

## 2 Methoden

### 2.1 Klonierung der Plasmid DNA

Schematische Diagramme des Vektors und des Glucocorticoid Responsiven Elementes [112], das für die Klonierung der Plasmide verwendet wurde, sind in den Abb. 4 und 5 gezeigt. Als Vektor wurde pEGFPLuc (Clontech, Palo Alto, CA, USA) verwendet. pEGFPLuc kodiert für die Reportergene EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und Luziferase vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (*Firefly Luciferase*). Dieses Plasmid wurde gewählt, um die Effektivität des Gentransfers mit Hilfe des GR sowohl im zellulären Homogenisat durch Messung der Luziferase Aktivität zu bestimmen, als auch durch Ermittlung der Anzahl der GFP exprimierenden Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen (FACS).

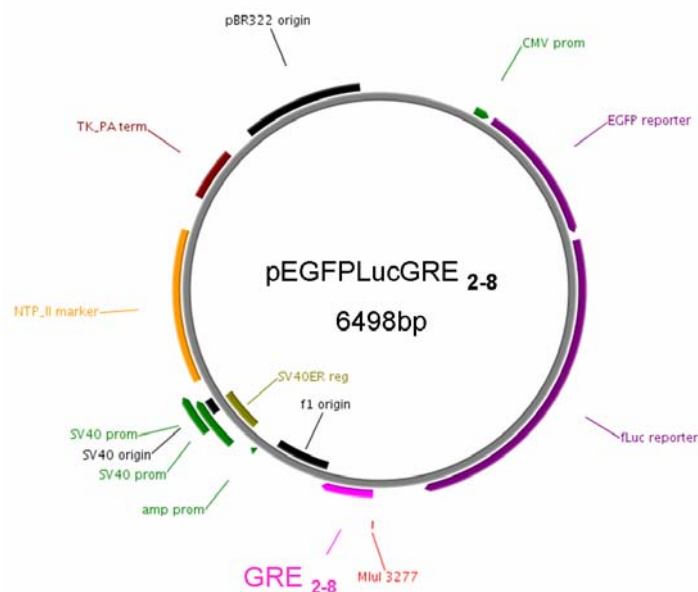


Abb. 4 Vektor pEGFPLuc

Das GRE (5'-ACGGGT GGTACA GAA TGTTCT TTTGGC-3') wurde als Oligonukleotid in dimerer Form als GRE-fwd und in der komplementären Form GRE-rwd erworben (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland) wie in Abb. 5 abgebildet. Die Sequenz des Oligomers wurde so gewählt, dass sich zwischen den beiden Glucocorticoid-Responsiven-Elementen (GREs) eine

SaII Schnittstelle, am einen Ende des Oligonukleotides eine MluI und am anderen Ende eine BssHII Schnittstelle befindet. Durch die Restriktionsendonuklease BssHII erhält man mit MluI Schnittstellen kompatible Enden, die nach einer erfolgten Ligation jedoch nicht mehr wieder durch MluI geschnitten werden können.

Jeweils 0,1 nmol der beiden komplementären Oligonukleotide wurden in TE-Puffer (Tris-EDTA: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) 5 min. bei 90°C zu Doppelsträngen ligiert. Die erfolgreiche Ligation wurde im 0,8%igen Agarosegel überprüft, wobei der Doppelstrang im Gel langsamer läuft und heller leuchtende Banden verursacht als Einzelstränge.

Der erhaltene Doppelstrang wurde für 30 min. bei 37°C durch die Restriktionsendonuklease MluI (6 units, Fermentas, Kanada) in Puffer (10x Buffer Tango, Fermentas, Kanada) und anschließend für 30 min. bei 50°C durch BssHII (8 units, Amersham Biosciences, England) geschnitten. Durch Zugabe von T4-DNA-Ligase (1 unit, Amersham Biosciences, England) wurden die Dimere dann über Nacht bei 21°C zu Multimeren ligiert. Nach der Ligation wurde das Gemisch auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen, so dass nach elektrophoretischer Trennung die verschiedenen Multimere erkennbar wurden (Abb. 5). Die Multimere wurden ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus dem Gel extrahiert.

Das Kit ermöglicht die Aufreinigung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp über eine Minisäule. Dabei wird die selektive Bindung von DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an eine Silika-Gel-Membran ausgenutzt, während Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen die Membran ungehindert passieren und durch mehrere aufeinander folgende Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden. Die gereinigte DNA wird mit Elutionspuffer oder destilliertem Wasser eluiert. Die Bindungskapazität einer Minisäule beträgt bis zu 10 µg DNA je Säule.

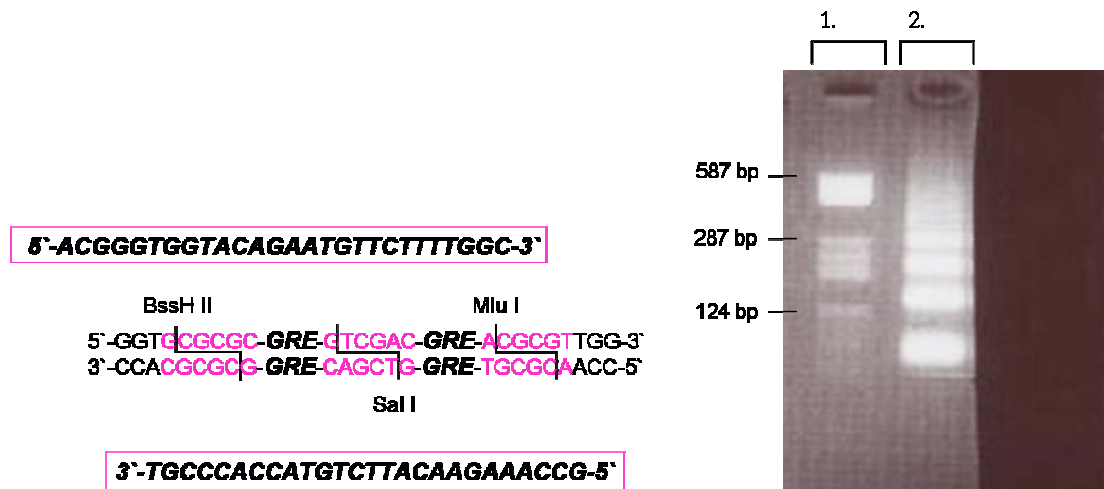


Abb. 5 GRE Oligonukleotid und seine Multimere

Das GRE wurde als Oligonukleotid erworben (Metabion, Martinsried, Deutschland) und zu Multimeren ligiert. Nach der Ligation wurde das Gemisch auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und man konnte nach elektrophoretischer Trennung die verschiedenen Multimere erkennen. 0,5  $\mu$ g 1 kb DNA-Ladder wurden als Standard verwendet (Bande 1). In der 2. Bande sind das dimere GRE<sub>2</sub> bei 78 bp, das tetramere GRE<sub>4</sub> bei 156 bp, das hexamere GRE<sub>6</sub> bei 234 bp und das oktamere GRE<sub>8</sub> bei 312 bp usw. zu erkennen.

Zur Insertion der GRE-Multimere wurden 500 ng des Vektors pEGFP<sub>Luc</sub> an der MluI Schnittstelle *downstream* neben der SV40 *poly A* Stelle mit 10 units MluI (Fermentas, Kanada) in Puffer (10x Buffer Tango, Fermentas, Kanada) für 1 h bei 37°C linearisiert. Die entstandenen Enden wurden dephosphoryliert (2 units Shrimp Alkaline Phosphatase, 15 min., 37°C, Fermentas, Kanada). Die Linearisierung wurde im 0,8%igen Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft und der linearisierte Vektor wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, s.o.). Das Oligomerengemisch wurde mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur in das Plasmid pEGFP<sub>Luc</sub> kloniert.

Die erhaltenen Plasmide pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-x</sub> wurde mittels Elektroporation bei 1,8 kVolt, 25  $\mu$ Farad und 100 Ohm in DH10B *high copy* Escherichia coli (Elektromax DH10B Cells, Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) transfiziert. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension in LB-Medium (Hefeextrakt 5 g/l; Trypton 10 g/l; HCl 5 g/l; pH 7) über Nacht bei

37°C inkubiert (Vorkultur). Die Bakterien wurden anschließend abzentrifugiert (3000 g, 10 min., 21°C), auf Kanamycin-haltige (75 µg/ml) LB-Agar Platten (Hefeextrakt 5 g/l; Trypton 10 g/l; HCl 5 g/l; Agar 15 g/l; pH 7) ausgestrichen und unter diesem Selektionsdruck erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien von den Agar-Platten entnommen und diese wieder jeweils in LB-Medium mit Kanamycin für zwölf Stunden inkubiert.

Um Bakterienklone längere Zeit bei –80°C lagern zu können, wurden sie mit Glycerol versetzt. Dazu wurde von der entsprechenden Bakterienkolonie eine Übernachtskultur in kanamycin-haltigem LB-Medium angefertigt. 100 µl der Übernachtskultur wurden mit 100 µl sterilem Glycerol gemischt und in Kryotubes bei –80°C gelagert. Aus diesem „Glycerolstock“ können erneut Bakterien zur Plasmidproduktion gewonnen werden.

Durch Säulenchromatographie entsprechend einer Standardvorschrift (Qiagen Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die Plasmid-DNA extrahiert und gereinigt. Die Präparation besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Bakterien mit einem alkalischen Puffer lysiert und das Lysat mit einem neutralisierenden Puffer mit hoher Salzkonzentration gemischt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von denaturierten und präzipitierten Zelltrümmern gereinigt. Im zweiten Schritt wurde das gereinigte Lysat in eine Säule pipettiert. Im Innern der Säule bindet die DNA an die Silika-Gel-Membran. Im letzten Schritt wurden ungebundene Lysatbestandteile durch mehrmaliges Waschen mit einem Waschpuffer herausgewaschen, bevor die DNA eluiert wurde.

