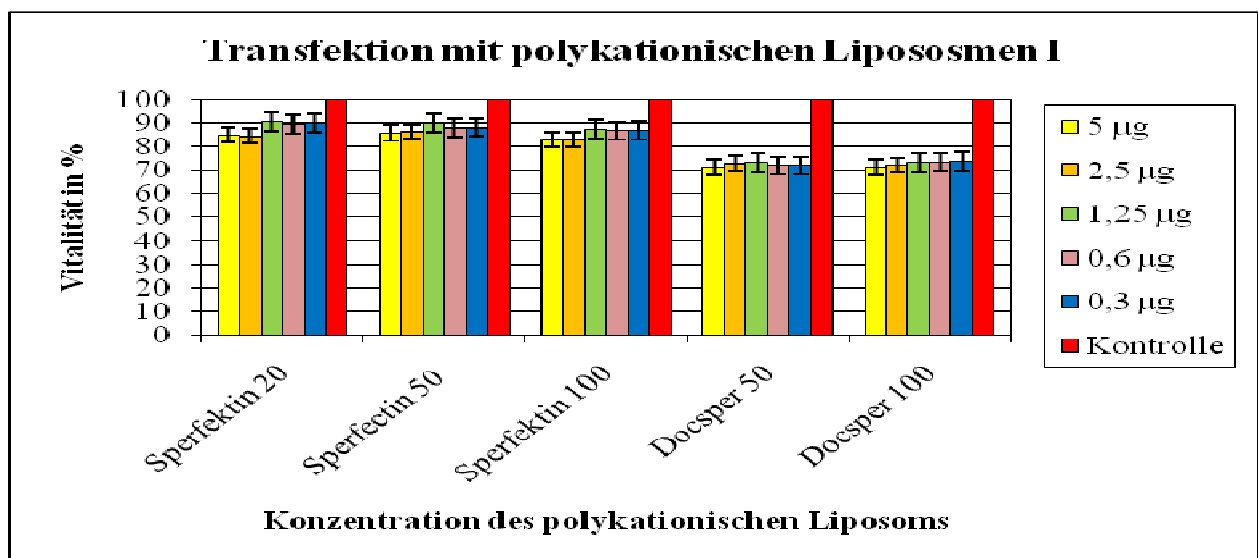


Diagramm 5: Vitalitäten nach Transfektion mit verschiedenen polykationischen Liposomen

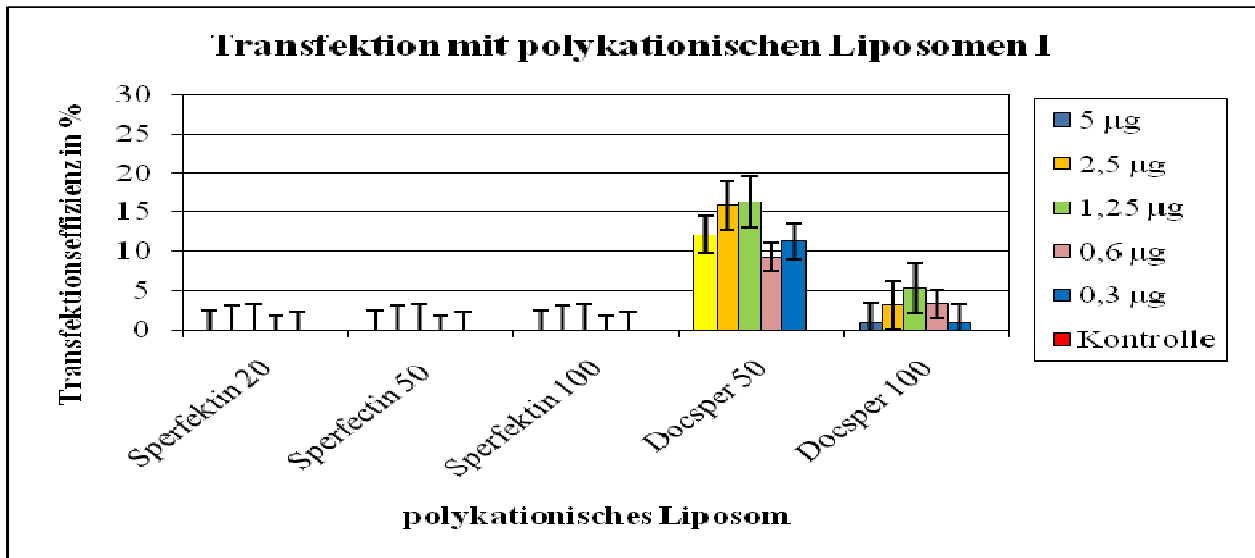


Diagramm 6: Transfektionseffizienzen mit verschiedenen polykationischen Liposomen

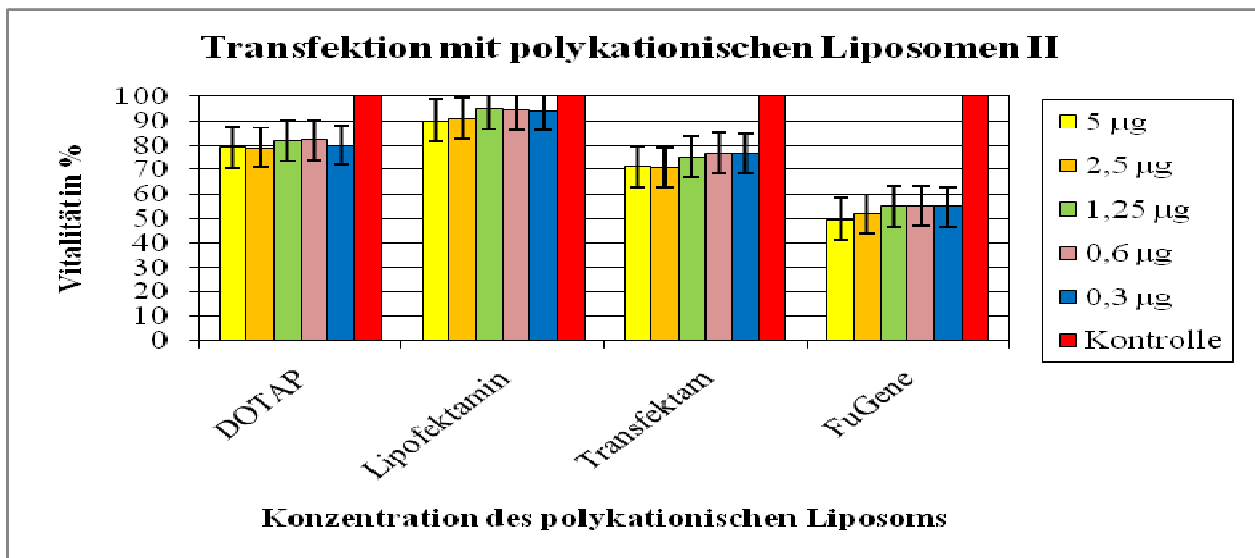


Diagramm 7: Vitalitäten nach Transfektion mit polykationischen Liposomen

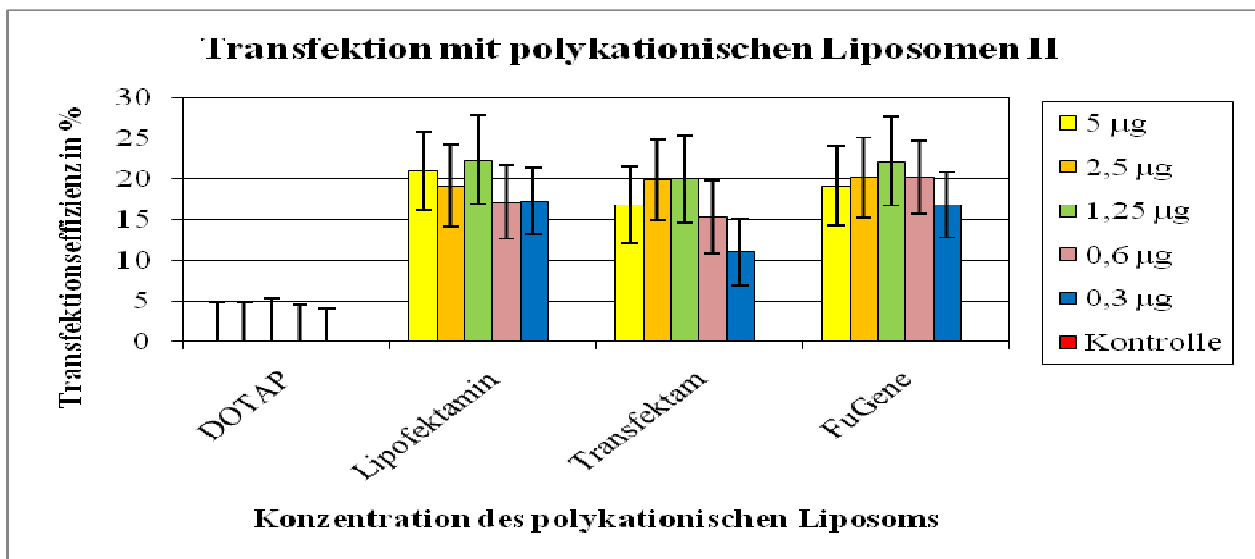


Diagramm 8: Transfektionseffizienzen mit polykationischen Liposomen

Die DNA- und Lipidmengen, bei denen der Gentransfer am effektivsten und die Toxizität am geringsten war, lagen für die meisten Lipide bei 1,25 µg (p max. 0,03) und für die DNA bei 0,5 µg (p max. 0,02). Niedrigere oder höhere Konzentrationen führten entweder zu keiner weiteren Verbesserung der Effizienz bzw. der Toxizität oder zu einer geringfügigen Abnahme der Transferrate und einer, ebenfalls nicht signifikanten, Toxizitätszunahme (p 0,083). Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass die Transfektionseffizienz anfangs parallel zur Lipidkonzentration anstieg, bei 1,25 µg das Maximum erreichte und anschließend abfiel oder stagnierte. Die Toxizitäten verhielten sich dagegen umgekehrt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen sind jedoch so vernachlässigbar gering, dass kein direkter Zusammenhang zwischen Lipid- und/ oder DNA- Konzentration und dem Einfluss auf den Gentransfer bei Nucleus pulposus Zellen hergestellt werden konnte (Diagramme 3 -8).

Es sollte unter anderem auch untersucht werden, ob es zwischen den einzelnen kationischen Lipiden Unterschiede in der Effizienz und Toxizität des Gentransfers gibt, welche auf bestimmte Eigenschaften der Liposomen zurückzuführen sind.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist eine Aussage über den Zusammenhang zwischen der **chemischen Struktur** des kationischen Lipids und Transfektionseffizienz nicht möglich, da keine Übereinstimmung gefunden werden konnte und die Ergebnisse dieser Arbeit keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen in Bezug darauf zulassen. Im Zusammenhang mit der Toxizität allerdings war auffällig, dass cholesterolhaltige Liposomen (DAC-30, 40, 60, 100, Sperfectin) scheinbar weniger toxisch sind als die übrigen Liposomen und Lipidformulierungen (p max. 0,04).

Obwohl in dieser Arbeit die genauen **Oberflächenladungen** (Zetapotential) der Liposomen nicht gemessen wurden, ist aus den Daten erkennbar, dass Liposomen, die polykationische Lipide enthielten, höhere Gentransfereffizienzen erreichten als monokationische (Diagramme 4,6,8) (p max. 0,03). In dieser Arbeit ist davon ausgegangen worden, dass die Oberfläche der Nucleus pulposus Zellen negativ geladen ist. Die erzielten Ergebnisse wären mit dieser Annahme vereinbar. Die Ergebnisse lassen auch darauf schlussfolgern, dass je größer die Ladungsunterschiede zwischen DNA, Nucleus pulposus Zellen- und Liposomenoberfläche, desto größer die Anziehungskräfte zwischen DNA und Liposom einerseits und zwischen Liposom und Nucleus pulposus Zelloberfläche andererseits sind. Polykationische Liposomen haben demnach eine höhere Affinität zur Nucleus pulposus Zelloberfläche als monokationische Liposomen. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Transfektionseffizienzen mit zunehmender

Lipidkonzentration geringfügig anstiegen (Diagramme 4,6,8). Der Anstieg war jedoch nicht signifikant genug, um einen direkten Zusammenhang herstellen zu können ($p > 0,05$). Bei den Untersuchungen zur Toxizität fiel jedoch auf, dass polykationische Liposomen im Allgemeinen toxischer waren als die monokationischen Liposomen (Diagramme 3,5,7) ($p \text{ max. } 0,03$). So lag die Vitalität bei den monokationischen zwischen 90 und 100 %, unterdessen sie bei den polykationischen Liposomen lediglich Vitalitäten von 70-90 % aufwiesen (Die Toxizität betrug demnach bei den monokationischen zwischen 0 und 10 %, bei den polykationischen Liposomen zwischen 10-20 %). Vermutlich führt die höhere positive Ladung der polykationischen Liposomen zu Membranschäden. Zusammengefasst kann also gesagt werden, dass polykationische Liposomen effizienter waren als monokationische, dafür aber auch toxischer. Umgekehrt wiesen die monokationischen Liposomen eine geringere Toxizität auf, dafür aber auch eine geringere Effizienz gegenüber den polykationischen. Die Untersuchungen mit DAC-Chol, Sperfectin und DOCSPER erfolgten mit unterschiedlichen Lipid/ **Helferlipidanteilen**.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Helferlipiden auf den liposomalen Gentransfer und die Zytotoxizität konnte festgestellt werden, dass je größer der Helferlipidanteil in einem Liposom war, desto größer waren auch die Gentransfereffizienzen ($p \text{ max. } 0,022$). So erreichte DAC-30, das einen Helferlipidanteil von 70% hat, höhere Transfektionsergebnisse (10-15%) als DAC-60, das nur noch 40% Helferlipid enthält (5%). DAC-100, das kein Helferlipid enthält, war nicht zur Transfektion von Nucleus pulposus Zellen geeignet (Diagramm4), ebenso wenig wie DOTAP (Diagramm 8) und DMRIE (Diagramm 4), die ebenfalls kein Helferlipid besitzen. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch DOCSPER 50 und 100. Unterdessen DOCSPER 50, das zu 50% aus Lipid und zu 50% aus Helferlipid besteht, Transfektionseffizienzen von bis zu 16% erreichen konnte, gelang mit DOCSPER 100, das zu 100% aus Lipid besteht und kein Helferlipidanteil besitzt, eine maximale Transfektionsrate von 5% (Diagramm 6). Über Sperfectin 20, 50, 100 konnte diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da es für den Gentransfer ungeeignet war (Diagramm 6). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind Helferlipide in der Lage, den Gentransfer günstig zu beeinflussen. Wie aus den Graphiken zu erkennen ist, hat ein höherer Helferlipidanteil nicht nur zur Verbesserung des Transfektionsergebnisses geführt, sondern sich auch günstig auf die Zytotoxizität ausgewirkt ($p \text{ max. } 0,024$). Dabei verminderte sich mit zunehmendem Helferlipidgehalt die Zelltoxizität.

Die Zellen verhielten sich unterschiedlich in Bezug auf die Menge an Helferlipid. Es war nicht möglich eine Aussage über ein optimales Mischungsverhältnis von kationischem Lipid und Helferlipid zu machen.

Die gewonnenen Ergebnisse des liposomalen Gentransfers an Nucleus pulposus Zellen können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Der liposomale Gentransfer bei Nucleus pulposus Zellen ist zwar generell möglich, aber sehr ineffizient. Nicht alle der untersuchten Liposomen sind für den Gentransfer an Nucleus pulposus Zellen geeignet und die wenigen geeigneten Liposomen unterscheiden sich in ihrer Transfektionseffizienz und Zytotoxizität.

Nucleus pulposus Zellen erwiesen sich liposomal als schwer transfizierbar. Die maximal erreichbare Transfektionsrate lag bei 22 % und wurde mit den polykationischen Lipidformulierungen Lipofectamin, Transfectam und FuGene erzielt (Diagramm 8). Jedoch wiesen diese Lipide, mit Ausnahme des Lipofektamins, im Vergleich auch höhere Toxizitäten auf als die übrigen Lipide (Diagramm 7) ($p \max. 0,03$). Von allen untersuchten Lipiden scheint Lipofectamin demnach für den liposomalen Gentransfer bei Nucleus pulposus Zellen am ehesten geeignet zu sein. Obwohl Lipofectamin eine der höchsten Effizienzen und gleichzeitig eine der niedrigsten Toxizitäten in dieser Arbeit erreichte, ist die Transferrate zu gering, um es als geeigneten Vektor für den liposomalen Gentransfer einsetzen zu können. Sperfectin, DOTAP, DAC 100 waren für den Gentransfer ungeeignet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Lipide wurden innerhalb der Arbeitsgruppe zur Transfektion anderer Zelllinien schon erfolgreich eingesetzt, so dass angenommen werden muss, dass die Ursachen für diese Ergebnisse bei den Nucleus pulposus Zellen zu suchen sind.

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte weder eine Aussage über die optimale chemische Struktur des beteiligten Lipids noch über günstige oder ungünstige Eigenschaften der Liposomen gemacht werden, da kein direkter Zusammenhang zwischen bestimmten Eigenschaften der Lipide bzw. der Liposomen und der Transfektionseffizienz bzw. Toxizität gefunden werden konnte.

3.2.3. Kombiniertes Gentransfer (Lipoadenofektion)

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Vektorkonstrukte hergestellt und eingesetzt: ein Konstrukt enthielt LacZ- tragende rekombinante Adenoviren, die an Liposomen gekoppelt waren (Adenolipofektion), das andere Konstrukt enthielt LacZ- tragende Liposomen, die an rekombinante Adenoviren gebunden wurden (Lipoadenofektion). Für die Versuche wurden 11 verschiedene Viruskonzentrationen (10^2 - 10^{12}) sowie 15 unterschiedliche Liposomen/Lipidgemische mit jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ l, 10 μ l) verwendet. Insgesamt wurden also 330 Versuche durchgeführt, bei denen ein LacZ- tragender Adenovirus an Liposomen gekoppelt wurde, und weitere 330 Untersuchungen, bei denen die Liposomen Träger des LacZ- Gens waren und die Adenoviren als Co- Vektoren dienten. Bei allen

Versuchsansätzen wurden jeweils die Effizienz und die Toxizität gemessen. Auf Grund der Vielzahl an Messergebnissen (insgesamt 1320) werden im folgenden Teil nur die Versuchsergebnisse graphisch dargestellt, die den größten Erfolg brachten. Das war in diesem Falle die Versuchsreihe, bei dem das Adenovirus Träger des LacZ- Gens war und die Liposomen oder Lipidgemische als Co-Vektoren dienten. In den Versuchen, bei denen die Liposomen LacZ-Träger waren, konnte, unabhängig von der Viruskonzentration oder Liposomenmenge, kein eindeutiger Transfektionserfolg (0,5% nur bei FuGene) festgestellt werden (p 0,07). Dieses Vektorkonstrukt ist demnach völlig ungeeignet gewesen und wird in diesem Teil nicht graphisch dargestellt.