Die Reinheit und Identität der Plasmid-DNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm bestimmt. Außerdem wurde zur Charakterisierung der klonierten Plasmide eine *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mit Primern, die für pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-x</sub> designed wurden, durchgeführt. Die Sequenzen der Primer waren PVe-fwd (5`- TGGTTTGTCCAAACTCATCAA -3`) und PVe-rwd (5`- CGTTGGAGTCCACGTTCTTT -3`). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 min. Vordenaturierung bei 94°C, dann 58 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing der Primer bei 59°C und 30 s Elongation bei 72°C.

Nach der Reaktion wurden die Amplifikate auf ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung der Agarosegele wurden 0,8 g Agarose in einen Erlenmeyer-Kolben eingewogen, mit 10 ml TAE-Puffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) aufgefüllt und 3 min. in der Mikrowelle (Micro 750 W, Whirpool) aufgeköcht. Unter Rühren wurde die Lösung abgekühlt, dann wurden 10 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzu pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde gefüllt, die Kämme für die Taschen eingesetzt und das Gel erstarren gelassen. Die DNA wurden mit *Loading-Buffer* gemischt (50% Glycerol; 0,2% Bromphenolblau), 15 µl dieser Mischung in jede Taschen des Gels pipettiert (0,2 µg DNA) und das Gel für 1,5 h bei 90 V laufen gelassen. 0,5 µg 1 kb DNA-*Ladder* wurden als Standard verwendet (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

Je nach Plasmid – pEGFP<sub>Luc</sub>, pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>2</sub>, pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>4</sub> und pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>8</sub> – konnten Amplifikate verschiedener Größen auf dem Gel detektiert werden. Außerdem wurde die Identität der Plasmide durch Sequenzierungen der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bestätigt.

Die klonierten und charakterisierten Plasmide wurden von PlasmidFactory (PlasmidFactory, Bielefeld, Deutschland) gereinigt und amplifiziert. Die 5 mg/ml Aliquots der Plasmide, mit einer Reinheit (LPS) von  $\leq 0,1$  E.U/µg und  $\geq 90\%$  supercoiled pDNA, wurden bei -20°C gelagert.

## 2.2 Zellkulturen

A549 Zellen, eine von einem humanen Alveolarzellkarzinom gewonnene Epithelzelllinie, BEAS-2B Zellen, eine humane Bronchialepithelzelllinie und COS-7 Zellen, eine Fibroblasten-artige Zelllinie aus der Niere von Affen, wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100% im Brutschrank kultiviert. COS-7 Zellen wurden in Dulbecco`s modifiziertem Eagle`s Medium (D-MEM) (Invitrogen, Karlsruhe) und 10% Fötalem Kälber Serum (FCS) (PAA, Pasching, Österreich) kultiviert. A549 Zellen und BEAS-2B wurden in *Airway Epithelial Cell Basal Growth Medium* (PromoCell, Heidelberg) mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren (Supplement Pack, PromoCell, Heidelberg) oder in *Eagle`s Minimum Essential Medium* (MEM) mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage mit 1 ml Trypsin-EDTA (Invitrogen,

Karlsruhe, Deutschland) trypsinisiert und passagiert. Zellen aus den Passagen 3-25 wurden für die Transfektionen benutzt.

### 2.3 Detektion des CFP-GR Fusionsprotein mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Das Plasmid pECFP-GR, das für ein CFP-GR Fusionsprotein kodiert, wurde uns freundlicherweise von Nishi et al. zur Verfügung gestellt [113] (Abb. 6). Zur Konstruktion des Plasmids wurde Ratten-Glucocorticoid-cDNA mit einem verkürzten 5'-Ende aus dem Vektor pGEM-4-GR isoliert und *in frame* in die *Multiple Cloning* Seite des Vektors pECFPC1 ligiert (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Das Plasmid wurde im *E. coli* Stamm DH10B (ElectroMAX DH10B Cells, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) amplifiziert und mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert und gereinigt.

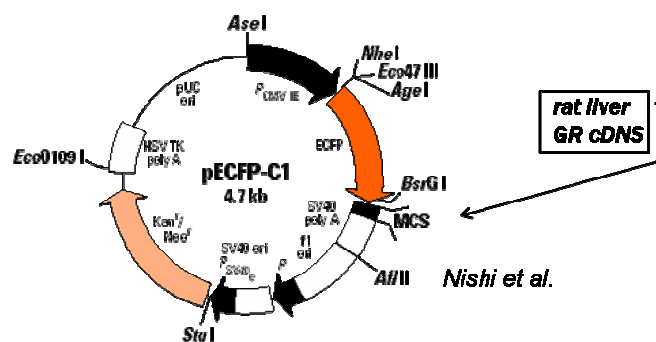


Abb. 6 pECFP-GR

Das in der Abb. gezeigte Plasmid pECFP-GR wurde von der Arbeitsgruppe Nishi und Kollegen zur Verfügung gestellt [113]. In diesem Fall wurde in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors pECFPC1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) an den Schnittstellen Bsp 121 I und Bam HI die cDNA des Glucocorticoidrezeptors aus Rattenleber kloniert. Der so modifizierte Vektor kodiert für ein CFP-GR Fusionsprotein mit 108 kDa.

COS-7 Zellen wurden mit dem Plasmid pECFP-GR transfiziert, um das *Shuttling* des CFP-GR Rezeptors nach Dexamethasongabe fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Zur Elektroporation wurden COS-7 Zellen mit 1 ml Trypsin trypsinisiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und bei 410 g für 10 min. bei 20°C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in

5 ml serumfreiem Medium resuspendiert ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) und mit 50 µg pECFP-GR im BioRad Gene Pulser II transfiziert. Die Elektroporation wurde in zehn 4 mm Küvetten bei 200 V und 1600 µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension 5 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die vereinigten Zellen zu 5 ml vorgewärmtem D-MEM mit 10% FCS pipettiert und 48h in FCS-haltigem Medium inkubiert. Nach 48h wurden die Zellen für weitere 15h in 10 ml serumfreiem D-MEM inkubiert (GR im Zytoplasma) und das *Shuttling* des blauen Glucocorticoidrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern nach Dexamethasongabe wurde fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Dabei wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert25, Zeiss) verwendet. Für die Anregung von ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein, 437 nm, 476 nm) wurde ein Anregungsfilter 430-475 nm verwendet. Für die Aufnahme von Bildern wurde eine CellCam Color CCD-Kamera (PHASE GmbH, Lübeck) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Objektiv durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung wurden, wie im nächsten Absatz (2.4) beschrieben, Zelllysate aus transfizierten COS-7 Zellen hergestellt und das CFP-GR Fusionsprotein detektiert.

#### **2.4 Western Blot Analyse verschiedener Zelllysate**

Die Glucocorticoidrezeptor-haltigen Zelllysate wurden jeweils aus einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit BEAS-2B Zellen, A549 Zellen oder pECFP-GR transfizierten COS-7 Zellen mit einer Konfluenz von 70-80% (ca. 5.000.000 Zellen) hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin trypsiniert. Dann wurden die Zellen mit 9 ml MEM bzw. D-MEM Medium gemischt und in einem 20 ml Falcon Tube für 5 min. bei 4°C und 150 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl *Radioimmunoprecipitation* (RIPA)-Puffer (1xPBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 1% Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [10mg/ml], 1% Aprotinin [10mg/ml] und 1% 100mM Natriumorthovanadat) durch Vortexen und 20-faches Auf- und Ab-Pipettieren resuspendiert und für 60 min. auf Eis inkubiert. Dann wurde das Lysat 10 min. bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert, der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Die Gesamtproteinkonzentration der Lysate wurde nach der Methode von Whitaker und Granum (1980) photometrisch bestimmt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus den gewonnenen Zelllysaten erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970) in *Sodium Dodecylsulfat* (SDS)-Polyacrylamid-Gelen (*Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-Page*). Es wurden 7% Tris-Acetat Gele (NuPage, Invitrogen GmbH, Deutschland) verwendet. Die Zelllysate wurden mit 1-fach SDS-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und es wurden 200 µg Gesamtprotein in einem Volumen von 30 µl pro Spur auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden 10 µl „Kaleidoskope Prestained Standard“ (Biorad, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und 150 V in *Tris-Acetat-SDS-Running-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Nass-Blot-Kammer mit Transfer-Puffer (50 ml 20x Puffer Invitrogen, 100 ml Methanol, 850 ml Wasser) vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Pall Gelman Science, Dreieich) für 1 h bei 30 V transferiert. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch Färben der Membran mit Amidoschwarz-Lösung überprüft. Anschließend wurden freie Bindestellen der Membran mit 5% Magermilch in *Tris-Buffered Saline Tween-20* (TBST) (20 mM Tris/HCl; 137 mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,6) abgesättigt. Der polyklonale Anti-human Glucocorticoidrezeptor Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 (*rabbit polyclonal antibody* [5µg/ml], Affinity BioReagents, USA) in 0,5% Magermilch in TBST eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde der Enzym-gelabelte Antikörper „*Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate*“ (Biorad, München, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,5% Magermilch in TBST eingesetzt. Anschließend wurde die Membran 1 min. mit 10 ml *Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection Reagent* (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Life Science, England) inkubiert, wobei das Enzym HRP (*Horseradish Peroxidase*) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid Luminol zu einem Dianion umwandelt, welches unter Abgabe von Licht wieder in seinen Grundzustand fällt. Die Signale wurden auf Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience, UK) detektiert.