In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vektorverhältnisse untersucht. Dabei wurden verschiedene Liposomenmengen (5µl, 10µl) mit einer konstanten Virusmenge (10^5) komplexiert sowie eine konstante Liposomenmenge (5 µl) mit variablen Virusmengen (10^2 - 10^{12}). Auf diese Weise wurden Adenoliposomen mit unterschiedlichen Virus/ Liposomen-Verhältnissen hergestellt. Bei der Untersuchung des Vektorverhältnisses auf die Effizienz und die Toxizität dieser Adenoliposomenkomplexe zeigte sich, dass die Effizienz- und Toxizitätsergebnisse, die mit 10 µl Liposomen ermittelt wurden, identisch waren mit den Ergebnissen, die mit 5 µl erreicht wurden (p max. 0,03 und 0,02). Die Verdoppelung der liposomalen Vektoranteile hatte den Ergebnissen zufolge, keinen Einfluss auf den Transfektionserfolg und/ oder die Toxizität des Adenoliposoms, so dass bei den nachfolgenden Grafiken davon ausgegangen werden kann, dass sie sowohl die Ergebnisse mit 5 µl als auch mit 10 µl Liposomen wiedergeben. Bei den Versuchen, in denen der Anteil des adenoviralen Vektors variiert wurde, konnten dagegen Unterschiede in der Effizienz und Toxizität festgestellt werden (p max. 0,04 und 0,04).

Zur besseren graphischen Vergleichbarkeit ist in den Effizienzdiagrammen links die maximale Effizienz des verwendeten Liposoms ohne das Virus aufgetragen und rechts davon die Effizienzen mit dem LacZ- tragenden Adenovirus.

Adenolipofektion mit monokationischen Liposomen und AdenoLacZ

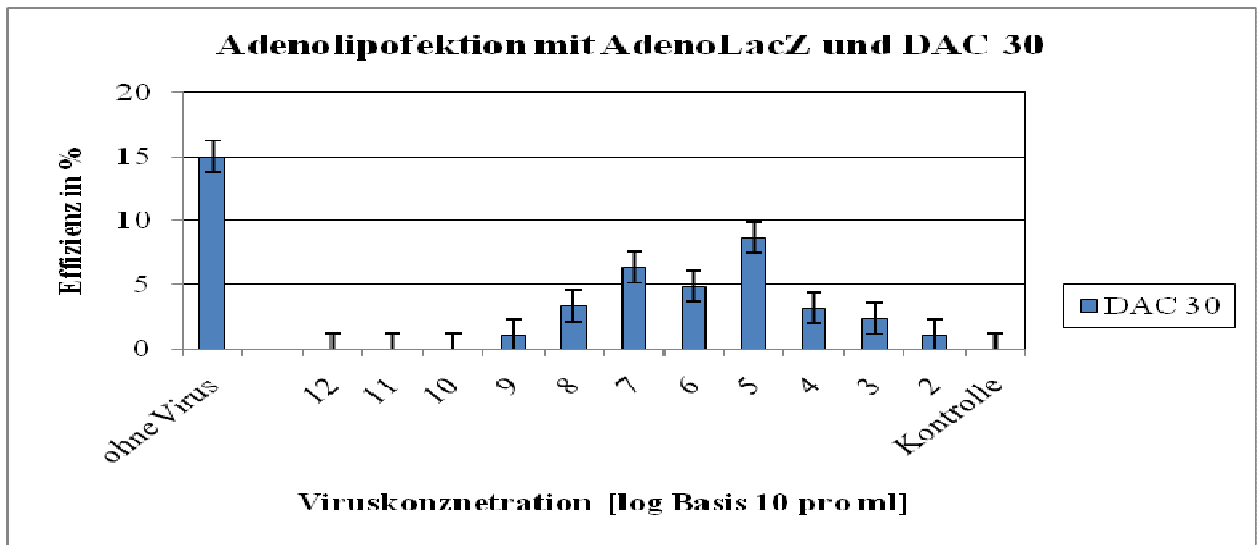


Diagramm 9: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 30

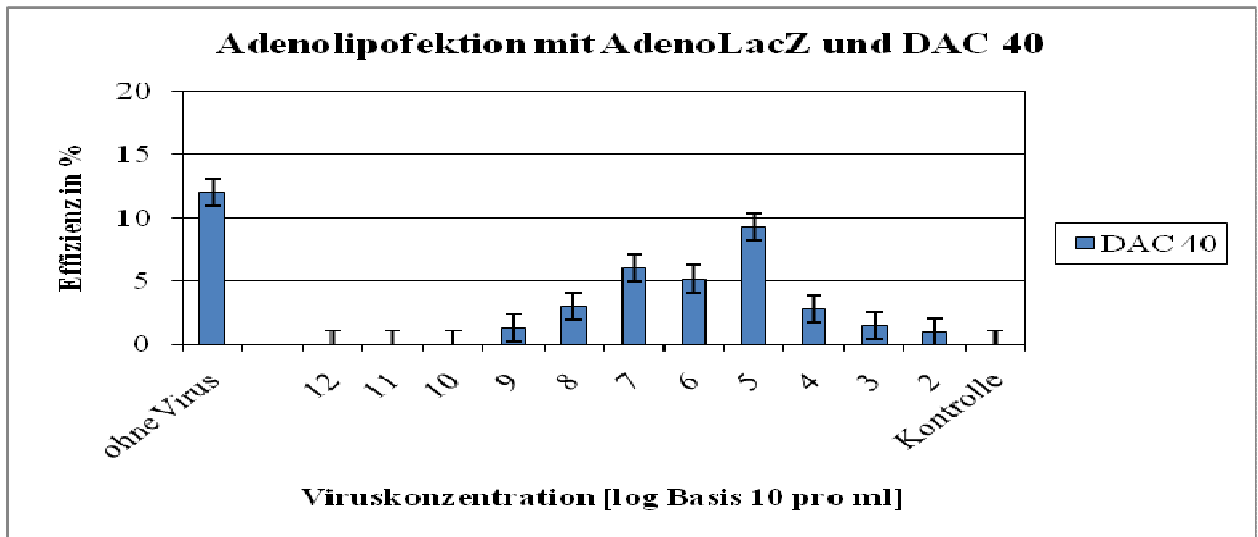


Diagramm 10: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 40

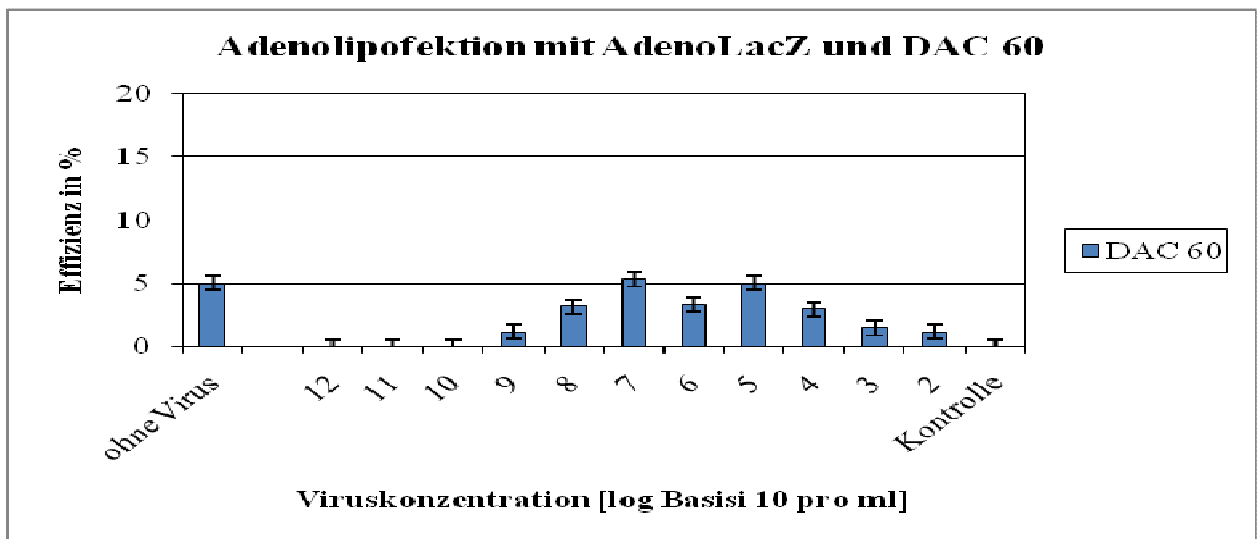


Diagramm 11: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 60

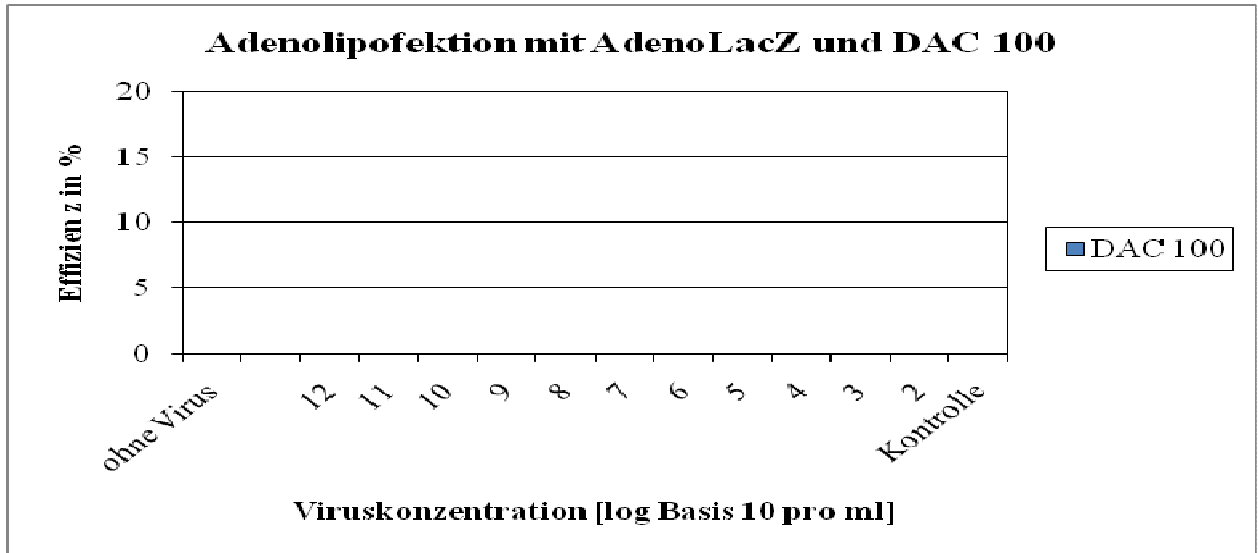


Diagramm 12: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 100

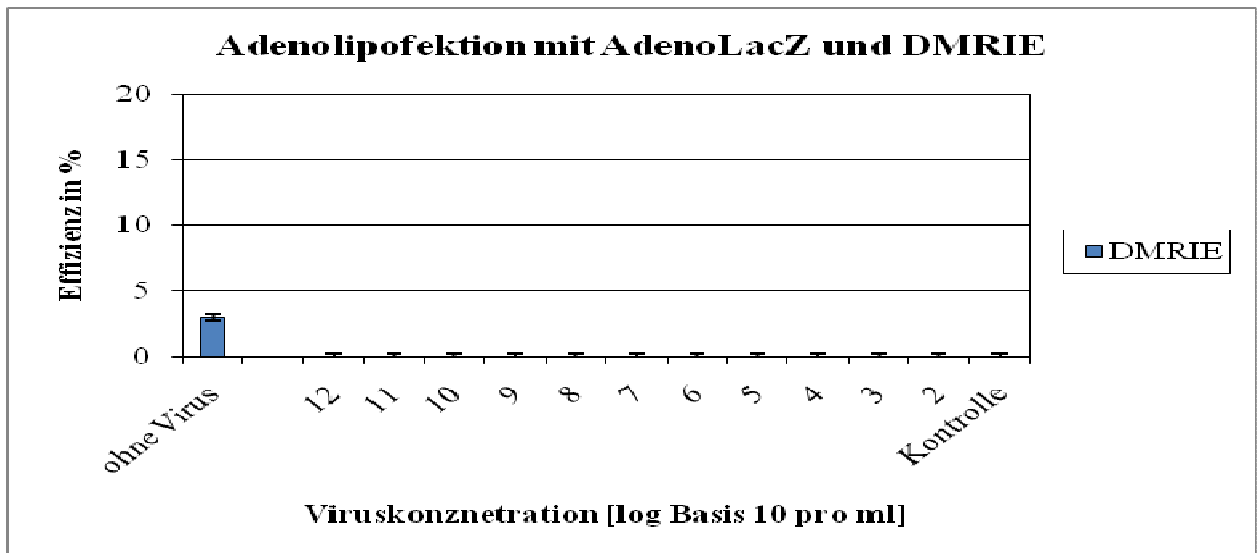


Diagramm 13: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DMRIE

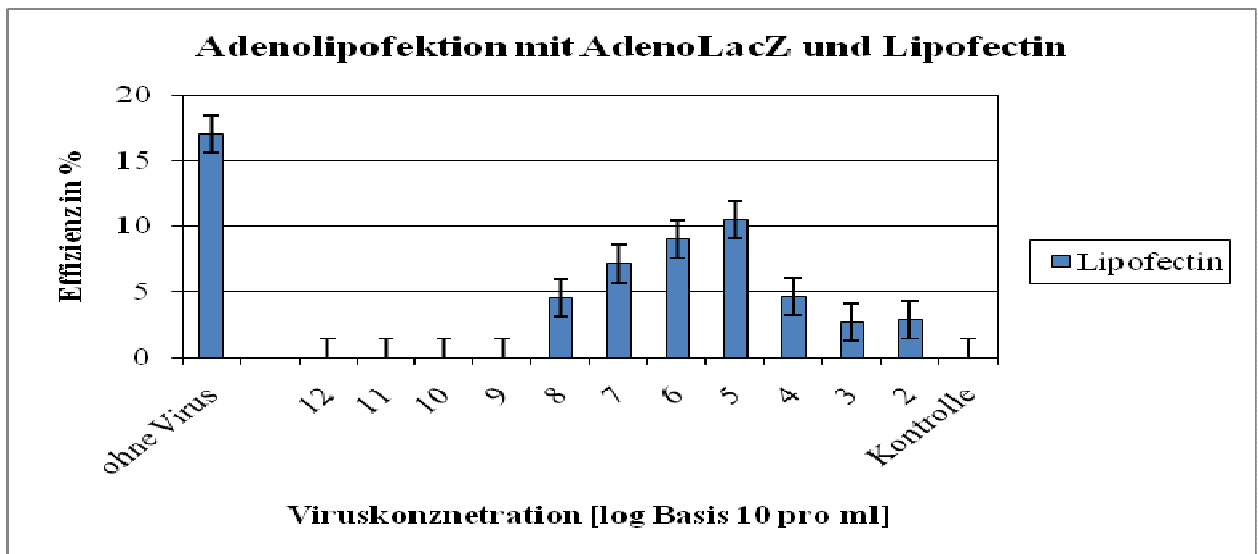


Diagramm 14: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Lipofectin

Adenolipofektion mit polykationischen Liposomen und AdenoLacZ

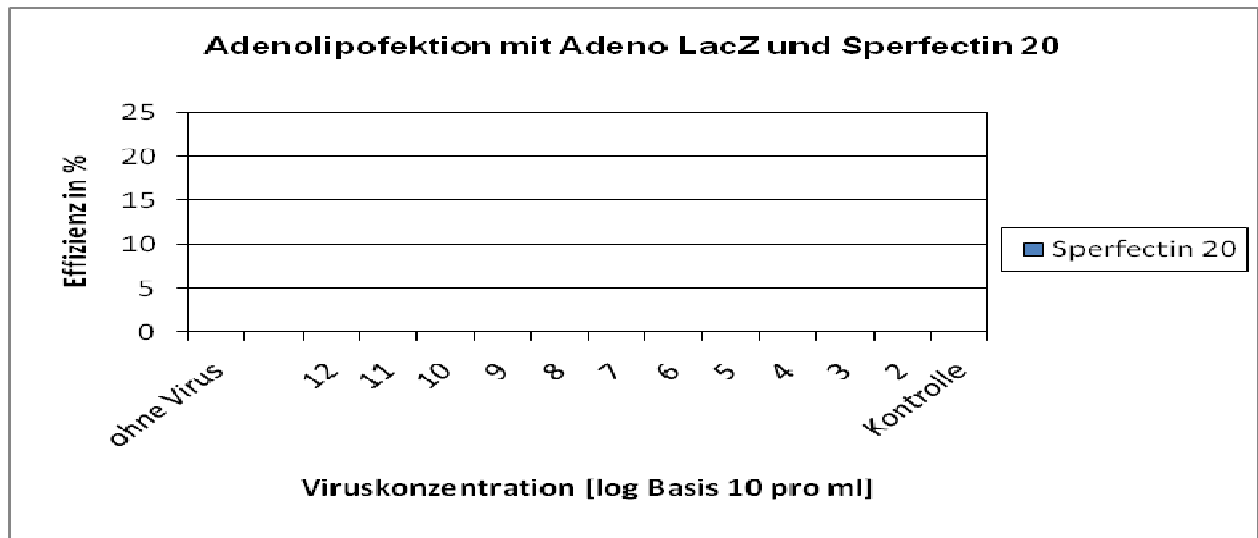


Diagramm 15: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 20

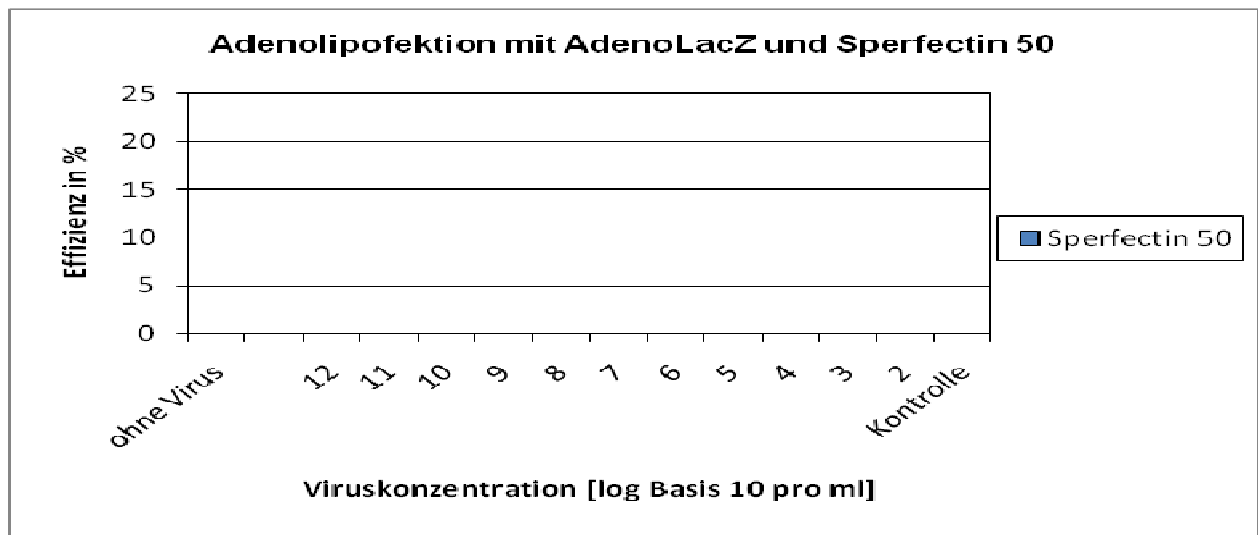


Diagramm 16: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 50

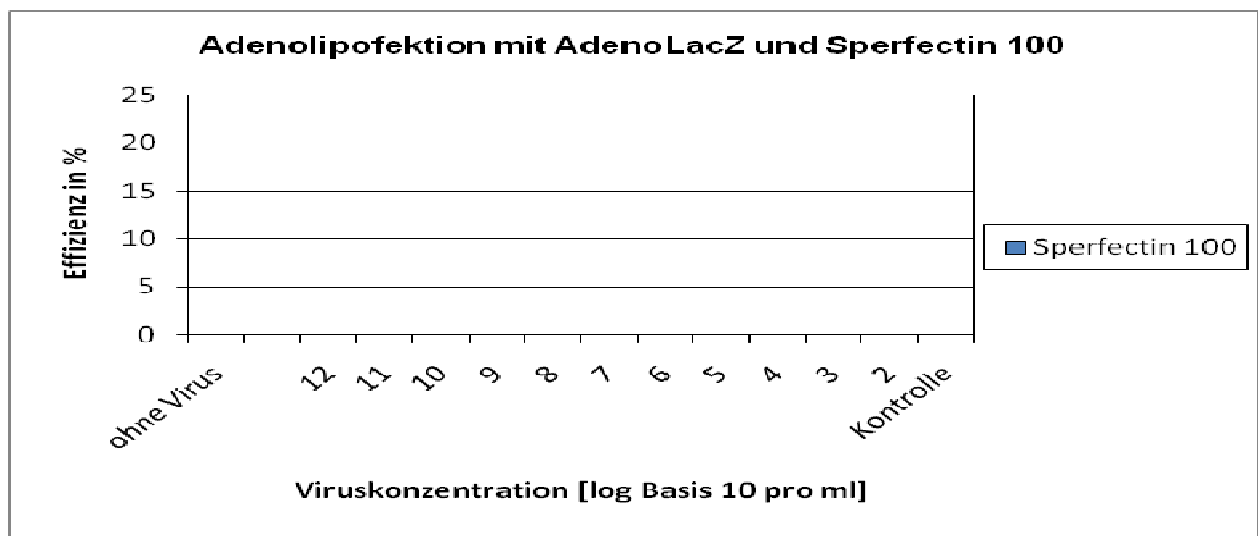


Diagramm 17: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 100

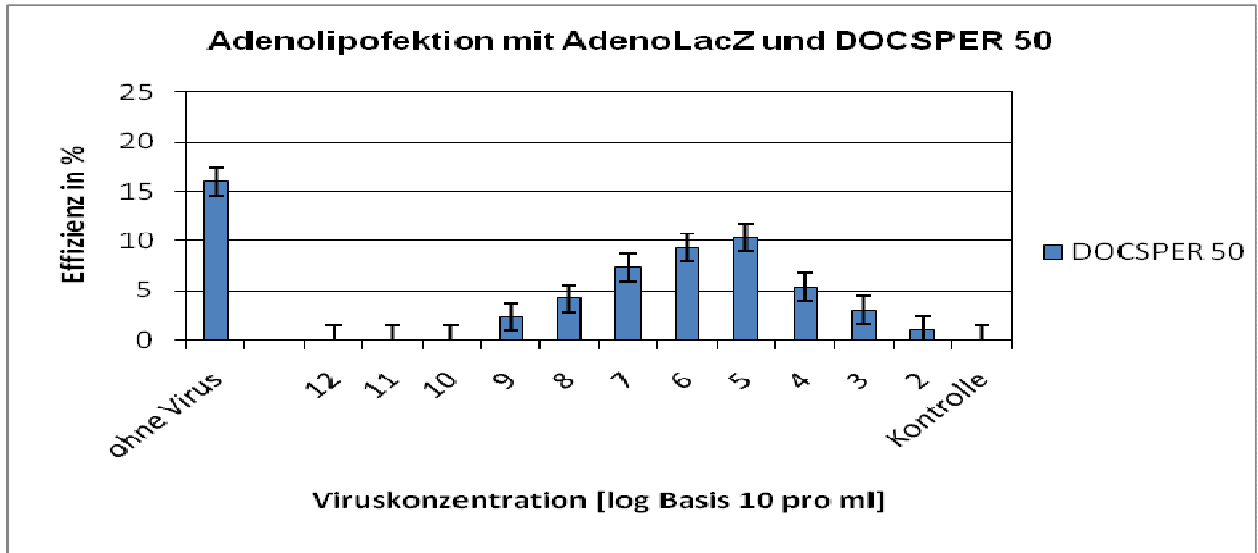


Diagramm 18: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOCSPER 50

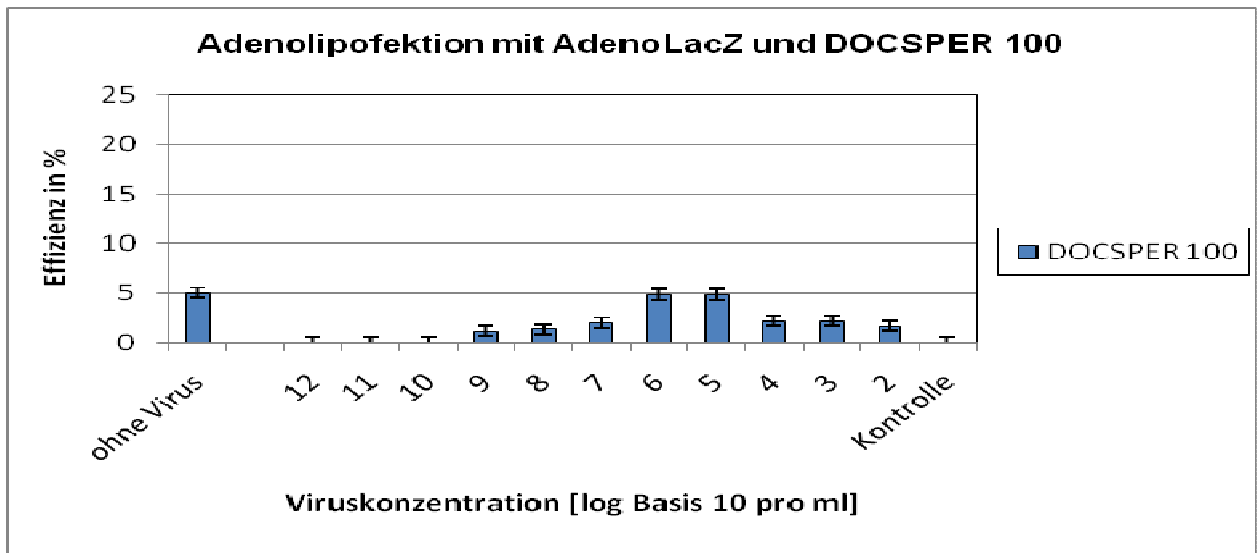


Diagramm 19: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOCSPER 100

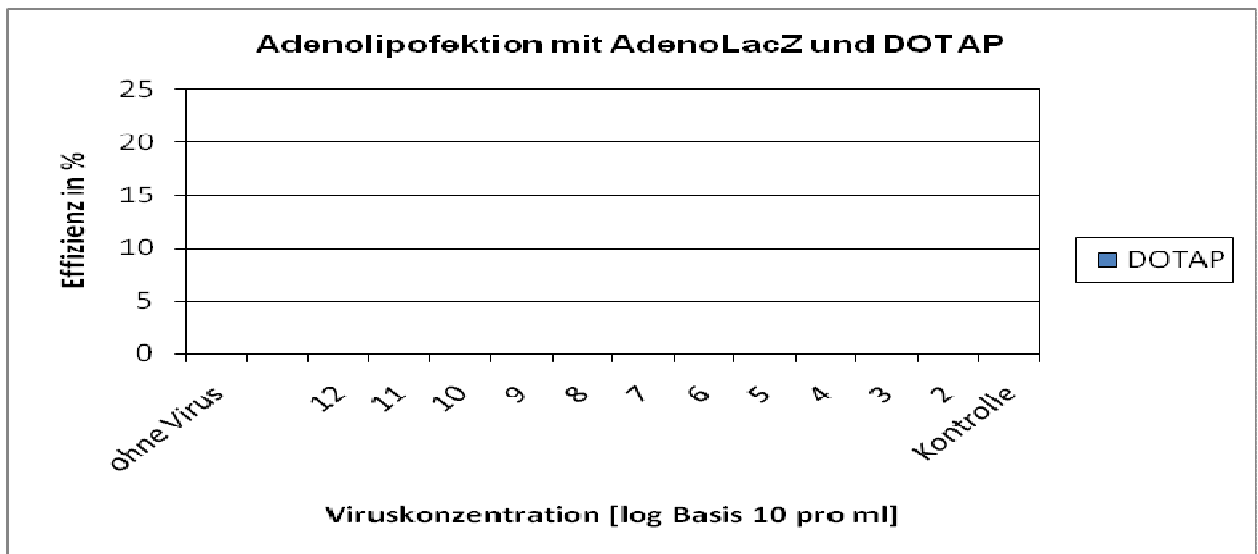


Diagramm 20: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOTAP

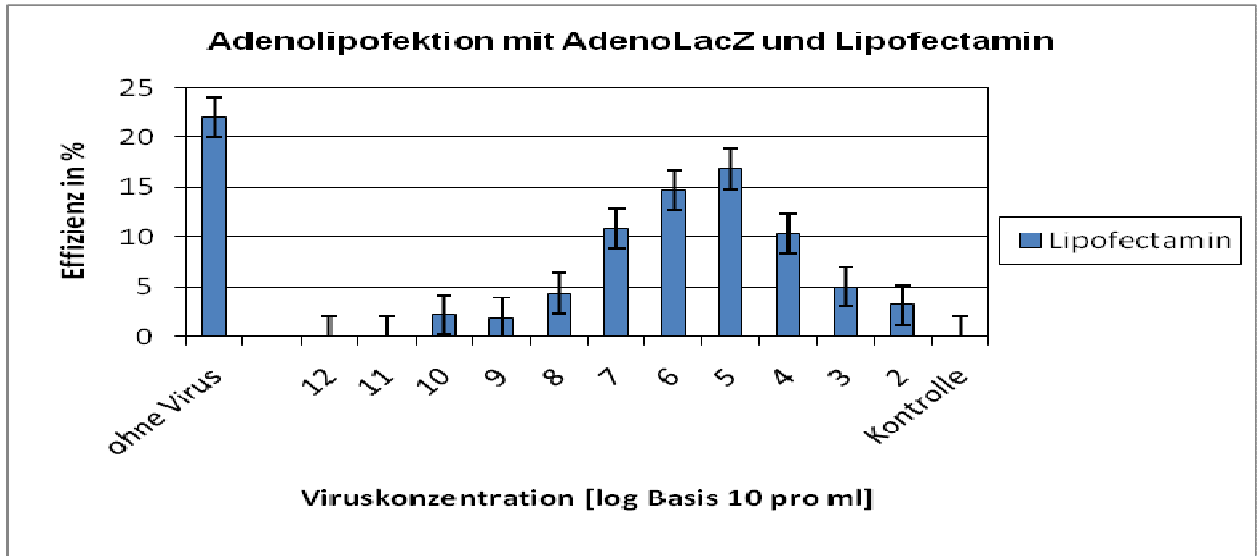


Diagramm 21: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Lipofectamin

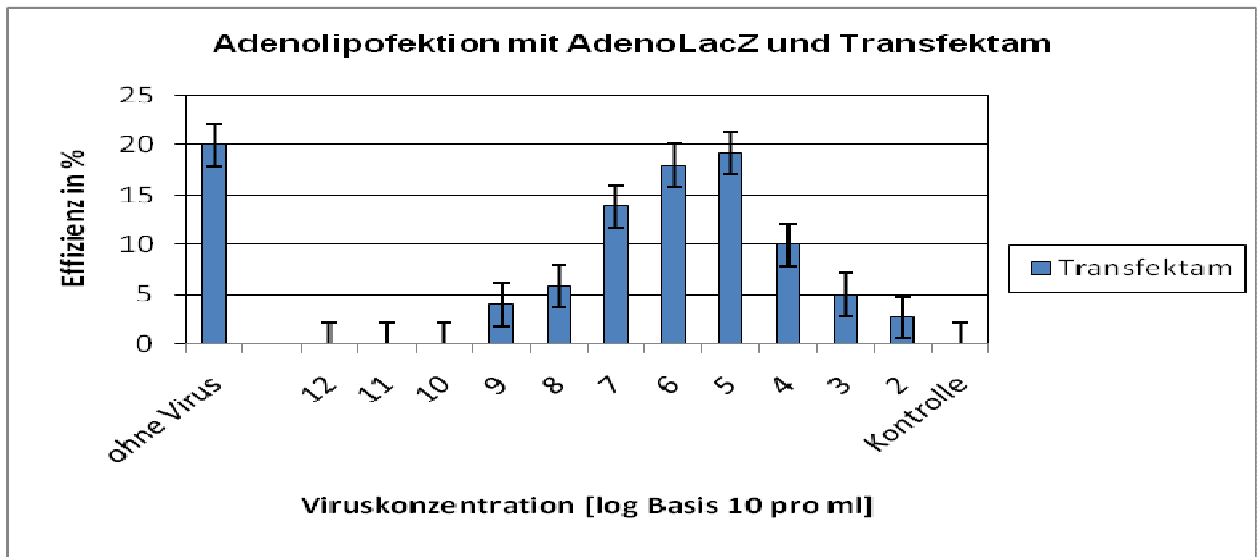


Diagramm 22: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Transfektam

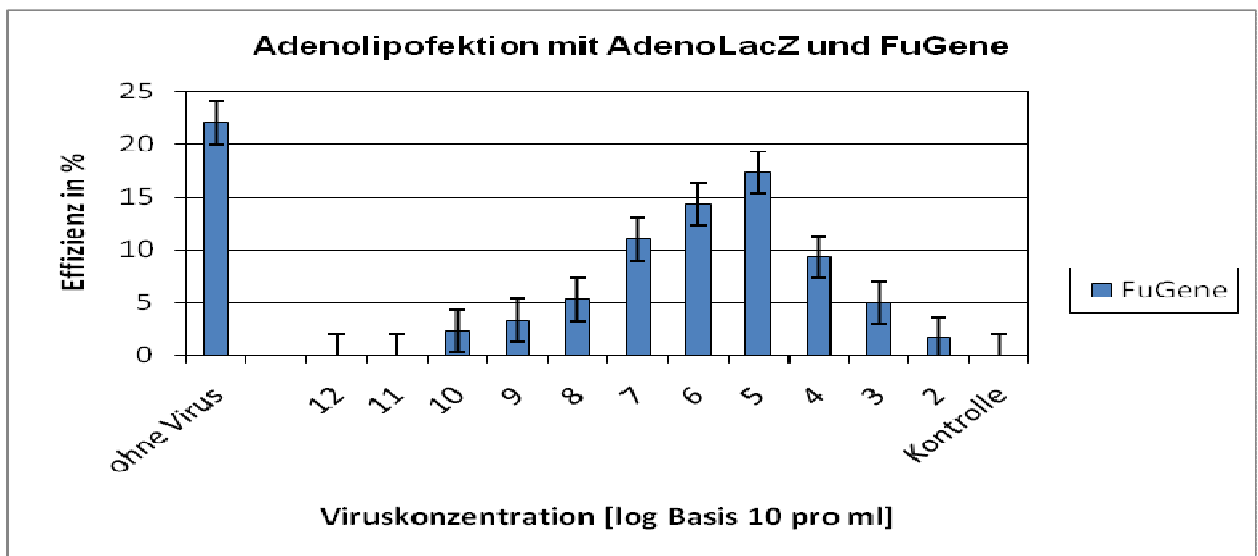


Diagramm 23: Effizienzen bei Adenolipofektion mit AdenoLacZ und FuGene

1.) Vergleich der Effizienzen aller drei Vektorsysteme:

Beim Vergleich der Effizienzen der **Adenoliposomen** mit den rekombinanten **Adenoviren** konnte festgestellt werden, dass bei allen Adenoliposomen, mit denen Transfektionserfolge erzielt werden konnten, die höchsten Effizienzen zusammen mit 10^5 Viruseinheiten gelangen (Diagramme 9 – 17) (p max. 0,03). Beim adenoviralen System dagegen waren 10^6 Viruseinheiten nötig, um das Effizienzmaximum zu erreichen (Diagramm2). Das bedeutet, in Verbindung mit Liposomen konnte mit einer geringeren Viruskonzentration das Effizienzmaximum erreicht werden als ohne Liposomen. Es kam dadurch zu einer Rechtsverschiebung der Effizienzkurve. Beim Vergleich der Effizienzen jeder einzelnen Viruskonzentrationsstufe lagen jedoch die Effizienzen der Adenoliposomen ausnahmslos unterhalb der adenoviralen Effizienzen (Diagramme 2 und 9 - 17). Vergleicht man die Grafiken des adenoliposomalalen Gentransfers mit der des adenoviralen System, fällt auf, dass die Kurven ähnlich verlaufen. Beide Effizienzkurven steigen zu Beginn mit zunehmender Viruskonzentration an, erreichen ihre maximale Effizienz und fallen anschließend ab. Es gibt aber auch einige Unterschiede in ihren Verläufen:

- 1.) Wie schon erwähnt unterscheiden sich die Kurven in ihrem Effizienzmaximum. Unterdessen der adenovirale Vektor erst bei 10^6 sein Maximum erreicht, liegt das Effizienzmaximum beim adenoliposomalalen Vektor schon bei 10^5 , d.h. die Kurve des gekoppelten Vektors ist gegenüber dem viralen Vektor rechtsverschoben. Die Effizienzen des adenoviralen Vektors sind unabhängig von der Viruskonzentration deutlich höher als die des gekoppelten Vektors.
- 2.) Die Kurve der Adenoliposomen erreicht im Gegensatz zum adenoviralen System den Nullpunkt, d.h. die Adenoliposomen verlieren bei höheren Konzentrationen die Fähigkeit, Nucleus pulposus Zellen transfizieren zu können.
- 3.) Die Kurve des viralen Vektors verläuft breitbasiger, d.h. der Bereich, in dem das Virus transduziert (10^2 - 10^{12}), ist größer als beim adenoliposomalalen Vektor (10^2 - 10^{8-10}).
- 4.) Die Kurve des viralen Vektors verläuft steiler als die des gekoppelten Vektors, d.h. die Effizienzunterschiede zwischen den einzelnen Viruskonzentrationen sind beim viralen Vektorsystem größer als beim adenoliposomalalen Vektorsystem

Bei der Auswertung der Effizienzen des **adenoliposomalalen** und des **liposomalalen** Systems fiel auf, dass die Liposomen, die ohne Virus nicht in der Lage waren Nucleus pulposus Zellen zu transfizieren, auch mit dem Virus zusammen nicht dazu fähig waren (Diagramme 4,6,8 und 9-

17), d.h. dem Virus gelang es nicht, die Transfektionseffizienz dieser Liposomen von 0% auf positive Werte zu steigern. Vergleicht man die Effizienzen der Adenoliposomen, die Nucleus pulposus Zellen erfolgreich transfizieren konnten, mit den Effizienzen des liposomalen System, so ist zu erkennen, dass die Effizienzen der Adenoliposomen auf dem gleichem Niveau wie die Liposomen lagen oder unterhalb davon (Diagramme 4,6,8 und 9-17). Keinem der verwendeten adenoliposomalen Vektoren gelang es höhere Effizienzen als das Liposom selbst zu erreichen (p 0,07). Durch die Kopplung von Adenoviren und Liposomen ist es also nicht gelungen, die Transfektionsfähigkeit der Liposomen zu steigern. Einige der Beobachtungen, die schon beim liposomalen Gentransfer gemacht wurden, konnten auch beim gekoppelten Gentransfer nachgewiesen werden: Adenoliposomen, die aus polykationischen Liposomen bestanden, erzielten höhere Effizienzen als Adenoliposomen mit monokationischen Liposomen (Diagramm 9 -12 und 13 -17) (p max. 0,04), und Adenoliposomen mit einem höheren Helferlipidanteil erreichten bessere Transfektionsergebnisse als Adenoliposomen, deren Liposomen kein oder wenig Helferlipid enthielten (p max. 0,03).