## **2.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

*In vitro* Bindungsstudien mit GR aus Zelllysate von BEAS-2B Zellen und der GRE-Sequenz, die in den Plasmiden pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>2,8</sub> verwendet wurde, wurden durchgeführt. BEAS-2B Zellen



wurden mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen und bei 4°C in Lysepuffer (NaCl 0,15 M; EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 5 mM; 1% Triton X-100; Tris/HCl 10 mM; DTT (Dithiothreitol) 1 M; 40 µl / ml *Protease Inhibitor* „Complete“) (Roche, Deutschland) lysiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber aus der Flasche isoliert, für 10 min. auf Eis inkubiert und 40 min. bei 4°C geschüttelt. Dann wurde das Lysat 10 min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Bindungsstudien wurden mit doppelsträngigem Oligonukleotid (291 bp) durchgeführt, das mittels PCR aus dem Plasmid pEGFPLucGRE<sub>2</sub> gewonnen wurde und GRE in dimerer Form enthielt. Dabei wurden die Primer PVe-fwd und PVe-rwd und Reaktionsbedingungen verwendet, wie im Absatz 2.1 bereits beschrieben.

Das Oligonukleotid wurde mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Adenosintriphosphat) und T4 Polynukleotidkinase (Amersham Bioscience Europa, Deutschland) radioaktiv gelabelt. Die radioaktive Sonde wurde von freiem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP mit MicroSpin G-50 Säulen (Amersham Bioscience Europa, Deutschland) aufgereinigt.

200 µg Gesamtprotein aus Zellextrakt von BEAS-2B Zellen wurden mit  $2,5 \times 10^{-4}$  nmol gelabeltem GRE<sub>2</sub> in Reaktionspuffer wie bei Pandit et al. [114] beschrieben (Tris-HCl (pH 7,5) 40 mM; EDTA 0,2 mM; Dithiothreitol 8 mM; NaCl 80 mM; 0,1% bovines Serum Albumin; 20% Glycerol; 0,25% Nonidet P-40; 15 µg Poly(dI-dC) und  $10^{-5}$  molar) 1 h 45 min. bei 25°C inkubiert. Um die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die radioaktive Sonde kompetitiv zu hemmen, wurde zum oben beschriebenen Reaktionsansatz ungelabeltes pEGFPLucGRE<sub>2</sub> in 100-fachem Überschuss gegeben.

Den Proben wurden 2 µl 0,1 % -iger Bromphenolblaulösung zugegeben und die Elektrophorese mit 50 µl jeder Probe in einem 6% -igen nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel (Invitrogen DNA Retardation Gel) 90 min. bei 180 V in MOPS (3-{N-Morpholino} Propansulfonsäure) SDS Laufpuffer (Invitrogen) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem

Filterpapier unter Vakuum getrocknet. Die radioaktiven Signale wurden auf einem Kodak Biomax MR Film (Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) detektiert.

## 2.6 Herstellung von DOTAP-Dexamethason Liposomen

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dreisenhofen, Deutschland) ist ein kationisches Lipid, das seit 1988 als Bestandteil von kationischen Liposomen zur Transfektion verwendet wird [115]. Es ist heute Bestandteil verschiedener kommerziell erhältlicher *in vitro* Transfektionsreagenzien z. B. Escort<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und „DOTAP liposomales Transfektionsreagenz“ (Roche) (Abb. 7).

Zur Herstellung der DOTAP-Dexamethason (DOTAP-Dex) Liposomen wurde ein 30 ml Rundkolben dreimal mit Chloroform ausgewaschen. Es wurden 0,8 ml DOTAP (25 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>) und 0,55 ml Dexamethason (20 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>) in den Rundkolben gegeben und gemischt. Durch Evaporation des Chloroforms im N<sub>2</sub>-Strom wurde ein dünner Lipidfilm gebildet, der für 2 h im Vakuum getrocknet wurde. Der Lipidfilm wurde in 2 ml destilliertem Wasser resuspendiert, in ein konisches Glasröhrchen überführt und 15 sec gevortext. Die Lipidsuspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Liposomen komplett zu hydratisieren. Dann wurde die Suspension erneut gevortext. In den *Avanti* Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, US) wurde der 0,1 µm Polycarbonat-Filter eingesetzt. Die Suspension und der Heizblock des Extruders wurden 10 min. auf 65°C erhitzt, um die Extrusion der Lipidsuspension zu erleichtern. Die Suspension wurde fünfmal durch den Extruder gepresst. Die Größe der DOTAP-DEX Liposomen (DOTAP-Dex Liposomen 150905, 150nm, Polydispersität 0,1) wurde mit Hilfe des Zeta-Sizers (ZetaPals, Brookhaven Instruments Corporation, Holtville, NY, USA) bestimmt. Die Endkonzentration der Liposomen betrug 10 mg/ml DOTAP mit 5,5 mg/ml Dexamethason.

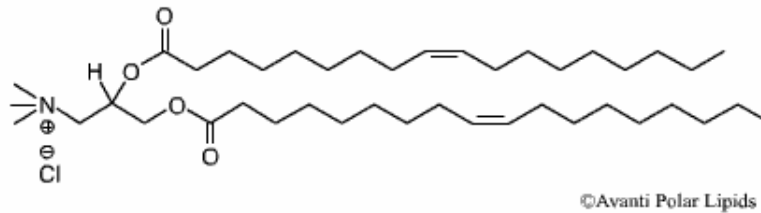


Abb. 7 Strukturformel des Lipids DOTAP

## 2.7 *In vitro* Transfektionen

### 2.7.1 Elektroporation von BEAS-2B Zellen

BEAS-2B Zellen wurden 24 h vor der Elektroporation in Medium supplementiert mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren aber ohne Hydrocortison kultiviert, um die Anwesenheit des GR in seiner inaktiven Form im Zytoplasma der Zellen sicher zu stellen. Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und zentrifugiert wie unter 2.3 beschrieben. Für die Elektroporation wurden die Zellen in Airway Epithelial Cell Basal Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren resuspendiert. 400 µl der Zellsuspension ( $7,5 \times 10^5$  Zellen / ml) wurden mit 5 µg pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-8</sub> gemischt und wie unter 2.3 beschrieben in 4 mm Küvetten elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension 5 min. auf Eis inkubiert. Ein Teil der elektroporierten Zellen wurden dann in 24-Well Platten für 24 h in 1 ml Medium mit Wachstumsfaktoren aber ohne Hydrocortison/Dexamethason kultiviert. Der andere Teil der elektroporierten Zellen wurde in 24-Well Platten erst 5 h in 1 ml Medium mit Wachstumsfaktoren und Dexamethason  $10^{-6}$  molar kultiviert und dann für 19 h in 1 ml Medium mit Wachstumsfaktoren aber ohne Hydrocortison/Dexamethason. Die Zellen wurden dann ein Mal mit PBS gewaschen und in 100 ml Lysepuffer (250 mM Tris, 0,1% Triton, pH=7,8) 10 min. lysiert. Die Platten wurden mit Folie zugeklebt und bis zur Luziferase-Aktivitätsmessung bei -80°C eingefroren.

### 2.7.2 Lipofektionen mit DOTAP-Dexamethason Lipoplexen oder *Metafectene*

Unter Lipofektion versteht man den Gentransfer mit Hilfe von kationischen Lipiden (Liposomen) als Gentransfercarrier. *Metafectene* ist ein liposomales Transfektionsreagenz der Firma Biontex (Martinsried/Planegg, Deutschland). DOTAP-Dexamethason Lipoplexe (*Safeplexe*) wurden 2004 von Liu et al. für den Gentransfer entwickelt. Dabei wird die pDNA mit Liposomen, bestehend aus dem kationischen Lipid DOTAP und Dexamethason, komplexiert. Durch *Safeplexe* konnten Immunreaktionen verringert werden, die nach intravenöser Applikation von Lipoplexen in die Schwanzvene von Mäusen normalerweise auftreten [17].

Vor den Transfektionen wurden BEAS-2B Zellen in MEM und 10% FCS kultiviert wie unter 2.2 beschrieben. Die Transfektionen wurden in 24-Well Platten durchgeführt (TPP, Peske). Drei Tage vor der Transfektion wurden pro Well 100.000 Zellen ausgesät, so dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 100% erreicht war. 5 h vor der Transfektion wurden die Zellen ein Mal mit 1 ml PBS gewaschen und in 1 ml serumfreiem MEM inkubiert. Nach 5h wurden die Zellen erneut gewaschen und 700µl serumfreies MEM wurde zugegeben. 50 µl pDNA Lösung (0,5 µg, 0,25 µg oder 0,1 µg) wurde zu 50 µl Vektor Lösung pipettiert, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Verhältnis Lipid zu pDNA betrug bei *Safeplexen* 20:1 (10µg DOTAP und 0,5 µg pDNA pro Well), bei *Metafectene* 2:1 bis 10:1 (1 µl *Metafectene* und 0,5; 0,25 oder 0,1 µg pDNA pro Well). Anschließend wurden 100 µl dieser Gentransferkomplexe auf die vorgelegten 700 µl MEM Medium pipettiert und 4 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Transfektionen wurden als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die Komplexe wurden durch die entsprechenden dreifachen Volumina generiert. Nach 4 h wurden die Komplexe abgesaugt. Im Falle der *Safeplexe* wurden die Zellen weiter in serumfreiem MEM Medium kultiviert, bei der Transfektion mit *Metafectene* in FCS-haltigem MEM. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer (250 mM Tris; 0,1% Triton; pH=7,8) pro Well 10 min. bei Raumtemperatur lysiert. Die Platten wurden mit Folie zugeklebt und bis zur Luziferase-Aktivitätsmessung bei -80°C eingefroren.