Im nun folgenden Teil soll geklärt werden, ob die Kopplung von Adenoviren und Liposomen Auswirkungen auf die Toxizität hatte.

2.) Vergleich der Toxizitäten aller drei Vektorsysteme:

In den Toxizitätsdiagrammen sind die Toxizitäten jeder einzelnen Viruskonzentrationsstufe jeweils mit und ohne Lipid aufgetragen worden.

Adenolipofektion mit monokationischen Liposomen:

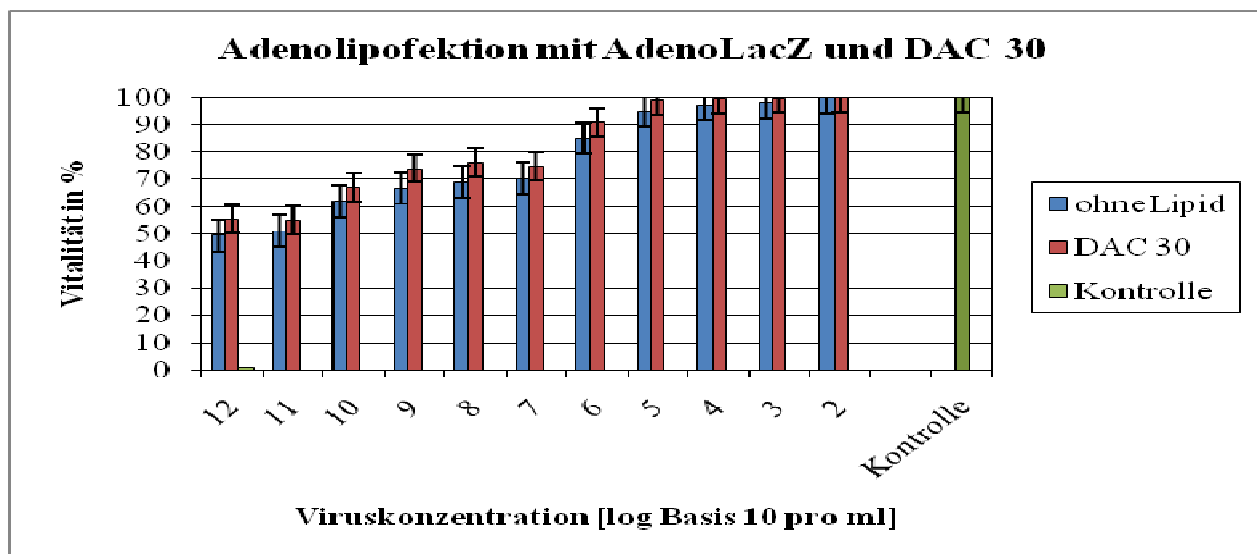


Diagramm 24: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 30

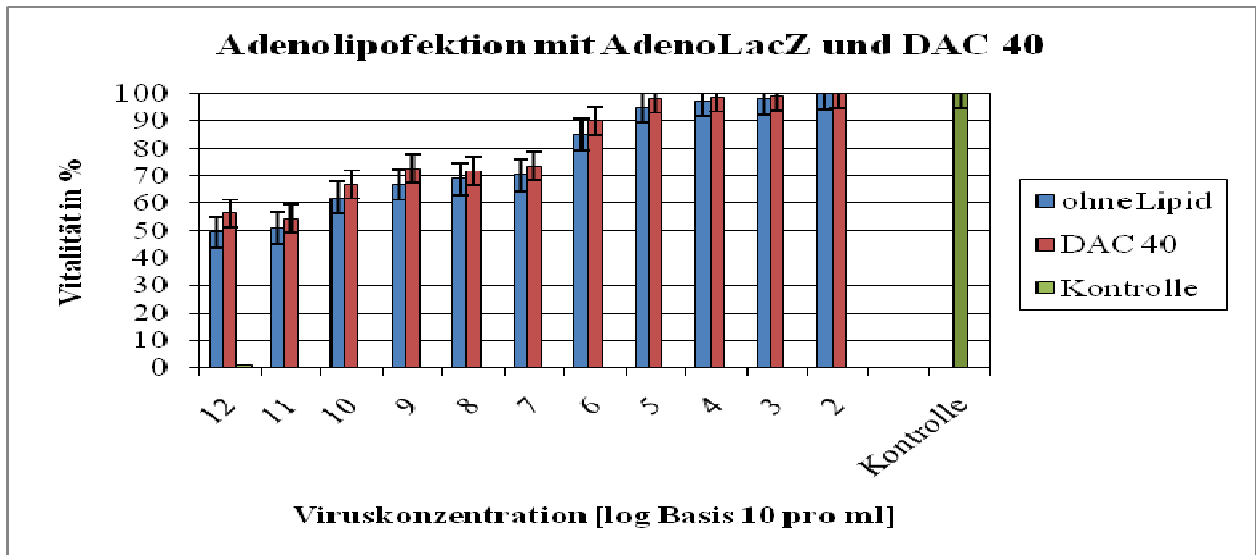


Diagramm 25: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 40

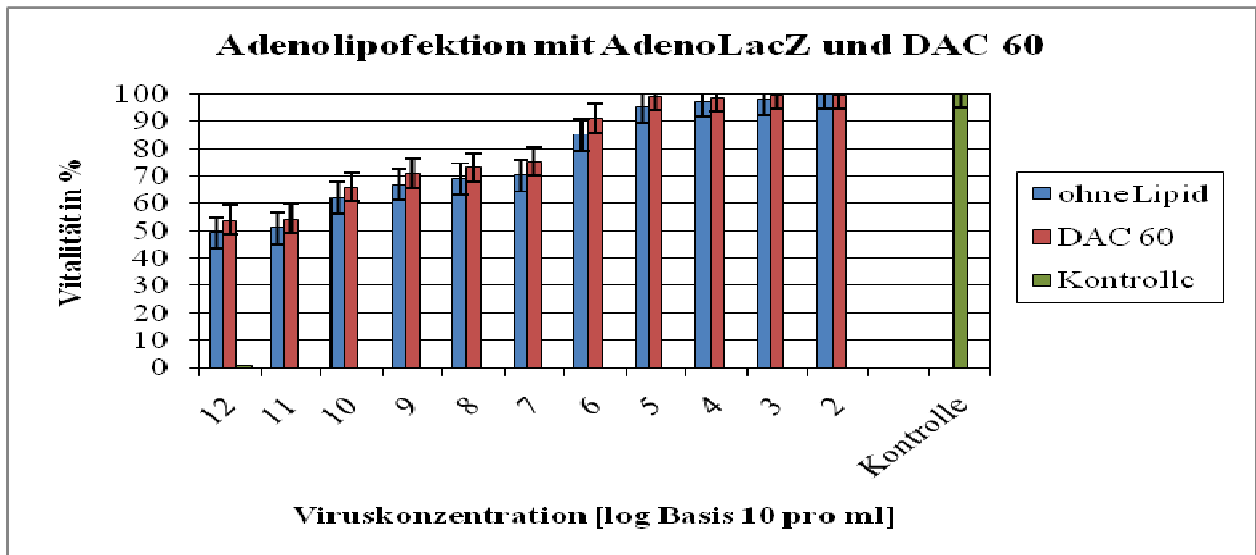


Diagramm 26: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 60

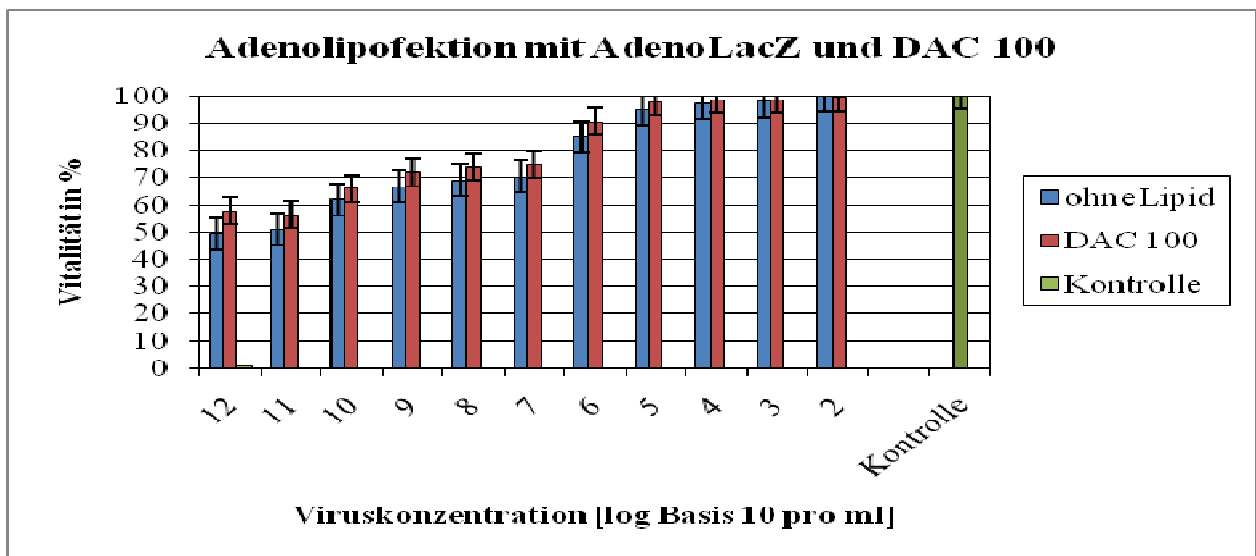


Diagramm 27: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DAC 100

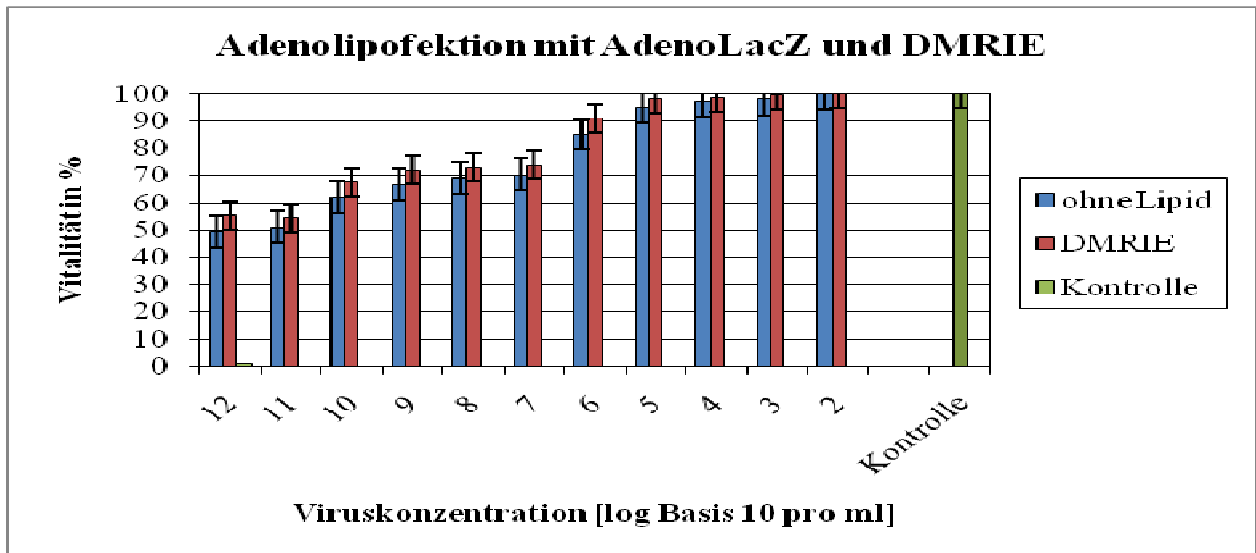


Diagramm 28: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DMRIE

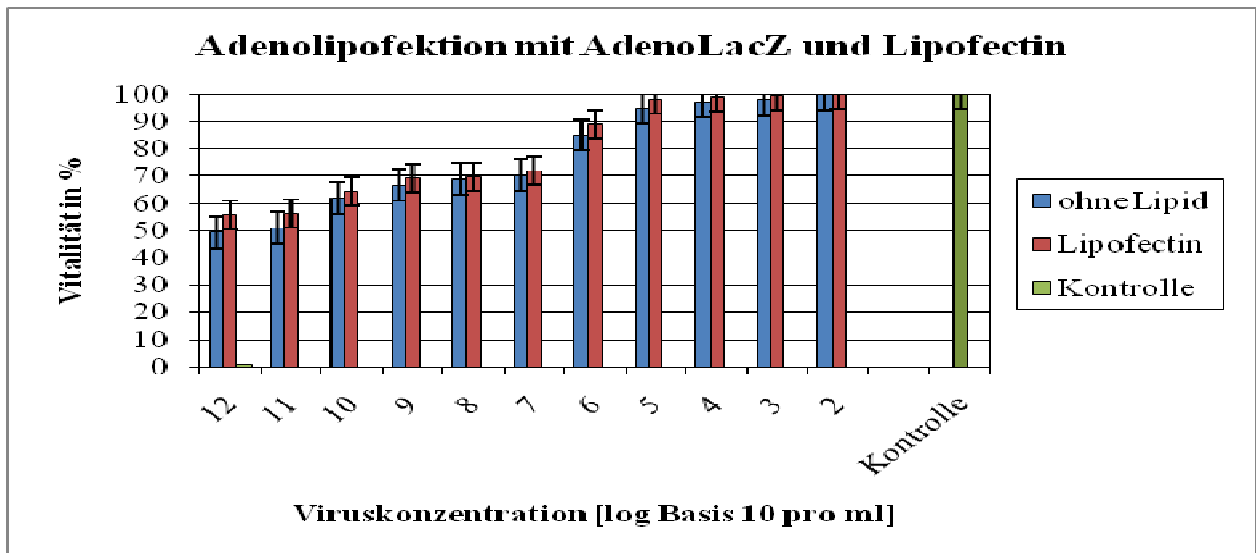


Diagramm 29: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Lipofectamin

Adenolipofektion mit polykationischen Lipiden und AdenoLacZ:

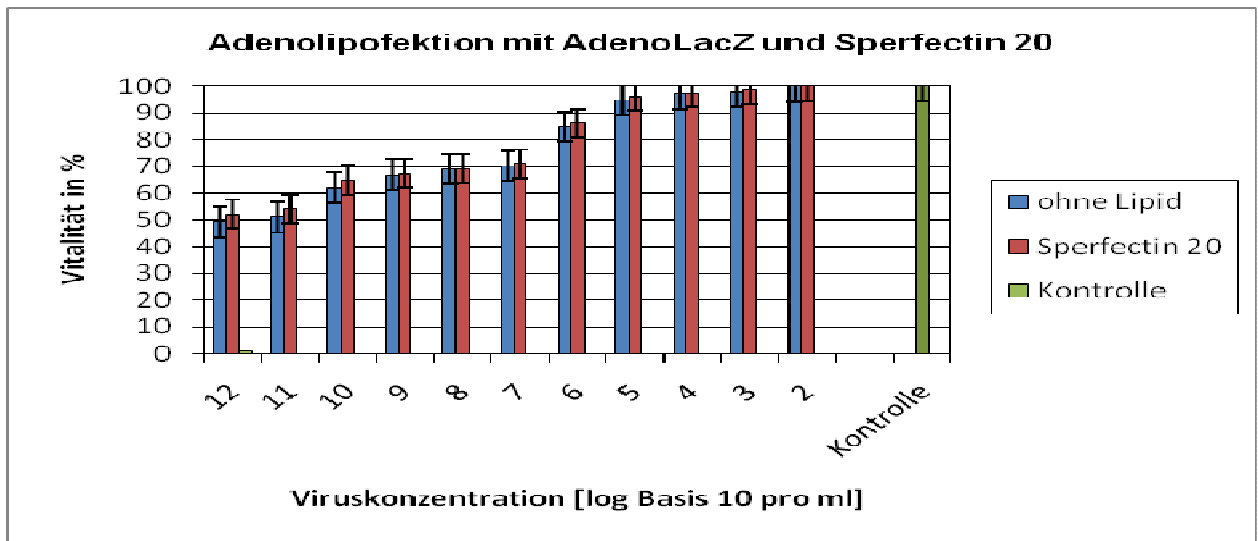


Diagramm 30: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 20

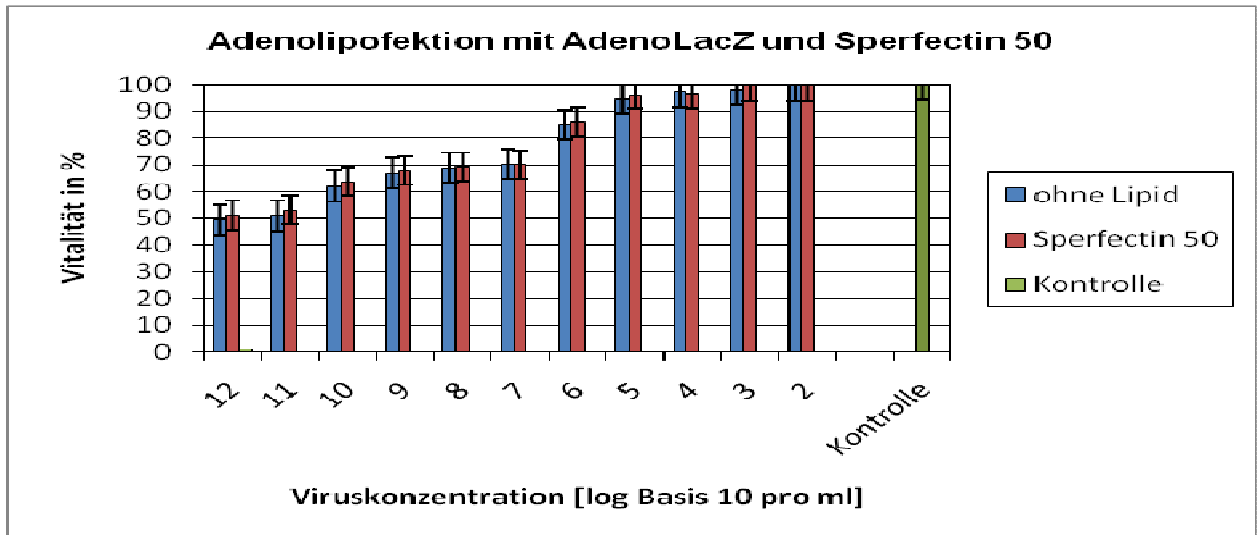


Diagramm 31: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 50

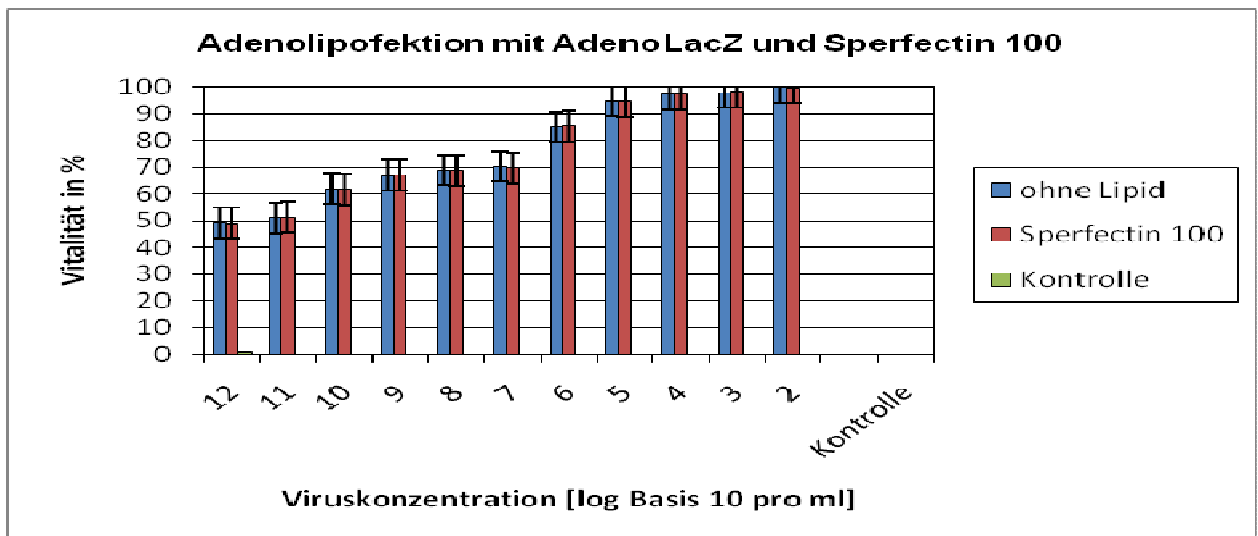


Diagramm 32: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Sperfectin 100

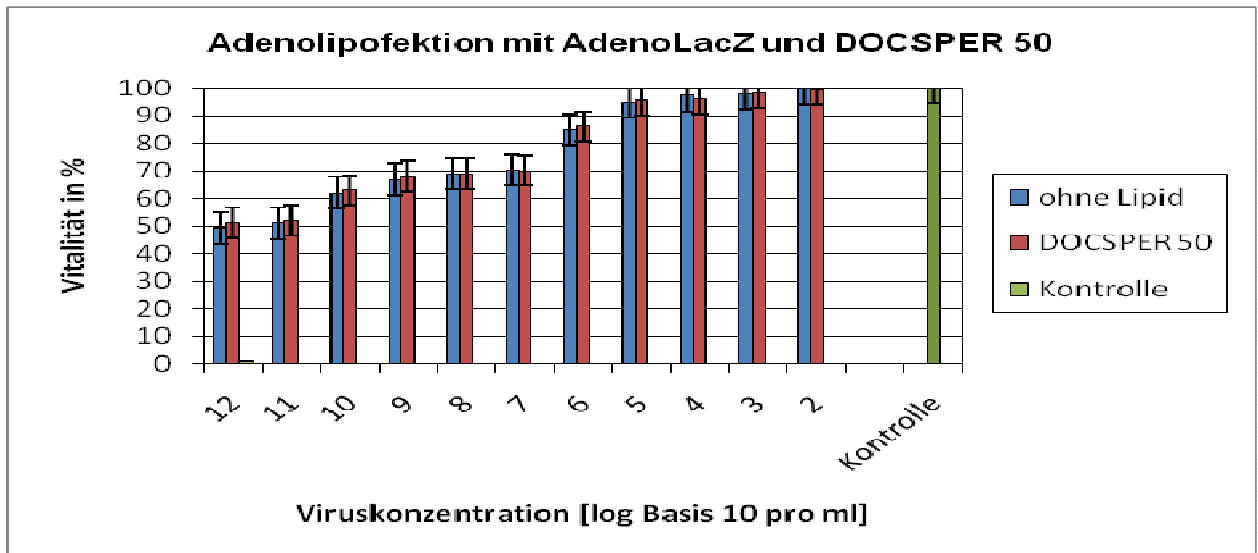


Diagramm 33: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOCSPER 50

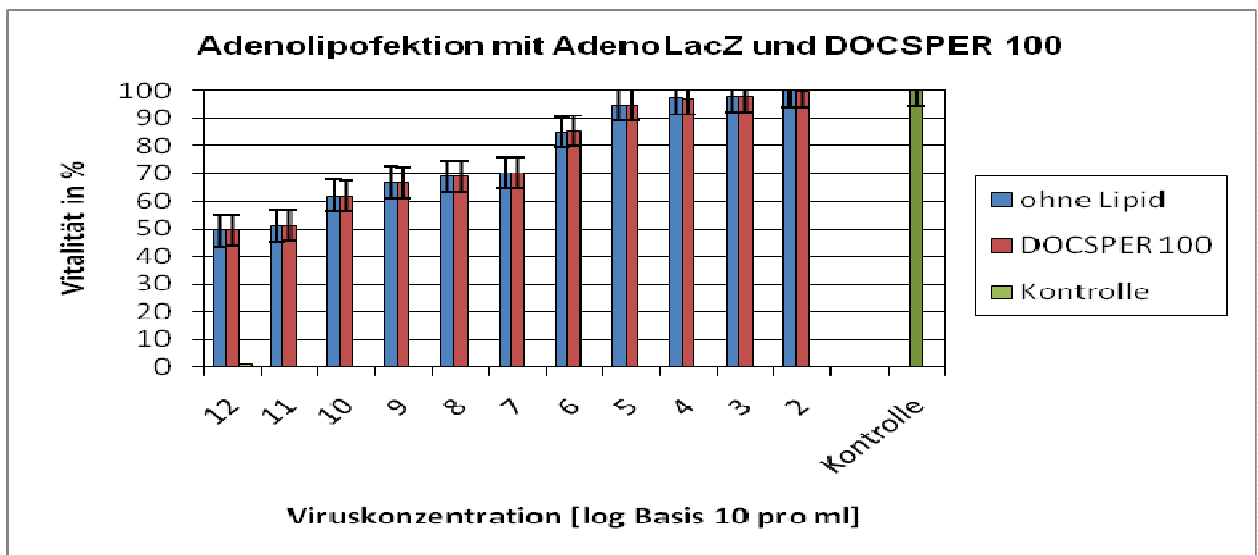


Diagramm 34: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOCSPER 100

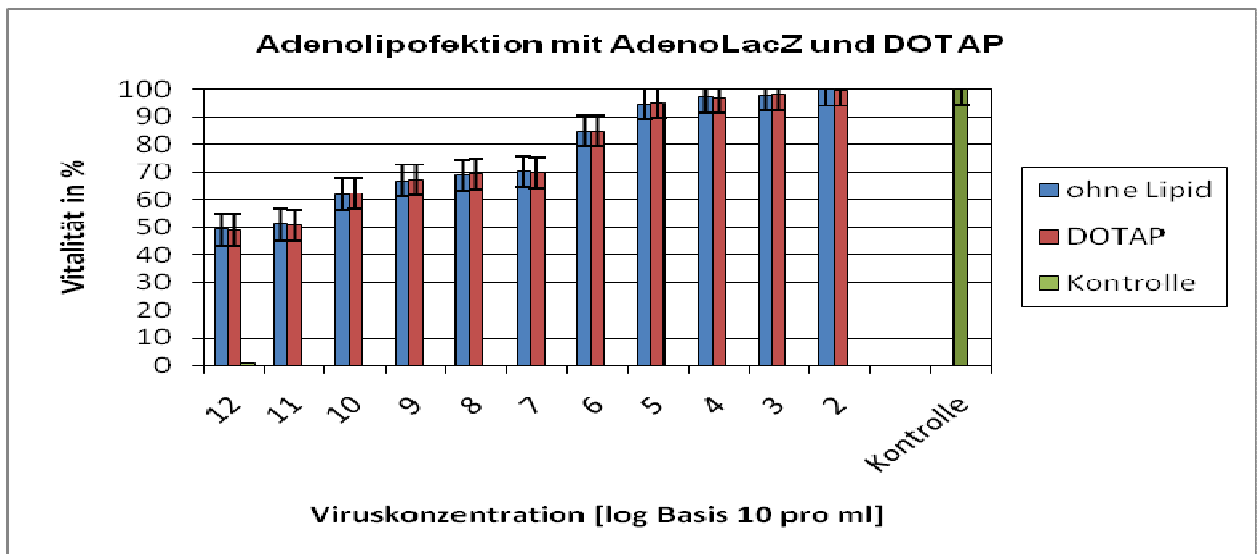


Diagramm 35: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und DOTAP

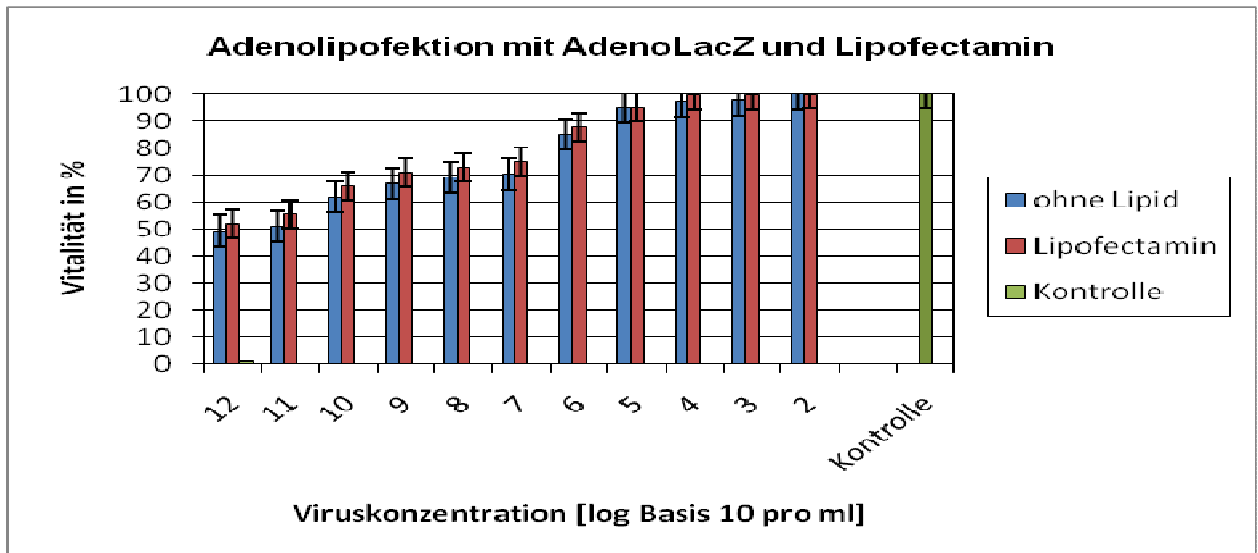


Diagramm 36: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Lipofektamin

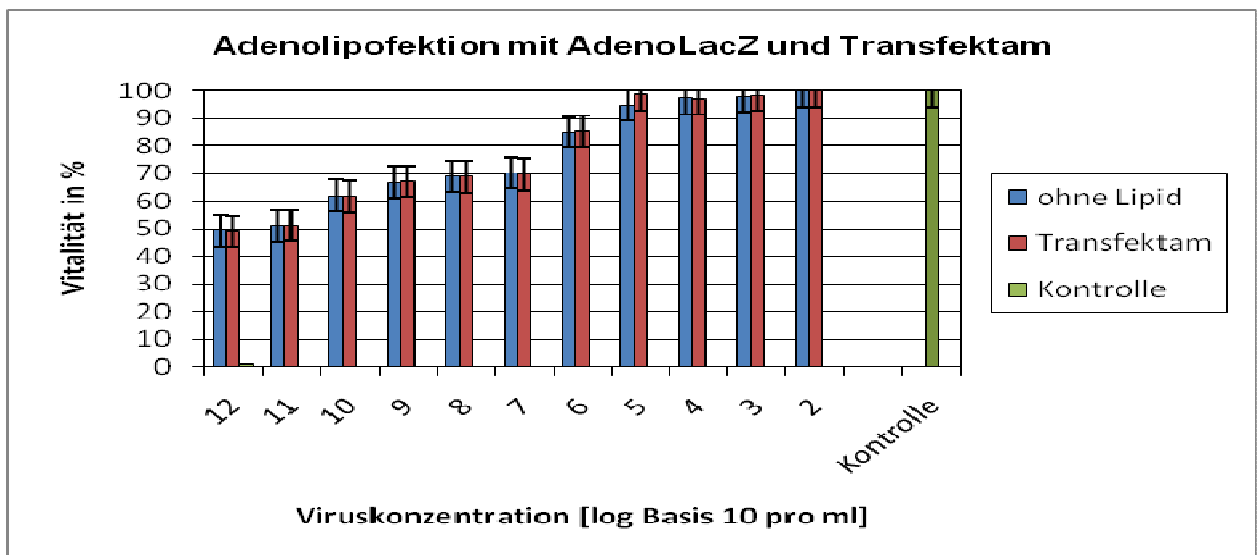


Diagramm 37: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und Transfektam

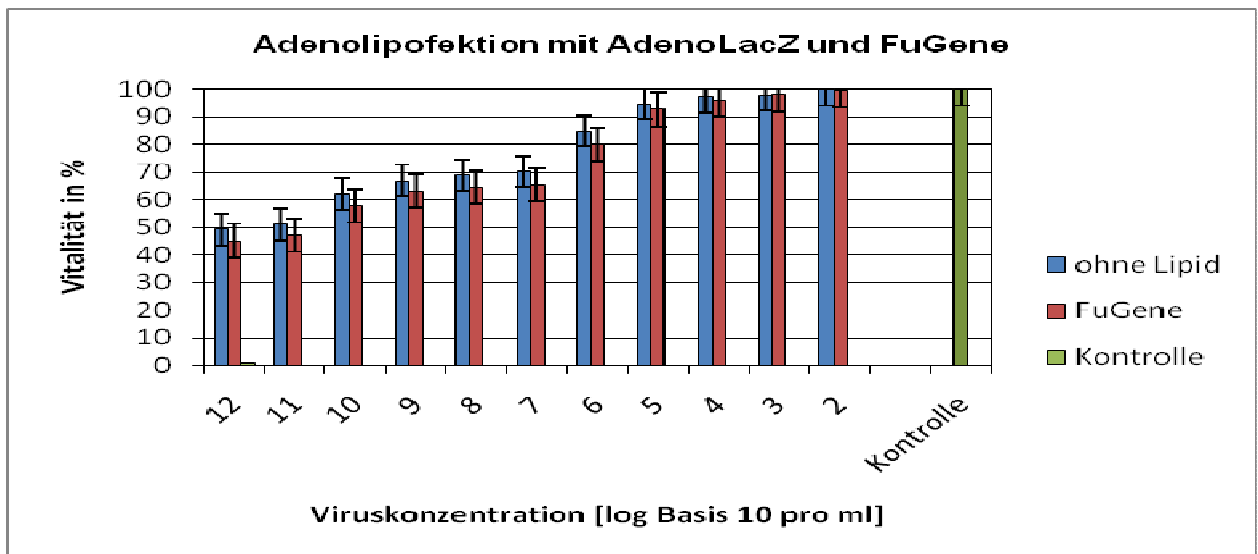


Diagramm 38: Vitalitäten nach Adenolipofektion mit AdenoLacZ und FuGene

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte eine interessante Beobachtung in Bezug auf die Toxizität gemacht werden. Vergleicht man die Toxizitäten des **adenoliposomalen** Gentransfers mit denen des **adenoviralen** Gentransfers (Diagramme 12 - 32), so zeigt sich, dass die Vitalitäten mit dem adenoliposomalen Vektor etwas höher waren als mit dem adenoviralen Vektor allein (p max. 0,04). Diese Beobachtung konnte für fast alle verwendeten Liposomen/ Lipidgemische sowie für fast alle Viruskonzentrationsstufen gemacht werden. Das bedeutet, dass die Adenoliposomen verglichen mit dem rekombinanten Adenovirus weniger toxisch waren. Es gelang ihnen aber nicht, die Toxizität auf das Niveau der Liposomen zu senken (p 0,09). Bei einigen wenigen verwendeten Adenoliposomen konnte kein Effekt auf die Toxizität festgestellt werden (p 0,05): Sperfectin 100, DOCSPER 100. Betrachtet man diese Substanzen hinsichtlich gemeinsamer Eigenschaften, dann fällt auf, dass vorrangig bei polykationischen Liposomen/ Lipidgemischen, die keinen Helferlipidanteil enthielten, der Effekt ausblieb. Weiterhin fiel auf, dass nicht nur die Anwesenheit eines Helferlipides im Adenoliposomenkomplex sich positiv auf die Toxizität auswirkt, sondern auch der Anteil am Liposom eine Rolle spielt. So konnten Liposomen mit hohen Helferlipidanteilen (DAC 30, Sperfectin 20, DOCSPER 50) die Toxizität stärker senken als Liposomen mit geringen Helferlipidanteilen (DAC 60, Sperfectin 50, DOCSPER 50) (p max 0,03).

Wie aus den Diagrammen abzulesen ist, konnten monokationische Liposomen die Toxizität stärker senken (maximal 7%) als polykationische Liposomen (maximal 3%) (p max. 0,03). Demnach scheint die Ladung des Liposoms ebenfalls eine Rolle bei der Toxizität zu spielen. Der Zusammenhang zwischen Ladung des Liposoms und Toxizität konnte auch schon beim liposomalen Gentransfer hergestellt werden.

Eine weitere Beobachtung, die gemacht werden konnte, war, dass der Abfall der Toxizitäten bzw. die Steigerung der Vitalitäten gegenüber dem adenoviralen Vektor bei höheren Viruskonzentrationen ausgeprägter war als im niedrigen Viruskonzentrationsbereich (p max 0,03). So konnten z.B. Adenoliposomenkomplexe die DAC 30 enthielten, bei 10^9 Viruseinheiten die Toxizität um 7% senken, unterdessen die Toxizität bei 10^3 Viruseinheiten nur 2% niedriger war als beim adenoviralen Vektor.

4. Diskussion

Mit den bisher existierenden Therapieverfahren zur Behandlung von degenerativen Veränderungen der Bandscheiben ist es möglich, die Folgen und Symptome zu behandeln, jedoch nicht die degenerativen Prozesse rückgängig zu machen, da die ausdifferenzierten Nucleus pulposus Zellen der Disci intervertebralis nicht mehr zur Zellteilung fähig sind und somit keine wirksame Potenz zur Regeneration besitzen. Mit der Entwicklung des Tissue engineering ist ein erster Ansatz zur Behandlung auf zellulärer Ebene gemacht worden. Dazu werden entnommene Bandscheibenzellen mit Hilfe verschiedener ex vivo- Verfahren vermehrt und anschließend wieder reimplantiert. Die autologe Nucleus pulposus Transplantation als biologischer Bandscheibenersatz ist jedoch durch die limitierte Lebensdauer der transplantierten Nucleus pulposus Zellen zeitlich begrenzt, da auch die reimplantierten Zellen über kein Teilungspotential verfügen. Durch gezielten Gentransfer könnte diese Limitation überwunden werden. Der gentherapeutische Einsatz der bislang entwickelten Vektoren wird jedoch entweder durch eine zu geringe Effizienz oder eine zu hohe Toxizität limitiert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage, ob sich ein Gentransfersystem entwickeln lässt, das eine ausreichend hohe Effizienz und gleichzeitig eine so niedrige Toxizität besitzt, dass es zur Therapie von degenerativen Veränderungen der Bandscheibe auf molekularer Ebene genutzt werden kann.