### 2.7.3 Luziferase-Reportergen-Assay

Die über 5 s emittierten Photonen nach Injektion von 100 µl Luziferin-Substrat-Puffer (470 µM D-Luziferin; 270 µM Coenzym A; 33,3 mM DTT; 530 µM ATP; 1,07 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 2,67 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 20 mM Tricin; 0,1 mM EDTA) [116] zu 50 µl des Zellüberstandes wurden in einem Wallac Victor<sup>2</sup>/1420 Multilable Counter (PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim) gemessen und jeweils der zuvor gemessene Hintergrund des Wells abgezogen. Die Luziferase-Werte wurden auf das Gesamtprotein der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde mittels eines Standard Protein Assays (BioRad; München) bestimmt (Methode nach Bradford).

## 2.8 *In vivo* Applikation von pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-2</sub> Vektoren

### 2.8.1 Applikation von *Safeplexen* in die Schwanzvene von BALB-C Mäusen

Weibliche BALB/c Mäuse wurden von der Firma Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) erworben und unter pathogenfreien Konditionen gehalten. Vor den Experimenten waren die Tiere mindestens 7 Tage zur Aklimatisierung im Tierstall. Alle Experimente wurden vom Ethik-Komitee zugelassen und kontrolliert und entsprechend des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

214 µl steriles Wasser und 86 µl DOTAP-Dex [10 mg/ml] wurden in einem konischen *Falcon Tube* gemischt. 280 µl steriles Wasser und 20 µl pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-2</sub> [5 µg/µl] bzw. pEGFP<sub>Luc</sub> [5 µg/µl] wurden in einem Eppendorf Tube gemischt und tropfenweise unter leichtem Schütteln zu den Liposomen gegeben. Zur Komplexbildung wurde die Mischung 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Größe der Komplexe im Zeta Sizer bestimmt. Es wurden pEGFP<sub>Luc</sub>-*Safeplexe* (180 nm) und pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>2</sub>-*Safeplexe* (190 nm) für je drei Mäuse hergestellt. Jeder Maus wurden entweder 250 µl der wässrigen Lösung der pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>2</sub>-*Safeplexe* bzw. der pEGFP<sub>Luc</sub>-*Safeplexe* in die Schwanzvene injiziert. 250 µl enthielten 41,7 µg pDNA und 358,3 µg DOTAP. Das Alter der Mäuse betrug 10-12 Wochen.

### 2.8.2 Aerosolapplikation von PEI-pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>0-2</sub>

Verzweigtes PEI (MW = 25 kDa) wurde von Sigma Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) erworben und mit HCl auf pH=7,4 eingestellt. Die Formulierung der PEI-pDNA Komplexe und die Aerosolapplikation erfolgten, wie es von Rudolph et al. bereits beschrieben wurde [117]. 1 mg pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>x</sub> wurden mit verzweigtem PEI komplexiert. Dazu wurden PEI und DNA Lösungen jeweils mit destilliertem Wasser auf 4 ml aufgefüllt, was eine Konzentration der DNA Lösungen von 0,25 mg/ml und von verzweigtem PEI von 0,33 mg/ml ergab. Das entspricht einem N/P Verhältnis von 10. Die pDNA Lösung wurde in die PEI Lösung pipettiert und durch Auf- und Ab-Pipettieren gut gemischt. Die pDNA Endkonzentration betrug 0,125 mg/ml. Die Komplexe wurden 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Größe der Partikel von 90 nm wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (Zetasizer, Brookhaven Instrument Corporation, ZetaPals Particle Software Ver. 3.42) bestimmt.

Je zehn 10-12 Wochen alte Mäuse (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) inhalierten die 8 ml wässrige PEI-pEGFP<sub>Luc</sub> (Gruppe 1) bzw. PEI-pEGFP<sub>Luc</sub>GRE<sub>2</sub> (Gruppe 2) Lösung. Die Aerosolapplikation dauerte jeweils ungefähr 25 min. und fand in einer geschlossenen 9,8 x 13,2 x 21,5 cm großen Plexiglas-Vernebelungskammer statt, in der die Mäuse plaziert wurden und die an einen 30 cm langen Spacer horizontal angeschlossen war. Der Spacer war am Boden mit 150 g Kieselgel bedeckt und an einen Vernebler (PARI BOY Jet Nebulizer, PARI GmbH, Deutschland) angeschlossen. Das Kieselgel führt durch Trocknung der Aerosoltröpfchen zu einer Verschiebung der Tröpfchengröße zu kleineren Durchmessern von ungefähr 0,4 µm. Die Lösungen wurden aus dem Probengefäß mit Luftdruck vernebelt (3-6 ml/min.), wobei synthetische Luft mit 5% CO<sub>2</sub> verwendet wurde, um die Atmungsfrequenz der Mäuse und somit die Genexpression zu erhöhen [118].

Fünf Mäuse jeder Gruppe erhielten 2h nach der Vernebelung 1 mg Dexamethason (Dexamethason-ratiopharm, 4 mg Ampullen, Deutschland) intraperitoneal.

### 2.8.3 *In Vivo* Luziferasedetektion mit dem Xenogen Ivis-100 System

24 h nach der i.v. Applikation von Safeplexen bzw. nach PEI-pEGFP<sub>LucGRE</sub><sub>0-2</sub> Aerosolapplikation wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Medetomidine (11.5 µg/kg), Midazolam (115 µg/kg) und Fentanyl (1.15 µg/kg) intraperitoneal narkotisiert und jeder Maus wurden 3 mg Luziferin (Synchem OHG, Felsberg / Altenburg, Deutschland) in 100 µl wässriger Lösung (pH=7,4) ebenfalls intraperitoneal injiziert. Zehn Minuten nach der Luziferinapplikation wurde die Luziferaseaktivität im IVIS-100 Imaging System (Xenogen, Alameda, CA, USA) bestimmt. Dazu wurde jeweils eine Maus auf dem Rücken auf einer elektronisch verstellbaren Platte in der beheizten Aufnahmekammer (37°C) des IVIS-100 platziert. Folgende Kameraeinstellungen wurden für die Aufnahme gewählt: Der Aufnahmeausschnitt wurde mit Hilfe der verstellbaren Platte so gewählt, dass die ganze Maus auf der Aufnahme zu sehen war (*field of view* = 10, f1 f-stop). Es wurde eine mittlere Auflösung / mittlere Sensitivität gewählt (*medium binning*). Pro Messung wurde vom IVIS-100 eine photographische Aufnahme der Maus gemacht und eine Lumineszenzaufnahme, die übereinander gelegt wurden. Die Messzeit für die Lumineszenzaufnahme (*exposure time*) betrug 5 min.

Die Lichtemission der durch *Firefly Luciferase* katalysierten Luziferin Reaktion liegt bei 530-640 nm, mit einem Peak bei 562 nm. Dieses Emissionsspektrum und die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe erlauben es, dass das Licht mehrere Zentimeter Gewebe durchdringen kann. Deshalb ist es möglich Licht zu detektieren, das von einem das Luziferase-Reporter gen exprimierenden Organ der Maus emittiert wird [119].

Nach der Messung wurde den Mäusen ein Antidot bestehend aus Atipamezol (50 µg/kg), Flumazenil (10 µg/kg) und Naloxon (24 µg/kg) verabreicht. Innerhalb von 15 min. erholten sich die Mäuse von der Narkose. Die erhaltenen Luziferaseexpressionsdaten wurden mit der *Living Image Software* (Xenogen, New Jersey, USA) ausgewertet.

## 2.9 Vernebelung und intranasale Instillation von PEI Genvektorkomplexen zur Untersuchung der Clearance bzw. der Lungenfunktion

### 2.9.1 Verwendete Plasmide

Für die folgenden Versuche (2.9.2-2.9.8) wurden die Plasmide pCMVLuc, pCpGLuc und pCpG-backbone verwendet. Das Plasmid pCMVLuc kodiert wie pEGFPLuc für Luziferase vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Reportergen, siehe Kapitel 2.1). Bei den Plasmiden pCpGLuc und pCpG-backbone wurden alle bakteriellen CG-Motive ersetzt. pCpGLuc kodiert ebenfalls für Luziferase, während im zweiten CpG-depletierte Plasmid nur der leere backbone enthalten ist (pCpG-backbone). Eine Übersicht der behandelten Mäuse mit den entsprechenden Plasmiden ist in Tabelle 1 dargestellt.

Zeitpunkte der Messungen nach der Behandlung	PEI-pCMVLuc Aerosol	PEI-pCMVLuc Instillation	PEI-pCpGLuc Aerosol	PEI-pCpG-backbone Aerosol
1 h	n=5	n=5	n=5	n=5
24 h	n=5+1	n=5+1	n=5+1	N=5+1
72 h	n=5	-----	n=5	n=5
7 Tage	n=5+1	n=5+1	n=5+1	N=5+1
14 Tage	-----	-----	n=5	n=5

**Tabelle 1** In der Tabelle ist die Anzahl der Mäuse (n) dargestellt, die zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Behandlung untersucht wurden. Es wurde die Lungenfunktion der Tiere gemessen, die BAL entnommen und die Lungen der Mäuse wurden entnommen. In den Gruppen 24 h und 7 Tage wurde je eine zusätzliche Maus behandelt, um histologische Schnitte der Lunge anzufertigen.

### 2.9.2 Herstellung der Genvektorkomplexe

Für die Aerosolapplikation wurden 2 mg des entsprechenden Plasmids, mit verzweigtem PEI 25 kDa komplexiert. Der pH Wert der eingesetzten PEI Lösung betrug 7,4. Die DNA und PEI



wurden mit destilliertem Wasser auf je 4 ml verdünnt. Die Konzentrationen betragen 0,66 mg/ml und 0,5 mg/ml für PEI bzw. DNA, was einem N/P-Verhältnis von 10 entspricht. Die pCMVLuc Lösung wurde zu der PEI Lösung pipettiert und gemischt wie unter 2.8.2 bereits beschrieben. Die Endkonzentration der pDNA pCMVLuc in 8 ml wässriger Lösung betrug 0,25 mg/ml.

Für die intranasalen Instillation wurden pro Maus 50 µg pCMVLuc und verzweigtes PEI mit destilliertem Wasser auf je 25µl Volumen verdünnt, was zu Konzentrationen von 2 mg/ml pDNA und 2.6 mg/ml PEI und einem N/P-Verhältnis von 10 führte. Nachdem die Lösungen gemischt wurden betrug die Konzentration der pDNA 1 mg/ml. Die Herstellung einer so hoch konzentrierten PEI-pDNA Lösung war nur möglich, wenn der pH-Wert der eingesetzten PEI Lösung auf pH=6 abgesenkt wurde und somit die Konzentration an  $\text{NR}_2\text{H}_2^+$ -Ionen zur Komplexbildung der pDNA erhöht wurde. Zur Komplexbildung wurden die Lösungen 20 min. bei 21°C inkubiert. Die Partikelgrößen der Lösungen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt (siehe 2.8.2).

### **2.9.3 Genvektorapplikation mittels Aerosol und intranasaler Instillation**

22 bzw. 27 weibliche BALB/c Mäuse (siehe Tabelle 1) im Alter von ca. 12 Wochen inhalierten 8 ml wässriger PEI-pDNA Lösung. Eine weitere Gruppe von 22 Mäusen inhalierte destilliertes Wasser alleine. Die Vernebelung wurde so durchgeführt, wie unter 2.8.2 bereits beschrieben.

Für die intranasale Instillation wurden 17 Mäuse (siehe Tabelle 1) mit einer Mischung aus Medetomidine (11.5 µg/kg), Midazolam (115 µg/kg) und Fentanyl (1.15 µg/kg) intraperitoneal narkotisiert. 50 µl der PEI-pDNA Partikel bzw. 50 µl destilliertes Wasser wurden jeder Maus tropfenweise intranasal instilliert. Nach der Instillation des kompletten Volumens wurde den Mäusen ein Antidot bestehend aus Atipamezol (50 µg/kg), Flumazenil (10 µg/kg) und Naloxon (24 µg/kg) verabreicht. Innerhalb von 15 min. erholten sich die Mäuse von der Narkose.

### 2.9.4 Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktionsparameter der Mäuse (siehe Tabelle 1) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Andreas Flemmer und Frau Kerstin Hajek mit dem Kolbenhub-Respirator für Kleintiere, wie Kaninchen, Ratten und Mäuse, bestimmt (SAV-Flexivent, Scireq Inc, Montreal Kanada). Dabei wurden die Tiere zu den vorgegebenen Zeiten nach Inhalation bzw. nasaler Instillation durch intraperitoneale Injektion von 100 µl einer Pentobarbitallösung (Narcoren, 50 mg/kg) getötet. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Tiere untersucht. Die Trachea wurde über eine Länge von ungefähr 10 mm freipräpariert und über einen kleinen Schnitt der Luftröhre wurden die Mäuse mit einer 20-Gauge Stahlkanüle intubiert. Nach Einbindung und Fixierung der Stahlkanüle mit einem 4-0 Polyesterfaden wurde das Tier an den Kolbenhubrespirator angeschlossen und unter Beimengung von Sauerstoff zur Einatemluft beatmet.

Zur Bestimmung der Lungenmechanik diente der Respirator sowohl als Signalgeber, als auch als Messgerät. Die Atemzugvolumina wurden anhand der Dislokation des Kolbens bestimmt, der Atemwegsdruck wurde über einen *sideport* am Kolben mit Hilfe eines Drucktransducers gemessen. Vor jedem Experiment wurde eine Zweipunktkalibrierung aller Sensoren durchgeführt. Um bei der Messung für Druck- bzw. Volumenänderungen (= Flowänderungen \* Zeit) im Schlausystem bis zur Tubusspitze korrigieren zu können, wurden vor jedem Experiment alle Mess-Signale im offenen und geschlossenen System kalibriert und in der Folge vom Messalgorithmus des Gerätes berücksichtigt. Die Bewegung des Kolbens wurde über einen Computer-kontrollierten Motor (Flexivent-Software, Scireq Inc., Toronto, Kanada) gesteuert.

Die Mäuse wurden mit dem Respirator mit einer Frequenz von 120/min. volumenkontrolliert und drucklimitiert beatmet. Dabei wurde ein Tidalvolumen der Maus von  $TV=10$  ml/kg, ein maximaler Druck ( $P_{max}$ ) von 30 cm H<sub>2</sub>O und ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 4 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Jede Maus wurde für 20 min. ventiliert und die Lungenmechanik wurde alle 6 min. gemessen. Durch die Position des Kolbens wurden das zugeführte Volumen, der angewendete Druck und die Stromgeschwindigkeit der Atemluft (*Flow*) bestimmt.

#### 2.9.4.1 Quasi-Statistische Lungencompliance und Resistance

Die quasi-statische Lungencompliance ( $C_{rs}$ ) wurde mittels einer langsamen In- und Expiration mit einem Tidalvolumen von 10 ml/kg und einer Frequenz von 2/ Minute über 2 Atemhübe bestimmt. Die quasi-statische Compliance wurde dabei zu jedem Zeitpunkt als Verhältnis von Volumeänderung / Druckänderung mittels multipler Regression bestimmt. In gleicher Weise wurde die Resistance des respiratorischen Systems ( $R_{rs}$ ) als Verhältnis von Druckänderung pro Flow gemessen.

#### 2.9.4.2 Totale Lungen-Volumen-Kapazität

Die totale Lungen-Volumen-Kapazität (TLC) wurde auf folgende Art gemessen: Die Lunge wurde kurz entleert und nachfolgend langsam in 3 s aufgebläht bis zu einem maximalen Druck von 30 cm H<sub>2</sub>O. Der Druck wurde für weitere 3 s aufrechterhalten, in denen das Lungenvolumen ein Plateau erreichte. Dieses end-inspiratorische Volumen wurde gemessen und entspricht der TLC.

#### 2.9.4.3 Forcierte Oszillation

Der Kolbenhubrespirator ist zudem Signalgeber für die Messung der forcierten Oszillation (FOT). Bei der forcierten Oszillation generiert ein computergesteuerter Signalgeber, hier der Kolbenhubrespirator, ein pseudo-randomisiertes oszillatorisches Signal über 8 s, mit einer Amplitude von 3 ml/kg und Frequenzen von 0,5 bis 19,6 Hz [120]. Dieses Signal induziert in der Lunge eine charakteristische, messbare Schwingung in Abhängigkeit von der Frequenz des eingebrachten Signals. Diese, als „Input-Impedance“ bezeichnete Schwingung lässt sich mit Hilfe der Messungen von Druck und Flow in die Lunge beschreiben. Sie wird mit  $Z_{rs}$  bezeichnet und kann im Frequenzraum mit zwei Größen beschrieben werden: *Resistance* ( $R_{rs}$ ) und *Reactance* ( $X_{rs}$ ) des respiratorischen Systems (Abb. 8). Nach Analyse der Impedanz im Frequenzraum erhält man nach einer Fast-Fourier Transformation die lungenmechanischen Messgrößen *Resistance* ( $R_{aw}$  oder  $R_n = \text{Newtonian Resistance}$ ) entsprechend dem Widerstand der peripheren Atemwege, Gewebedämpfung ( $G_{tiss}$ , [cmH<sub>2</sub>O/ml]), als Maß der resistiven Kräfte des

Lungengewebes und *Elastance* ( $H_{tiss}$ , [cmH<sub>2</sub>O/ml]), entsprechend den elastischen Kräften der Lunge. Dabei repräsentiert der niederfrequente Bereich der *Resistance* die resistiven Kräfte des Lungenparenchyms (Dämpfung). Der hochfrequente Bereich bildet dagegen die peripheren Atemwegwiderstände ( $R_{aw}$ ) ab. Zusätzlich kann man sagen, dass die niederfrequenten Impedanzdaten der *Reactance* als Maß für die elastischen Kräfte, die hochfrequenten Daten als Maß für die inerten Kräfte (also die Gasbeschleunigung,  $I_{aw}$ ) gelten. Da bei unseren Untersuchungen  $I_{aw}$  aber nur eine untergeordnete Rolle spielte, werden diese Kräfte im Weiteren vernachlässigt.

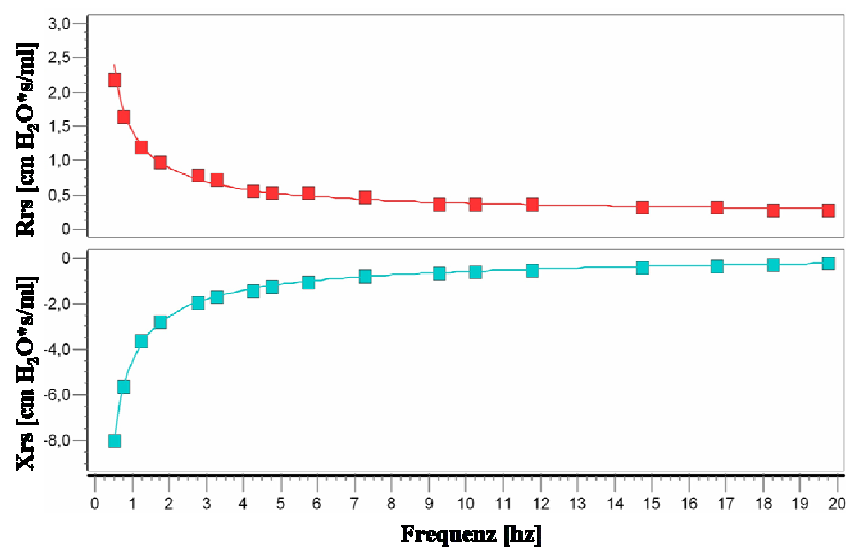


Abb. 8 Beispiel einer Impedanz-Kurve

Die Grafik zeigt den Kurvenverlauf der Impedanz im Frequenzraum mit den beiden Komponenten *Resistance* und *Reactance*.