Da adenovirale Vektoren eine hohe Effizienz und Toxizität und liposomale Vektoren eine niedrige Toxizität und Effizienz besitzen, entwickelten wir einen adenoliposomalen Kombinationsvektor, wodurch ein Vektorsystem mit hoher Effizienz und niedriger Toxizität entstehen sollte. Zu diesem Zwecke untersuchten wir die Gentransfereigenschaften von Nucleus pulposus Zellen für den viralen und den nicht- viralen Gentransfer und verglichen die Toxizitäten und Effizienzen mit dem entwickelten adenoliopsomalen Vektor. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass sich Nucleus pulposus Zellen aus degenerierten Bandscheiben nicht gut für den Gentransfer eignen und der adenoliposomale Kombinationsvektor keine nennenswerte Steigerung der Effizienz bzw. Reduktion der Toxizität erreichen konnte.

4.1. Limitationen der Arbeit

- Es wurden lediglich Bandscheibengewebe von 5 Patienten unterschiedlicher Alters untersucht. Dadurch kann keine Aussage bezüglich des Einflusses durch z.B. das Geschlecht oder das Alter der Patienten auf den Gentransfer gemacht werden.
- Der Einfluss des Degenerationsgrad auf den Gentransfer wurde nicht untersucht
- Die Eigenschaften der Nucleus pulposus Zellen (z.B. Messungen der Oberflächenladung, Veränderungen der Nucleus pulposus Zelloberfläche (z.B. der Oberflächenrezeptoren)

durch das Herauslösen aus der Extrazellulären Matrix bei der Aufbereitung des Bandscheibengewebes usw.) wurden nicht näher untersucht.

- Intrazelluläre Prozesse sind bisher zu wenig untersucht und könnten Einfluss auf die Effizienz haben. Was z.B. passiert nach Aufnahme des Vektorkomplexes auf dem Weg zum Zellkern? Wird er vielleicht inaktiviert?
- Die saure Phosphatase differenziert zwischen vitalen und nicht- vitalen Zellen, nicht aber zwischen Nucleus pulposus Zellen und dedifferenzierten Zellen (z.B. Fibroblasten), so dass nicht sicher ist, dass ausschließlich Nucleus pulposus Zellen transfiziert und transduziert wurden.
- Es wurden keine Untersuchungen zu physikalisch- chemischen Eigenschaften der Liposomen bzw. der entstandenen Lipoplexe (z.B. Zetapotential, Liposomengröße und chemische Struktur) durchgeführt.
- Es wurde nur ein Adenovirustyp (Adenovirus Typ 5) verwendet. Daher können die Ergebnisse nicht auf alle Adenoviren übertragen werden. Es ist möglich, dass andere Adenovirusarten bessere Effizienzen und/ oder geringere Toxizitäten erzielen können.
- Es gibt keinen Beweis dafür, dass beim gekoppelten Gentransfer die Liposomen und die Adenoviren eine Komplexbildung eingehen, d.h., dass Liposomen und Adenoviren wirklich aneinander gebunden waren.
- Die geringen Transfektions- und Transduktionsergebnisse können auch durch eine erhöhte Toxizität bedingt sein, d.h. es werden falsch niedrige Transfektionsergebnisse durch einen vorzeitigen toxischen Zelltod erzielt.
- Die in vitro- Ergebnisse sind nur bedingt auf in vivo- Verhältnisse übertragbar, da die Bedingungen in vitro optimiert sind (z.B. Zusammensetzung der Kulturmedien, Wachstums- Differenzierungsfaktoren, Abwesenheit von eliminierenden Faktoren (z.B. Immunsystem) und extrazelluläre Matrix.

4.2. Eignung der Nucleus pulposus Zellen zum Tissue engineering

Knorpelgewebe ist völlig frei von Gefäßen und Nerven und dadurch auf eine Ernährung durch Diffusion angewiesen. Dies wiederum macht Nucleus pulposus Zellen für Zellkulturen besonders gut geeignet. Um die im Monolayer eintretende Dedifferenzierung der Zellen zu minimieren wurden Zellen bis höchstens zur dritten Passage verwendet.

4.3. Eignung der Nucleus pulposus Zellen zum in vivo- und in vitro- Gentransfer

Beim Transfer von genetischem Material in die Zielzellen müssen mehrere Barrieren überwunden werden. Bei der in vivo-Anwendung stellt die **Strecke vom Applikationsort zum Wirkungsort** die erste große Barriere dar. Die Inaktivierung durch das Immunsystem bzw. durch die im Serum vorhandenen Serumproteine spielen dabei eine entscheidende Rolle, weshalb eine systemische Applikation oft schwierig ist. Da Knorpelzellen an vielen Stellen des Körpers vorkommen und die meisten geschädigten Gewebe weniger durchblutet und somit unterversorgt sind, besteht außerdem die Gefahr, dass bei systemischer Anwendung nicht genügend Genmaterial im geschädigten Gewebe ankommt. Hinzu kommt, dass keines der Gentransfersysteme zwischen degenerierten und gesunden Knorpelzellen unterscheiden kann, so dass ebenfalls die Gefahr besteht, dass gesunde Knorpelzellen mittransfiziert werden.

Auch die Spezifität der Vektoren ist noch nicht gut genug, um zu garantieren, dass ausschließlich Knorpelzellen transfiziert werden, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen würde. Ein weiteres Problem bei der in vivo- Transfektion von Nucleus pulposus Zellen ist die dichte extrazelluläre Matrix, die um die Nucleus pulposus Zellen herum angeordnet ist. Dadurch ist der Transport zu den Zellen erschwert. Um einen nennenswerten Erfolg im Zielgewebe erreichen zu können, müssten die Applikationsdosen sehr hoch sein.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine in vivo- Anwendung nicht geeignet ist und Therapien eher ex vivo durchgeführt werden müssen, d.h. Zellen werden vom Patienten entnommen, das Therapiegewebe wird in die Zellen transfiziert und die modifizierten Zellen werden in den Patienten zurückgebracht. Das ermöglicht auf der anderen Seite aber auch die Anwendung von Transfektionstechniken, die in vivo nicht oder nur schlecht anzuwenden sind, z.B. Elektroporation und Mikroinjektion.

Die nächste Barriere stellt die **Zellmembran** dar. Die Interaktion der Zelloberfläche mit dem DNA- Vektorkomplex ist von ihrer Oberfläche (Ladung, Rezeptortyp, Rezeptordichte usw.) abhängig. In dieser Arbeit wurde angenommen, dass die Oberfläche der Nucleus pulposus Zellen negativ geladen ist. Es könnte aber auch sein, dass die Oberfläche entweder schwach positiv geladen oder neutral ist, was die geringe liposomale Transfektionseffizienz erklären könnte.

Nach der Freisetzung aus dem **Endosom bzw. Endolysosom** muss die DNA zum Zellkern transportiert werden und durch die Kernmembran ins Innere des Zellkerns gelangen. Die Mechanismen zur Überwindung der beiden Barrieren sind bis heute nicht vollständig geklärt. Daher ist es schwer auf diesen Mechanismus effizienzsteigernd einzuwirken. Die meisten Autoren stimmen in der Vorstellung überein, dass der Transport über mikrotubuläre Mechanismen gesteuert wird, aber es ist unklar, ob die DNA über die Kernporen, über die

Fusion mit der Kernmembran oder über Kernmembranspezifische Rezeptorinternalisierung in den Zellkern gelangen.

Ist der DNA- Vektorkomplex im **Zellkern** angelangt, müssen weitere Barrieren überwunden werden. Dazu gehören die Integration ins Wirtsgenom, die Genexpression- und regulation.

Da die Integration bisher schlecht gesteuert werden kann, erfolgt sie nach dem Zufallsprinzip. Die Verschiebung der Gensequenzen kann zu Störungen in der Expression anderer Gene führen, die eine Expression des eingeschleusten Gens verhindern. Außerdem kann es durch Reparaturprozesse der Zelle zum Herausschneiden des Fremdgenes kommen, was letztendlich zum Verlust des „Gene of therapy“ führt. Da weder Liposomen noch Adenoviren das Transgen ins Genom der Nucleus pulposus Zellen integrieren, greifen diese Mechanismen hier nicht.

Die letzte Barriere stellt wiederum das **Immunsystem** dar, denn wenn das produzierte Protein als fremd erkannt wird, werden die produzierende Zelle und das Protein durch das Immunsystem zerstört und eliminiert.

Beim Gentransfer spielen aber auch **Zelltyp**, Differenzierungsgrad der Zellen, der Zellzyklus und die Zellvitalität eine wichtige Rolle. Chondrozyten bzw. Nucleus pulposus Zellen wurden bisher als schwer zu transfizierende Zellen beschrieben.

In der Arbeit von Felgner und Ringold wurde der Einfluss des **Zellzyklus** auf die Transfektionseffizienz untersucht. Das Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Transfektion in einer Phase des Zellzyklus stattfinden sollte, in der keine Kernmembran vorhanden ist (Felgner et Ringold, 1989), um eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erreichen. Da dies nur während der Mitose der Fall ist, sollten sich zum Zeitpunkt der Transfektion möglichst viele Zellen in der Proliferationsphase befinden (Felgner et Ringold, 1989). Fassbender, Mortimer und Wilke führten ähnliche Versuche durch und kamen zu demselben Ergebnis (Fassbender, 1997; Mortimer, 1999; Wilke, 1996).

Gramlich beschäftigte sich unter anderem in seiner Arbeit mit der Frage, welchen Einfluss der **Differenzierungsgrad** der Zellen auf den Gentransfer hat, und kam zu dem Schluss, dass die Transfektion von undifferenzierten Vorläuferzellen in der Expansionsphase erfolgreicher war als bei differenzierten Zellen (Gramlich, 2003). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Dedifferenzierung, die bei langer Kultivierungszeit und mehrfacher Zellpassage auftritt, den Gentransfer nicht negativ beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden, im Gegensatz zu den anderen Arbeiten, primäre humane Nucleus pulposus Zellen verwendet, und keine immortalisierten Zelllinien, die über mehrere Zellgenerationen vermehrt wurden, so dass die Unterschiede vermutlich auch darauf zurückzuführen sind.

Wesentlich ist der Einfluss von Rezeptortyp, Rezeptordichte und die Affinität der Vektoren zu den Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Der **Rezeptortyp** spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Vektors und nimmt damit eine wichtige Funktion bei der Spezifität ein. Die **Affinität** eines Rezeptors reguliert die Interaktion zwischen Vektor und Rezeptor. Je stärker die Affinität des Vektors zum Rezeptor ist, desto geringer ist die benötigte Vektordosis, die zum erfolgreichen Gentransfer nötig ist. Die **Rezeptordichte** reguliert die Transportrate durch die Zellmembran. Je mehr Rezeptoren sich auf der Zelloberfläche befinden, desto mehr und desto schneller können Vektoren in die Zelle aufgenommen werden. Eine verminderte Rezeptordichte auf der Oberfläche von Nucleus pulposus Zellen wäre eine mögliche Erklärung für die geringe liposomale Transfektionseffizienz.

4.4. Eignung der verwendeten Vektoren für den Gentransfer an Nucleus pulposus Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden liposomale, adenovirale und adenoliposomale Vektoren als Genfähren verwendet. Sie unterschieden sich in ihrer Gentransfereffizienz und ihrer Toxizität.

4.4.1. Adenovirale Vektoren

Die in vitro- Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der adenovirale Vektor prinzipiell geeignet ist, um Nucleus pulposus Zellen zu transduzieren. Transduzierte Zellen konnten durch die Expression des Reportergens LacZ nachgewiesen werden. Dabei konnte sowohl ein Zusammenhang zwischen **Virusexpositionsdauer** und Transduktionseffizienz als auch zwischen **Viruskonzentration** und Transduktionseffizienz beobachtet werden: je länger die Virusexposition und je höher die Viruskonzentration, desto höher die Infektionsrate der Nucleus pulposus Zellen bei gleichbleibender oder leicht ansteigender Toxizität. Dies war allerdings limitiert, denn auffällig war, dass nachdem das Optimum von Virusexpositionsdauer und Viruskonzentration erreicht war, sich die Transduktionseffizienz und die Toxizität gegenüber der Viruskontaktzeit und dem Virustiter gegenläufig verhielten, d.h. bei Erhöhung der Viruslast und Verlängerung der Viruskontaktzeit über das Optimum hinaus fiel die Transduktionseffizienz deutlich ab (Diagramm 2), die Toxizität dagegen nahm sprunghaft zu (Diagramm 1). Auffällig dabei war, dass der Abfall der Effizienzen und der Vitalitätsrate nach Überschreiten der optimalen Viruskonzentration stärker ausgeprägt waren als der Anstieg der Effizienz und der Toxizität vor Erreichen des Optimums. Dies könnte ein Hinweis auf eine stark toxische Reaktion sein, die sowohl in einer Abnahme der β -Galaktosidase- Aktivität als auch der sauren Phosphatase- Aktivität zeigte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass für die vorliegende Arbeit adenovirale Vektoren der 1. Generation verwendet worden sind, die außer der deletierten E₁-

Region alle viralen Gene enthielten. Demnach ist nicht auszuschließen, dass es zu einer übermäßigen Expression viraler Proteine kam, die zur Anhäufung von Virusproteinen in den Zellen geführt hat und dadurch eine toxische Reaktion ausgelöst worden ist, die zur Lyse der transduzierten Nucleus pulposus Zellen führte. Die Toxizität stieg dabei schneller als die Transfektionseffizienz, so dass sie den Einsatz adenoviraler Vektoren in der Gentherapie von Bandscheibendefekten limitiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Vektoren der 1. Generation verwendet. Bei diesen ist die E₁- Region durch ein therapeutisches Gen, das in die Zielzellen gebracht werden soll, ausgetauscht worden. Dadurch können Gene mit einer Länge von ca. 3 kb, d.h. von insgesamt 4,7 kb, eingebaut werden (Günzburg, 1997). Adenovirale Vektoren, die die E₁-Region nicht mehr exprimieren, sind zwar in der Lage, Zielzellen effizient zu infizieren, können sich aber in diesen Zellen nicht mehr vermehren. Das bedeutet, dass diese Vektoren in einer Verpackungszelllinie (z.B. HEK 293) produziert werden müssen, die diese E₁- Funktion zur Verfügung stellt. Nachteilig an diesen Vektoren ist, dass es dabei durch homologe Rekombination mit den E₁- Sequenzen der Verpackungszelllinie zur Entstehung von replikationskompetenten Adenoviren kommen kann, d.h. einen E₁- Region- enthaltenen Wildtypvirus. Ein zweiter Nachteil dieser Vektoren ist, dass trotz Entfernung der E₁- Region virale Proteine exprimiert werden, die zytotoxische Eigenschaften haben und das Immunsystem aktivieren. Zusätzlich kann bei Vektoren der 1. Generation die E₃- Region deletiert sein, da sie nicht unmittelbar für die Infektion und Replikation benötigt wird. Dadurch können weitere 2-3 kb DNA eingebaut werden. Das bedeutet, dass durch die 105 %-ige Verpackungsfähigkeit E₁/E₃- deletierte Vektoren maximal 7,5 kb aufnehmen können (Graham et al., 1991). Die E₃- Region kodiert allerdings für Proteine zur Umgehung der Wirtsimmunität, so dass sich die Entfernung der E₃- Region auch nachteilig auswirken kann.

4.4.2. Liposomale Vektoren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gentransfereffizienz (Diagramme 4,6,8) und die Toxizität der Liposomen (Diagramme 3,5,7) im Vergleich mit viralen Vektoren (Diagramme 1,2) deutlich geringer ist.

DNA

Die Transfektionseffizienz ist unter anderem abhängig von der Menge an DNA, die in die Zelle gelangt, denn je mehr DNA in die Zelle transportiert wird, desto mehr Gene stehen für die Expression zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden verschiedene DNA- Mengen eingesetzt und

die Transfektionseffizienzen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass auch höhere DNA- Mengen weder auf die Transfektionseffizienz noch auf die Toxizität Einfluss nahmen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die geringen Transfektionserfolge nicht durch eine zu gering eingesetzte DNA- Menge bedingt waren.

Kationisches Lipid

Es wurde kein Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur des kationischen Lipids und der Transfektionseffizienz festgestellt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Groth, der schlussfolgert, dass die chemische Struktur des kationischen Lipids eines Liposoms einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Transfektionseffizienz nimmt (Groth, 1999).

Helferlipid

In der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen mit und ohne Helferlipid verwendet. Dabei zeigte sich, dass Liposomen in Verbindung mit einem Helferlipid bessere Transfektionsraten erzielten als ohne Helferlipid (Diagramme 4,6,8). Auch andere Arbeiten zeigen, dass die Effizienz des Gentransfers mit kationischen Liposomen meist durch den Zusatz eines neutralen Helferlipids wie DOPE, Phosphatidylcholin oder Cholesterol gesteigert werden kann (Groth, 1999). In Experimenten zum Vergleich der Transfektionseffizienzen mit und ohne Helferlipid konnten einige Arbeitsgruppen einen verminderten Gentransfer bei Fehlen des entsprechenden Helferlipides feststellen. (Legendre et al, 1992; Wrobel et al, 1995 ; Farhood et al 1995). Man nimmt an, dass sie die Fusion von Liposomen und Endosomenmembran vermitteln und so die Freisetzung der DNA aus dem Endosom ins Zellinnere fördern. Der Nachteil in der Verwendung der Helferlipide liegt darin, dass sie zelltoxisch wirken. Cholesterol als natürlicher Membranbestandteil besitzt dabei die geringste Zelltoxizität (Groth, 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit waren cholesterolhaltige Vektoren (Diagramme 3,5) weniger toxisch als nicht-cholesterolhaltige Vektoren.

DNA/Lipid- Verhältnis

Für die Gentransfereffizienz ist nicht nur die Menge an DNA und Liposomen von Bedeutung, sondern auch das Mischungsverhältnis beider Komponenten. Bei der Mischung von Liposomen und DNA binden die positiv geladenen Kopfgruppen der Lipide an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, und bilden dabei Lipoplexe.

Ist die DNA-Konzentration kleiner als die der Liposomen, entstehen kationische Lipoplexe und einzelne kationische Liposomen (Rädler et al., 1997). Da sich die einzelnen Lipoplexe auf Grund ihrer gleichen Oberflächenladung gegenseitig abstoßen, sind sie vor Fusionen untereinander geschützt und somit stabil. Bei steigender DNA- Konzentration bis zu einem annähernd neutralen Verhältnis von DNA und Lipid werden zunehmend neutrale Komplexe gebildet, da die Oberflächenladung der kationischen Liposomen durch die Bindung der anionischen DNA an die Liposomenoberfläche zunehmend vermindert wird. Die Reduktion der Oberflächenladung führt zur Verminderung der Abstoßungskräfte zwischen den Liposomen und es kommt zur Fusion mit Größenzunahme der Vesikel. Bei einem Überschuss an DNA werden dagegen negativ geladene Komplexe und freie DNA gebildet (Lehmann, 2003). Auf Grund der Abstoßungskräfte zwischen den negativen Komplexen können sie nicht miteinander fusionieren, so dass ihre Größe weitgehend konstant bleibt (Gustafsson et al., 1995; Rädler et al., 1997).