### 2.9.5 Broncho-Alveoläre-Lavage (BAL)

Die Broncho-Alveoläre-Lavage wurde an den Mäusen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Aerosolapplikation bzw. intranasalen Instillation durchgeführt. Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 100 µl einer Pentobarbitallösung (Narcoren) entsprechend 50 mg pro kg Körpergewicht getötet, intubiert und die Lungen wurden mit 10x0,7 ml Aliquots PBS

lavagiert. Die vereinigte Waschflüssigkeit wurde für 10 min. bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde von Überstand getrennt und in 500 µl PBS resuspendiert. 100 µl wurden für den Zytospin verwendet, 200 µl für die Quantifizierung der pDNA mittels Real Time PCR und 200 µl für die Luziferasemessung. Der Überstand der BALF (ca. 6,5 ml) wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **2.9.6 Zellzählung**

Die Zahl der Zellen, die durch die BAL gewonnen wurden, wurde in einer Haemozytometer-Kammer bestimmt. Mit 200 µl der resuspendierten Zellen der BALF wurden durch Zentrifugation bei 900 rpm für 10 min. Zytospin-Slides hergestellt, die dann bei 22°C getrocknet wurden. Die Präparate wurden mit May-Grünwald und Giemsa entsprechend der Standardprozedur für Blutproben angefärbt. Für die Quantifizierung des Verhältnisses der verschiedenen Zelltypen wurden 500 Zellen in unterschiedlichen Betrachtungsfeldern gezählt. Die drei Hauptzelltypen Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophile wurden berücksichtigt und die Zählung einzeln für jedes Versuchstier durchgeführt.

Für die Bestimmung der aktivierten Makrophagen wurden die Zellen auf frisch hergestellten Zytospin-Slides mit Benzidindihydrochlorid fixiert und nach der Methode von Kaplow [121] mit Myeloperoxidase und Giemsa gefärbt. 500 Makrophagen wurden in verschiedenen Betrachtungsfeldern gezählt und der Level der aktivierten Makrophagen wurde bestimmt.

### **2.9.7 Lungenentnahme und Aufarbeitung**

Nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation, BAL und Lungenfunktionsmessung wurden die Mauslungen entnommen. Nach medianem Hautschnitt am Bauch wurde die Haut stumpf vom Bauchmuskel abpräpariert. Anschließend wurde der Bauchmuskel median durchtrennt und damit das Peritoneum eröffnet. Die Vena cava inferior wurde durch einen Schnitt komplett durchtrennt und 1 ml einer isotonischen Kochsalzlösung direkt in den rechten Ventrikel injiziert, um die Lungen von Blut zu reinigen. Dies ist nötig, da die Luziferase-Aktivität durch Blutbestandteile, vor allem Hämoglobin (Colin *et al.*, 2000) beeinflusst wird und folglich die

Ergebnisse verändert. Die Lunge wurde entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung gelagert. Mörser und Pistill wurden in flüssigem Stickstoff gekühlt bevor durch aus den einzelnen gefrorenen Lungen ein homogenes Pulver hergestellt wurde. Das Pulver wurde wiederum bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.9.8 Histologie**

Die Mauslungen wurden zu bestimmten Zeitpunkten (siehe Tabelle 1) nach der Aerosolapplikation bzw. intranasalen Instillation mittels kardialer Perfusion mit 1-5 ml einer heparinisierten isotonischen Kochsalzlösung (25000 I.E. Heparin/1000 ml) gewaschen. Anschließend wurden die Lungen mittels einer Perfusion von 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Paraffinschnitte einer Dicke von 6  $\mu\text{m}$  wurden von Frau Charell im Pathologischen Institut der LMU unter Leitung von Frau PD Dr. Iris Bittmann angefertigt. Die Schnitte wurden kurz mit Hämatoxylin (Gill no.3, Sigma) angefärbt bevor sie mit einem Deckglas abgedeckt wurden. Die Histologie der Lungen wurde auf inflammatorische Zellen und Gewebeeinflammation sowie Gewebeschäden hin doppelblind mikroskopisch untersucht. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde ein Axioplan 2 Mikroskop mit dem Programm Axiovision und einem 20x oder 40x Objektiv (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

## **2.10 Bestimmung der pDNA in Mauslungenkompartimenten mittels *Real Time* PCR**

### **2.10.1 DNA-Extraktion aus Lungengewebe oder Zellen der BALF**

25 mg des im Abschnitt 2.9.7 beschriebenen Lungenpulvers wurden zur Isolation der Gesamt-DNA (genomische DNA + applizierte pDNA) mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei wurde das Pulver über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  in Puffer mit Proteinase K verdaut (Denaturierung der Proteine) und die DNA nach Angaben des Qiagen-Manuals extrahiert.

Im Falle der resuspendierten Zellen der BALF wurden 200  $\mu\text{l}$  der Proben in 180  $\mu\text{l}$  Puffer mit 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K wiederum bei  $55^{\circ}\text{C}$  über Nacht verdaut und die DNA weiter wie oben

beschrieben extrahiert. Für die DNA Isolierung aus dem Überstand der BALF wurden 1300 µl Überstand in Micropore YM-3 Spin Columns (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) zu 300 µl aufkonzentriert. Ein Verdau von Zellen oder Gewebe war im Fall der pDNA Detektion im Überstand der BALF nicht nötig.

Die isolierte Gesamt-DNA wurde dann 3h bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease XbaI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) entsprechend des Herstellerprotokolls verdaut, um die in den Proben vorhandene pDNA zu linearisieren. Nach dem Verdau wurden die DNA-Proben mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

### 2.10.2 Quantitative *Real-time* PCR

Die quantitative Analyse der pDNA pCMV-Luc wurde im *iCycler IQ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die Akkumulationsrate der amplifizierten pDNA wurde durch kontinuierliche Messung der *SYBR Green I* (asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, 2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation) Fluoreszenz bestimmt. Primer wurden für die luziferase-kodierende Region des Plasmids pCMV-Luc designed. Die Sequenzen der Primer waren: forward 5'-TCCATCTTCCAGGGATACG-3', was den Nukleotiden 1751-1770 des pCMV-Luc entsprach und reverse 5'-ATCCAGATCCACAACCTTCG-3', entsprechend der Nukleotide 1872-1891 des Plasmids.

Die *Real-time* PCR wurde in Triplikaten mit 80 ng Gesamt-DNA pro 50 µl Reaktion und iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) durchgeführt. Für die Standardkurve wurde pCMV-Luc wie im letzten Absatz des Kapitels 2.10.1 beschrieben mit der Restriktionsendonuklease XbaI linearisiert und Verdünnungen der Konzentrationen 1 ng; 0,1 ng; 0,01 ng; 0,001 ng und 0,0001 ng/µl hergestellt. 2,5 µl jeder Verdünnung wurden in jeder *Real-time* PCR verwendet. Die PCR-Konditionen waren wie folgt: 95°C für 4 min., 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 60°C für 1 min. Eine Schmelz-Kurven-Analyse zur Beurteilung der PCR-Produkte wurde sofort nach der

Amplifikation durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur in 80x10 s Schritten je um 0,5°C erhöht, angefangen bei 55°C. Die Daten wurden mit der *Optical System Software* Version 3.1 (Bio-Rad) analysiert.

### **2.11 Luziferaseaktivitätsmessung im Lungengewebe mit dem Röhrenluminometer**

Für die Messung der Luziferaseaktivität wurde Lungenpulver in 400 µl Lysepuffer suspendiert, gevortext und auf Eis für 15 min. inkubiert. 10x Lysepuffer bestand aus 15,1 g Tris-HCl in 50 ml destilliertem Wasser, pH 7,8; 0,5 g Triton X-100 und einer Tablette *Complete Protease Inhibitor Mix* (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Schweiz). Nach der Inkubation auf Eis und erneutem Vortexen wurden die Proben bei 10.000 g und 4°C für 10 min. zentrifugiert. 2x100 µl des Überstands jeder Probe (Doppelbestimmung) wurden in Messröhrchen pipettiert und in einem Lumat LB9507 (Berthold, Bad Wildbach) vermessen. Dabei wurden 100 µl Luziferin-Substrat-Puffer (60 mM DTT, 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM ATP, 30 µM Luziferin in 25 mM Glycyl-Glycin Puffer, pH 7.8) automatisch in die Proben injiziert und die über 10 s emittierten Photonen (RLU, *Relative Light Units*) nach der Injektion gemessen. Die RLU-Werte der Proben wurden von einem Hintergrundwert abgezogen, der jeweils vor der Luziferin-Injektion gemessen wurde. Die Proben wurden während der Aufarbeitung kühl gehalten, da die Luziferase-Aktivität mit steigender Temperatur schnell abnimmt.

Für die Luziferase-Aktivitäts Messung der BALF Zellen wurden 20 µl 10x Lyse-Puffer zu den in 200 µl PBS suspendierten Zellen gegeben. Die Proben wurden auf Eis inkubiert, zentrifugiert und wie oben beschrieben gemessen.

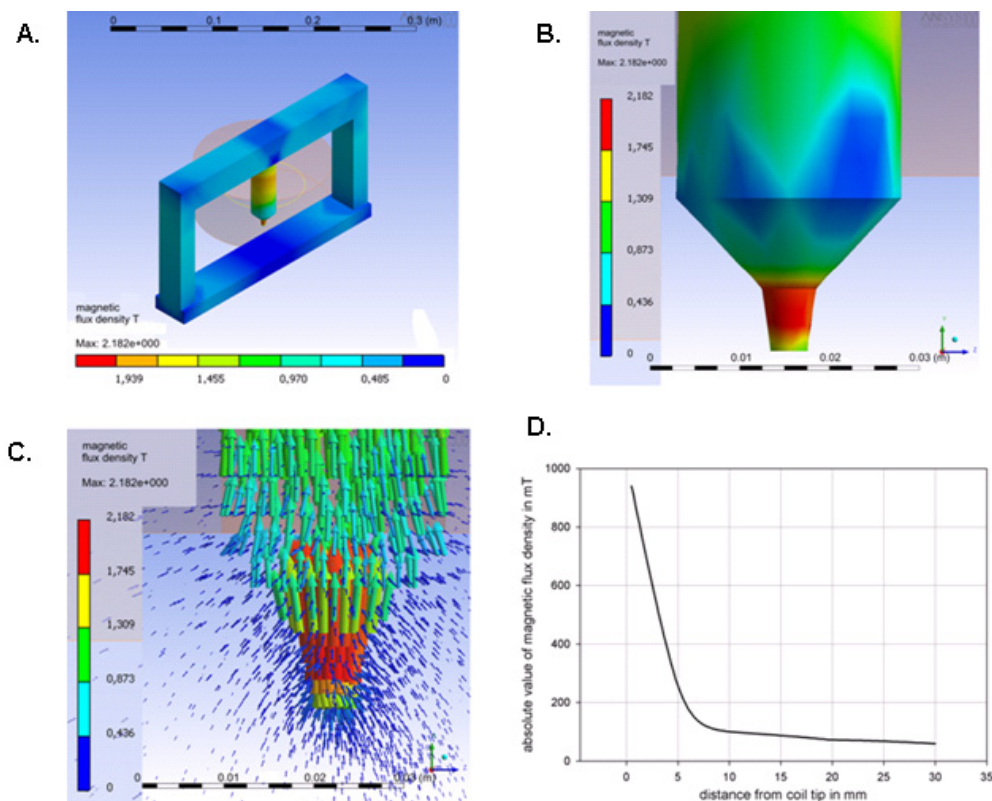


## 2.12 Versuche mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPION)

### 2.12.1 Konstruktion eines Elektromagneten

Von Herrn Dr. Bernhard Gleich am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik der Technischen Universität in München wurde ein maßgeschneiderter Elektromagnet konstruiert, mit dem ein starkes inhomogenes Magnetfeld erzeugt werden konnte, das für die Anziehung der superparamagnetischen Nanopartikel nötig ist.

Der Elektromagnet bestand aus einem Eisenmantel mit einer äußeren Größe von 250 x 160 cm (Abb. 9). Der Eisenmantel bestand aus extra reinem Eisen (Armco Telar 75S, Remag AG, Deutschland) und die Spitze aus einer Eisen-Kobalt Legierung (Vacuflux 50, Vacuumschmelze Hanau). Der Vorteil beider Materialien ist, dass eine hohe magnetische Flussdichte erforderlich ist, bis eine magnetische Sättigung erreicht wird (extra reines Eisen ca. 2T (Tesla), Vacuflux ca. 2,4T). Das Innere der Magnetspitze bestand aus 800 Windungen isoliertem Kupferdraht (1 mm Durchmesser). Der Magnet wurde für einen Strom von 5 Ampere (A) konstruiert und die Magnetspitze ist austauschbar. Die kegelförmige Magnetspitze führt zu einem hohen Magnetfeldgradienten, der mit zunehmendem Abstand von der Spulenspitze in einem zweiphasigen Kurvenverlauf abnimmt. Der Magnetfeldgradient betrug  $\nabla B > 100$  T/m in unmittelbarer Nähe ( $< 6$ mm) zur Magnetspitze, wobei der Gradient mit zunehmendem Abstand auf Werte unter  $\nabla B < 60$  T/m sank.



**Abb. 9 Konstruktion des Elektromagneten und Magnetfeldgradient der kegelförmigen Magnetspitze**

In Abb. A. ist der Elektromagnet dargestellt, wobei die Spule als transparenter Zylinder gezeigt wird. Die Stärke des magnetischen Feldgradienten ist als *Multicolor Plot* gezeigt. In Abb. B. sieht man die Magnetspitze und in C. die Kräfte, die an der Spitze auf die SPION wirken. Im Diagramm D. ist der Magnetfeldgradient in Abhängigkeit des Abstandes zur Magnetspitze aufgetragen.

### 2.12.2 Computer-unterstützte Simulation der magnetfeldgesteuerten Aerosolapplikation

Die Parameter des unter 2.12.1 beschriebenen Elektromagneten wurden auch für die Computer-unterstützte Simulation des magnetischen Aerosoltargetings verwendet. Mit Matlab R14 wurden von Herrn Dr. Bernhard Gleich Flugbahnen von Aerosoltröpfchen und die resultierende Kraft, die an jeder Position P auf ein Aerosoltröpfchen wirkt, berechnet. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in der Dissertation von Herrn Dr. Bernhard Gleich [122].

### 2.12.3 Intratracheale Aerosolapplikation und Lungenfunktionsmessung

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) wurden freundlicherweise von der Firma Chemicell GmbH in Berlin zur Verfügung gestellt. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen (Beckmann Counter *submicron analyzer* N5) und betrug 80 nm. Dabei betrug der Durchmesser des Eisenoxidkernes 50 nm, bestehend aus 5 nm großen einzelnen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel mit einer Packungsdichte von 30%. An der Oberfläche des Eisenoxidkernes war eine 15 nm PEI 25 kDa Schicht adsorbiert.

Acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und mindestens sieben Tage vor dem Start der Experimente aklimatisiert. Die Mäuse wurden intubiert und mit dem FlexiVent System beatmet wie in Kapitel 2.9.4 bereits beschrieben. Die Lungenfunktion der Mäuse wurde ebenfalls bestimmt. Ca. 0,8 ml einer wässrigen Lösung der SPION ( $c=12,5$  mg/ml; 2930 SPION per Tröpfchen) wurden während der kontrollierten Beatmung mit einem Ultraschallvernebler (Aeroneb® Lab Micropump Nebulizer, Nektar Therapeutics, Mountain View, Ca, USA) in die Mauslungen vernebelt. Der Ultraschallvernebler war mit 3-Wege Ventilen zu der Respirator-Einheit parallel geschaltet. Zwanzig 10 s Aerosol-Gaben der SPION Lösung wurden in jede Mauslunge vernebelt.

In einem ersten Versuchsaufbau wurde der Thorax der Mäuse operativ entfernt (siehe Tabelle 2, 3 Mäuse mit Magnet und 3 Mäuse ohne Magnet) und die Magnetspitze direkt über dem rechten Lungenflügel platziert, ohne das Gewebe zu berühren (1 mm Abstand). In einem weiteren Set von Experimenten wurde die Magnetspitze direkt über dem Fell des rechten Thorax auf der Höhe des mittleren Lungenlappens positioniert (siehe Tabelle 2, 3 Mäuse mit Magnet und 3 Mäuse ohne Magnet). Der Abstand der Magnetspitze vom Lungengewebe vergrößerte sich dabei notwendigerweise auf ca. 2-3 mm. Die magnetische Flussdichte wurde auf 1,0 T eingestellt, was zu einem Feldgradienten von  $\nabla B > 100$  T/m über der Lungenoberfläche führte. Am Ende der Vernebelung wurden rechte und linke Lungenflügel getrennt entnommen.

Weitere Mäuse (siehe Tabelle 2, 3 Mäuse mit Magnet und 3 Mäuse ohne Magnet) inhalierten SPION zusammen mit pCMVLuc, um die Menge der deponierten pDNA in den Lungenflügeln mittels *Real Time* PCR zu bestimmen (siehe Kapitel 2.12.5). Vor der Vernebelung wurde eine wässrige pCMVLuc Lösung (c=1,25 mg/ml) mit SPION (c=25 mg/ml) in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt. Ca. 0,8 ml der wässrigen Lösung der SPION (c=12,5 mg/ml) zusammen mit pDNA (c=0,625 mg/ml; Verhältnis pDNA zu SPION=1:20) wurden während der kontrollierten Beatmung mit dem Ultraschallvernebler in die Mauslungen vernebelt wie oben beschrieben.

	Magnetfeld (Elektromagnet)	Histologie	Magnet- relaxometrie	SPION PEI- pDNA
<b>Offener Thorax</b>	+	n=1	n=5	----
	-	n=1	n=5	----
<b>Geschlossener Thorax</b>	+	----	n=5	n=3
	-	----	n=5	n=3

**Tabelle 2** In der Tabelle ist die Anzahl der Mäuse (n) dargestellt, die intubiert wurden und SPION inhalierten bzw. SPION zusammen mit PEI-pDNA.

#### 2.12.4 Aerosolapplikation von PEI-pDNA Partikeln in Kombination mit SPION an Mäuse in der Vernebelungskammer

Für die Aerosolapplikation wurden 2 mg oder 1 mg Plasmid mit verzweigtem PEI 25 kDa komplexiert wie auch in Kapitel 2.9.2 beschrieben. Der pH Wert der eingesetzten PEI Lösung betrug 7,4. Die DNA und PEI wurden mit destilliertem Wasser auf je 2,5 ml verdünnt. Wenn 1 mg pDNA zur Vernebelung eingesetzt wurden, wurden 2,5 ml der PEI-Verdünnung (c=0,5 mg/ml) und 2,5 ml der pDNA-Verdünnung (c=0,4 mg/ml) (N/P-Verhältnis=10) gemischt. 5 ml dieser PEI-pDNA Lösung wurden zu 5 ml SPION (c=25 mg/ml) pipettiert und gemischt. Die Endkonzentration der pDNA in 10 ml wässriger Lösung betrug 0,1 mg/ml (Verhältnis pDNA zu

SPION=1:125).