Bei diesen Untersuchungen steht natürlich die Frage im Vordergrund, welche der gebildeten Komplexe besonders effektiv transfizieren und wie sich die Toxizität im Vergleich dazu verhält. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Transfektionseffizienz mit zunehmenden Lipidanteil anstieg (Diagramme 4,6,8) und die Toxizität gleichzeitig zunahm (Diagramme 3,5,7), jedoch war der Unterschied so gering, dass kein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden konnte. Dennoch konnte diese Beobachtung bei mehreren Lipiden gemacht werden, so dass es nahe liegt, dass Transfektionseffizienz und Toxizität im engeren Zusammenhang stehen: Anfangs führt die Zunahme des kationischen Lipidanteils zu einer immer positiveren Oberflächenladung des Liposoms. Unter der Annahme, dass die Nucleus pulposus Zellen negativ geladen sind, steigen demnach auch die Anziehungskräfte zwischen Liposomen und Nucleus pulposus Zellen, was mit einer Zunahme der Effizienz verbunden ist. Da aber die Lipide auch eine toxische Wirkung besitzen, die parallel zur steigenden Transfektionsrate zunimmt, kommt es über die Abnahme der Zellzahl auch zur Abnahme der LacZ- Aktivität.

Unterschiedliche DNA- Mengen zeigten hier keine Veränderungen in der Transfektionseffizienz oder in der Toxizität. Diese Ergebnisse deckten sich nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Bezüglich der Toxizitäten waren die Ergebnisse dieser Arbeit aber wieder übereinstimmend mit den Ergebnissen vieler anderer Arbeiten.

Die Mehrzahl der Autoren (Schwartz et al., 1995; Zabner et al., 1995) fand mit annähernd neutralen bis leicht positiven Komplexen gute Transferergebnisse. Clement und Groth untersuchten in ihren Arbeiten den Einfluss von unterschiedlichen DNA- Mengen, Lipidmengen und unterschiedlichen DNA/Lipid- Verhältnissen auf die Transfektionseffizienz und die Toxizität. Dazu führten sie zum einen Versuche durch, bei denen sie entweder die DNA-

Mengen oder die Lipidkonzentration, also das DNA/Lipid- Verhältnis, veränderten, zum anderen Versuche, bei denen sie die DNA- und Lipidmenge gleichzeitig erhöhten, ohne dabei aber das Lipid/DNA- Verhältniss zu verändern. Dabei stellten sie fest, dass sowohl die Erhöhung der DNA- Menge als auch die Erhöhung der Lipidmenge zur Vergrößerung der Liposomen (Groth, 1999) und zur Steigerung der Transfektionsrate führte (Clement, 2005). Auch bei der Zunahme des Lipid/ DNA- Verhältnisses zeigte sich ein Anstieg der Transfektionseffizienz. Möglicherweise trug das stärker positive Ladungsverhältnis auf der Liposomenoberfläche zu einer verbesserten Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen mit ihrer negativ geladenen Membran bei. Die Toxizität dagegen blieb sowohl bei konstanten als auch bei unterschiedlichen DNA/Lipid- Verhältnissen gleich (Clement, 2005). Somit schien das DNA/Lipid- Verhältnis zwar einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz genommen zu haben, aber nicht auf die Toxizität. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Lipid/Helferlipid- Verhältnis

Die meisten Liposomen, die zum Gentransfer eingesetzt werden, setzen sich aus einem kationischen Lipid und einem neutralen Helferlipid zusammen. Ihnen wird ein positiver Effekt bei der Freisetzung der Vesikel aus der Endolysosommembran und damit auf die Transfektionseffizienz zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen mit und ohne Helferlipid sowie mit unterschiedlichen Lipid/ Helferlipidanteilen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Transfektionseffizienzen von Liposomen mit einem höheren Helferlipidanteil (z.B. DAC 30) gegenüber Liposomen mit einem geringeren (z.B. DAC 60) oder fehlenden Helferlipidanteil (z.B. DAC 100, Docsper 100) höher, die Toxizitäten dagegen niedriger waren (Diagramme 3,4).

Oberflächenladung von Liposomen und Lipoplexen

Die positive Oberflächenladung der Liposomen spielt sowohl eine Rolle bei der Lipoplexgröße als auch bei der Interaktion zwischen anionischer DNA und der ebenfalls negativ geladenen Zelloberfläche. Dabei gilt, dass je größer der Ladungsunterschied sowohl zwischen DNA und Liposom als auch zwischen Liposom und Nucleus pulposus Zellen ist, desto besser ist die Interaktion der Liposomen mit der DNA einerseits und mit der Zelloberfläche andererseits (Groth, 1999). Folglich müssten polykationische Liposomen eine höhere Affinität zur negativen Nucleus pulposus Zellenoberfläche und zur anionischen DNA haben als monokationische. Die

Transfektionsergebnisse dieser Arbeit wären damit vereinbar, denn die Ergebnisse zeigen, dass polykationische Liposomen (Diagramme 6,8) besser transfizierten als monokationische (Diagramm 4).

Allerdings ist für den Gentransfer die Oberflächenladung der Lipoplexe entscheidender als die des Liposoms, denn durch die Komplexbildung wird ein Teil der positiven Oberflächenladung des Liposoms durch die anionische DNA neutralisiert. Folglich ist die Nettoladung der gebildeten Lipoplexe geringer als die der ursprünglichen kationischen Lipide.

Unter der Voraussetzung, dass die Nucleus pulposus Zellen eine negative Oberflächenladung haben, ist eine positive Nettoladung der Lipoplexe, also ein Überschuss an kationischen Liposomen, Voraussetzung für einen effektiven Transfer. Dabei sind die Anziehungskräfte zwischen Nucleus pulposus Zellen und Lipoplexen umso größer, je positiver die Oberflächenladung der Lipoplexe und je negativer die Oberflächenladung der Nucleus pulposus Zellen ist.

Da das Ladungsverhältnis der Lipoplexe vor allem durch das Verhältnis von positiver Liposomenladung und anionischer DNA- Ladung bedingt ist, scheint das DNA/ Lipidverhältnis eine entscheidendere Rolle bei der Effektivität des Gentransfers zu spielen.

Da die Oberflächenladung der Komplexe in dieser Arbeit nicht gemessen wurde, kann die vorliegende Arbeit den Zusammenhang zwischen der Oberflächenladung und Transfektionseffizienz der Liposomen nicht überprüfen.

Bei den Untersuchungen zur Toxizität fiel auf, dass die verwendeten polykationischen Liposomen toxischer waren (Diagramme 5,7) als die verwendeten oligo- oder monokationischen Liposomen (Diagramm3). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zunahme der Toxizität von Liposomen durch Membranschädigungen bei stärkerer positiver Ladung bedingt ist.

4.4.3. Adenoliposomale Vektoren (adenoassoziierte Lipofektion, Adenolipofektion)

Der adenovirale und liposomale Gentransfer an Nucleus pulposus Zellen ist bisher nur wenig untersucht worden. In den meisten Arbeiten, in denen Nucleus pulposus Zellen zum Gentransfer verwendet worden sind, wurden verschiedene Vektoren benutzt, um mögliche Therapiogene in Nucleus pulposus Zellen einzubringen und ihre Wirkung auf die Chondrogenese und die Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile zu beobachten. In diesen Arbeiten wurde also lediglich die Wirkung der eingebrachten Gene untersucht und weniger die Eignung der Nucleus

pulposus Zellen bzw. die Eignung verschiedener Vektoren zum Gentransfer in Nucleus pulposus Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass der Gentransfer in Nucleus pulposus Zellen problematisch ist. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Nucleus pulposus Zellen prinzipiell transfiziert als auch transduziert werden können, jedoch mit limitierter Effizienz.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Autoren. Dinser z.B. berichtete über den erfolgreichen liposomalen Gentransfer von 42% boviner Chondrozyten. Diese Gentransferrate erzielte auch Madry in bovinen Chondrozyten, wogegen in humanen Chondrozyten nur 20% erreicht werden konnten. Die Gentransfereigenschaften humaner Chondrozyten scheinen sich demnach nicht nur von denen anderer Zellarten zu unterscheiden, sondern auch von Chondrozyten anderer Spezies. Bestätigt wird dies auch durch die Arbeit von Goomer. Beim liposomalen Gentransfer mit Chondrozyten vom Kaninchen gelang ihm mit 70% Transfektionseffizienz eine der höchsten Gentransferraten bei Chondrozyten (Dinser et al., 2001; Madry et al., 2000 und 2003; Goomer et al., 2001).

Beim adenoviralen Gentransfer mit humanen Chondrozyten dagegen konnten Effizienzen zwischen 70 und 80% erzielt werden (Dinser et al., 2001; Madry et al., 2003). Doch auch hier gibt es Unterschiede zu anderen Zellarten. Dannowski gelang in ihrer Arbeit z.B. humane Endothelzellen bis zu 100% viral zu transduzieren (Dannowski, 2004).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der Gentransfer an Chondrozyten bzw. Nucleus pulposus Zellen bislang wenig effizient ist und dass Nucleus pulposus Zellen sich bisher als schwer transfizierbar und schwer transduzierbar erwiesen, wobei der Erfolg auch zellart- und speziesabhängig zu sein scheint.

Zum adenoliposomalen Gentransfer an Nucleus pulposus Zellen gibt es bisher keine Daten. Qiu und Kreuzer waren mit dem adenoliposomalen Gentransfer bei Muskelzellen sehr erfolgreich, Dunphy und Lee dagegen wendeten diese Methode erfolgreich bei Tumorzellen an (Qiu, et al., 1998; Kreuzer et al., 1996; Dunphy et al., 1999; Lee et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden humane Chondrozyten eingesetzt, und obwohl die Versuche dieser Arbeit nach den Protokollen, mit denen die genannten Autoren erfolgreich waren, durchgeführt wurden, konnte der Erfolg des adenoliposomalen Gentransfers bei den Nucleus pulposus Zellen nicht bestätigt werden.

In den Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden unterschiedliche Virus- Liposomenverhältnisse getestet. Dabei zeigte sich, dass bei verschiedenen Liposomenmengen (5µg und 10µg) kein Unterschied in der Toxizität oder Effizienz bestand, jedoch bei unterschiedlichen adenoviralen Vektoranteilen sich die Toxizitäten und Effizienzen mit zunehmender Viruskonzentration

erhöhten. Beim Vergleich der Effizienzen der kombinierten Vektoren mit den adenoviralen Vektoren konnte festgestellt werden, dass in Verbindung mit Liposomen das Effizienzmaximum mit einer geringeren Viruskonzentration als ohne Liposomen erreicht werden konnte, jedoch die Effizienzen jeder einzelnen Titerstufe unter denen des adenoviralen Transfers lagen (Diagramme 2, 9 - 17). Daraus kann geschlossen werden, dass beim adenoliposomalen Gentransfer zwar eine geringere Virusdosis benötigt wurde, um das Effizienzmaximum zu erreichen, aber die durchgehend deutlich niedrigeren Effizienzen der Adenoliposomen gegenüber den Adenoviren weisen darauf hin, dass es durch die Kopplung an Liposomen zu einem Effizienzverlust des Virus gekommen ist.

Vergleicht man die Effizienzen des adenoliposomalen Gentransfers mit denen des reinen liposomalen Vektors, so fällt auf, dass durch die Kopplung von Adenoviren und Liposomen die Transfektionsfähigkeit der Liposomen nicht wesentlich erhöht werden konnte (Vergleich Diagramme 4,6,8 und 9 - 17).

Bezüglich der Toxizität zeigte sich, dass adenoliposomale Vektoren toxischer als reine liposomale Vektoren, aber dafür weniger toxisch als reine adenovirale Vektoren waren (Vergleich Diagramme 1 und 18-32).

Die Ergebnisse zeigten also, dass der kombinierte adenovirale Vektor ähnliche Effizienzen wie die Liposomen erreichte und ähnliche Toxizitäten wie der adenovirale Vektor. Das Ziel dieser Arbeit, einen Vektor zu konstruieren, der die Effizienz der Liposomen deutlich erhöht und dabei weniger toxisch als die Adenoviren wirkt, damit er als Vektorkonstrukt in der Gentherapie eingesetzt werden kann, wurde also nicht erreicht.

Am Anfang des Kapitels zum Gentransfer in Nucleus pulposus Zellen wurde darauf hingewiesen, dass der Gentransfer zum einen durch die Zelle und das Vektorsystem, und zum anderen durch das Zusammenspiel der beiden Komponenten beeinflusst wird. Für die Erklärung der gewonnenen Ergebnisse ergeben sich daraus folgende Ansatzpunkte:

Eine mögliche Ursache könnte im **Vektorkomplex** selbst liegen, der auf Grund seiner Herstellung oder seiner dadurch erworbenen Eigenschaften nicht mehr in der Lage ist, an die Nucleus pulposus Zelloberfläche zu binden und zu internalisieren. Es besteht z.B. die Möglichkeit, dass Adenoviren gar nicht an Liposomen binden können und somit gar keinen Adenovirus- Liposomenkomplex bilden können. Das würde aber bedeuten, dass jeder der beiden Vektoren den Gentransfer ermöglichen könnte. Da ausschließlich das Virus der Träger des LacZ-Gens ist, könnte nur die Expression, die durch den viralen Gentransfer verursacht worden ist,

nachgewiesen werden. Zu erwarten wären dann Transfektionsergebnisse, die denen des isolierten adenoviralen Gentransfers entsprechen würden. Da dies nicht der Fall ist, ist anzunehmen, dass die erreichten Transfereffizienzen nicht durch den alleinigen viralen Transport bedingt sind.

Die Transferergebnisse entsprechen eher denen des isolierten liposomalen Gentransfers (Vergleich Diagramme 4,6,8 und 9 - 17). Da aber die Liposomen beim isolierten Gentransfer nicht Träger des LacZ- Gens sind, können sie demnach auch nicht alleine am Gentransfer beteiligt gewesen sein. Dies lässt darauf schlussfolgern, dass die Komplexbildung aus Virus und Liposom stattgefunden hat, jedoch durch die neuen Eigenschaften des Virus-Liposomenkomplexes ein Effizienzverlust des Virus eintrat (z.B. durch Verminderung der Rezeptorerkennungsfähigkeit oder der Verminderung der Affinität des Rezeptors). Vergleicht man dagegen die Toxizitäten des gekoppelten Gentransfers mit dem einfachen adenoviralen Gentransfer, fällt auf, dass die Toxizität beim adenoliposomalen Gentransfer geringer ausfiel, als beim isolierten adenoviralen Gentransfer (Vergleich Diagramme 1 und 18 - 32). Dies stützt die Hypothese, dass es zwischen den Liposomen und den Adenoviren zu einer Komplexbildung gekommen ist. Diese Komplexierung führte offensichtlich zu einer verminderten Toxizität des Adenovirus.

Unter der Voraussetzung, dass Liposomen und Adenovirus zusammen einen Komplex bilden können, wäre es z.B. auch möglich, dass alle Bindungsstellen des Virus durch die gebundenen Liposomen besetzt sind oder dass durch die rundliche Form der Liposomen die benachbarten Bindungsstellen an der Virusoberfläche überdeckt sind, so dass der Komplex keine Möglichkeit hat, mit der Viruskomponente an die Nucleus pulposus Zellen zu binden. Das Liposom müsste es dann aus eigener Kraft schaffen, an die Nucleus pulposus Zellen zu binden und die Internalisierung zu induzieren. Die Ergebnisse des isolierten liposomalen Gentransfers zeigen jedoch, dass dies den Liposomen nicht besonders gut gelingt, daher ist es nicht zu erwarten gewesen, dass sich die Liposomen im Komplex mit dem Virus anders verhalten. Diese Theorie würde erklären, warum die Transfereffizienzen des gekoppelten Gentransfers denen des isolierten liposomalen Transfers ähnlich sind.

Die andere Möglichkeit wäre, dass die **Interaktion des Virus- Liposomenkomplexes mit der Zelloberfläche** auf Grund der neuen Komplexeigenschaften gestört ist. Es ist nicht auszuschließen, dass die Liposomen nicht an die Virusoberfläche gekoppelt werden, sondern dass sie das Virus vollständig umhüllen. In diesem Falle müssten wieder die Liposomen die Verbindung zur Zielzelle herstellen und die Internalisierung vermitteln. Auch diese Möglichkeit würde erklären, warum die Transfereffizienzen des adenoliposomalen Gentransfers so gering

sind und sich in dem Bereich bewegen, in dem sich auch die Transfereffizienzen der Liposomen befinden.

Möglich wäre auch, dass die positive Ladung der Liposomen durch eine eventuelle negative Oberflächenladung des Adenovirus neutralisiert wird. Dies hätte zur Folge, dass die Anziehungskräfte zwischen der liposomalen Komponente und der Nucleus pulposus Zelloberfläche reduziert sind oder vollständig fehlen. Bei einer negativen Gesamtladung des Komplexes wäre auch die Abstoßung von der Zelloberfläche eine mögliche Ursache für die geringen Effizienzen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass polykationische Liposomen, die an der Komplexbildung beteiligt waren, bessere Effizienzen erzielen konnten als monokationische. Die geringeren Effizienzen im liposomalen und adenoviralen Gentransfer im Vergleich mit anderen Zellarten ließen schon vermuten, dass Nucleus pulposus Zellen eine geringere Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche besitzen, so dass dieser Umstand erschwerend hinzu kommen könnte.

Eine weitere mögliche Ursache besteht in einer **gestörten Internalisierung des Virus-Liposomenkomplexes**. Durch die Komplexbildung von Virus und Liposom könnte es z.B. zu einer Größenzunahme gekommen sein, so dass die Aufnahmekapazitäten der Nucleus pulposus Zellen sehr schnell erschöpft waren, was sich in einer sehr geringen Transferrate widerspiegeln würde. Auch die Interaktion der viralen Pentonbasis mit den Integrinen der Zelloberfläche könnten ähnlich gestört sein wie die Rezeptoren auf der Nucleus pulposus Zelloberfläche und zu einer Abnahme der Komplexinternalisierung und demnach auch zu einer Abnahme der Transferrate führen.

Beide Vektorsysteme werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, so dass eine Ambivalenz zwischen zwei verschiedenen Aufnahmemechanismen eher unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen ist.

Auch **intrazelluläre Prozesse** wären eine Möglichkeit, die geringen Gentransfererfolge zu erklären. So wäre es z.B. denkbar, dass sich der Virus- Liposomenkomplex nach der Internalisierung nicht rechtzeitig aus dem Endolysosom befreien konnte, was zur Folge hätte, dass der Virus- Liposomenkomplex zerstört wird und somit nicht mehr in den Zellkern gelangen kann, um dort exprimiert zu werden. Auch dies würde sich in einer verminderten LacZ- Aktivität ausdrücken. Zu überlegen wäre auch, ob das Virus durch intrazelluläre Vorgänge vom Liposom abgekoppelt wird und welche Auswirkungen das auf den weiteren Verlauf hat.

Ebenso ist es möglich, dass der Virus- Liposomenkomplex die Kernmembran nicht überwinden kann und somit gar nicht erst im Zellkern ankommt, um exprimiert zu werden. Möglich wäre

jedoch, dass der liposomale Anteil des Komplexes mit der Kernmembran fusioniert und das Virus ins Innere des Zellkerns transportiert.

Wenn der gesamte Komplex es schafft, in den Zellkern zu gelangen, wäre es interessant, wie die Transkription, Translation und Replikation des Transgens erfolgt. Eine Abnahme der LacZ-Aktivität durch Verlust des Transgens, z.B. durch Genreparaturprozesse, ist eher unwahrscheinlich, da beide Vektoren nicht stabil ins Genom der Zelle integrieren. Zu Genreparaturprozessen von episomalem Genmaterial gibt es bisher keine Daten. Da aber der isolierte adenovirale und der isolierte liposomale Gentransfer dagegen LacZ- Aktivitäten zeigten, wird der Verlust des LacZ- Gens durch Zellreparaturprozesse ausgeschlossen.