Wenn 2 mg pDNA zur Vernebelung eingesetzt wurden, wurden 2,5 ml einer wässrigen PEI-Lösung mit einer Konzentrationen von 1 mg/ml und 2,5 ml einer wässrigen pDNA-Lösung mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml (N/P-Verhältnis=10) gemischt. 5 ml dieser PEI-pDNA Lösung wurden zu 5 ml SPION (c=6,25 mg/ml) pipettiert und gemischt. Die Endkonzentration der pDNA in 10 ml wässriger Lösung betrug 0,2 mg/ml (Verhältnis pDNA zu SPION=1:15).

Weibliche BALB/c Mäuse (siehe Tabelle 3) im Alter von ca. 12 Wochen inhalierten 10 ml der wässrigen PEI-pDNA Lösung zusammen mit SPION. Die Vernebelung wurde durchgeführt, wie unter 2.8.2 bereits beschrieben. Als externes Magnetfeld wurde ein kleiner, würfelförmiger (10 mm<sup>3</sup>) Permanentmagnet (500 mT) mit Gewebekleber am Fell der Mäuse über der Lunge angebracht.

<b>Magnetfeld (Permanentmagnet)</b>	<b>pEGFPLuc (1 mg)</b>	<b>pCMVLuc (2 mg)</b>
-	n=3	n=3
+	n=3	n=3

**Tabelle 3** In der Tabelle ist die Anzahl der Mäuse (n) mit oder ohne Permanentmagnet dargestellt, die PEI-pDNA zusammen mit SPION in der Vernebelungskammer inhalierten.

Nach der Aerosolbehandlung wurden die Lungen entweder für die Histologie präpariert wie in Kapitel 2.9.8 beschrieben. Es wurden Paraffin-Schnitte von Frau Charell im Pathologischen Institut der LMU angefertigt, um SPION mittels Berliner-Blau-Färbung zu detektieren.

Bei weiteren Mäusen wurden die Lungen operativ entfernt und zu einem Lungenpulver verarbeitet wie in Kapitel 2.9.7 beschrieben. Danach wurde die pDNA Menge in den Proben

mittels *Real Time* PCR bestimmt (Kapitel 2.10) und mittels Magnetrelaxometrie wurde die Menge an SPION in den Proben von Dr. Frank Wiekhorst an der physikalisch-technischen Bundesanstalt in Berlin wie folgt detektiert.

### **2.12.5 Magnetrelaxometrie**

Die Anzahl der SPION wurde von Herrn Dr. Frank Wiekhorst aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Trahms der Physikalisch Technischen Bundesanstalt in Berlin mit einem SQUID-Sensor mit Magnetrelaxometrie bestimmt [123]. Dazu wurden Teile des Lungenpulvers (siehe Kapitel 2.12.5) mit einem Volumen von ca. 100  $\mu$ l mit einem ein-kanaligen superparamagnetischen Interferenz-Gerät (SQUID) in einem magnetisch abgeschirmten Raum gemessen. Dabei wird ein magnetisches Feld angelgt, nach dem sich das magnetische Moment der SPION ausrichtet. Ein helium-gekühlter SQUID-Sensor detektiert die mit der Zeit veränderte magnetische Induktion, die von der magnetischen Relaxation der SPION generiert wird, kurz nachdem das magnetische Feld ausgeschaltet wird. Mit einem Abstand zwischen Probe und Sensor von weniger als 10 mm ist dieses System für hochauflösende Messungen optimiert, wobei Änderungen des Magnetfeldes von 1 pT Flussdichte detektiert werden können. Das Messsignal ist direkt proportional zu der Menge an SPION in den Proben. Die Amplituden der Messsignale wurden mit den Signalen von Referenzmessungen mit bekanntem SPION Gehalt verglichen. Das Detektionslimit für die magnetischen Nanopartikel liegt bei ungefähr 1 ng Eisen.

### **2.12.7 *In vitro* Magnetofektionen mit SPION**

Vor der Transfektion wurden die BEAS-2B Zellen in MEM und 10% FCS kultiviert wie unter 2.2 beschrieben. Die Transfektionen wurden in 24-Well Platten durchgeführt (TPP, Peske). Einen Tag vor der Transfektion wurden pro Well 100.000 Zellen ausgesät, so dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80% erreicht war.

Pro Well wurden 0,5  $\mu$ g pCMVLuc zur Transfektion eingesetzt. Die Transfektionen wurden als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die Komplexe wurden durch die entsprechenden dreifachen Volumina generiert. 62,5  $\mu$ l pDNA Lösung wurden zu 62,5  $\mu$ l verzweigtem PEI

pipettiert (N/P=10) und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Zu 125 µl SPION mit verschiedenen Konzentrationen (2,4 mg/ml; 1,8 mg/ml; 1,2 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,3 mg/ml) wurden je 125 µl der PEI-pDNA Lösung gegeben, was in Verhältnissen von SPION zu pDNA zwischen 60:1 und 7,5:1 resultierte. 250 µl dieser Gentransferkomplexe wurden in jedes Well mit Zellen in 600 µl serumfreiem MEM Medium pipettiert und auf einer Magnetplatte 15 min. bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach 15 min. wurden die Komplexe von den Zellen entfernt, mit PBS gewaschen und für weitere 24 h ohne externes Magnetfeld in serumhaltigem Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer (250 mM Tris; 0,1% Triton; pH=7,8) pro Well 10 min. bei Raumtemperatur lysiert. Die Platten wurden mit Folie zugeklebt und bis zur Luziferase-Aktivitätsmessung bei -80°C eingefroren.

#### **2.12.8 Freisetzung der pDNA aus PEI-pDNA-SPION-Mischungen**

Durch das Polyanion Heparansulfat lässt sich pDNA kompetitiv aus PEI-pDNA Komplexen verdrängen. Nach Inkubation von Gentransferkomplexen mit Heparansulfat, wandert freie pDNA im elektrischen Feld (Agarosegelelektrophorese) und indiziert eine Dekomplexierung aus den PEI-pDNA Komplexen.

In zwei *Tubes* wurden je 15 µl PEI-pDNA (0,3 µg pDNA) mit 15 µl SPION (0,6 µg) gemischt, 5 µl Heparansulfat (20 mg/ml) dazu pipettiert und für 20 min. bei 21°C inkubiert. In einem *Tube* wurden vor der Inkubation mit Hilfe eines Permanentmagneten die SPION separiert. Ein 0,8%iges Agarosegel wurde hergestellt wie in Kapitel 2.1 bereits beschrieben. Zum Überstand bzw. zu der ungefällten Mischung wurden 5 µl Bromphenolblau-*Loading-Buffer* (siehe Kapitel 2.1) gegeben und je 30 µl wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Kontrolle wurden auch SPION alleine mit Bromphenolblau-*Loading-Buffer* gemischt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Das Gel wurde für 2h bei 90 V laufen gelassen.

### **2.13 Größenmessung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und Bestimmung des Zetapotentials**

Die Größen von PEI-pDNA Partikeln wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und die Zetapotenziale elektrophoretisch mit einem Zetasizer 3000HS (Zetasizer, Brookhaven Instrument Corporation, ZetaPALS Particle Software Ver. 3.42) bestimmt.

Für die Größenbestimmung wurden jeweils 600 µl der Lösungen in eine Plastikkuvette pipettiert und über 10 min. die dynamische Laserlicht-Streuung gemessen. Das Messprinzip beruht auf der Brown'schen Molekularbewegung der Teilchen. Bei gleicher Temperatur bewegen diese sich umso schneller, je kleiner sie sind. Das gestreute Licht wird von einem Photomultiplier detektiert. Wenn größere Teilchen vorhanden sind, bleibt die gemessene Lichtintensität (Streurate) für eine längere Zeit konstant. Verändert sich die Lichtintensität innerhalb kürzester Zeit, so sind die Teilchen klein. Die zeitliche Verteilung der Detektionsereignisse erlaubt dann, auf die Größe der streuenden Teilchen und somit die Partikelgrößenverteilung der Probe zu schließen.

Zetapotenziale von PEI-pDNA Komplexen in wässriger Lösung wurden elektrophoretisch bestimmt. Bei der Elektrophorese bewegen sich beim Anlegen eines elektrischen Feldes die Partikel in der wässrigen Phase. Die Messung der Partikelgeschwindigkeit (EM, elektrophoretische Mobilität) erlaubt die Berechnung der „Nettoladung“ des Partikels (Zetapotential) und seines Oberflächenpotentials relativ zur umgebenden Phase. Für die Zetapotentialmessung wurde jeweils 1 ml der zu vermessenden Probe in eine Plastikkuvette pipettiert. Eine Palladiumelektrode wurde in die Lösung eingetaucht und in das Gerät eingesetzt. Die folgenden Einstellungen wurden verwendet: 10 Messungen à 30 s wurden pro Probe durchgeführt; die Viskosität von Wasser als Dispersionsmedium bei Messtemperatur betrug 0,0089 P (Poise); die Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums bei Messtemperatur betrug 80,8 und die Messtemperatur 25°C. Das Zetapotential wurde nach Smoluchowski berechnet.



**2.14 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden mit einem nicht gepaarten  $t$ -Test auf statistische Signifikanz untersucht. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn  $p \leq 0,05$  war (wenn nicht anders angegeben). Für den statistischen Vergleich zwischen rechter und linker Lunge einer Gruppe wurde ein gepaarter  $t$ -Test verwendet. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn  $p \leq 0,05$  war (wenn nicht anders angegeben). Alle statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.