Eine Möglichkeit, die Aufnahme der Liposomen in die Zelle zu erhöhen, besteht in der Verwendung von sogenannten Virosomen. Virosomen sind Vesikel, in deren Lipidschicht virale Oberflächenproteine eingebaut wurden, d.h. das gewünschte Protein wird aus seiner Virusmembran isoliert und in Lipidvesikel platziert (Walter et al. 1991). Diese Proteine sollen die Erkennung und die Bindung an die Zielzelle erleichtern.

Über den gleichen Mechanismus wäre es theoretisch auch möglich, Einfluss auf die Spezifität der Liposomen zu nehmen. Um die Spezifität der Lipoplexe für bestimmte Zelltypen zu erhöhen, könnte man z.B. bestimmte Proteine aus der Virushülle in die Membran der Liposomen einbauen.

Weitere Proteine, die sich für den Einbau in die Membran eignen, sind so genannte Virusfusionsproteine. Diese erleichtern die Fusion der Lipoplexe mit der Zellmembran und die damit verbundene Freigabe der DNA in das Zellinnere. Durch die Verwendung solcher sogenannten fusogenen Liposomen sollen die Vorteile der viralen Fusiogenität mit den Liposomen kombiniert und die Aufnahme der Liposomen in die Zelle erhöht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verknüpfung von therapeutischen Genen mit speziellen viralen Proteinen, die dabei helfen, die Gene zum Zellkern zu dirigieren, damit dort die Information abgelesen und in Proteine übersetzt werden kann.

5. Zusammenfassung

Wirbelsäulen assoziierte Erkrankungen, speziell discogener Genese, sind ein sozioökonomisches Problem, da sie zu den häufigsten Gründen von Arbeitsausfällen und vorzeitigen Berentungen zählen. Da Bandscheibengewebe kein Regenerationspotential besitzt, können derzeit nur die Folgen und Symptome der Bandscheibendegeneration adressiert werden. Durch molekularbiologische Techniken des Gentransfers könnten die bislang enttäuschenden Ergebnisse des Tissue engineering von Bandscheibengewebe möglicherweise verbessert werden. Die Effizienz und Toxizität dieser Techniken limitiert zur Zeit ihren Einsatz, eine Kombination im Sinne eines adenoliposomalen Gentransfers zeigte in anderen Gewebetypen Vorteile durch Reduktion der Toxizität und Steigerung der Effizienz.

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Kombination des liposomalen und adenoviralen Gentransfers bei humanen Nucleus pulposus Zellen den Einzelverfahren hinsichtlich Toxizität und Effizienz überlegen ist. Dazu wurden humane Nucleus pulposus Zellen aus degenerierten Bandscheiben kultiviert und mittels viraler und nicht- viraler sowie kombinierter Genvektoren transfiziert. Es wurden adenovirale, liposomale und adenoliposomale Vektoren verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass Adenoviren effizient die Zellen transduzieren konnten, jedoch eine hohe Toxizität aufwiesen. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Liposomen nicht geeignet für den Gentransfer an Nucleus pulposus Zellen degenerierter Bandscheiben, zeigten sich allerdings weniger toxisch. Die kombinierte Transfektion mit Liposomen und Adenoviren Typ 5 führte nicht zu einer Verbesserung der Gentransfereigenschaften, weder der Effizienz noch der Toxizität.

Die Transfektion von Nucleus pulposus Zellen aus degeneriertem Bandscheibengewebe lässt sich im Gegensatz zu anderen Zelltypen nicht durch eine Lipoadenofektion mit Adenovirus Typ 5 optimieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AAV	Adenoassoziiertes Virus
β- Gal	β- Galaktosidase
BMP	bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAR	Coxsackie- und Adenovirusrezeptor
CD	cluster of differentiation
Chol	Cholesterol
CMV	Cytomegalie- Virus
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPE	cytopatischer Effekt
CPRG	Chlorphenolrot- β- D- Galactopyranosid
DAC- Chol	3β- [N- (N,N- dimethylaminoethan)- carbamoyl] cholesterol
DEAE- Dextran	Diethylaminoethyl- Dextran
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium
DMRIE	1,2- Dimyristyloxypropyl- 3- methylhydroxyethylamminumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCSPER	1,3- dioleoyloxy- 2- (N5- carbamoyl- spermine)- propan
DOPE	1,2- Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSPA	2,3- Diolyloxy- N- [2(spermincarboxamido)ethyl]- N,N- dimethyl- propan- ammoniumtrifluoroacetat
DOSPER	1,3- Dioleoyloxy- 2- (6- Carboxy- spermyl)- propylamid
DOTAP	1,2- Dioleoyloxy- 3- (trimethylamonium)propan
DOTMA	N- [1- (2,3- dioleoxy)propyl]- N,N,N- trimethylammonium
DSMO	Dimethylsulfoxid
E ₁₋₃	Elongationsfaktoren, frühe Elongationsfaktoren
E. coli	Escherichia coli
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
g/l	Gramm pro Liter

h	Stunde
HBSS	Hank`s balancierte Salzlösung
HEK	Human Embryonic Kidney
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L ₁₋₅	späte Transkriptionsfaktoren
LacZ	β- Lactamase- Gen für das Enzym β- Galactosidase
min.	Minute
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natiumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
NPPZ	Nucleus pulposus Zellen
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
TGF- β	transforming growth factor
UpM	Umdrehungen pro Minute
X- Gal	5- Brom- 4- Chlor- 3- indoyl- β- D- galactopyranosid

7. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

1. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G.
Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5
Science, 1997, 275, 1320- 1323
2. Blaese, R.M. Culver, K.W., Miller, A.D.
T- Lymphocyte-directed gene therapy for ADA deficiency SCID: Initial trial
results after 4 years.
Science 1995, 270: 475-480
3. Cartier, C.
Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for
nonviral gene transfer systems
Gene Therapy, 2002; 9: 157-167
4. Chida, K.
Efficient and stable gene transfer following microinjektion into nuclei of
synchronized animal cells progresssing from G1/ S boundary to early S phase
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1998; 249 : 849- 852
5. Clement, Jule
Methoden zur Charakterisierung von großtechnisch hergestellten Lipoplexen zum
Gentransfer Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät
für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br., 2005
6. Danowski, Heike
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. „ Gentransfer in
korneale Endothelzellen: nicht- virale und virale Ansätze zur Modulation der
Endothelzellfunktion und allogenen Immunreaktion“ an der mathematisch-
naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt- Universität Berlin; 2004
7. Dinser, R., Kreppel, F., Zauke, F., Blank, C., Paulsson, M., Kochanek, S., Mauerer, P.
Comparison of long- termtransgene expression after non- viral and adenoviral
gene transfer into primary articular chondrocytes
Histochem. Cell Biol 2001; 116: 69- 77;

8. Dunphy, E.J., Redman, R., A., Herweijer, H., Cripe, T. P.
 Reciprocal Enhancement of Gene Transferr by combinatorial Adenovirus
 Transduction and Plasmid DNA Transfection in vitro and in vivo
 Hum Gene Ther 1999; 10: 2407- 2417
9. Farhood, H. Serbina, N., Hu Hang, L.
 The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated
 gene transfer. Biochim. Biophys. Acta 1995; 1235: 289-195
10. Fassbender, A.
 A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-
 mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia
 Gene Therapy, 1997; 4: 1173- 1180
11. Felgner, P.L.
 Lipofection: a highly efficient and lipid- mediated DNA- transfection procedure
 Proc. Natl. Acad Sci USA, 1987; 84: 7413- 7417
12. Felgner, P.L.
 Nomenclature for synthetic gene delivery systems
 Human Gene Therapy, 1997; 8: 511- 512
13. Felgner, P.L., Ringold, G.M.
 Cationic liposome-mediated transfection
 Nature 1989; 337: 387-8
14. Ganey, T., Libera, J., Moos, V., Alasevic, O., Fritsch, K.-G., Meisel, J.H., Hutton, W.
 Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated
 or damaged intervertebral disc.
 Spine 2003 Dec 1;28(23):2609-20
15. Ganey, T.M., Meisel, H.J.
 A potential role for cell- based therapeutics in the treatment of intervertebral disc
 herniation European Spine Journal 2002;11: 206-214,
16. Gao, X., Huang, L.
 Cationic liposome- mediated gene transfer
 Gene Therapy, 1995; 2: 710- 722
17. Godon, C.
 Transient plant gene expression: a simple and reproducible method based on
 flowing particel gun
 Biochmie, 1993;75: 591-593

18. Gokorsch, S., Nehring, D., Grottke, C., Czermak, P.
Hydromechanical stimulation of intervertebral disc cells
Bioworld 2003; 6
19. Goomer, R.S., Deftos, L.J., terkeltaub, R., Maris, T., Lee M.C., Harwood, F.L., Amiel, D.
High- efficiency non- viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial
cells for ex vivo gene therapy to repair articular cartilage defects Osteoarthritis
Cartilage 2001; 9: 248-256
20. Graham, F.L., Prevec, L.
Manipulation of adenovirusvectors
In: Walker, J.M., Murray, E.J. (Hrsg.): Methods in Molecular Biology 7 : Gen
Transfer and Expression protocols, 1991
21. Gramlich, S.
Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München „Optimierung eines
Lipid-vermittelten Gentransfers für primäre, mesencephale Vorläuferneuronen in
vitro“; 2003
22. Groth, D.,
Dissertation an der Freien Universität Berlin zum Thema: Entwicklung von
liposomalen Gentransfervesikeln auf der Grundlage optimierter kationischer
Lipide, 1999
23. Günzburg, W.H.
Gentransfer in Säugetierzellen
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 19- 30, 85- 114
24. Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., and Almgren, M.
Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM
Biochimica et Biophysica Acta 1995; 1235: 305-312
25. Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U.
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 3. Auflage Springer- Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York, 1999; S. 625 72. Günzburg, W.H. Gentransfer in
Säugetierzellen
26. Hanahan, D.
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids
J Mol Biol., 1983; Jun 5;166(4):557-80

27. Kirby, I., Davison, E., Beavil, A.J.
Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR
J Virology, 1999, 73, 9508- 9514
28. Koch- Brandt, C.
Gentransfer- Prinzipien, Experimente, Anwendung bei Säugern
Georg Thieme Verlag, Seite 45
29. Kochanek
High- capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy
Hum Gene Therapy, 10:2451-2459; 1999
30. Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.H., Chan, S., Caskey, C.T.
A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full- length dystrophin and beta-galactosidase
Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 5731- 5736
31. Kreuzer, J., Denger, S., Reifers, F., Beisel, C., Haack, K., Gebert, J., Kubler, W.
Adenovirus- assisted lipofection: efficient in vitro gene transfer of luciferase and cytosine deaminase to human smooth muscle cells
Atherosklerosis, 1996; 124 (1), 49- 60
32. Krötz, F.
Magnetofection- a highly efficient tool for Antisense Oligonucleotide delivery in vitro and in vivo
Molekulare Therapy, 2003, 7- 5
33. Krötz, F.
Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells
Vasc. Res., 2003; 40: 425- 434
34. Küttemeyer, M., Schultz, U.
Lumago- Ischalgie- Syndrome
Uexküll, Th.v.: Psychosomatische Medizin
Urban & Schwarzenberg 4. Aufl., München Wien Baltimore, 1990
35. Lash, J.W.
Glykosaminoglycans of cartilage: Structure, function, and biochemistry
Hall, B.H., Ed. 1:215-251; 1983

36. Lee, E.M., Hong, S.H., Lee, Y.J., Kang, Y.H., Choi, K.C., Choi, S.H., Kim, I.H.
Liposome- complexed adenoviral gene transfer in cancer cells expressing various levels of Coxsackievirus and adenovirus receptor
J Cancer Res Clin Oncol 2004; 130: 169- 177
37. Legendre, J. Y., Szoka, F. C.
Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes
Pharm. Res. 1992; 9, 1235-1242
38. Lehmann, Cathleen
Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen Liposomen- DNA- Komplexen für den Gentransfer
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. an der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Universität Potsdam, 2003
39. Madry H, Trippel SB
Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes
Gene Ther, 2000; 7: 286-291
40. Madry, H.
Gene transfer in cruciate ligament surgery
Orthopäde, 2002, 31:799-809
41. Madry, H.
Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid- mediated gene transfer in a gel suspension delivery system Gene Medicine, 2003, 5:502-509
42. Madry, H., Cucchiaroni, M., Terwilliger, E.F., Trippel, S.B.
Recombinant adeno- associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage
Hum Gene Ther, 2003; 14: 393- 402
43. Martinez, I., Dornburg, R.
Partial reconstitution of a replication-competent retrovirus in helper cells with partial overlaps between vector and helper cell genomes
Hum. Gene Ther. 1996; 7(6), 705-712

44. Matthews, K.E.
Electroporation for gene therapy Methods
Mol. Biol. 1995; 48: 273- 280
45. Meisel, H.j., Ganey, T., Hutton, W.C., Libera, Y.M., Alasevic, O.
Clinical experience in cell- based therapeutics: intervention and outcome
Spine 2006, 15 (suppl.3): 397- 405
46. Mortimer, I.
Cationic lipid- mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity
Gene Therapy, 1999; 6: 403- 411
47. Neuberger, T.
Wirkung von superparamagnetischen Nanopartikeln auf Zellen des
Bewegungsapparates- in vitro Studie an Osteoblasten, Chondrozyten und
Synovialzellen
Dissertation, Uni Zürich, 2002
48. Nicoll, S. B.
Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis
Biochem. Biophys. Res. Commun., 292:819-825 ; 2002
49. Nishida, K.
Adenovirus- mediated gene transfer to nucleus pulposus cells
Spine, 22: 2437- 2443; 1998
50. Nishida, K.
Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene
therapy: an in vivo study of adenovirus- mediated transfer of the human
transforming growth factor β 1 encoding gene
Spine, 23: 2419-2425; 1999
51. Pollard, J.S.
Polyethyleneimine but not cationic lipids promotes transgene delivey to the
nucleus in mammilian cells
Biol. Chem., 1998; 273: 7507- 7511
52. Qiu, C., De Young, M.B., Finn, A., Dichek, D.A.
Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the
fiber receptor and alpha(v)- intergrins
Hum Gene Ther 1998; Mar 1; 9(4); 507- 520

53. Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T. and Safinya, C.
Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes.
Science 1997, 725, 810-814
54. Raff, S.
Molekular Biologie der Zelle
Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson (Hrsg.), VCH, 1986; 384-395
55. Regelin, A.
Dissertation zum Thema: Entwicklung eines automatisierten Verfahrens zum Test neuer Transfektionslipide und Untersuchungen zum Mechanismus der Lipofection
Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe, 2000
56. Robbins, P.D., Tahara, H., Ghivizzani, S.C.
Viral vectors for gene therapy
Trends in Biotech. 1998;16, 35-40
57. Roelvink, P.W.; Mi Lee, G., Einfeld, D.A., Kovesdi, I., Wickham, T.J.
Identification of a conserved receptor binding site on the fiber proteins of CAR recognizing adenoviridae Science, 1999; 286: 1568- 1571,
58. Ross, P.C.
Multilamellar cationic liposomes are efficient vectors for in vitro gene transfer in serum Liposom.
Res., 1998; 8: 499- 520
59. Scherer, F.
Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo Gene Therapy, 2002,;9: 102- 109
60. Schochat, Th., Jäckel, W.H.
Rückenschmerzen aus epidemiologischer Sicht
Manuelle Therapie, Springer- Verlag, 1998, 36: 48-54
61. Schwartz, B., Benoist, C., Abdallah, B., Scherman, D., Behr, J.-P. and Demeneix, B.A.
Lipospermine-based gene transfer into the newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio
Human Gene Therapy 1995; 6: 1515- 1524
62. Templeton, N.S.
Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells
Gene Therapy, 1997; 4: 700-709

63. Templeton, N.S., Lasic, D.D., Frederik, P.M., Strey, H.H., Roberts, D.D., Pavlakis, G.N.
Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression *Nature Biotechnology* 1997; 15: 647-652,
64. Walter, A.
Functional reconstitution of viral envelopes in *Membrane Fusion*
Wilschut, J. and Hoekstra, D. (eds), Marcel Dekker Inc.: New York, Hong Kong 1991, 395-418).
65. Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. und Nemerow, G.R.
Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment
Cell, 1993; 73: 309-319
66. Wilke, M.
Efficacy of a peptid- based gene delivery system depends on mitotic activity
Gene Therapy, 1996; 3: 1133- 1142
67. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P.
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo
Science 1990, 247: 1465- 1468
68. Wrobel, I.; Collins, D.
Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis.
Biochem. Biophys. Acta 1995; 1235: 296-304
69. Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T, Poellinger, K. and Welsh, M.J.
Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipid
J. Biol. Chem. 1995; 270: 18997-9007
70. Zhao, D.D.
Gene transfection by cationic liposomes: comparison of the transfection efficiency of liposomes prepared from various positively charged lipids
Acta Med. Okayayma, 1997; 51: 149- 154

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Aufbau der Wirbelsäule
 Huch/ Bauer: Mensch Körper Krankheit
 4. Auflage, 2003 Urban + Fischer Verlag, München, Jena
- Abb. 2 Aufbau der Bandscheibe
 Huch/ Bauer: Mensch Körper Krankheit
 4. Auflage, 2003 Urban + Fischer Verlag, München, Jena
- Abb. 3 Nucleus pulposus bei Bewegung
 Huch/ Bauer: Mensch Körper Krankheit
 4. Auflage, 2003 Urban + Fischer Verlag, München, Jena
- Abb. 4 Aufbau eines Adenovirus
 http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/45_3/html/v4503contreras.shtml
- Abb. 5 Aufnahme adenoviraler Vektoren in die Zelle
 http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/45_3/html/v4503contreras.shtml
- Abb.6 Aufbau eines Lipides
 Skriptum Biochemie, FUB
- Abb. 7 Schematische Darstellung zur Bildung eines unilamellären Liposoms
 <http://content.grin.com/binary/wi24/96178/1.gif>
- Abb. 8 Lipoplexbildung
 Skriptum Biochemie, MUB
- Abb. 9 differenzierte Chondrozyten
 aus der eigenen Arbeitsgruppe
- Abb. 10 entdifferenzierte Chondrozyten
 aus der eigenen Arbeitsgruppe

9. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Als erstes möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. G. Matziolis und Dr. med. R. Spitzer für die Ermöglichung und Betreuung der Dissertation sowie Frau Dr. R. Reszka für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit diese Arbeit in der Arbeitsgruppe am MDC durchführen zu können, bedanken. Sie alle sorgten mit ihrem fundierten Fachwissen, Anregungen und Verbesserungsvorschlägen für das Gelingen dieser Arbeit. Danke sage ich auch meinen Kollegen der Arbeitsgruppe am MDC, die mich unterstützt haben und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet haben. Den Mitarbeitern dieser Abteilung, allen voran und stellvertretend Bärbel Pohl, sei für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Planung und Durchführung der Experimente gedankt.

Ein sehr herzlicher Dank gilt ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden, die alle auf ihre Weise direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, indem sie nicht nur meine schlechten Launen und Zeiten der überstrapazierten Nerven ertragen, geduldet und überstanden haben, sondern mir mit ihrem Verständnis, ihrer konstruktiven Kritik, den unzähligen und wertvollen Diskussionen, ihrem produktiven wissenschaftlichen Wissen und ihren vielen Ideen immer wieder die nötige Motivation zum Weitermachen gegeben haben.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Erklärung

„Ich, Katleen Just, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum adenoliposomalen Gentransfer an humanen Nucleus pulposus Zellen aus degenerierten Bandscheibengewebe“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift