

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Identifizierung und Optimierung kritischer Schritte bei der Transfektion
eukaryontischer Zellen

Michael Schurig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landwirtschaft und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. apl. Prof. Dr. W. J. Neubert

Die Dissertation wurde am 24.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landwirtschaft und
Umwelt am 13.10.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	- 4 -
2 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	- 6 -
2.1 ANWENDUNGEN DER TRANSFEKTION	- 7 -
2.2 METHODEN DER TRANSFEKTION	- 9 -
2.2.1 <i>viraler Gentransfer als Modell der Transfektion</i>	- 10 -
2.2.2 <i>Physikalische Transfektionsmethoden</i>	- 13 -
2.2.3 <i>Chemische Transfektionsmethoden</i>	- 15 -
2.2.3.1 Kationische Polymere.....	- 15 -
2.2.3.2 Kationische Lipide	- 17 -
2.3 ABLAUF DER LIPOFEKTION	- 21 -
2.3.1 <i>Kritische Schritte bei der Lipofektion</i>	- 24 -
2.3.2 <i>Verwendung von Peptiden zur Verbesserung der Lipofektion</i>	- 27 -
2.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	- 29 -
3 MATERIAL UND METHODEN	- 31 -
3.1 MATERIAL.....	- 31 -
3.1.1 <i>Laborgeräte</i>	- 31 -
3.1.2 <i>Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial</i>	- 32 -
3.1.3 <i>Plasmid DNA</i>	- 33 -
3.1.4 <i>verwendete Peptide</i>	- 33 -
3.1.5 <i>verwendete Lipide</i>	- 34 -
3.1.6 <i>Verwendete Kits</i>	- 35 -
3.1.7 <i>Verwendete Puffer und Lösungen</i>	- 35 -
3.1.8 <i>verwendete Zelllinien</i>	- 36 -
3.1.9 <i>Zellkulturmedien</i>	- 36 -
3.2 METHODEN	- 37 -
3.2.1 <i>Herstellung von Plasmid DNA</i>	- 37 -
3.2.2 <i>Zellkultur</i>	- 39 -
3.2.3 <i>Umgang mit Peptiden</i>	- 40 -
3.2.4 <i>Herstellung von Liposomen aus Dotap, Dope und/oder Cholesterin</i>	- 41 -
3.2.5 <i>Bindung von Peptiden an DNA</i>	- 42 -
3.2.6 <i>Herstellung von DNA/Peptid/Lipid-Komplexen</i>	- 42 -
3.2.7 <i>Transfektion von Zellen</i>	- 44 -
3.2.7.1 <i>Elektroporation</i>	- 44 -
3.2.7.2 <i>Lipofektion</i>	- 45 -

3.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz	- 46 -
3.2.8.1 Bestimmung der Expressionsstärke (SEAP).....	- 47 -
3.2.8.2 Bestimmung der Transfektionsrate (GFP)	- 48 -
3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie	- 48 -
3.2.9.1 Herstellung markierter DNA und markierter Lipide.....	- 48 -
3.2.9.2 Zellkernfärbung	- 49 -
3.2.9.3 Wasch- und Verdauschritte.....	- 50 -
3.2.10 PicoGreenAssay.....	- 50 -
3.2.11 In-Vitro-Transkription	- 52 -
3.2.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	- 52 -
3.2.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	- 53 -
3.2.14 Ligation von DNA-Fragmenten	- 53 -
3.2.15 Agarose-Gelelektrophorese	- 53 -
3.2.16 Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegel	- 54 -
3.2.17 Fusogenitätsassay.....	- 54 -
4 ERGEBNISSE	- 57 -
4.1 ERMITTLUNG DER OPTIMALEN TRANSFEKTIONSBEDINGUNGEN	- 58 -
4.1.1 Zellen	- 58 -
4.1.2 Lipofektion.....	- 61 -
4.1.3 Elektroporation.....	- 65 -
4.2 IDENTIFIZIERUNG DER HÜRDEN EINER TRANSFEKTION	- 66 -
4.2.1 Screening Lipofektion	- 66 -
4.2.2 Genetracking	- 72 -
4.2.2.1 Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen	- 73 -
4.2.2.2 Transport der DNA in den Zellkern.....	- 78 -
4.2.2.3 Phänomen der „falsch negativen“ und „falsch positiven“ Zellen.....	- 80 -
4.2.3 Transkribierbarkeit der DNA im Zellkern	- 82 -
4.2.4 Quantitative Lokalisierung der DNA.....	- 83 -
4.2.5 Zusammenfassung der Identifikation kritischer Schritte	- 85 -
4.3 VERBESSERUNG DER AUFNAHME DER DNA IN DIE ZELLEN	- 86 -
4.3.1 Liganden	- 86 -
4.3.1.1 Transferrin.....	- 88 -
4.3.1.2 Integrinbindende Peptide mit RRE-Motif.....	- 90 -
4.3.1.3 Integrine mit RGD-Motif.....	- 93 -
4.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	- 94 -
4.3.3 Zusammenfassung.....	- 96 -
4.4 VERBESSERUNG DES TRANSPORT DER DNA IN DEN KERN	- 97 -
4.4.1 getestete NLS-Peptide.....	- 98 -
4.4.1.1 Lipofektion	- 99 -

4.4.1.2 Elektroporation	- 104 -
4.4.2 Zusammenfassung.....	- 105 -
4.5 VERBESSERUNG DER FREISETZUNG DER DNA AUS DEN ENDOSOMEN.....	- 106 -
4.5.1 fusogene LV-Peptide.....	- 107 -
4.5.2 Herstellung fusogener Liposomen	- 108 -
4.5.2.1 Inkorporation fusogener Peptide in Liposomen (SUV)	- 108 -
4.5.2.2 Hemifusion	- 111 -
4.5.3 Zusammenfassung.....	- 116 -
4.6 KOMBINATION VON FUSOGENEN PEPTIDEN MIT NLS-PEPTIDEN	- 117 -
4.6.1 Struktur der Komplexe für eine Kombination.....	- 118 -
4.6.2 Testen verschiedener Peptide	- 123 -
4.6.3 Testen verschiedener Lipide	- 124 -
4.6.4 Zusammenfassung.....	- 125 -
5. DISKUSSION	- 127 -
5.1 IDENTIFIZIERUNG DER HÜRDEN BEI DER TRANSFEKTION	- 128 -
5.2 BINDUNG DER TRANSFEKTIONSKOMPLEXE AN DIE ZELLEN.....	- 129 -
5.3 VERBESSERUNG DER BINDUNG VON TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN UND ZELLEN	- 131 -
5.4 TRANSPORT DER DNA IN DEN KERN	- 134 -
5.5 VERBESSERUNG DES KERNTRANSPORTES	- 135 -
5.6 FREISETZUNG DER DNA AUS DEN ENDOSOMEN	- 138 -
5.7 VERBESSERUNG DER ENDOSOMALEN FREISETZUNG	- 139 -
5.8 KOMBINATION MEHRERER STRATEGIEN.....	- 142 -
5.9 AUSBLICK	- 144 -
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 146 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 149 -

1 Zusammenfassung

Durch die vorliegende Arbeit sollte die Effizienz des *in vitro* Gentransfers bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen gesteigert werden. Hierzu mussten zunächst die für die Transfektionseffizienz maßgeblichen Schritte durch ein umfangreiches Screening verschiedener Zellen, Transfektionsreagenzien sowie unterschiedlichen Peptiden bestimmt werden. Dabei ließen sich mehrere kritische Schritte identifizieren, die die Transfektionseffizienz je nach Zelltyp unterschiedlich stark beeinflussten. So war bereits die Bindung der Transfektionskomplexe an die zu transfizierenden Zellen bei einigen Zellen problematisch und korrelierte mit der Transfizierbarkeit des jeweiligen Zelltypes. Eine Verbesserung der Bindung von Transfektionskomplex und Zelle und in deren Folge eine Steigerung der Transfektionseffizienz wurde durch Integrin bindende Peptide als Liganden ermöglicht. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten ferner, dass der Transport der durch die Zellen internalisierten DNA in den Zellkern je nach Zelltyp und Transfektionsmethode ein ineffizienter Prozess ist. Auch hier korrelierte die Transfektionseffizienz mit der ermittelten Kerntransportrate. Eine Strategie zur Verbesserung des Kerntransportes besteht in der Verwendung von peptidischen Kernlokalisationsignalen (NLS), um durch Nutzung von zellulären Transportmechanismen den Kernimport der DNA zu erleichtern. Die in den Transfektionsversuchen eingesetzten NLS-Peptide führten zu einer maximalen Steigerung der Transgenexpression um Faktor 3-4. Der Effekt war allerdings vom NLS-Peptid, dem Zelltyp sowie den verwendeten Lipiden abhängig. Elektroporationsversuche sowie die fluoreszenzmikroskopischen Daten ergaben, dass eine effiziente Freisetzung der Transfektionskomplexe aus den Endosomen für den Transport der DNA in den Zellkern und somit der Transgenexpression essentiell ist. Zur Steigerung der endosomalen Freisetzung wurden speziell designte pH abhängig fusogene Peptide verwendet, die eine 4-5fach höhere Transgenexpression erzeugten. Dabei konnte gezeigt werden, dass neben der Sequenzspezifität auch die pH abhängig einsetzende fusogene Wirkung der Peptide für die erzielte Verbesserung verantwortlich sind. Die Kombination von NLS- und fusogenen Peptiden führte zu einer weiteren Verbesserung und steigerte die Transfektionseffizienz um Faktor 10. Bei allen Versuchen zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz jeweils von der Kombination aus Transfektionsreagenz, Zelle und zusätzlich genutzten Peptiden abhängt. Die mit einem Lipid oder einer Zelle ermittelten Ergebnisse waren nicht auf andere Zelltypen oder Lipide übertragbar und verdeutlichten somit die große Bedeutung der durchgeführten, systematischen Untersuchung.

Summary

The aim of this work was to increase the efficiency of in vitro gene transfer for eukaryotic cells. To this end, different transfection reagents, cell types and various peptides were used in gene transfer to evaluate their effect on the transfection efficiency.

Multiple critical steps during the transfection process were identified, which influence strongly the transgene expression to a different degree depending on the type of cells used.

The first crucial step was the binding of the transfection complexes to the cells. For some cell lines, this adsorption was very ineffective. The ability of different cell types to bind the transfection complexes correlated with the achieved transgene expression. Integrine binding peptides were used as ligands and improved the binding between cells and transfection complexes and thus the transfection efficiency.

Gene tracking studies showed that the transport of internalized DNA into the nucleus was a critical and very inefficient process depending on the used cell line and the method of transfection. The determined rate of nuclear transport also correlated with the measured transfection efficiency of the respective cell line. One widely used strategy to overcome this barrier is the utilization of peptides containing so called nuclear localization sequences (NLS), which target the DNA to the nucleus using the cellular transport machinery. The tested NLS peptides obtained a 3 to 4fold enhanced transfection efficiency. That effect was dependent on the sequence of the NLS peptide, the cell line and the composition of the liposomes. Electroporation experiments further showed that the efficiency of endosomal release is essential for nuclear transport and therefore for transgene expression. To attain a better endosomal release, specific pH dependent fusogenic peptides were used, which enhanced the transfection efficiency 4 to 5fold. That effect was dependent on the sequence of the peptides and their property of mediate fusion only at acidic pH. The combination of pH dependent fusogenic peptides and peptides containing a NLS was a pivotal step forward and lead to an increased transfection efficiency by factor 10 due to a synergistic effect of both types of peptides.

Taken together, the describes experiments showed that the transfection efficiency generally depends on the combination of lipids, peptides and the cell type used in an assay. Conclusions drawn from experiments with only one cell line are not universally valid, a finding that underlines the importance of the systematic approach of this work.

2 Einleitung und Zielstellung

Als Transfektion wird die Infektion einer Zelle mit freier Nukleinsäure bezeichnet (Old und Primose, 1980). Durch die Transfektion von eukaryontischen Zellen ist es möglich, Gene in Organismen zu transportieren. DEAE-Dextran war eines der ersten synthetischen Polymere, die zu diesem Zweck eingesetzt wurden (Pagano und Vaheri, 1965). Diese positiv geladenen, stark verzweigten Polymere komplexieren die Plasmid-DNA und werden von den Zielzellen aufgenommen. Vor allem *in vitro* konnten bei vielen Zelllinien relativ gute Transfereffizienzen erreicht werden. Allerdings ist die Gentransfer mit DEAE-Dextran sehr zytotoxisch und eignet sich dadurch auch nicht zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien (Pari und Xu, 2004). Graham und Eb entwickelten 1973 die Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation (Graham und Eb, 1973). Dabei wird die negativ geladene DNA mit Kalziumionen ausgefällt und die dadurch entstandenen Komplexe werden von den Zellen aufgenommen (Felgner, 1999; Batard et al., 2001). Beide Methoden sind auf Anwendungen *in vitro* oder *ex vivo* begrenzt. Felgner und Mitarbeitern zeigten 1987 erstmalig die erfolgreiche Transfektion eukaryontischer Zellen mittels kationischer Lipide. Auf Grund ihrer positiven Ladung können die Liposomen DNA binden und an die zelluläre Membran adsorbieren, um von den Zellen aufgenommen zu werden (Felgner et al., 1987). 1995 wurde erstmals Polyethylenimin (PEI) zur Transfektion eukaryontischer Zellen verwendet (Boussif et al., 1995) Dabei handelt es sich um ein kationisches Polymer, dass durch seine positive Ladung, DNA komplexieren und die Bindung an die Zellmembran vermitteln kann. PEI wurde in linearer (Chemin et al., 1998; Wightman et al., 2001) und verzweigter Form (Boletta et al., 1997; Kircheis et al., 1999) für die Transfektion eingesetzt. Weitere untersuchte kationische Polymere sind Polylysine (Wagner, Zenke et al. 1990) und PAMAM Dendrimere (Haensler und Szoka, 1993). Kationische Lipide und PEI erreichten höhere Transfektionseffizienzen als DEAE-Dextran oder die Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation und sind außerdem *in vivo* einsetzbar (Pari und Xu., 2004; Alton et al., 1999; Gill et al., 1997).

Neben diesen chemischen Verfahren wurden auch physikalische Methoden für den Transfer von DNA in Zellen entwickelt. 1976 wurden die ersten menschlichen Zellen mit Glaskapillaren mikroinjiziert. Dabei konnte die Translation von mRNA's nachgewiesen werden, indem aus Enten gewonnene mRNA in menschlichen und in Mauszellen translatiert wurde. Außerdem konnte die Translation über mehrere Zellgenerationen bei injizierter Globin-mRNA nachgewiesen werden (Stacey und Allfrey, 1976). Neumann und Mitarbeiter nutzen 1982 die

Elektroporation für den Gentransfer (Neumann et al., 1982). Bei dieser Methode wird die zelluläre Membran kurzzeitig permeabilisiert, so dass freie DNA in die Zellen gelangen kann.

Ziel aller Transfektionsmethoden ist die effiziente Übertragung von genetischem Material in Zellen und deren Expression. Für diesen Transport sind Mechanismen nötig, die erreichen, dass die DNA von den Zellen aufgenommen, in den Zellkern transportiert und dort exprimiert wird (Huang et al., 1999; Martin und Rice, 2007). Jedes der erwähnten Verfahren hat verschiedene Vor- und Nachteile und ist nicht für alle Anwendungen gleichermaßen gut einsetzbar (siehe Tabelle 2.1). Trotz aller in den letzten Jahrzehnten erzielter Fortschritte und Verbesserungen ist die Transfektion eukaryontischer Zellen auch heute noch bei vielen Zelltypen problematisch und äußerst ineffizient (u.a.: Martin und Rice, 2007; Rettig und Rice, 2007; Ritter et al., 2003; Rudolph et al., 2003; Escriou et al., 2001; Groth, 2000).

2.1 Anwendungen der Transfektion

Die Möglichkeit durch Transfektion, Gene in Organismen transportieren zu können, eröffnete für Wissenschaft und Medizin eine Vielzahl neuer Methoden und Anwendungen. Die Erforschung von Genfunktionen und die Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen rückten damit in den Mittelpunkt biologischer und medizinischer Forschung. Die medizinische Anwendung der Transfektion führte zur Entwicklung der Gentherapie. Durch das Einschleusen so genannter therapeutischer Gene in erkrankte Körperzellen konnten Patienten gezielt geheilt werden (Caplen, Alton et al. 1995). In der modernen Medizin werden beispielsweise Liposomen zur Behandlung von Mukoviszidose eingesetzt. Mukoviszidose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit. Sie tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:2.500 Geburten auf und führt trotz stetig verbesserter Therapiemöglichkeiten zu einer deutlichen Reduktion der Lebenserwartung (Assael, Castellani et al. 2002). Caplen und Kollegen transfizierten durch die Verwendung von Liposomen ein korrekt funktionierendes *CFTR*-Gen. Dadurch war eine vorübergehende Korrektur des durch das fehlerhafte *CFTR*-Gen entstandenen Transportdefektes für Chlorid-Ionen erreicht wurden (Caplen, Alton et al. 1995; Hyde et al. 2000). Auch bei der Behandlung von Krebs konnten durch gentherapeutische Möglichkeiten wichtige Fortschritte erzielt werden. Dabei kommen verschiedene Ansätze zur Anwendung. Bei der so genannten Suizidgentherapie werden in transfizierten Krebszellen Proteine hergestellt, die aus nebenwirkungsarmen Medikamenten

toxische Varianten metabolisieren (Brand und Strauss, 1997; Narita et al., 2001). Die ersten Versuche einer Therapie genetischer Erkrankungen mit nichtviralen Gentransfersystemen ergaben nicht den erhofften Erfolg (Bellon, Michel-Calemard et al. 1997; Huang und Viroonchatapan 1999; Bigger and Coutelle 2001). Man erkannte, dass zahlreiche intra- und extrazelluläre Faktoren den Gentransfer hemmten und beeinflussten. Zu diesen gehören der intrazelluläre Transport der DNA in den Kern, sowie die Art und Struktur der Transfektionsreagenzien (Huang und Viroonchatapan 1999).

Neben Liposomen werden besonders im Bereich der Gentherapie verschiedene virale Vektoren für das Einschleusen von Genen in Zellen verwendet und in klinischen Studien erprobt (siehe Abbildung 2.2). Zabner und Kollegen führten 1994 den ersten klinischen Test zur Therapie von Mukoviszidose mit adenoviralen Vektoren durch (siehe Abbildung 2.1) und erreichten ebenfalls eine vorübergehende Heilung der Krankheit (Zabner, Couture et al. 1994). Leider kam es auch zu tragischen Rückschlägen bei der Gentherapie. So wurde bei Kindern, die an einer X-chromosomalen SCID Immundefizienz litten, nach retroviraler Transfektion eine Leukämie induziert (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Auch auf anderen Gebieten ergaben sich durch die Transfektion neue Anwendungen. So wird heute durch Transfektion die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen in der Nahrungsmittelproduktion, veränderter Mikroorganismen wie beispielsweise Öl-abbauende Bakterien und nicht zu letzt transgenen Zellen und Tieren zur Produktion pharmazeutisch wirksamer Proteine erreicht.

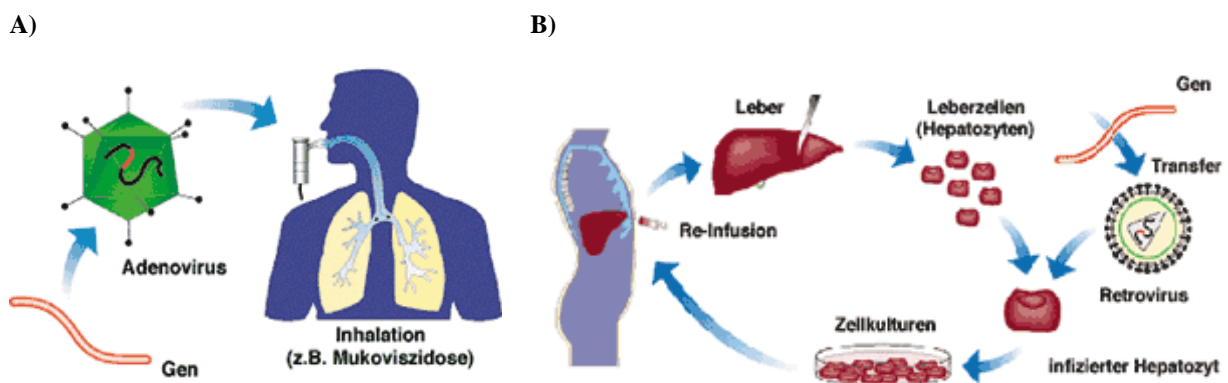


Abb. 2.1: Verschiedene virale Gentherapien (Schweizer Gesellschaft für Diabetis). A) Behandlung von Mukoviszidose durch Adenoviren. Das genveränderte Adenovirus wird inhaliert und kann dadurch die Lungenzellen infizieren. Dadurch kann die Wirkung gezielt eintreten. B) Leberzellen werden isoliert und mittels eines gentragenden Retrovirus infiziert. Diese veränderten Zellen werden nun kultiviert und anschliessend dem Patienten wieder infundiert. Die gentherapierten Zellen können die entsprechende Funktion im Körper aufnehmen.

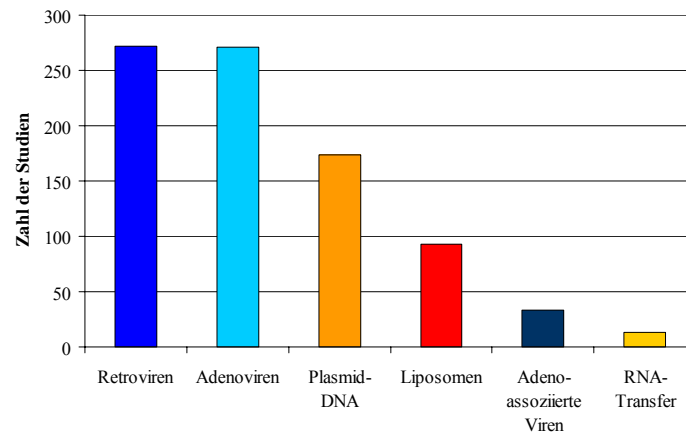


Abb. 2.2: Vektoren in klinischen Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2005). Dargestellt sind verschiedene Gentransfersysteme und die Anzahl der klinischen Studien im Jahr 2005.

2.2 Methoden der Transfektion

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden unterschiedliche Techniken zum Gentransfer entwickelt. Der Transport von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen ist heute mit Hilfe von Viren, Peptiden, Proteinen, Polymeren oder Lipiden realisierbar. Neben chemischen und biologischen Verfahren finden auch physikalische Methoden wie die Elektroporation, Mikroinjektion, Magnetofektion, die so genannte gene gun oder der Transfer mittels Ultraschall ihre Anwendung. Jede dieser Methoden hat verschiedene Vor- und Nachteile und ist nicht für alle Anwendungen einsetzbar (siehe Tabelle 2.1).

Methode	Expression	Anwendung	
		ex vivo	in vivo
Virale Vektoren			
Retroviren	stabil	+++	+
Adenoviren	transient	+++	+++
Herpesviren	transient/stabil	+++	+
Nicht-virale Vektoren			
Liposomen	transient/stabil	++	+
Physikalische Methoden			
Elektroporation	transient/stabil	+++	nein
Mikroinjektion	transient/stabil	+++	nein
Direkte Injektion	transient	nein	+

Tabelle 2.1: Übersicht verschiedener Gentransfersysteme und ihrer gentherapeutischen Anwendung (Schweizer Gesellschaft für Diabetis, leicht abgeändert)

2.2.1 viraler Gentransfer als Modell der Transfektion

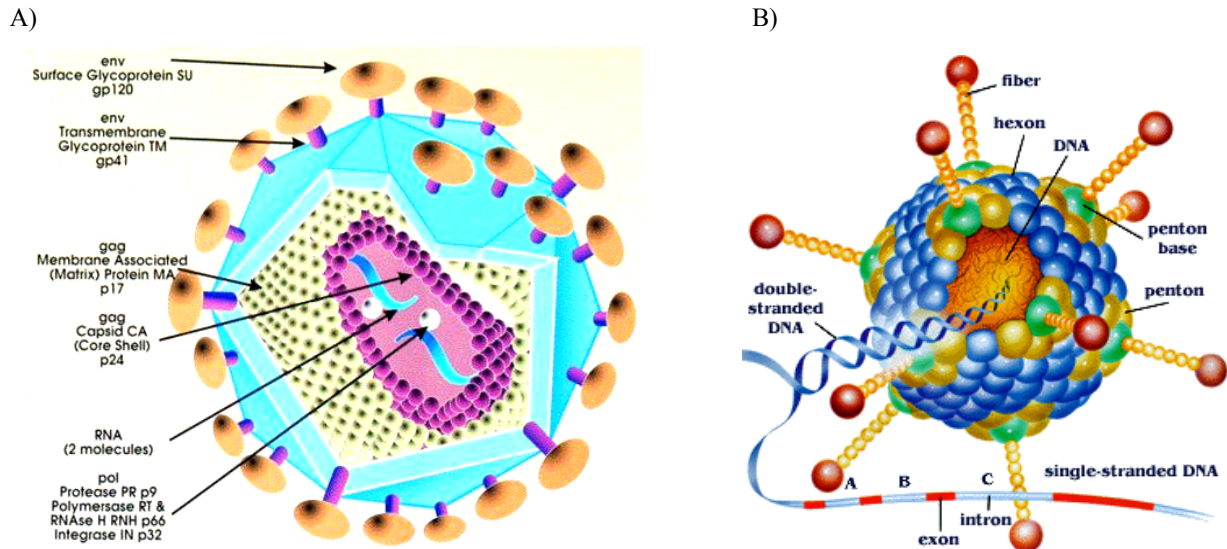


Abb. 2.3: Aufbau und Struktur verschiedener Viren. Schematische Darstellung eines Retrovirus (A) und eines Adenovirus (B). Das Retrovirus (HIV) ist von einer Membran umhüllt und besitzt ein Genom aus 2 identischen RNA-Molekülen. Adenoviren weisen keine Hülle auf und verfügen über doppelsträngige DNA.

Quellen: A) Par Emile Djakpah, 2003; B) www.Nobelprize.org

Als Transfektion wird definitionsgemäß die Infektion einer Zelle mit freier DNA bezeichnet (Old und Primose, 1980). Viren infizieren Zellen. Sie sind somit ein durch die Evolution optimiertes, äußerst effizientes Modellsystem für die Transfektion eukaryontischer Zellen. Um eine Zelle zu infizieren ist ein Virus pro Zelle ausreichend. Im Gegensatz dazu werden bei den chemischen Transfektionsmethoden pro Zelle 1×10^5 DNA-Moleküle für eine erfolgreiche Transfektion benötigt (Martin und Rice, 2007; Rettig und Rice, 2007). Kim und Mitarbeiter zeigten 2008, dass durch Zufügen viraler Proteine die Transfektion verbessert werden kann. Sie stellten so genannte Virosomen her, die aus den Fusions- und Hämagglutination-Neuraminidaseproteinen des Sendai Virus sowie kationischen Lipiden bestanden (Kim et al., 2008). Mehrere Autoren zeigten, dass die Kondensation der zu transfizierenden DNA mit dem TAT-Peptid des HIV zu einer Verbesserung der Transfektion führte (Fawell et al., 1994; Rudolph et al., 2003; Brooks et al., 2005). Ebenso konnte die Transfektion durch Verwendung viraler Kerntargetingpeptide wie das NLS-Peptid des SV40 Virus (Lanford et al., 1986; Collas et al., 1996) oder das Produkt des E1a Genes der Adenoviren (Lyons et al., 1987) realisiert werden. Kircheis und Mitarbeiter zeigten, dass durch die membrandestabilisierende Wirkung des Influenzavirus INF5 Peptid die

Transfektion von H225-Zellen gesteigert werden kann (Kircheis et al., 1997). Die Versuche und die hohe Effizienz viraler Gentransfersysteme zeigten, dass Viren über Mechanismen verfügen, die einen optimalen Gentransfer ermöglichen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass die Abläufe der Infektion durch einige Viren (z.B.: Retro-, Adeno- und Influenzaviren [siehe Abbildung 2.4]) denen der Transfektion sehr ähnlich sind, belegen zweifelsfrei, dass ein Verständnis der intrazellulären Abläufe bei der Virusinfektion für die Lösung möglicher Probleme bei der Transfektion und somit die Steigerung der Transfektionseffizienz notwendig sind.

Viren sind kleinste genetisches Material enthaltende Partikel (siehe Abbildung 2.3) und existieren seit einigen Millionen Jahren. Es sind intrazelluläre Parasiten, die für Ihre Fortpflanzung auf eine geeignete Wirtszelle angewiesen sind. Der Replikationszyklus eines Virus beginnt mit der Adsorption an die Zielzelle. Danach wird das Virus von den Zellen aufgenommen. Dieser Vorgang wird als Penetration bezeichnet. Bei unbehüllten Viren geschieht dies durch die rezeptorvermittelte Endozytose, bei der das Viruspartikel in einem Vesikel in das Zytoplasma der Zelle gelangt. Da die Endosomen reich an abbauenden Enzymen wie beispielsweise Proteasen sind, muss das Virus diese schnell verlassen. Dies kann über unterschiedliche Mechanismen erreicht werden. So ist bei Polioviren eines der Kapsidproteine für die endosomale Freisetzung verantwortlich. Viren, die von einer Membran umgeben sind, können auf zwei verschiedenen Wegen ins Zellinnere gelangen. Eine Möglichkeit der Aufnahme ist ähnlich den unbehüllten Viren die Endozytose. Die Kapside sind in folge dieser Aufnahme von zwei Membranhüllen umgeben; ihrer eigenen und die des Endosomens. Die Freisetzung der Kapside in das Zellinnere kann nun durch eine Membranfusion erreicht werden. So löst eine fusionsaktive Sequenz des viralen Hämagglutinins bei Influenzaviren eine Fusion beider Membranen aus, in deren Folge das Viruspartikel in das Zytoplasma entlassen wird. Die Verschmelzung beider Membranen ist bei vielen Viren pH-abhängig (Modrow und Falke, 2003). Dieser Mechanismus ist in ähnlicher Weise auch bei anderen behüllten Viren zu finden. Eine andere Möglichkeit der Aufnahme besteht in der Fusion von Virushülle und Zellmembran. So haben beispielsweise Paramyxoviren ein Fusionsprotein in ihrer Virushülle eingelagert, welches ein Verschmelzen von Virushülle und Zytoplasmamembran bereits nach der Bindung des Partikels durch die Zellen ermöglicht. Dadurch wird das Kapsid direkt in das Zytoplasma entlassen. Dort kann dann, je nach Art des Virus (beispielsweise RNA-Viren), die Transkription direkt erfolgen oder die Erbinformation wird in den Zellkern transportiert.

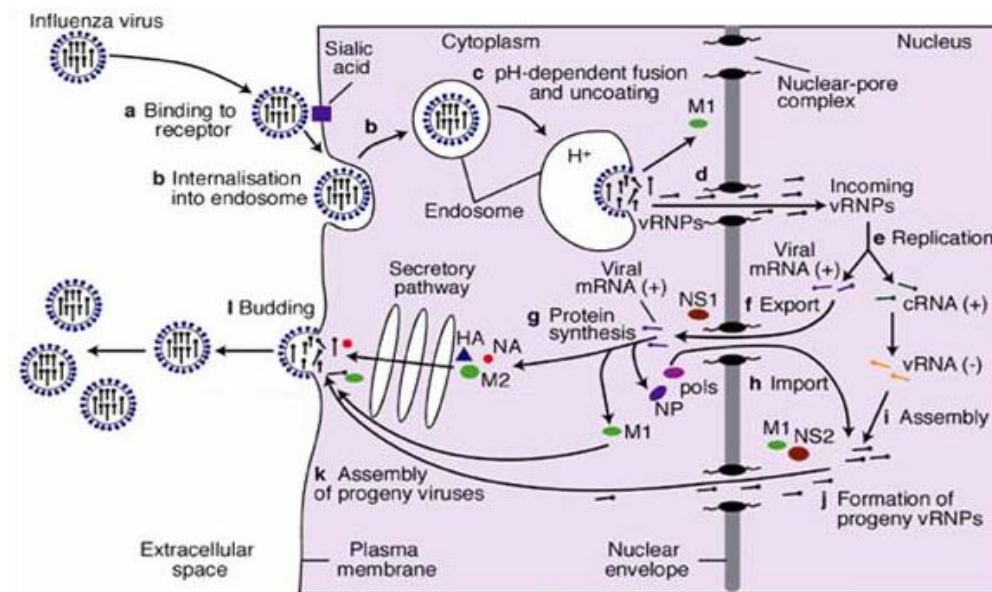


Abb 2.4: Replikationszyklus von Influenza-Viren (Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001). Nach Bindung des Virus an die Zelle erfolgt die endozytische Aufnahme der Partikel. Durch Fusion der Virushülle mit den Endosomen wird das Genom freigesetzt und gelangt in den Zellkern. Dort erfolgt die Transkription der viralen Gene. Der Zusammenbau der Viren erfolgt beim so genannten Budding an der Zytoplasmamembran.

Nach der Transkription der viralen Gene erfolgt der Zusammenbau der neuen Viren entweder im Zytoplasma oder an einer zellulären Membran. Danach erfolgt die Freisetzung der hergestellten Viren durch das so genannte Budding oder durch Zellyse. Eine schematische Zusammenfassung des Replikationszyklus von Influenzaviren ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Auch Viren werden für den Gentransfer verwendet. Auf Grund der hohen Transfereffizienz scheinen sie die idealen Träger therapeutischer Gene zu sein. In der Mehrzahl aller klinischen Studien wurden retrovirale Vektoren eingesetzt (siehe Abbildung 2.2). Sie können das therapeutische Gen in das Genom der Wirtszelle integrieren und erreichen dadurch eine Langzeitexpression. Allerdings geschieht der Einbau an einer beliebigen Stelle im Genom, wodurch die chromosomalen Gene in Ihrer Funktion gestört werden können. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur sich teilende Zellen durch Retroviren transfiziert werden (Modrow und Falke, 2003).

Adenoviren sind eine Alternative zum retroviralen Gentransfer. Sie infizieren leicht menschliche Zellen und rufen in der Natur Atemwegserkrankungen hervor. Im Gegensatz zu Retroviren wird das virale Genom aber nicht in das der Zelle integriert. Dadurch wird keine Langzeitexpression erreicht. Außerdem ist ein Großteil der Bevölkerung mit Adenoviren infiziert gewesen und besitzt somit Antikörper gegen adenovirale Antigene, so dass bei einer therapeutischen

Anwendung eine Immunantwort induziert werden kann (Rüger, 1997). Bei der Suche nach viralen Vektoren wurden auch Adeno-assoziierte Viren getestet. Sie gelten als nicht humanpathogen haben aber den Nachteil, dass auf Grund ihrer geringen Größe nur kleine Fremdgene (4,7kb) aufgenommen werden können (Brand und Strauss, 1997). Sendai Viren besitzen ein RNA-Genom und wurden ebenfalls schon für den Gentransfer verwendet (Shoji et al., 2003; Yonemitsu et al., 2000). Sie haben ein breites Spektrum an Wirtszellen und sind nicht humanpathogen. Im Gegensatz zu Retroviren integrieren die viralen Gene nicht in das Genom der Zellen. Die Transkription kann nach erfolgter Infektion im Zytoplasma stattfinden. Sendai Viren wurden auch schon zur Herstellung fusogener Liposomen verwendet (Sakai et al., 1999). Dabei wurden Teile der viralen Membran mit Liposomen gemischt. Die in der Membran enthaltenen viralen Fusionsproteine können mit Liposomen und Zellmembranen fusionieren und dabei DNA in das Zytoplasma der Zellen transportieren (Kim et al., 2008).

Der Hauptnachteil aller viralen Systeme ist ihre immunogene Wirkung, die zu heftigen Immunreaktionen führen kann (Simon et al. 1993; Worgall et al. 1997; Brown und Lillicrap 2002). Dadurch wird auch eine mehrfache Applikation erschwert. Auch die Herstellung rekombinanter Viren ist aufwendiger und komplizierter als die Erzeugung synthetischer Vektoren (Yei et al. 1994; Zabner, Couture et al. 1994; Harvey et al. 1999). Der nichtvirale Gentransfer versucht die positiven Eigenschaften des viralen Gentransfers zu imitieren und dessen Nachteile zu vermeiden. Die geringe Immunogenität ist der große Vorteil der nichtviralen Systeme wie beispielsweise der Transfektion mittels kationischer Lipide. Allerdings ist bei Ihnen die Transfereffizienz noch sehr gering und bedarf einer deutlichen Verbesserung. Hierfür sind die von Viren entwickelten Mechanismen ein guter Ansatzpunkt.

2.2.2 Physikalische Transfektionsmethoden

Neumann und Mitarbeiter nutzen 1982 die Elektroporation für den Gentransfer (Neumann et al., 1982). Bei dieser Methode werden die Zellen kurzzeitig einem Spannungsfeld ausgesetzt. Dadurch werden in der behandelten Zellmembran mikroskopisch kleine Löcher erzeugt, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. Dieser Effekt der Elektroporation wurde erstmals von Zimmermann 1974 sowie Neumann 1972 beschrieben. Die Poreninduktion bedingt einen Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran und die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Fügt man dem Umgebungsmedium vorher freie DNA hinzu, kann diese von den Zellen

aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden. Die erzielte Effizienz ist zwar sehr hoch, allerdings ist diese Methode sehr zytotoxisch und nur begrenzt *in vivo* anwendbar.

Bei der Mikroinjektion wird die DNA mit Hilfe einer feinen Glaskapillare durch Luftdruck direkt in die Zellen oder den Zellkern injiziert. Dieses Verfahren ist die sicherste und effektivste Methode zur Übertragung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Das Verfahren besitzt eine Transfektionseffizienz von nahezu 100% und erlaubt im Gegensatz zu allen anderen Methoden die Transfektion mitotisch ruhender Zellen, da hier die Kernmembran auf direktem, mechanischem Wege überwunden wird (Shen et al., 1982). Die Mikroinjektion wird u.a. bei der Erzeugung von transgenen Tieren eingesetzt (Sikes et al., 1994) und ermöglicht neben dem Transfer von DNA auch den Transport von RNA, Peptiden, Proteinen, Antikörpern und sogar ganzen Zellen (Tigyi et al., 1991; Shubeita et al., 1992; Matsuoka et al., 2006). Für Pflanzenzellen ist dieses Verfahren schwerer anwendbar, da Pflanzenzellen eine stabile Zellwand und mit ca. 30 bar einen höheren Zellinnendruck haben. Wenn die Membran dieser Zellen mit einer Kanüle perforiert wird, sinkt der Innendruck drastisch und die Zelle stirbt ab. Hier müssen besondere Methoden eingesetzt werden, bei denen ein Druckgenerator den Innendruck der Zelle stabilisiert, oder es wird mit Protoplasten gearbeitet, die keine Zellwand besitzen (Universität Gießen, Institut für Botanik, 2004).

Ein weiteres Verfahren ist die so genannte *gene gun* (Yang et al., 1990). Die DNA wird an Mikroprojekteile z. B. Wolframpartikel adsorbiert. Die Mikroprojekteile werden auf einem Makroträger fixiert. Dieser wird stark beschleunigt. Ursprünglich geschah dies durch eine Schwarzpulverladung - daher der Name *gene gun* - in den aktuellen Geräten wird Gas verwendet. Das Gas wird mechanisch vorkomprimiert. Wenn ein kritischer Druck überschritten wird, bricht eine Scheibe, hinter der sich der Makroträger befindet. Dessen Beschleunigung wird durch ein grobmaschiges Aufprallsieb abrupt gebremst, so dass die Mikroprojekteile sich ablösen und mit hoher Geschwindigkeit durch das Sieb auf die Zielzellen zuschiessen. Sie werden erst in den Zellen abgebremst, wobei es dann zur Ablösung der DNA kommt (Vain et al., 1995). Diese Methode eignet sich auf Grund der großen mechanischen Kraft vorzüglich zur Penetration von pflanzlichen Zellen, deren Zellwand bei allen anderen Verfahren eine unüberwindliche Barriere darstellt und erst entfernt werden müsste (Ye et al., 1990; Seki et al., 1991).

Mittlerweile wurde die Technik auch für den Gentransfer in die Haut von Mäusen adaptiert (Lee et al., 2008).

2.2.3 Chemische Transfektionsmethoden

Zu den chemischen Gentransfermethoden zählen eine Vielzahl von Vektoren wie Polymere, Peptide, Proteine und Lipide. Diese Verbindungen zeichnen sich durch eine positive Ladung aus, die sie befähigt, Nukleinsäuren zu binden und eine Adsorption an die negativ geladene Zellmembran zu bewirken.

2.2.3.1 Kationische Polymere

Wu et al. beschrieben 1988 als erste den Gentransfer durch Polyplexe (Wu et al., 1988). Behr und Mitarbeiter transfizierten 1995 erstmals verschiedene Zelltypen (u.a. HepG2, Cos7, HeLa) mittels Polyethylenimin (Boussif et al., 1995). Es existieren verschiedene Klassen von kationischen Polymeren, die sich für die Transfektion eignen. Zu ihnen gehören Polymere wie beispielsweise Poly(L-) Lysin (PLL), Polyethylenimin (PEI), Chitosan (Polysaccharid aus D-Glucosamin und N-acetyl-D-Glucosamin) (Han et al., 2000; Boussif et al., 1995; Chemin et al., 1998; Wightman et al., 2001; Boletta et al., 1997; Wagner, Zenke et al. 1990; Haensler und Szoka, 1993). Die positiv geladenen Aminogruppen reagieren mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Die Polymere bilden somit durch elektrostatische Kräfte spontan Komplexe mit der DNA, die als Polyplexe bezeichnet werden. Die Größe der DNA kann hierdurch um Faktor 10^4 bis 10^5 reduziert werden, so dass Komplexe mit einer Größe von 50 - 100 nm entstehen (Bloomfield 1996, Wolfert et al., 1998). Die positive Ladung der Polyplexe ist zwar grundsätzlich für eine bessere Bindung an die negative Zellmembran erwünscht, aber führt zu Problemen hinsichtlich der Transfektionseffizienz bei *in vivo* Anwendungen. Die positiv geladenen Komplexe neigen unter physiologischen Salzkonzentrationen sowie durch Kontakt zu Serumbestandteilen (z. B. Albumin) zur Aggregatbildung, was schließlich zum Ausfällen der DNA-Komplexe führt (Kircheis et al., 1999). Um dies zu vermeiden, werden vor allem *in vivo* die Polyplexe mit einem schützenden Hüllpolymer, basierend auf Polyethylenglycol (PEG), ummantelt und zeigen so nach außen hin eine neutrale Nettoladung (Finsinger et al., 2000).

Viele Polymere, wie z. B. PLL, vermögen nach Aufnahme des Polyplexes in die Zelle nicht, die DNA nicht aus dem Endosom freizusetzen. Unter Zugabe von inaktivierten Adenoviren (Wagner et al., 1992) oder dem fusogenen Peptid *INF 7* (Derivat des HA-2 Peptid des Influenzavirus) kann im sauren Milieu durch Membrandestabilisierung ein endosomolytischer Effekt erzielt werden

(Plank et al., 1994). Auch der Einsatz des lysosomotropen Agens Chloroquin förderte die Freisetzung der DNA ins Zytoplasma (Mislick et al., 1996), indem dieses Chininderivat den Durchgang der DNA durch die Lysosommembran fördert. Im Gegensatz dazu besitzen PEI und die Dendrimere einen endosomolytischen Mechanismus (siehe Abbildung 2.5). Damit der niedere pH-Wert (5 bis 6,5) im Endosom in Gegenwart der positiv geladenen Polymere aufrecht erhalten werden kann, muss die Protonenpumpe vermehrt H-Ionen in das Endosominnere transportieren. Dies geht mit einem passiven Chlorid Einstrom einher. Als Konsequenz des so entstandenen Ionenungleichgewichts kommt es zusätzlich zum Wassereinstrom vom Zytosol ins Endosom. Dadurch schwillt das Endosom bis zur osmotischen Lyse an. Durch das Platzen der Endosomen werden die Polyplexe in das Zytoplasma der Zellen freigesetzt. Dieser Mechanismus wurde ursprünglich von Behr und Mitarbeitern (Boussif et al., 1995) als so genannte „Protonen-Schwamm-Hypothese“ vorgeschlagen und mittlerweile von mehreren Autoren bestätigt (Behr, 1997; Kichler et al., 2001; Akinc et al., 2005).

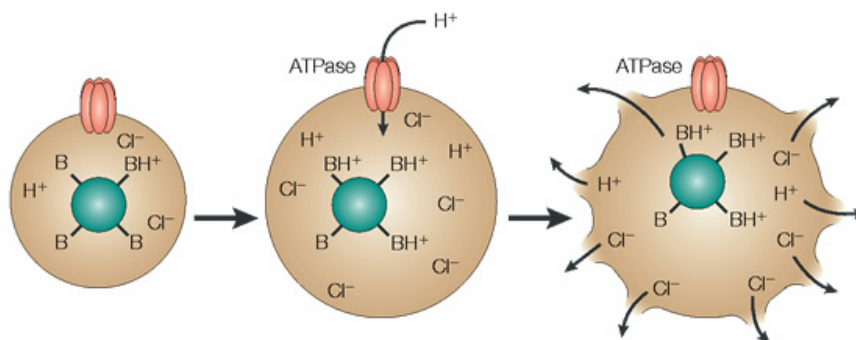


Abb. 2.5.: Protonen-Schwamm-Hypothese (Nature Reviews Drug Discovery 2005). Die Protonierung des Polymers (grün) führt zu einem Einstrom von Protonen und Gegenionen. Durch den folgenden Wassereinstrom werden die Endosomen zerstört.

Um eine effektivere Aufnahme der DNA in die Zielzelle und den Zellkern zu erreichen, wurden Polymere wie Poly-L-Lysin (PLL) oder PEI mit Hilfe von Transferrin, einem Transportprotein zur Sauerstoffversorgung der Körperzellen, chemisch modifiziert. Transferrin bindet an so genannte Transferrinrezeptoren und wird durch die Zellen internalisiert. Die Transfektionseffizienz konnte dadurch gesteigert werden (Curiel et al., 1991; Wagner et al., 1992; Kircheis et al., 1997).

2.2.3.2 Kationische Lipide

Bei der Lipofektion, der Applikation von Nukleinsäuren mit Hilfe kationischer Lipide, wird die DNA über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen assoziiert. Diese Komplexe werden als Lipoplexe bezeichnet und über einen bisher noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus in die Zellen transferiert. Die Transfektionseffizienz ist dabei in Abhängigkeit der Zellen sowie der verwendeten Lipide sehr unterschiedlich. Synthetisch hergestellte kationische Lipide und aus ihnen präparierte Lipoplexe eignen sich außerdem zur Applikation von RNA, Proteinen und Ribozymen (Malone et al., 1989; Debs et al., 1990; Felgner et al., 1997).

Chemische Struktur der Lipide

Kationische Lipoplexe bestehen aus kationischen Lipiden oder einer Mischung aus positiv geladenen Lipiden und neutralen Helferlipiden. Felgner und Mitarbeiter zeigten 1987 erstmalig die Verwendung solcher Strukturen für den Gentransfer. Das Lipid N-[1-2,3-Dioleoxy-propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) bildet allein oder mit einem neutralen Helferlipid wie Phosphatidylethanolamin (PE) Bilayer. Die quarternäre Trimethylammoniumgruppe erzeugt eine positive Ladungsoberfläche der, sich in wässriger Umgebung bildenden, multilamellaren Strukturen. Die kationischen Lipide können auf Grund Ihrer positiven Ladung die durch die Phosphatgruppen negativ geladene DNA binden und komplexieren. Mit der durch kationischen Lipiden komplexierten DNA konnte bis zu Faktor 100 effizienter transfiziert werden, als durch die Kalziumphosphatmethode (Felgner et al., 1987). Neben dem von Felgner und Mitarbeitern hergestellten Lipid, wurden in den letzten Jahren viele, strukturell unterschiedliche kationische Lipide synthetisiert (siehe Abbildung 2.6). Gao und Huang definierten folgende chemischen Komponenten, die für den Gentransfer geeignete Lipide enthalten sollen (Gao und Huang, 1995):

- eine Kopfgruppe mit positiver Ladung
- eine hydrophobe/lipophile Ankergruppe
- einen Spacer, der beide Komponenten verbindet

Die kationischen Lipide lassen sich nach ihrer Struktur, Anzahl der Ladung, kationischer Kopfgruppe und Ankergruppe in Gruppen einteilen. Einige Lipide besitzen ein Cholesterolgrundgerüst (DAC-Chol, Sp-Chol), andere bestehen aus doppelkettigen Lipiden (DOTMA, DOTAP, DOCSPER, DOSGA). Durch die Anzahl der Ladungen der Kopfgruppe kann man die Lipide in monokationische (DOTAP, DOTMA, DAC-Chol) und polykationische Lipide (DOCSPER) einteilen. Das natürlich vorkommende Polykation Spermin wurde häufig für die kationische Kopfgruppe verwendet. Es zeichnet sich durch eine hohe Affinität gegenüber Nukleinsäuren aus und dient der Komplexierung der DNA im Kopf der Spermien. Die meisten kationischen Lipide weisen im Gegensatz zu natürlich vorkommenden Lipiden eine Etherbindung auf. Sie sind dadurch chemisch stabiler, aber wirken durch die Etherbindung in Zellen oft zytotoxisch, da sie nicht hydrolysierbar ist (Winterhalter und Lasic, 1993). Um dieses Problem zu lösen, wird in letzter Zeit verstärkt nach abbaubaren Lipiden gesucht.

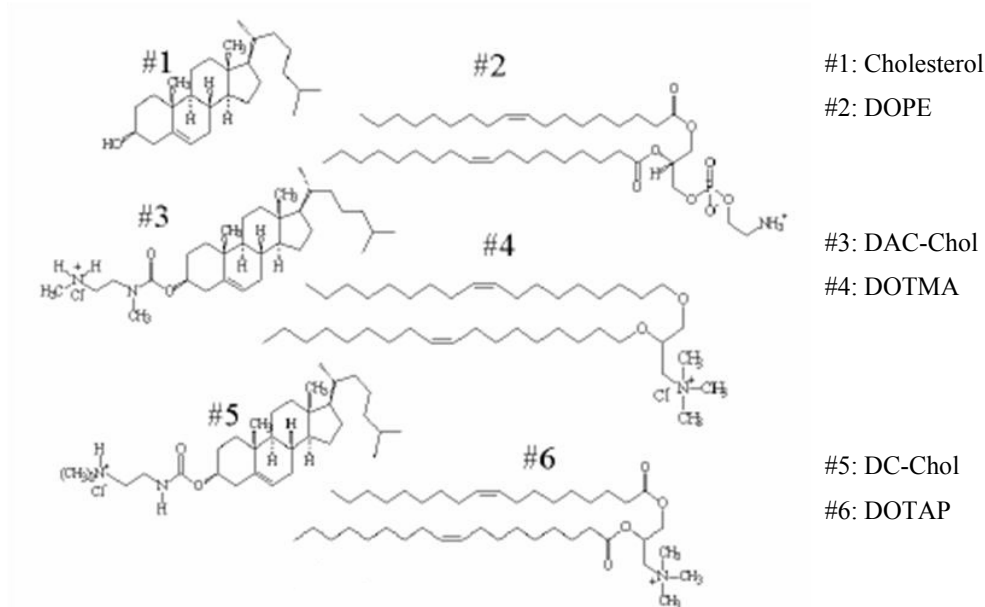


Abb. 2.6: Struktur für die Transfektion genutzter Lipide (Groth, 2000)

Durch die Verwendung eines neutralen Helferlipides wie DOPE, Cholesterol oder Phosphatidylcholin konnte die Effizienz bei der Transfektion eukaryontischer Zellen gesteigert werden (Fasbender et al., 1997). Teilweise muss die Liposomenbildung durch Helferlipide unterstützt werden (Wrobel und Collins, 1995). So sind einige Cholesterolderivate ohne Helferlipide nicht in der Lage, Liposomen zu bilden. Nachteilig bei der Verwendung eines

Helferlipides ist die aufwendigere reproduzierbare Formulierung der Liposomen, da zur Herstellung der Lipidvesikel eine absolut gleichmäßige und homogene Mischung der Lipide verwendet werden muss. Außerdem kann es bei der Verwendung von Helferlipiden wie DOPE zu möglichen Abbaureaktionen beispielsweise der Hydrolyse der Esterbindungen oder der Oxidation ungesättigter Doppelbindungen in den Seitenketten kommen (Winterhalter und Lasic, 1993). Deshalb wurden auch Phosphatidylethanolamine mit vollständig gesättigten Ketten (Felgner et al., 1994; Zhou et al., 1994) oder Cholesterin (Hong et al., 1997) als Helferlipide für kationische Liposomen eingesetzt. Bei diesen Versuchen erwiesen sich die gesättigten Phosphatidylethanolamine als wenig effizient. Der natürliche und daher weniger zelltoxische Membranbestandteil Cholesterin hingegen stellte sich besonders bei *in vivo* Versuchen als vielversprechend heraus (Hong et al., 1997).

Wechselwirkung zwischen DNA und Liposomen

Kationische Lipide interagieren auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen mit DNA und bilden so genannte Lipoplexe. Die Komplexbildung wird vor allem durch das Verhältnis von Lipid und DNA bestimmt. Bei der Kondensation mit kationischen Lipiden werden an allen Phosphatgruppen der DNA die natürlichen Gegenionen durch kationische Lipide ersetzt. Die Struktur der Lipid/DNA-Komplexe war lange umstritten. Die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Studien zeigten verschiedene Formen von Komplexen wie kettenartige Strukturen (Gershon et al., 1993), oligolamellare Strukturen im Kryo-EM (Gustafsson et al., 1995), außerdem Fusionsereignisse und röhrenartige Strukturen nach Gefrierbruch (Sternberg et al., 1994). Die Mehrzahl der Autoren geht heute von multilamellaren Strukturen aus bei denen sich Lipidbilayer und DNA-Monolayer abwechseln (u.a.: Rädler et al., 1997; Boukhnikachvili et al., 1997; Groth, 2000; Lehmann et al. 2003;).

Die meisten Untersuchungen zeigten, dass die Größe und Struktur der Lipoplexe besonders vom DNA-Lipidverhältnis und somit der Ladung der Komplexe abhängig ist (Gershon et al., 1993; Zuidam und Barenholz, 1998; Groth, 2000). So entstehen bei einem niedrigen Lipid/DNA-Verhältnissen, also einem Überschuss an DNA resultierend in einer negativen Gesamtladung, kleine Lipoplexe (<40nm) (Gustafsson et al., 1995; Rädler et al., 1997). Bei steigender Lipidkonzentration bis zu einem annähernd neutralen Verhältnis von DNA und Lipid werden vor allem größere (bis zu mehreren μm) Komplexe beobachtet. Der Größenzuwachs wird durch die

Reduktion der Oberflächenladung erzeugt, die die Abstoßungskräfte zwischen den Liposomen verringert. Dadurch sind Fusionen zwischen den einzelnen Liposomen möglich. Dies erklärt auch die geringere Größe der Komplexe bei einem Überschuss an Lipid oder DNA, da sich die dann stärker geladenen Komplexe voneinander abstoßen (Felgner et al., 1994; Sternberg et al., 1994; Zabner et al., 1995). Neben der Größe wurde auch die submikroskopische Struktur der Komplexe untersucht. Rädler und Mitarbeiter (Rädler et al., 1997) fanden heraus, dass bei der Komplexierung von kationischem Lipid und DNA, sich die DNA zwischen den Lipidbilayern anordnet. Dadurch entstehen hochgeordnete multilamellare Strukturen unabhängig von der Größe der verwendeten DNA (siehe Abbildung 2.7).

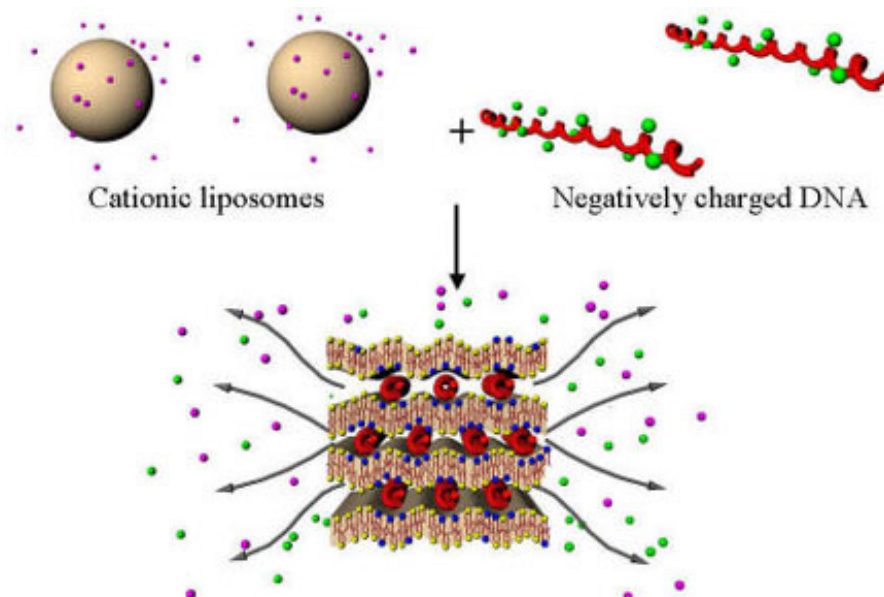


Abb. 2.7: Interaktion von kationischen Lipiden mit Plasmid-DNA (P. Bruni, M. Pisani, A. Amici, C. Marchini, M. Montani und O. Francescangeli, *Appl. Phys. Lett.* 88, 073901 (2006)). Die kationischen Lipide bilden zusammen mit der negativ geladenen DNA so genannte multilamellare Strukturen. Dabei ist die DNA alternierend mit den Lipidbilayern angeordnet. Dieses Modell ersetzte die frühere Vorstellung der klassischen Liposomen, an deren äußerer Hülle die DNA assoziiert gewesen sei.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang natürlich die Frage, welche Struktur der Lipoplexe zu einer effizienten Transfektion von Zellen geeignet ist. Die besten Ergebnisse wurden mit Komplexen erzielt, die eine annähernd neutrale bis leicht positive Ladung besitzen (Schwartz et al., 1995; Zabner et al., 1995). Allgemein scheinen heterogene Mischungen von verschiedenen Liposomenstrukturen und Größen (0,2-1,4µm) besser für die Transfektion geeignet zu sein (Schwartz et al., 1995; Yang et al., 1997).

2.3 Ablauf der Lipofektion

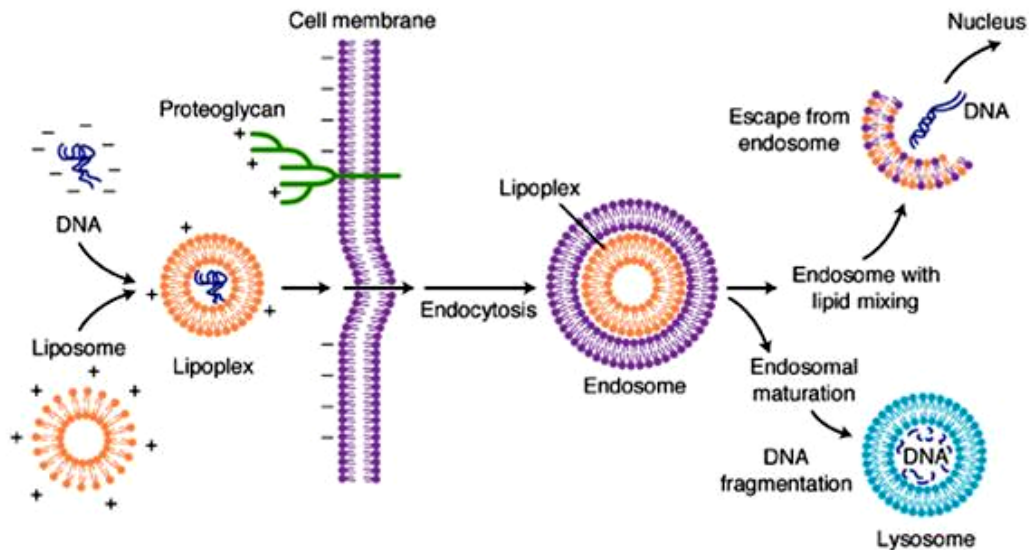


Abb. 2.8: Modell zum Ablauf der Transfektion mittels kationischer Lipide (www.nano-lifescience.de). Nachdem die Lipoplexe an die Zellmembran gebunden haben, werden sie von den Zellen durch Endozytose internalisiert. Um einem Abbau in den Lysosomen zu entgehen, muss die DNA aus den Endosomen freigesetzt werden. Hierfür existieren unterschiedliche Modelle. Danach gelangt die DNA durch aktiven Transport oder Mitose in den Zellkern.

In den letzten Jahren wurden viele Arbeiten veröffentlicht, die die Aufnahme der Lipoplexe und deren intrazelluläres Schicksal untersuchen. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess (siehe Abbildung 2.8). Der erste Schritt ist die Anheftung der Lipoplexe (Liposom + DNA) an die Zellmembran. Dabei vermitteln die positiv geladenen Lipide den Kontakt zwischen der negativ geladenen DNA und der gleichfalls negativ geladenen Glykokalix der Zellmembran wie Hui und Mitarbeiter in ihren Arbeiten zeigen konnten. An mit Pronase, einem Enzym, das die Glykokalix zerstört, behandelten Zellen erfolgte weder Bindung noch Aufnahme der Komplexe (Hui et al., 1996). Früheren Auffassungen zufolge gelangen kationische Liposomen durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle. Zu dieser anfänglichen Annahme haben die fusogenen Eigenschaften kationischer Lipide beigetragen (Düzgünes et al., 1989; Felgner und Ringold, 1989). Untersuchungen mit modernen mikroskopischen Techniken haben jedoch gezeigt, dass die Hauptaufnahmeroute über endozytotische Mechanismen erfolgt (Matsui et al., 1997; Conrood et al., 1997; Chu et al., 1999; Serafino et al., 1999; Labat-Moleur, et al. 1996; Zabner et al. 1995; Zhou und Huang, 1994). Allerdings zeigen verschiedene Arbeiten, dass eine Hemmung der

Fusogenität der Membranen zu einer deutlich ineffizienten Transfektion führt. Almofti und Mitarbeiter zeigten, dass eine Hemmung der Fusion zwischen Lipoplexen und der Zytoplasmamembran durch speziell hergestellte, fusionshemmende Peptide (ZPhe-Phe-Gly), die Transfektionseffizienz deutlich reduziert (Almofti et al., 2003). Einige Stunden nach Applikation wurden Lipoplexe von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen mikroskopischen Techniken in der Nähe des Zellkerns im perinukleären Raum beobachtet (Serafino et al., 1999; Zabner et al., 1995; Almofti et al., 2002). Es ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, wie sie dorthin gelangen. Einer Hypothese zufolge wandern frühe Endosomen mit den endozytierten Molekülen langsam in Richtung Zellkern und reifen zu späten Endosomen. Bevor sie mit den Lysosomen verschmelzen, muss die DNA aus den Endosomen freigesetzt werden, um nicht durch die lysosomalen Enzyme abgebaut zu werden (Alberts et al., 1995).

Wahrscheinlich ist es notwendig, dass sich die DNA vor dem Eintritt in den Kern vom Lipid trennt. Diese Vermutung erhielt durch Versuche von Zabner und Mitarbeitern neue Bestätigung. Sie zeigten, dass Lipoplexe deutlich schlechter transfizieren, wenn sie direkt in den Kern anstatt ins Zytoplasma injiziert werden (Zabner et al., 1995). Wo diese Trennung von Lipid und DNA stattfindet ist nicht endgültig geklärt. Nach Auffassung von Xu und Szoka findet sie in den Endosomen durch die Ladungsneutralisierung der positiv geladenen Lipoplexe durch anionische Lipide statt (Xu und Szoka, 1996). Nach dem vorgeschlagenen Modell wird die endosomale Membran durch die Lipoplexe destabilisiert, so dass es zum Flip-Flop der zytoplasmatischen, negativ geladenen Lipide ins Endosomeninnere und dadurch zur Ladungsneutralisierung kommt (siehe Abbildung 2.9). Danach kann es zur Fusion zwischen der Endosomenmembran und dem Lipoplex kommen, in dessen Ergebnis DNA ins Zytoplasma gelangt. Dieses Modell wird durch Untersuchungen von Friend und Mitarbeitern untermauert, die Gold-Markierte DNA auch außerhalb der Endosomen beobachteten (Friend et al., 1996). Allerdings gibt es Arbeiten, die keine Freisetzung der DNA aus den Endosomen nachweisen. So konnten Lehmann und Mitarbeiter bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine DNA außerhalb der Endosomen detektieren (Lehmann, 2003). Für die Freisetzung aus den Endosomen spielen auch Fusionen zwischen Komplex und Endosomen eine wichtige Rolle. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Versuche von Zhang und Mitarbeiter. Sie belegten, dass eine Hemmung der Fusion zwischen Endosomenmembran und Liposomen durch den Zusatz von Nigericin zu einer stark reduzierten Freisetzung von Oligonukleotiden ins Zytoplasma führt (Zhang et al., 2006).

Nigericin ist ein von *Streptomyces hygroscopicus* hergestelltes Ionophor, welches das Membranpotential zerstört und Membranfusionen inhibiert. In der Medizin wird es als Antibiotikum genutzt.

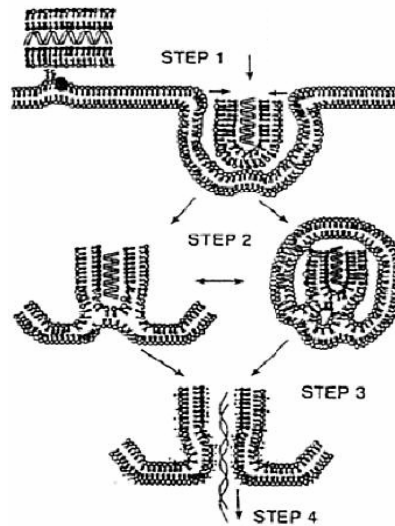


Abb. 2.9: Modell zum Freisetzung der DNA aus den Endosomen (Xu und Szoka, 1996). Nach der Aufnahme der Komplexe durch die Zellen findet ein Flip-Flop es der zytoplasmatischen, negativ geladenen Lipide ins Endosomeninnere und dadurch zur Ladungsneutralisierung kommt. Danach kann es zur Fusion zwischen der Endosomenmembran und dem Lipoplex kommen, in dessen Ergebnis DNA ins Zytoplasma gelangt.

Die meisten Autoren sind der Meinung, dass die DNA vom Zytoplasma aus in den Kern gelangt (Dowty et al., 1995; Cotten et al., 1992). Der Eintritt der DNA in den Kern erfolgt demnach über Kernporen (Agutter und Prochnow, 1994), die als molekulares Sieb wirken. Die Zellkernporen (NPC) haben eine zylindrische Gestalt mit einer Breite von 125nm und einer Länge von 150-200nm. Die Dichte der Poren beträgt etwa 1-10 NPCs/ μm^2 (Keminer und Peters, 1999). Der Durchmesser für den passiven Transport beträgt 9nm, so dass Makromoleküle mit einer Größe bis zu 45 kDa frei hindurch diffundieren können. Größere Moleküle bedürfen einer aktiven, selektiven und signalvermittelten Aufnahme, bei der sich der Kanal bis zu einem Durchmesser von etwa 25nm öffnet (Alberts et al., 1995; Gorlich und Kutay, 1999). Folglich ist auch der Zutritt von DNA in den Kern größenabhängig. Studien von Hagstrom und Mitarbeitern ergaben, dass DNA mit einer Größe von 2 kb deutlich weniger effizient in den Kern gelangt, als 1 kb DNA. Der Autor vermutete, dass die mit der DNA komplexierten NLS-Peptide an mehrere NPC binden und sich somit gegenseitig blockieren (Hagstrom et al., 1997). Einige Autoren argumentieren auch, dass ins Zytoplasma freigesetzte DNA auf Grund der hohen Viskosität des Zyotosols

weitgehen immobil ist, so dass ein aktiver oder passiver Kerntransport erschwert wird (Lukacs et al., 2000; Zanta et al., 1999) Nach weiteren Untersuchungen (Jans et al., 1998; Cartier and Reszka, 2002) geht man trotzdem davon aus, dass sogenannte Kernerkennungssequenzen an der zu transferierenden linearen DNA eine gezielte Aufnahme bewirken und damit die Effizienz steigern können. Eine natürliche Methode des Kerntransportes stellt die Mitose dar. Während der Zellteilung wird die Kernmembran aufgelöst und wieder neu gebildet, so dass dabei sich im Zytoplasma befindliche DNA zufällig eingeschlossen werden kann. Dies erklärt auch, warum die Transfektionseffizienz bei sich nicht oder nur langsam teilenden Zellen in der Regel geringer ist, als bei sich schnell teilenden Zellen (Zabner et al., 1995; Escriou et al., 2001). Allerdings entsteht hierbei das Problem des Abbaus der DNA im Zytoplasma, durch zelluläre Nukleasen (Orrantia und Chang, 1990). Daher ist auch bei sich teilenden Zellen eine schnelle Aufnahme der DNA wünschenswert.

2.3.1 Kritische Schritte bei der Lipofektion

Die Literatur auf diesem Gebiet ist nicht eindeutig und oftmals widersprüchlich. Vielfach wurden vor allem die Freisetzung der DNA aus den Endosomen und der Transport der DNA in den Zellkern als Probleme für die *in vitro* Transfektion diskutiert (Plank et al., 1994; Collas et al., 1996; Midoux et al., 1999; Khalil et al., 2006; Martin und Rice, 2007; Rettig und Rice, 2007).

Bindung der Transfektionkomplexe an die Zellen

Die meisten Autoren sehen in der Bindung der Komplexe an die Zellen keinen limitierenden Vorgang bei der *in vitro* Transfektion. So konnte mit Gold- oder fluoreszenzmarkierter DNA, die mit Liposomen komplexiert wurde, eine effektive Aufnahme der Lipoplexe in verschiedene Zelltypen elektronen- bzw. fluoreszenzmikroskopisch oder mittels FACS gezeigt werden (James und Giorgio, 2000; Tseng et al., 1997; Zabner et al., 1995). In allen Fällen nahmen innerhalb weniger Stunden 70-95% der Zellen die Lipoplexe mit durchschnittlich 20.000-30.000 Plamide pro Zelle über Endozytose auf (James und Giorgio, 2000; Tseng et al., 1997; Zabner et al., 1995), d.h. das Transgen erreichte in großem Maße das Zellinnere.

Beim Gentransfer *in vivo* hingegen ist das sogenannte primäre targeting als Problem beschrieben (Schatzlein, 2003; Martin und Rice, 2007; Rettig und Rice, 2007). Eine Verbesserung der Bindung wurde von vielen Gruppen durch den Einsatz verschiedener Liganden versucht. Beispielsweise wurden mit Peptiden, die an den EGF-Rezeptor binden Krebszellen gezielt zu transfizieren versucht (Liu et al., 2003; Wolschek et al., 2002). Ein weiteres Ziel solcher Liganden sind Integrine. Dabei handelt es sich um Heterodimere, die aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit bestehen und bei allen Zelltypen vorhanden sind. Integrinbindende Peptide bestehen aus etwa 6 Aminosäuren und können Integrinspezifisch eingesetzt werden. Am bekanntesten ist das sogenannte RGD-Motif, welches an verschiedene Integrine binden kann (Hart et al., 1999). Die dadurch verbesserte Bindung und Aufnahme der DNA führte auch zu einer Verbesserung des Gentransfers (Collins et al., 2000; Collins und Fabre, 2004).

Freisetzung der DNA in das Zytoplasma

Nach dem Eintritt der Lipoplexe in die Zelle durch die Endozytose, muss die DNA aus den Endosomen freigesetzt werden, um nicht durch die lysosomalen Enzyme zerstört zu werden. Die Problematik dieses Schrittes konnte schon früh durch die Beobachtung gezeigt werden, dass die Transfektionseffizienz durch den Einsatz von Chloroquine – einem endosomolytischen Agens – gesteigert werden konnte (u.a. Murphy et al., 1998). Inzwischen hat man allerdings auch Lipide gefunden, bei denen eine Steigerung der Expression durch Chloroquine nicht möglich ist (Almofti et al., 2002). Dennoch konnte die Verbesserung der Transfektion durch eine gesteigerte Freisetzung der DNA aus den Endosomen auch mit fusogenen oder lytischen Peptiden demonstriert werden. Hierzu gibt es eine Reihe von Versuchen, die sich überwiegend mit viralen fusogenen Peptiden (Influenza, Sendai) beschäftigen (Kircheis et al., 1997; Ritter et al., 2003) und eine signifikante Steigerung der Transgenexpression durch die verbesserte endosomale Freisetzung der DNA belegen. Trotz aller erzielten Verbesserungen handelt es sich bei der Freisetzung der DNA aus den Endosomen unabhängig vom postulierten Mechanismus um ein seltenes Ereignis. Der größte Teil der DNA verbleibt in den Endosomen wie mehrere Versuche mit markierter DNA zeigten (Zabner et al., 1995; Lehmann, 2003). Diese ineffiziente Freisetzung der DNA erklärt auch, dass etwa 50.000 DNA-Moleküle von den Zellen aufgenommen werden müssen, um eine erfolgreiche Transfektion zu erreichen (Lehmann, 2003).

Transport der DNA in den Zellkern

Ein Transport der transfizierten DNA in den Kern ist für die Expression des Transgenes zwingend erforderlich. So führt die Mikroinjektion nackter DNA in den Kern zu einer Transfektionsrate von 50-100%, während die Injektion von DNA in das Zytoplasma keine messbare Transfektion bewirkt (Capecchi, 1980). Diese Ergebnisse konnten auch durch die Versuche mit Fluoreszenz- und Biotin-Markierten Plasmiden bestätigt werden (Escriou et al., 1998). In anderen Arbeiten wurden die Zellen mit einem Vacciniavirus infiziert, welches die T7 RNA-Polymerase exprimiert und somit eine zytoplasmatische Expression des transfizierten Plasmides ermöglicht. Nach der Transfektion der infizierten Zellen mit Lipoplexen wurde eine Transfektion von nahezu 100% erreicht. Die Kontrollversuche mit einem Plasmid ohne T7-Promoter erzielten eine Transfektionsrate von 10% (Zabner et al., 1995). Pollard und Mitarbeiter injizierten 10.000 mit PEI komplexierten Moleküle Plasmid-DNA in das Zytoplasma von Cos7-Zellen. Die erzielte Transgenexpression war vergleichbar mit 100 Plasmiden nackter DNA, die direkt in den Kern injiziert wurden (Pollard et al., 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von mit Lipopolyamin transfizierten Zellen verdeutlichten, dass von 100 Plasmid-Molekülen im Zytoplasma nur eines in den Zellkern gelangt (Labat-Moleur et al., 1996). Aus beiden Arbeiten folgt, dass nur 1% der Plasmide aus dem Zytoplasma in den Kern gelangen. Weitere Mikroinjektionsversuche zeigten, dass der Kernimport abhängig von der Größe der DNA ist und nur bei linearen Fragmenten bis etwa 2kb Länge zu beobachten ist (Hagstrom et al., 1997; Ludtke et al., 1999). Statt eines Transportes der DNA durch die Kernporen weisen Versuche von Friend und Mitarbeitern auch auf eine Fusion der Lipoplexe mit der Kernmembran hin. Bei dieser Fusion könnte dann auch die Dissoziation von Lipid und DNA erfolgen (Friend et al., 1996). Es ist bis heute noch nicht abschließend geklärt, auf welche Weise der Transport der DNA in den Zellkern erfolgt.

Zusammenfassend erscheinen folgende Schritte bei der Transfektion *in vitro* kritisch:

- Freisetzung der DNA aus den Endosomen
- Transport der DNA in den Zellkern

2.3.2 Verwendung von Peptiden zur Verbesserung der Lipofektion

Peptide mit einer kerntargeting Sequenz (NLS-Peptide)

Eine Lösung des Problems des Kerntransportes wird durch den Einsatz so genannter Kern-targeting-Peptide (NLS) bzw. durch die Komplexierung der DNA mit Proteinen (z.B.: Histonen, viralen Proteinen), die in den Kern transportiert werden, zu realisieren versucht. Hierzu gibt es eine Unzahl von Arbeiten mit verschiedenen NLS-Peptiden (siehe Tabelle 2.2). Die erzielten Ergebnisse sind unterschiedlich. Von etwa der Hälfte der Autoren konnte keine Verbesserung der Transfektion erreicht werden (Neves et al., 1999; Schwartz et al., 1999), wohingegen andere eine deutliche Steigerung der Effizienz feststellten. (Zanta et al., 1999; Cartier et al. 2004). Bei einigen Arbeiten fehlen entsprechende Kontrollen mit Peptiden die aus gleichen Aminosäuren in einer zufälligen Reihenfolge bestehen und somit eine sequenzspezifische Verbesserung nachweisen könnten.

NLS	DNA	Kopplung der NLS an DNA	Transfektionsmethode	Reporter-gen	Ergebnis	Referenz
SV40	Plasmid	kovalent	Mikroinjektion	Luc	kein Effekt	Sebestyen et al., 1998
SV40	linear, 0.9 kb	nicht kovalent	Mikroinjektion	GFP	Verbesserung	Ludtke et al., 1999
SV40	linear, 3.4 kb	kovalent	PEI	Luc	Verbesserung	Zanta et al., 1999
SV40	Plasmid	kovalent	Lipide	beta-Gal	kein Effekt	Neves et al., 1999
SV40	Plasmid	nicht kovalent	PEI	beta-Gal / Luc	kein Effekt	Schwartz et al., 1999
SV40	Plasmid	nicht kovalent	Polylysin / Transferrin	beta-Gal	Verbesserung	Chan et al., 1999
SV40	Plasmid	nicht kovalent	Ca ₂ PO ₄ / Lipide	beta-Gal	kein Effekt	Chan et al., 2000
SV40	Plasmid	nicht kovalent	PEI	Luc	Verbesserung	Ritter et al., 2003
SV40	linear	kovalent	PEI	Mikroskop	kein Effekt	van der Aa et al., 2004
SV40	Plasmid	nicht kovalent	Elektroporation	lacZ	Verbesserung	Arenal et al., 2004
SV40	Plasmid	nicht kovalent	PEI	Luc	Verbesserung	Cartier et al., 2002
SV40	Plasmid	nicht kovalent	Lipide	Luc	kein Effekt	Gourbatsi et al., 2006
SV40	Plasmid	nicht kovalent	Ca ₂ PO ₄	Luc	Verbesserung	Gourbatsi et al., 2006

Tabelle 2.2: Versuche zur Verwendung von NLS-Peptide bei der Transfektion. Abkürzungen: SV40, NLS des großen T-Antigens des SV40-Virus; TE, Transfektionseffizienz; kb, Länge der verwendeten DNA in Kilobasen; GFP, green fluorescent protein als Reporter gen verwendet; Luc, Luziferase als Reporter gen genutzt; beta-Gal, beta-Galactosidase als Reporter gen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich eventuell durch die unterschiedlichen Zellen und Transfektionsmethoden erklären, die jeweils verwendet wurden. Im Gegensatz zur chemischen Transfektion umgeht die Mikroinjektion den gesamten endozytotischen Aufnahmeweg und transportiert die DNA direkt in das Zytoplasma. Da für die Wirkung der NLS-Peptide die DNA frei im Zytoplasma vorliegen muss, ist die Freisetzung der DNA aus den Endosomen eine zwingende Voraussetzung. Bei der chemischen Transfektion kann ferner auch eine Interferenz zwischen den Peptiden und den Lipoplexen, die zu einer eingeschränkten Funktionalität der Peptide führen könnte, nicht ausgeschlossen werden. So zeigten mehrere Gruppen, dass die verwendeten Peptide durch die Transfektionskomplexe maskiert und in ihrer Funktion eingeschränkt werden können (Boulikas et al., 1993; Ritter et al., 2003). Ebenso ist es möglich, dass der Transport der DNA in den Zellkern je nach Zelltyp in unterschiedlichem Maße kritisch ist. Beispielsweise kann bei sich teilenden Zellen ein zufälliger Einschluss der DNA in den Kern während der Mitose erfolgen (Khalil et al., 2006; Martin und Rice, 2007). Zusammenfassend ist festzustellen, dass Wirkung und Einfluss der NLS-Peptide auf die Transfektion eukaryontischer Zellen noch nicht abschließend geklärt ist (siehe Tabelle 2.2).

Fusogene und endosomolytische Peptide

Um die Freisetzung der DNA aus den Endosomen zu unterstützen, wurden von mehreren Gruppen synthetische fusogene Peptide wie GALA oder KALA bei der Transfektion eingesetzt. GALA ist ein amphipatisches Peptid, das bei pH 5 seine Struktur zur alpha-Helix ändert. Es besteht aus mehreren, sich wiederholenden Einheiten von Glutaminsäure-Alanin-Leucin-Alanine (GALA). Bei endosomalen pH bindet GALA an die Endosomenmembran und induziert eine Porenbildung. Dies geschieht durch Aggregation von 8-12 Peptiden, die dann einen Kanal in Lipiddoppelschichten ausbilden (Parente et al., 1990). KALA ist eine Weiterentwicklung des GALA-Peptides, welches durch den Austausch einiger Alanine gegen Lysine DNA binden kann. Seine Fähigkeit zur Endosomenlyse ist trotzdem erhalten (Wyman et al., 1997). Beide Peptide erzielen in Abhängigkeit des transfizierten Zelltypes unterschiedliche Erfolge.

Ebenfalls etwas unklar ist die Rolle der so genannten *cell penetrating peptides*, zu der beispielsweise die TAT-Peptide, Melittin oder Transportan gehören. Ihre ursprünglich ermittelte membran-durchdringende Eigenschaft musste inzwischen relativiert werden. Richards und Mitarbeiter zeigten, dass die beobachtete Fähigkeit zur Durchdringung von Membranen

überwiegend auf Artefakte, die bei der Fixierung der Zellen entstanden, zurück zu führen waren. Selbst bei einer milden Fixierung wird eine ungewollte Umverteilung der an Membranen assoziierten Peptide, DNA und Lipide erzeugt. Dadurch wurden bei der Untersuchung der *cell penetrating peptides* falsche Ergebnisse erzielt, die später klar widerlegt werden konnten (Richard et al., 2002). Dennoch gibt es Arbeiten, die zeigen, dass die Transfektion durch ihren Einsatz verbessert werden kann (Cho et al., 2003; Gupta et al., 2005; Deshayes et al., 2005). Möglicherweise spielen hier auch ein verbessertes Kerntargeting sowie eine effizientere Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen eine Rolle (Ritter et al., 2003).

2.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Verbesserung der Transfektionseffizienz bei der Transfektion eukaryontischer Zellen durch kationische Lipide.

Grundsätzliche Überlegungen

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur lassen sich möglicherweise durch eine fehlende Systematik der Experimente erklären. So wurden im Regelfall die in der Literatur beschriebenen Versuche nur mit einer Zelllinie durchgeführt. Bei den unterschiedlichen Arten verfügbarer Zellen sowie deren verschiedenen physiologischen und morphologischen Eigenschaften sind allgemeingültig formulierte Aussagen über die Wirkung der getesteten Peptide (z.B.: NLS-Peptide, fusogene, lytische Peptide) zweifelhaft. Weiterhin wird in den meisten Arbeiten nur mit ein oder zwei Lipiden experimentiert, obwohl von vielen Autoren berichtet wurde, dass die Transfektionseffizienz bei der Lipofektion stark vom verwendeten Lipid abhängt (u.a. Karmali et al., 2004). Einige Autoren weichen bei ihren Versuchen von den durch die Hersteller angegebenen Idealbedingungen ab und verwenden beispielsweise andere DNA-Mengen. Oftmals werden – vor allem bei Versuchen mit verschiedenen Peptiden – suboptimale Lipid/DNA-Verhältnisse verwendet. Eine Widersprüchlichkeit in den erzielten Ergebnissen ist daher nicht verwunderlich.

Hinzu kommen bei einigen Publikationen handwerkliche Fehler wie das falsche Fixieren von Zellen, welches zu einer Umverteilung der extra- und intrazellulären Peptide und der mit ihnen

assoziierten DNA führte (Richard et al., 2002; Lundberg et al., 2002). Ein weiteres Problem bei Versuchen zum so genannten *gene tracking*, also der mikroskopischen Verfolgung der transfizierten Komplexe, ist die oftmals nur unzureichende Unterscheidung zwischen an den Zellen gebundener sowie aufgenommener DNA auf Grund nicht ausreichender Wasch- und Verdauungsschritte nicht aufgenommener Lipoplexe.

Geplantes Vorgehen

Der Aufbau der Arbeit lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Um das Ziel, die Steigerung der Transfektionseffizienz, zu erreichen, sollten zunächst die limitierenden Schritte einer erfolgreichen Transfektion ermittelt werden. Auf Grund der uneindeutigen Literaturlage erschienen breit angelegte Transfektionsversuche und deren mikroskopische Untersuchung mit unterschiedlichen Methoden, Reagenzien und Zelltypen zielführend. Durch dieses systematische Vorgehen sollten sich die widersprüchlichen Ergebnisse erklären lassen. Danach sollte für die ermittelten Probleme Lösungen gefunden werden, die zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz führen. Schwerpunkte sind hierbei gemäß der Literatur die Freisetzung der DNA aus den Endosomen sowie der Transport in den Zellkern. Hierbei sollten vor allem spezielle pH-abhängig fusogene Peptide zum Einsatz kommen, die transmembran in die Liposomen eingebaut wurden. Um die Ziele zu erreichen waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Identifizierung der Hürden bei der Transfektion durch ein systematisches screening, das die Verwendung verschiedener Reagenzien, Zelltypen und Peptide beinhaltet
- Verbesserung des Transportes der DNA in den Zellkern durch die Verwendung geeigneter NLS-Peptide
- Herstellung von Liposomen, die durch die Verwendung fusogener Peptide eine verbesserte Freisetzung aus den Endosomen erzielen
- Eventuelle Kombination mehrerer Strategien zur Optimierung der Transfektionseffizienz

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Gerät

Brutschrank Heraeus cytoperm 2

Centrifuge 5417R

Centrifuge 5415D

Durchlichtmikroskop Diavert

Elektrophorese

 Gelkammer SUB-CELL GT

 Power Pac 300

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M

 Kamera Axioacam MRm

 Quecksilberlampe HBO 100

 Steuerung FluoArc

 Software Axiovision 4.6

Labsonic2000

Lumi-Imager F1

Luminometer Microlumat Plus

Multifuge 3S-R

NanoDrop

Nucleofector I

Spectrafluor

SpeedVac concentrator

Thermocycler T3

Thermomixer compact

Ultraschallbad Transsonic

Vortexer

Waage Sartorius BP211D

Wasserbad precitherm PFV

Hersteller

Heraeus Instruments GmbH

Eppendorf AG

Eppendorf AG

Leica Microsystems GmbH

Bio-Rad Laboratories Inc.

Bio-Rad Laboratories Inc.

Carl Zeiss GmbH

Carl Zeiss GmbH

Carl Zeiss GmbH

Carl Zeiss GmbH

Carl Zeiss GmbH

Braun Biotech

Roche Diagnostics GmbH

EG&G Berthold

Heraeus Instruments GmbH

PeqLab Biotechnologie GmbH

Amaxa AG

Tecan GmbH

Savant

Biometra GmbH

Eppendorf AG

Carl Roth GmbH

Bender & Hobein

Sartorius AG

Labora Mannheim

3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche Diagnostics GmbH
BSA	New England Biolabs
Chloroform	Carl Roth GmbH
Cell Proliferation Agent WST-1	Roche Diagnostics GmbH
DAPI	Invitrogen GmbH
DMSO	Carl Roth GmbH
DNaseI	Roche Diagnostics GmbH
E.coli DNA Ligase	New England Biolabs
EDTA	Sigma-Aldrich
FKS	PAN Biotech GmbH
Fluorescein-12-dUTP	Roche Diagnostics GmbH
Hoechst 33342	Invitrogen GmbH
L-Glutamine	PAN Biotech GmbH
Lipofectamine	Invitrogen GmbH
Lipofectamine2000	Invitrogen GmbH
Megafectin20	QbioGene Inc.
Megafectin40	QbioGene Inc.
Megafectin60	QbioGene Inc.
PBS	PAN Biotech GmbH
PCR-H ₂ O	Roche Diagnostics GmbH
Restriktionsenzyme	
BglIII	Roche Diagnostics GmbH
NdeI	Roche Diagnostics GmbH
XbaI	Roche Diagnostics GmbH
Transferrin	Sigma-Aldrich
Trifluorethanol	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH
Trypanblau	PAN Biotech GmbH
XL1-Blue Supercompetent cells	Stratagen GmbH

3.1.3 Plasmid DNA

pcDNA 3.1 eGFP	Invitrogen GmbH
pGeneGrip Maleimide/Rhodamine/GFP Plasmid	Gene Therapy Systems Inc.
pM1-SEAP	Roche Diagnostics GmbH
pmax GFP	Amaya AG

3.1.4 verwendete Peptide

NLS-Peptid SV4 (Tetramer, linear) <i>NH₂-(PKKKRKVG)₄-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
NLS-Peptid zNLS (zyklisch) <i>NH₂-K₁₆-CV*KLKVYPLKKKRKP* -COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
NLS-Peptid KSV (linear, DNA-Bindedomäne) <i>NH₂-K₁₆-GAPKKRKVG-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
Fusogenes Peptid (p10 avian reovirus) <i>NH₂-RMPPGSCNGATAVFGNVH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
pH abhängig fusogenes LV-Peptid LVGP 8 <i>NH₂-HHHLVLPVLLVHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
pH abhängig fusogenes LV-Peptid LVGP12 <i>NH₂-HHHLVLPVLLVHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
pH abhängig fusogenes LV-Peptid LVGP16 <i>NH₂-HHHLVLPVLLVHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
pH abhängig fusogenes LV-Peptid LVGP 20 <i>NH₂-HHHLVLPVLLVHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific

pH unabhängig fusogenes LV-Peptid LVGP12-K <i>NH₂-KKKLVLVLGPVLVLVKKK-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
pH unabhängig fusogenes LV-Peptid LVGP16-K <i>NH₂-KKKLVLVLVLGPVLVLVLVKKK-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
Kontrollpeptid LVL <i>NH₂-HHLLLLLLLLLLLLLHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
Kontrollpeptid LVV <i>NH₂-HHVVVVVVVVVVVVVHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
Kontrollpeptid LVH <i>NH₂-HHHHHHHHHH-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
RGD-Peptid (linear) <i>NH₂-K₁₆-GGCRGDMFGC-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
RGD-Peptid (zyklisch) <i>NH₂-K₁₆-GGC*RGDMFGC*-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
RRE-Peptid (linear) <i>NH₂-K₁₆-GACRRETAWAC-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific
RRE-Peptid (zyklisch) <i>NH₂-K₁₆-GAC*RRETAWAC*-COOH</i>	Thermo Fisher Scientific

* markiert die durch die Zyklisierung verknüpften Aminosäuren.

3.1.5 verwendete Lipide

Cholesterin	Avanti Polar Lipids
Dope	Avanti Polar Lipids
Dotap	Avanti Polar Lipids
NBD-PE	Molecular Probes
Rhodamine DHPE	Molecular Probes

3.1.6 Verwendete Kits

High Pure PCR product purification Kit	Roche Diagnostics GmbH
Label IT Fluorescein labeling kit	Mirus Corporation
Label IT Rhodamine labeling kit	Mirus Corporation
Label IT Cy3 labeling kit	Mirus Corporation
Microarray RNA Target Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH
Nick Translation Kit	Roche Diagnostics GmbH
Nucleofector Kit V	Amaxa AG
Nucleofector Kit R	Amaxa AG
PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen GmbH
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH
SEAP reporter gene assay	Roche Diagnostics GmbH

3.1.7 Verwendete Puffer und Lösungen

Essigsäure Acetatpuffer pH 4.5	
Fusionspuffer	
20mM Tris pH 7.4	
150mM NaCl	
0.1mM EDTA	
Hepes Puffer	Roche Diagnostics GmbH
Restriktionspuffer H	Roche Diagnostics GmbH
Restriktionspuffer NEBuffer 2	New England Biolabs
Restriktionspuffer NEBuffer 3	New England Biolabs
Restriktionspuffer NEBuffer 4	New England Biolabs
Ripa Puffer	Roche Diagnostics GmbH

3.1.8 verwendete Zelllinien

A549	ECACC No. 86012804
CHO-K1	ECACC No. 85051005
Cos7	ECACC No. 87021302
Hek-293	ECACC No. 85120602
HeLa	ECACC No. 93021013
HT29	ECACC No. 91072201
Jurkat	ECACC No. 88042803
U937	ECACC No. 85011440

3.1.9 Zellkulturmedien

Medien und Zusätze

DMEM
MEM
OptiMem
RPMI
Ham's F12K
Glutamine
FKS
Non Essential Amino Acids

Hersteller

Invitrogen GmbH
Invitrogen GmbH
Invitrogen GmbH
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
PAN Biotech GmbH
PAN Biotech GmbH
PAN Biotech GmbH

Zelllinie

A549, CHO-K1
Cos7
Hek-293, HeLa
HT29, Jurkat, U937

verwendetes Medium

Ham's F12K + 2mM Glutamine + 10% FKS
DMEM + 2mM Glutamine + 10% FKS
MEM + 2mM Glutamine + 10% FKS + 1% Non Essential Amino Acids
RPMI + 2mM Glutamine + 10% FKS

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Plasmid DNA

Transformation von kompetenten Bakterienzellen

- Kompetente Zellen (E. coli XL-1 blue (Stratagene)) und DNA (Plasmid ca. 5 ng) auf Eis auftauen
- 40 µl Kompetente Zellen + 0,68 µl 1,42 M Mercaptoethanol (leicht schwenken)
- Kompetente Zellen + ca. 5 ng DNA (vorsichtig mischen) 20-30 min auf Eis

- Währendessen:
 - o Platten vorbereiten: 2 LB-Platten + Antibiotikum (hier Kanamycin) unter Flowbox öffnen und trocknen
 - o 400µl SOC-Medium (LB-Medium angereichert m. Mg. u. Glucose, ohne Antibiotika) oder LB-Medium unter der Bench in Eppi abfüllen und warm stellen

- 45 s bei 42°C Hitzeschock
- 2 min auf Eis
- 360 µl Medium zugeben
- ca. ½ h – 1 h bei 37°C schütteln (Thermomixer ca. 800 rpm)
- 50 µl und 10 µl mit Drygalskispatel (diesen vorher in 100% Ethanol tauchen, abflammen und abkühlen lassen) gleichmäßig verteilen (bis Spatel nicht mehr leicht gleitet)
- Platten bei 37°C über Nacht im Dunklen inkubieren

Ansetzen der Über-Tag-Kultur :

- kleine Röhrchen mit LB Medium ansetzen
- Antibiotikum (hier Kanamycin) zugeben
- Von den LB-Platten mehrere Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze picken und in die Röhrchen geben
- Röhrchen in Schüttelinkubator bei 37°C und 200rpm für etwa 7 Stunden inkubieren

Ansetzen der Über-Nacht-Kultur:

- Röhrchen aus dem Inkubator nehmen
- In 1000 ml Kolben je 500 ml LB-Medium + 500 µl Antibiotikum (Kanamycin) vorlegen
- Eines der Röhrchen auswählen und je 500µl der Zelllösung in die Kolben geben und diese über Nacht bei 37°C und 200 rpm in den Schüttelinkubator stellen und über Nacht inkubieren

Isolierung der Plasmid DNA aus den Bakterien

Verwendete Materialien

Kit: Plasmid Giga Kit

Firma: Quiagen

Bestell-Nr.: 12291

- Zentrifuge auf 4°C kühlen
- Die Bakteriensuspension aus dem 1000 ml Kolben in Zentrifugengefäße überführen
- 15' mit 6000 x g zentrifugieren bei 4°C
- Überstand entfernen
- QIAfilter Giga Kartusche auf 1L Flasche schrauben
- das Bakterienpellet in je 20,8 mL Puffer P1 resuspendieren
- 62,5 ml Puffer P2 zugeben und 4-6 mal schwenken, dann bei RT max. 5' inkubieren
- 62,5 ml Puffer P3 (eiskalt!) zugeben sofort gründlich mischen (4-6 mal schwenken)
- das Lysat in QIAfilter Giga Kartusche schütten bei RT 10' inkubieren
- Vakuum anlegen und Lysat durchlaufen lassen
- 50 mL Puffer FWB2 auf QIAfilter geben gut mit dem Filterkuchen verrühren (mit sterilem Spatel); Vakuum anlegen
- QIAGEN-tip 10000 auf Messzylinder setzten (1000 ml) und 75 mL Puffer QBT zu equilibrieren auf Säule geben, durchlaufen lassen
- Filtrat auf Säule schütten
- Säule mit 600 mL Puffer QC waschen (hier nur 300 ml Puffer)
- DNA von Säule mit 75 mL Puffer QN in neuen, sterilen Meßzylinder eluieren

- 52,5 mL Isopropanol zugeben; mischen; auf Falcons aufteilen; und bei 4°C 15000g 30 min zentrifugieren (Überstand vorsichtig dekantieren)
- jedes Pellet mit 2,5 mL 70% Ethanol waschen; 10' zentrifugieren bei 15000 x g; Überstand vorsichtig dekantieren;
- Pellet ca. 8' an Luft trocknen (5' Falcotube senkrecht auf Öffnung gestanden, 3' schräg liegend das Pellet oben)
- jedes Pellet in 1,0 mL PCR-H₂O aufnehmen, 15' stehen gelassen (oder über Nacht im Kühlschrank) ; resuspendiert und in ein Falcontube poolen
- Konzentration am NanoDrop bestimmen
- Restriktionsspaltung zum Test der DNA

3.2.2 Zellkultur

Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden bei -80°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Vials aus dem Stickstofftank entnommen und sofort auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen fast vollständig aufgetaut waren wurden sie in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben, dass mit 10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium gefüllt war. Die Zellen wurden dann vorsichtig gemischt und für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene und zelltoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Passagieren der Suspensionszellen

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage in T175 Zellkulturflaschen passagiert. Die Zellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Danach wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit 30 ml Medium inkubiert.

Passagieren der adhärennten Zellen

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von 90% in T175 Zellkulturflaschen passagiert. Dabei wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Trypsin/EDTA. Nachdem das Trypsin den Boden der Zellkulturflaschen vollständig bedeckte, wurden diese für etwa 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Danach wurden mit 2 ml PBS die Zellen gründlich vom Boden der Zellkulturflaschen abgespült und in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Dort wurde die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Danach wurden 10ml Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen für 10min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die gewünschte Anzahl der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit 20 ml Medium inkubiert.

3.2.3 Umgang mit Peptiden

Lagerung der Peptide

Die Peptide wurden von der Firma Thermo Fischer synthetisiert und als Pulver bei -20°C gelagert. Im gelösten Zustand wurden die Peptide bei 4°C maximal 3 Monate aufbewahrt.

Lösen der Peptide

Alle Peptide wurden derart gelöst, dass eine 1mM Stammlösung erzeugt wurde

- berechnete Menge an Peptid abwiegen
- lösen in 1/5 des postulierten Endvolumens in 50% DMSO / 50% TFE
- 10 min Ultraschallbad (unter Eiskühlung)
- zentrifugieren (13 000 rpm, 10 min 4°C)
- Überstand einfrieren bei -18°C über Nacht
- Konzentration bestimmen am NanoDrop
 - o Programm Adsorption 280 wählen
 - o 1,5 µl der Peptidlösung auf die Messvorrichtung des NanoDrop pipettieren
 - o Messung starten
- Auffüllen mit reinem TFE, um die Konzentration von 1mM zu erzielen

3.2.4 Herstellung von Liposomen aus Dotap, Dope und/oder Cholesterin

Die Lipide Dotap, Dope und Cholesterin wurden von der Firma Avanti Polar Lipids bezogen und in Chloroform gelöst geliefert (c=10 mg/ml).

Durchführung

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Liposomen erstellt. Diese enthielten teilweise transmembran eingebaute Peptide oder wurden fluoreszenzmarkiert (mit Rh-PE bzw. NBD-PE).

- Ansatz:
 - 150 μ l Lipidlösung (10mg/ml)
 - optional 45 μ l Peptid (400 μ M)
 - optional 21 μ l Rh-PE (1mg/ml)
 - optional 15 μ l NBD-PE (1mg/ml)

- Lipid/Peptidmischungen zusammenpipettieren und unter Stickstoff trocknen. Dabei muss ein gleichmäßiger Lipidfilm erzeugt werden
- Über Nacht evakuieren, um letzte Spuren Chloroform zu entfernen
- Proben hydratisieren mit 600 μ l 20mM Hepes-Puffer
- 1h schütteln bei 1400 rpm und 37°C im Eppendorf-Schüttler
- Optional: Sonifizierung zur Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)
 - Kühlung mit Eiswasser
 - Amplitude 80%
 - 8 min
- Optional: Zentrifugation zum Entfernen nicht eingebauter Peptide
 - 13000 rpm bei 4°C für 20min

Die hergestellten Liposomen wurden umgehend für die Versuche verwendet.

3.2.5 Bindung von Peptiden an DNA

Die NLS- und RGD- bzw. RRE-Peptide wurden über elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA assoziiert. Dabei wurden einfach die gewünschte DNA-Menge (Pro Probe 150 ng) mit der entsprechenden Menge an Peptiden kombiniert.

- Ansatz:
 - 150 ng DNA
 - Gewünschte Menge an Peptid
 - Ad H₂O, so dass eine DNA-Konzentration von 67 ng/μl entsteht

- Inkubation 30 min bei RT

3.2.6 Herstellung von DNA/Peptid/Lipid-Komplexen

Dieses Protokoll wurde zur Herstellung von Lipoplexten aus kationischen Lipiden entwickelt, die mit DNA und fusogenen LV-Peptiden assoziiert waren. Die Erzeugung der Komplexe erfolgte in 96well Platten. Dadurch war durch die Verwendung von Mehrkanal-Pipetten ein einfaches und schnelles Pipettieren möglich. Das war notwendig, um bei allen Komplexierungen gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Vorbereiten der Liposomenlösungen

Die Liposomenlösungen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben generiert.

Vorbereiten der DNA

DNA ohne NLS-Peptide

Die DNA wurde mit Wasser verdünnt, so dass eine Konzentration von 67 ng/μl erreicht wurde. Unmittelbar vor Nutzung wurde die DNA-Lösung kurz gevortext und abzentrifugiert, um eine homogene Lösung zu erreichen.

DNA mit Peptiden (vorkomplexiert)

Die Vorkomplexierung wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Unmittelbar vor Nutzung wurde die DNA-Lösung kurz gevortext und abzentrifugiert, um eine homogene Lösung zu erreichen.

Vorbereiten der LV-Peptide

Die Peptide wurden wie unter 3.2.3 beschrieben gelöst. Mit H₂O wurde die Stammlösung verdünnt und die gewünschten Konzentrationen erstellt.

Herstellung der Komplexe

- Ansatz pro 96well:
 - 2,25 µl DNA (150ng)
 - 0,75 µl Liposomen (1mM)
 - 3 µl Hepes Puffer (20mM)
 - 1,5 µl LV-Peptid

- Vorlegen des Hepes Puffers
- Zugabe der Liposomenlösung
- Zugabe der LV-Peptide
- Mischen durch Pipettieren (3x)
- Inkubation 5 min bei RT
- Zugabe der DNA-Lösung
- Mischen durch Pipettieren (3x)
- Inkubation 15 min bei RT

Damit sind die Lipoplexe erstellt und konnten bei den Transfektionen eingesetzt werden (siehe 3.2.7).

3.2.7 Transfektion von Zellen

Alle Versuche wurden 3 mal unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei wurden jeweils Duplikate oder Triplikate verwendet. Alle Lipofektionen wurden im 96well Format realisiert.

3.2.7.1 Elektroporation

Verwendete Materialien

Kit: Nucleofector Kit V (Cos7, Jurkat), bzw. Nucleofector Kit R (HT29)
Firma: Amaxa AG
Bestell-Nr.: VCA-1003, VCA-1004

Durchführung

Die Elektroporationen wurden gemäß der Herstellerangaben der Firma Amaxa durchgeführt.

1. Vorbereiten von 2 µg DNA pro Probe (eventuell Vorkomplexierung)
2. Aufwärmen der Nucleofector Lösung auf RT
3. Vorbereiten eines 6wells pro Probe mit 1 ml serumhaltigem Kulturmedium
4. 1×10^6 Zellen pro Probe wurden in 100 µl der Nucleofector-Lösung resuspendiert
5. Zugabe von 2 µg Plasmid-DNA (siehe Schritt 1) und mischen
6. Transfer der Zell-DNA-Lösung in eine Küvette
7. Die Küvette wurde in den Küvettenhalter des Nucleofector I gestellt. Wahl des Elektroporationsprogrammes
8. Elektroporation
9. Sofortige Zugabe von 500 µl vorgewärmten (37°C) RPMI-Medium mit Serum in die Küvette
10. Transfer des Küvetteninhaltes in das vorbereitete 6well (Siehe Schritt 3)

3.2.7.2 Lipofektion

Vorbereiten der Zellen

Adhärente Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well mit 150µl Kulturmedium ausgesät (Cos7: 1×10^4 Zellen; HT29 3×10^4 Zellen). Unmittelbar vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 150 µl Zellkulturmedium durchgeführt. Suspensionszellen wurden unmittelbar vor Transfektion in einem 96well mit 150µl Kulturmedium eingesät (Jurkat 3×10^4 Zellen).

Herstellung der Transfektionskomplexe

Die Transfektionskomplexe wurden gemäß der Herstellerangaben (Lipofectamine2000, Invitrogen GmbH; Megafectin, QbioGene Inc.) erstellt.

Lipofectamine2000 (Invitrogen GmbH)

- Ansatz (DNA):
 - 150 ng DNA
 - Ad 25 µl OptiMem
- Ansatz (Lipofectamine2000):
 - 0,4 µl Lipofectamine2000
 - Ad 25µl OptiMem
- Aufwärmen aller Reagenzien auf RT
- Lipofectamine2000 kurz vortexen
- Mischen von Lipofectamine2000 und OptiMem
- Mischen von DNA und OptiMem
- Vereinen beider Lösungen und Mischen durch Pipettieren (3x)
- Inkubation 20 min bei RT
- Zugabe von 50 µl zu den Zellen

Megafectin (QbioGene Inc.)

- Ansatz:
 - 150 ng DNA
 - 0,75 µl Megafectin
 - Ad 10 µl Hepes Puffer

- Aufwärmen aller Reagenzien auf RT
- Megafectin kurz vortexen
- Zugabe des Megafectin zum Hepes Puffer
- Zugabe der DNA zur Megafectin/Hepes-Lösung
- Mischen durch Pipettieren (3x)
- Inkubation 15 min bei RT
- Zugabe von 10 µl zu den Zellen

Komplexe aus verschiedenen Lipiden und Peptiden

Die Herstellung von Komplexen aus Peptiden und Lipiden ist unter 3.2.5 bzw. 3.2.6 beschrieben.

Transfektion

Die Transfektionkomplexe wurden zu den Zellen pipettiert. Danach erfolgt ein vorsichtiges Mischen durch Schwenken der Platten. Diese werden dann für 48 Stunden im Zellinkubator inkubiert und danach ausgewertet.

3.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde durch 2 Parameter bestimmt. Zum einen die so genannte Expressionsstärke, d.h.: die Menge des Genproduktes, welches durch die Transfektion erzeugt wurde und zum anderen die so genannte Transfektionsrate, d.h.: die Anzahl der Zellen, die das Genprodukt herstellen.

3.2.8.1 Bestimmung der Expressionsstärke (SEAP)

Verwendete Materialien

Kit: SEAP reporter gene assay
Firma: Roche Diagnostics GmbH
Bestell-Nr.: 11779842001

Vorbereitung der Proben

Die Überstände der transfizierten Zellen wurden gesammelt anschließend für 24 Stunden bei -20° gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Messung mittels des SEAP-Kit von Roche.

Vorbereitung der Reagenzien

Zur Herstellung des Substratlösung wurde das Substrat 1:20 mit dem Substrat Puffer verdünnt. Die Positivkontrolle wurde in 1 ml H₂O gelöst (c=5 µg/µl). Mit dieser Positivkontrolle wurde eine Standardreihe mit dem dilution buffer erstellt (1 µg, 100 ng, 10 ng, ..., 0g).

Durchführung der Messung

Die Durchführung erfolgte analog den Herstellerangaben. Es wurden grundsätzlich Triplets gemessen. Alle Messungen wurden mit 96well Platten durchgeführt.

- Proben und Standardreihe wurden für 30min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gestellt
- 35 µl dilution buffer in jedes well geben
- 15 µl Probe bzw. Standard in jedes well pipettieren
- Zugabe von 50µl des Inactivation buffers in alle wells
- Inkubation 5 min RT
- Zugabe von 50 µl Substratlösung
- Inkubation 10 min bei RT unter Schütteln mit 300 rpm; vor Licht schützen
- Messung der Platten im Luminometer Microlumat Plus

3.2.8.2 Bestimmung der Transfektionsrate (GFP)

Die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen wurde durch Auszählen der Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Hierzu wurden 3 Ausschnitte in einer geeigneten Vergrößerung ausgezählt. Eine geeignete Vergrößerung lag vor, wenn die Anzahl der positiven Zellen zwischen 50 und 150 Zellen pro Ausschnitt betrug. Die gezählte Zellzahl der 3 Ausschnitte wurde gemittelt, auf das gesamte well extrapoliert und in Relation zur eingesäten Zellzahl gesetzt. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Wert.

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der AxioCam MRm erstellt und mit der Software AxioVision (Version 4.6) bearbeitet.

3.2.9.1 Herstellung markierter DNA und markierter Lipide

Herstellung markierter DNA

Kit: Label IT Cy3 labeling kit, Label IT Fluorescein labelling kit

Firma: Mirus Corporation

Bestell-Nr.: MIR 3625, MIR 3225

Die Herstellung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Label Fluorescein bzw. Cy3 wurden in einem Verhältniss von 1:1 (DNA[w]:Label[v]) zur DNA eingesetzt.

- DNA: 5 µg pro Probe einsetzen
- Ansatz:
 - 5 µg DNA
 - 5 µl Label
 - 5 µl Puffer A
 - 35 µl H₂O

- Lösungen in ein Eppendorf Cup geben und 30 min bei 37°C inkubieren
- Kurz (2 s) zentrifugieren und weitere 30 min bei 37°C inkubieren
- Zur Aufreinigung der Proben: mitgelieferte Säulchen kurz vortexen, Verschluss durch ¼ Drehung lösen, Bottom Closure herausziehen
- Säulchen auf einem 1,5 ml Mikrotube stecken und 1 min bei 735 g zentrifugieren
- Mikrotubes mit Puffer verwerfen und Säulchen auf neue Mikrotubes stecken
- Proben auf die Säulchen geben und 2 min bei 735 g zentrifugieren
- Im Durchfluss befindet sich die markierte DNA → Säulchen verwerfen
- Konzentration der DNA bestimmen mittels NanoDrop

pGeneGrip-Plasmide (Firma Gene Therapy Systems)

Die durch das chemische Labeling mittels der Label IT labeling kits erzeugte markierte DNA ist nicht mehr transkribierbar, da die kovalente Bindung der Fluophore eine Transkription durch die Polymerase inhibiert (siehe Herstellerangaben). Für bestimmte Anwendungen war es aber notwendig, dass die markierte DNA auch transkribiert werden kann. Derartige DNA wurde von der Firma Gene Therapie Systems bezogen und ist im Kapitel 3.1.3 aufgeführt.

Markierte Lipide

Um eine Lokalisierung der bei der Transfektion eingesetzten Lipide zu ermöglichen wurden von der Firma QbioGene Inc. Rhodamine markierte Lipide bezogen (Megafectin). Die verwendeten Lipide sind im Kapitel 3.1.2 aufgeführt.

3.2.9.2 Zellkernfärbung

Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 von Invitrogen gefärbt. Hierzu wurde eine 1:500-Verdünnung der Hoechst 33342 Lösung mit Zellkulturmedium erstellt. 100 µl dieser Lösung wurden zu den Zellen in jedes 96well zugegeben und für 20 min inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel mit Standardmedium durchgeführt.

3.2.9.3 Wasch- und Verdauschritte

Durch die Wasch- und Verdauschritte sollte die extrazellulär gebundene und somit nicht internalisierte DNA entfernt werden. Dadurch ist eine leichtere Lokalisierung der intrazellulären DNA ermöglicht worden, da die Fluoreszenzsignale nicht durch die der extrazellulären DNA überlagert werden.

Trypsin-Behandlung

Die Trypsin-Behandlung wurde durchgeführt um die Lipoplexe von der äußeren Zellmembran zu entfernen. Hierzu wurde bei den Zellen das Medium abgenommen und die Zellen ein mal mit PBS gewaschen. Danach wurden 50 µl Trypsin/EDTA pro well zugegeben und die Zellen für 5 min inkubiert. Um das Ablösen der Zellen zu erleichtern wurde alle 2 min durch leichtes Pipettieren gemischt. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurden sie bei 250 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

DNaseI-Verdau

Die trypsinierten Zellen wurden dann in DNaseI-haltigem Zellkulturmedium (c=200 µg DNaseI / ml Medium) resuspendiert und für 45 min inkubiert. Dadurch kann die sich noch frei im Medium befindliche DNA abgebaut werden. Danach wurden die Zellen erneut für 10 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach eine Inkubation von 3 Stunden (damit die Zellen anwachsen können) wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

3.2.10 PicoGreenAssay

Verwendete Materialien

Kit: Quant-iT PicoGreen
Firma: Invitrogen GmbH
Bestell-Nr.: P7589

Herstellung der Reagenzien

- 1xTE herstellen: Dazu eine 1:20 Verdünnung des im Kit befindlichen TE mit PCR-Wasser erstellen
(Pro Probe werden insgesamt 150 µl 1xTE; pro Standard 200 µl 1xTE benötigt)
- PicoGreen-Reagenz-Lösung herstellen: Hierfür wird eine 1:200-Verdünnung des PicoGreen-Reagenz (vorher auftauen) in 1xTE erzeugt.
(Pro Probe werden 100 µl der Reagenz-Lösung benötigt, vor Licht schützen!)

Durchführung der Messung

- in eine schwarze Nunc-Platte (96well) wurden für die Proben und Standards 90 µl 1xTE vorgelegt
- 10 µl der Proben/Standards werden in den vorgelegten TE-Puffer pipettiert
- Bei den Standards werden die entsprechenden DNA-Mengen (1,3,10,33,100 ng) verwendet
- Zugabe von 100µl der Reaktionslösung
- Inkubation 5min im Schüttler bei RT (vor Licht schützen!)
- gemessen wird im Tecan SpectraFluoR
- Filter wählen (Excitation: 485 ; Emission: 535)
- Einstellungen wählen:
 - Schütteln 5 sec linear
 - Gain auf optimal stellen
- 1. Messung starten
- Nach der Messung Tritonzugabe, um Lipide und Peptide von der DNA zu trennen:
 - es werden 10 µl einer 20%-Tritonlösung zu jedem well pipettiert
 - Optional: Um Peptide abzdauen, 50 µl Trypsin / well zugeben
 - Inkubation 5 min RT
- 2. Messung starten
- Daten speichern

3.2.11 In-Vitro-Transkription

Verwendete Materialien

Kit: Microarray RNA Target Synthesis Kit

Firma: Roche Diagnostics GmbH

Bestell-Nr.: 03266877910

Der im Kit enthaltene Reaktionspuffer musste durch den Restriktionspuffer NEB2 von New England Biolabs ersetzt werden. Der eigentliche Reaktionspuffer enthält ein Detergenz und löst somit die Bindung von DNA und kationischen Lipiden. Dies war nicht gewollt, da die Transkribierbarkeit der DNA im gebundenen Zustand überprüft werden sollte.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

- Ansatz:
 - 0,5 µg komplexierte DNA (Lipidmenge siehe 3.2.6)
 - 3µl 10x Puffer NEB2
 - 2µl DTT
 - 4µl NTP's
 - 3µl Polymerase
 - Ad 30µl H₂O
- Ansatz in ein Eppendorf Gefäß geben und durch Pipettieren mischen
- Inkubation 150 min bei RT
- Analyse durch Gelelektrophorese

3.2.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Die zur vollständigen Spaltung der DNA einzusetzende Enzymmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymmenge (U)} = \frac{\text{Schnittstellen in Plasmid-DNA}}{\text{Schnittstellen in Lambda-DNA}} \times \frac{\text{kb Lambda-DNA}}{\text{kb Plasmid-DNA}} \times \mu\text{g DNA}$$

3.2.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Selbstligation der freien Enden eines Vektors abzuschwächen, wurden die Enden dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA in 1/10 Volumen Alkalische-Phosphatase-Puffer (oder direkt im Puffer des Restriktionsverdau) und 1 µl Alkalische Phosphatase (20 U) für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.2.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Gereinigte DNA-Fragmente, die nach Restriktionsspaltung und anderen Modifikationen durch präparative Agarose-Gelelektrophorese erhalten worden waren, wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. In einem Gesamtvolumen von 20 µl, in dem Vektor und Insert in einem Verhältnis von ca. 1:3 vorlagen, wurde in Gegenwart von 1-2 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C ligiert. Neben der DNA enthielt der Ansatz noch 1/10 Volumen eines 10x Ligase-Puffers des Herstellers. Für die anschließende Transformation wurden 5µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

3.2.15 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook et al., 1989).

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,7-2% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 65°C in eine Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben (20-500 ng je Fragment) wurden mit 1/6 ihres Volumens mit Auftragspuffer versetzt, in die vorgeformten Taschen gegeben und bei 5-10 V/cm aufgetrennt.

- TBE-Puffer:
 - 90 mM Tris
 - 90 mM Borsäure
 - 2,5 mM EDTA
 - 0,1 μ M Ethidiumbromid

- Auftragspuffer:
 - 0,25 % Bromphenolblau
 - 0,25 % Xylencyanol
 - 40 % Glycerin
 - 30 mM EDTA

3.2.16 Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegel

Nukleinsäuren werden durch die Fluoreszenz des in sie eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Dazu wurde das Agarosegel nach Beendigung der Elektrophorese mit dem LumiImager fotografiert.

3.2.17 Fusogenitätsassay

Dieser Test diente zur Messung der Fusogenität der hergestellten Liposomen und wurde eingesetzt, um die Wirkung der fusogenen LV-Peptide zu bestimmen. Dabei werden die zu testenden Liposomen mit Liposomen gemischt, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine [NBD-PE] und LissamineTM rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine [Rh-PE]) derart markiert sind, dass ein FRET vorliegt. Durch Fusionsereignisse dieser markierten Liposomen mit den hergestellten Liposomen wird der FRET aufgehoben, so dass die Fluoreszenz des NBD-PE stärker wird. Diese Zunahme ist ein Maß für die Fusogenität der Liposomen

Durchführung

Vorbereitung der Liposomen

Die Liposomen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben erstellt. Für die Messung der Fusogenität wurden zusätzlich noch Liposomen mit NBD-PE bzw. Rh-PE generiert. Alle Liposomen wurden sonifiziert, um SUV's zu erhalten.

Um pH abhängig fusogene Liposomen testen zu können, musste der pH der Liposomenlösung auf pH 4,5 eingestellt werden. Hierzu wurden 1/20 des Volumens der Liposomenlösung eines Essigsäure-Acetat-Puffers (1M, pH 4.5) zugegeben.

- Proben mischen:
 - 4 Teile unmarkierte Liposomen/Peptid Probe (80µl)
 - 1 Teil markierte Probe (20µl)

- Driftkontrolle:
 - 80µl Fusionspuffer + 20µl markierte Probe

- pro Probe bzw Leer:
 - 120 µl Liposomen/Leer + 30 µl markierte Liposomen
 - davon 100 µl (well) für Zeile 2
 -

- für Driftkontrolle:
 - 240 µl Fusionspuffer + 60 µl markierte Liposomen mischen und zu 100 µl aliquotieren

Messung am Fluostar

- FLUOstar Fluoreszenz Reader und Wasserbad auf 37°C vorheizen,
- Pumpe mit entsprechender Lösung (T X/100) spülen, Test Parameter festlegen

Beispiel: Auftragschema (für 4 Proben + Leerwert):

80 µl Probe + 20 µl markierte Liposomen	80 µl Probe + 20 µl markierte Liposomen	80 µl Probe + 20 µl markierte Liposomen	80 µl Probe + 20 µl markierte Liposomen	80 µl Leer + 20 µl markierte Liposomen
Driftkontrolle	Driftkontrolle	Driftkontrolle		

- je 100µl Probe pro Well in 96 Well Platte pipettieren
- Platte mit Proben im ausgeschalteten Wasserbad bei 37 °C für 2 min inkubieren (Stoppuhr!).
- Plattenboden abwischen und sofort in Reader stellen und Messung starten (T1)
- Zweite Messung (T2) starten für 100% Fusion: 10µl 5% (w/v) Triton X-100 wird automatisch in jedes Well pipettiert.
- Ex: 460 nm; Em: 530 nm

4 Ergebnisse

Die widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen Verbesserung der Transfektion durch die Verwendung von NLS- oder fusogener Peptide (siehe Kapitel 2.3.2) zeigten zweifelsfrei, dass für eine genaue Beurteilung ihrer Wirkung ein geeignetes Analysesystem etabliert werden muss, um die widersprüchlichen Resultate verstehen zu können. Dieses System musste neben einer exakten Bestimmung der Transfektionseffizienz auch eine fehlerfreie Lokalisierung der transfizierten DNA ermöglichen, um beispielsweise gesicherte Aussagen über die funktionelle Wirkungsweise verwendeter Lipide oder Peptide zu ermöglichen.

Es sollten zunächst Versuche mit verschiedenen lipidbasierten Transfektionsreagenzien sowie unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt werden, um eine Identifizierung der für eine erfolgreiche Transfektion kritischen Schritte bei verschiedenen Zelllinien und Reagenzien machen zu können. Zum Vergleich unterschiedlicher Methoden wurden auch Transfektionen mittels Elektroporation durchgeführt. Bei dieser physikalischen Gentransfermethode wird die Aufnahme der DNA über eine kurzzeitige Porenbildung in der Zellmembran erreicht (siehe Kapitel 2.2.2). Dadurch gelangt die DNA direkt in das Zytoplasma der Zellen und muss im Gegensatz zur Lipofektion nicht aus den Endosomen freigesetzt werden (siehe Kapitel 2.3). Deshalb eignet sich die Elektroporation besonders als Modellsystem für die Beurteilung von NLS-Peptiden, die den Transport der DNA vom Zytoplasma in den Zellkern steigern sollen (siehe Kapitel 2.3).

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden zwei Parameter betrachtet. Zum einen die Transfektionsrate, d.h.: die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl, und zum anderen die Expressionsstärke, d.h.: die Expression eines Transgenes der erfolgreich transfizierten Zellen. In der Literatur wird leider zwischen diesen durchaus unterschiedlichen Kriterien selten unterschieden, so dass der standardmäßig genutzte Begriff der Transfektionseffizienz je nach Publikation unterschiedliche Sachverhalte darstellt. So beschreiben Arbeiten mit GFP als Reportergen (z.B.: Ludtke et al., 1999) die Veränderung der Anzahl der transgenexprimierenden Zellen und somit der Transfektionsrate. Da eine Quantifizierung des GFP relativ ungenau ist, lassen sich keine verlässlichen Angaben zur produzierten Proteinmenge machen. Arbeiten mit Luziferase oder SEAP als Reportergene quantifizieren die Menge an synthetisiertem Genprodukt und somit der Expressionsstärke, aber lassen nur ungenaue Rückschlüsse auf die Anzahl der transfizierten Zellen zu (Zanta et al., 1999).

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden fluoreszenzmarkierte Lipide sowie markierte DNA eingesetzt und die Zellkerne gefärbt. Um auftretende Artefakte durch die Fixierung von Zellen, die zu falschen Ergebnissen führt, zu vermeiden, wurden alle mikroskopischen Arbeiten mit lebenden Zellen vollführt. Hierzu mussten geeignete Wasch- und Verdauschritte etabliert werden, um die an die Zellmembran assoziierte aber nicht endozytierte DNA zu entfernen. Dadurch ist eine genaue Lokalisierung der DNA erst möglich, da eine exakte Differenzierung zwischen adsorbierter und internalisierter Lipoplexe gewährleistet ist.

4.1 Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen

Als erstes mussten die optimalen Transfektionsbedingungen bestimmt werden, um die Transfektionen mit der höchsten Effizienz durchführen zu können. Bei der Lipofektion ist vor allem das richtige Verhältnis von DNA und Lipid für die Transfektionseffizienz entscheidend (siehe Kapitel 2.2.3). Bei der Elektroporation spielt Art, Länge und Höhe des elektrischen Impulses eine entscheidende Bedeutung. Ein weiterer Punkt ist die ideale Zelldichte, die für jeden Zelltyp individuell bestimmt werden musste.

4.1.1 Zellen

Eukaryontische Zellen lassen sich unterschiedlich gut transfizieren. Anhand der bei der Transfektion erreichten Effizienz kann man sie grob in 3 Gruppen einteilen:

- leicht zu transfizierende Zellen (z.B.: Cos7, HeLa, A549, CHO-K1)
- schwer zu transfizierende Zellen (z.B.: Jurkat, U937, RAW, PC12)
- nicht leicht und nicht schwer zu transfizierende Zellen (z.B.: HT29, L8)

In den Untersuchungen sollte ein Zelltyp aus jeder der beschriebenen Gruppen zum Einsatz kommen. Dadurch sind fundierte Aussagen über die möglichen intrazellulären Unterschiede bei der Transfektion und der sich daraus ergebenden Hindernisse möglich, da nur so ausgeschlossen werden kann, dass es sich nicht um spezifischen Probleme einer bestimmten Zelllinie handelt.

Für die Durchführung der Transfektionen war es wichtig, die am besten geeignete Zellzahl zu bestimmen, die dann für alle weiteren Versuche und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet wurde. Hierzu wurde eine unterschiedliche Anzahl an Zellen eingesät, transfiziert und die Transfektionseffizienz bestimmt. Somit konnte die für alle Untersuchungen optimale Zellzahl für jede Zelllinie bestimmt werden.

Cos7-Zellen

Die Zelllinie COS-7 (siehe Abb. 4.1) gehört zur Gruppe der leicht zu transfizierenden Zellen und wurde 1981 aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen (Gluzman et al., 1981). Es handelt sich um eine etablierte Fibroblasten-Zelllinie, die häufig in zellbiologischen Experimenten eingesetzt wird. Die Zellen wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert und produzieren daher das so genannte T-Antigen. Auf Grund ihrer guten Transfizierbarkeit eignen sie sich besonders gut für Transfektionsexperimente. Die optimale Zelldichte wurde erreicht, wenn 24 Stunden vor Transfektion 1×10^4 Zellen pro well einer 96well Platte in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät wurden.

HT29-Zellen

Die Zellen wurden 1964 aus Tumorgewebe isoliert (Fogh, 1975). Es handelt sich um humane Epithelienzellen. HT29-Zellen (siehe Abb. 4.2) gehören weder zur Gruppe der besonders schwer, noch zu den besonders leicht zu transfizierenden Zellen und wurden in verschiedenen Versuchen hinsichtlich des Gentransfers eingesetzt (Fa. Amaxa, Fa. Roche). Als ideal stellte sich eine Einsaat von 3×10^4 Zellen pro well einer 96well Platte in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium 24 Stunden vor Transfektion heraus.

Jurkat-Zellen

Die Jurkatzelle (siehe Abb. 4.3) ist eine Leukämie-Zelllinie, die von menschlichen T-Zellen abstammt. Sie wurden aus dem Blut eines 14 Jahre alten Jungen isoliert (Schneider et al., 1977). Sie wird heute oftmals verwendet, um die Wirkungen von Krebsmedikamenten und Bestrahlung zu untersuchen. Jurkatzellen gehören zur Gruppe der so genannten schwer zu transfizierenden Zellen. Da Jurkatzellen Suspensionszellen sind und somit nicht wie adhärente Zellen anwachsen

müssen, konnten die Zellen direkt vor der Transfektion vorbereitet werden. Die besten Ergebnisse konnten bei einer Zelldichte von 3×10^4 Zellen pro well einer 96well Platte in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium erzielt werden. Die für alle Zelllinien ermittelten idealen Zellzahlen wurden folgend bei allen Experimenten angewendet.

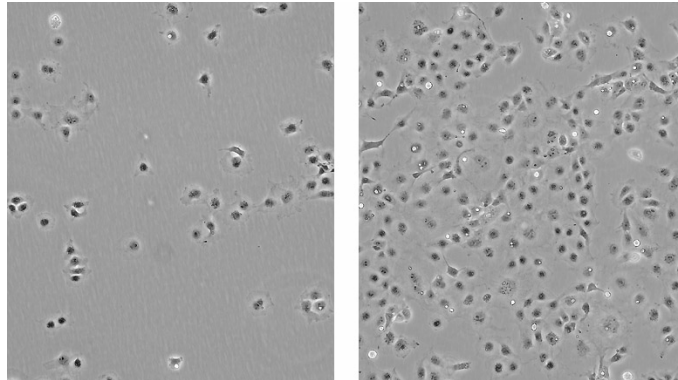


Abb. 4.1: Mikroskopie von Cos7-Zellen. Links: geringe Zelldichte; Rechts: hohe Zelldichte; 400fach vergrößert

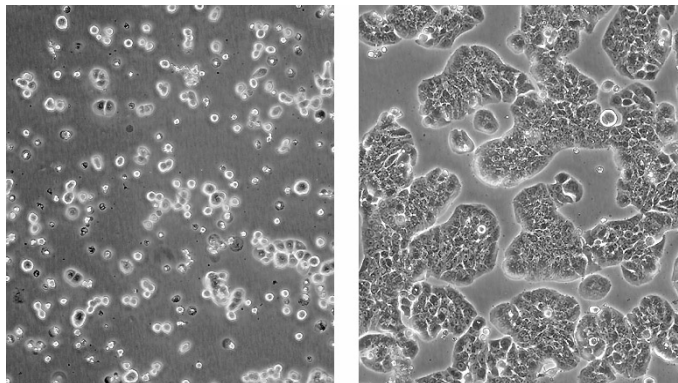


Abb. 4.2: Mikroskopie von HT29-Zellen. Links: geringe Zelldichte; Rechts: hohe Zelldichte; 400fach vergrößert

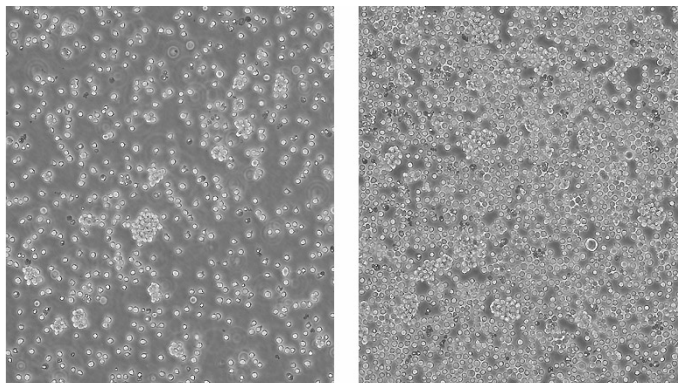


Abb. 4.3: Mikroskopie von Jurkat-Zellen. Links: geringe Zelldichte; Rechts: hohe Zelldichte; 400fach vergrößert

4.1.2 Lipofektion

Bereits früh konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von DNA zu Lipid ein kritischer und für die Transfektionseffizienz maßgebender Faktor bei der Lipofektion von eukaryontischen Zellen ist (siehe Kapitel 2.2.3). Die eingesetzten Mengen der negativ geladenen DNA und der positiv geladenen oder neutralen Lipiden beeinflussen dabei die Größe der Lipoplexe und den für die Transfektion sehr wichtigen Aspekt der Ladung (siehe Kapitel 2.2.3.2). Daher ist es üblich das Verhältnis von DNA und Lipid als Ladungsverhältnis zwischen den Phosphatgruppen der DNA und den kationischen Kopfgruppen der Lipide anzugeben. Für die Wirkung von NLS- und besonders fusogenen Peptiden sind die molaren Verhältnisse von DNA, Peptiden und Lipiden entscheidend. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen habe ich üblicherweise die molaren Verhältnisse angegeben. Um diese bezüglich der für die Transfektion wichtigen Gesamtladung der Komplexe verständlich zu machen, sind bei der Ermittlung der idealen Verhältnisse jeweils beide Parameter dargestellt.

Um eine optimale Transgenexpression zu erreichen, wurden Transfektionskomplexe erzeugt, die ein unterschiedliches Verhältnis zwischen Lipid und DNA aufweisen und für den Gentransfer von Cos7-, HT29-, und Jurkatzellen eingesetzt. Als Reporter gen wurde die sekretorische alkaline Phosphatase (SEAP) verwendet. Diese ermöglicht eine hochsensitive und zuverlässige Detektion der Transgenexpression und ist somit ein Maß für die Expressionsstärke. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden Überstände der Zellen abgenommen und die Aktivität der SEAP durch den *SEAP reporter gene assay* (siehe Kapitel 3) bestimmt. Die Transfektionsrate, d.h.: die Anzahl der transfizierten Zellen wurde durch das sogenannte *green fluorescent protein* (GFP) ermittelt. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl der transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Auszählen bestimmt (siehe Kapitel 3).

Die Herstellerangaben der Firma QbioGene für die Transfektion mit Liposomen bestehend aus den Lipiden Dotap, Dotap/Dope (molares Verhältnis 1:1) und Dotap/Cholesterin (molares Verhältnis 1:1) empfehlen das Testen der molaren DNA:Lipid-Verhältnisse 1:7.500, 1:15.000, 1:30.000 und 1:75.000 für die Optimierung der Transfektion. Alle molaren Angaben beziehen sich dabei nur auf das kationische Lipid. Bei einem 6,5 kb großem Plasmid entsprechen die molaren Verhältnisse somit einem Ladungsverhältnis (negativ geladene DNA:kationisches Lipid) von etwa 1:0,6 (molares Verhältnis von 1:7.500) bis 1:5,7 (molares Verhältnis von 1:75.000). Es entstehen also Komplexe, deren Gesamtladung negativ (molares Verhältnis von 1:7.500), leicht

positiv (molares Verhältnis von 1:15.000) sowie mittel bis stark positiv (molares Verhältnis von 1:30.000 bzw. 1:75.000) ist.

Bei der Transfektion von Cos7-Zellen zeigte sich, dass Liposomen bestehend aus dem kationischen Lipid Dotap und den Helferlipiden Dope oder Cholesterin bei allen getesteten Verhältnissen eine gleichbleibende, nur minimalen Schwankungen unterworfenen Transfektionseffizienz ergeben. Lediglich die Komplexe mit dem geringsten Anteil an kationischen Lipid (1:7.500) reduzierten die Transgenexpression leicht um den Faktor 2 (siehe Abbildung 4.4). Liposomen ohne Helferlipid erzielten bei einem Verhältnis von 1:30.000 ein optimales Ergebnis. Eine Verringerung der Menge eingesetzten Lipides auf nur 1:7.500 Moleküle pro Plasmid hemmte die Effizienz um bis zu Faktor 100. Demnach spielt das optimale Verhältnis von DNA und Lipid eine entscheidende Bedeutung bei der Effizienz des Gentransfers. Liposomen aus Dotap und Dope ermöglichte eine um Faktor 10 höhere Transgenexpression als die Dotap und Cholesterin und eine um Faktor 4 gesteigerte Transfektionseffizienz verglichen mit Dotap allein (siehe Abbildung 4.4).

Bei der Transfektion von HT29 war die Bedeutung der richtigen Zusammensetzung der Transfektionskomplexe enorm. Auch hier war ein deutlicher Unterschied bei Liposomen mit Helferlipid und denen ohne detektierbar. Das ideale Verhältnis bei der Verwendung des Lipides Dotap lag bei 1:30.000 und entsprach dem Ergebnis der Cos7-Zellen. Komplexe mit einem anderen Verhältnis erwirkten eine um Faktor 2-3 geringere Transfektionseffizienz. Abweichend von den Resultaten bei der Transfektion von Cos7, variierte die Transgenexpression bei verschiedenen Zusammensetzungen der Komplexe mit Helferlipid deutlich. Bei beiden Helferlipiden war das optimale Verhältnis von DNA und kationischem Lipid 1:15.000. Von diesem abweichend reduzierte sich die Transfektionseffizienz um Faktor 10 (Dotap/Dope) beziehungsweise Faktor 20 (bei Dotap/Cholesterin). Im Falle der cholesterinhaltigen Liposomen entstand die geringste Transgenexpression bei einem Verhältnis von 1:30.000. Interessanterweise führten eine höhere und eine geringere Menge an Lipid zu einer Steigerung der Effizienz (siehe Abbildung 4.5). Dieses überraschende Resultat wurde durch mehrere Versuche verifiziert. Eine Erklärung könnte in der Struktur der Lipid/DNA-Komplexe gefunden werden, die sich bei einem DNA:Lipid-Verhältnis von 1:30.000 möglicherweise nicht für die Transfektion eignen. Es sei daran erinnert, dass das Verhältnis von DNA und Lipid auch maßgeblich die Größe und Struktur der Komplexe bestimmt (siehe Kapitel 2.3). Am besten geeignet waren Liposomen aus Dotap

und Dope sowie Dotap und Cholesterin. Beide Mischungen führten zu einer um Faktor 10 höhere Transgenexpression als mit Dotap allein transfizierte Zellen (siehe Abbildung 4.5).

Die Ergebnisse bei der Transfektion von Jurkatzellen waren denen der Cos7-Zellen ähnlich. Das optimale Verhältnis von kationischem Lipid zu DNA lag bei Dotap/Dope und Dotap/Chol bei 1:15.000. Höhere und niedrigere Mengen an Lipid führten zu einer Reduktion der Transfektionseffizienz um Faktor 2-3 (siehe Abbildung 4.6). Liposomen ohne Helferlipide zeigten keine große Varianz der Transfektionseffizienz bei unterschiedlichen DNA/Lipid Verhältnissen. Das bei Cos7 und HT29 optimale Verhältnis von 1:30.000 war auch bei der Transfektion von Jurkat mit Dotap ideal. Analog zu den Versuchen mit HT29 wurde auch bei Jurkatzellen die höchste Transfektionseffizienz mit Liposomen aus Dotap und Dope oder Dotap und Cholesterin erreicht (siehe Abbildung 4.6).

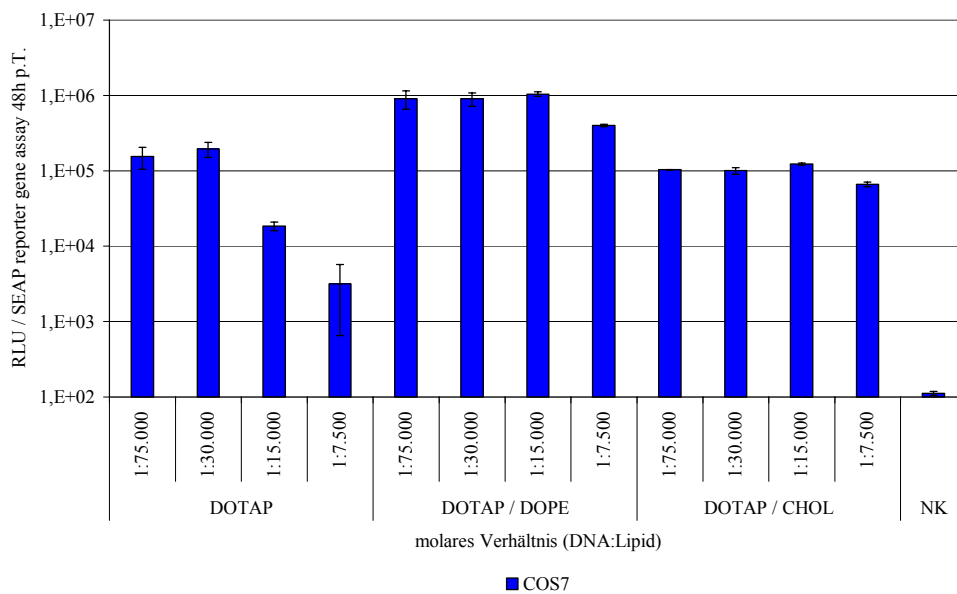


Abb. 4.4: Optimierung des DNA:Lipid-Verhältnisses bei Cos7-Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der exprimierten SEAP. 1×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen DNA:Lipid-Verhältnissen erzeugt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die Aktivität der exprimierten SEAP mittels des *SEAP reporter gene assay* bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

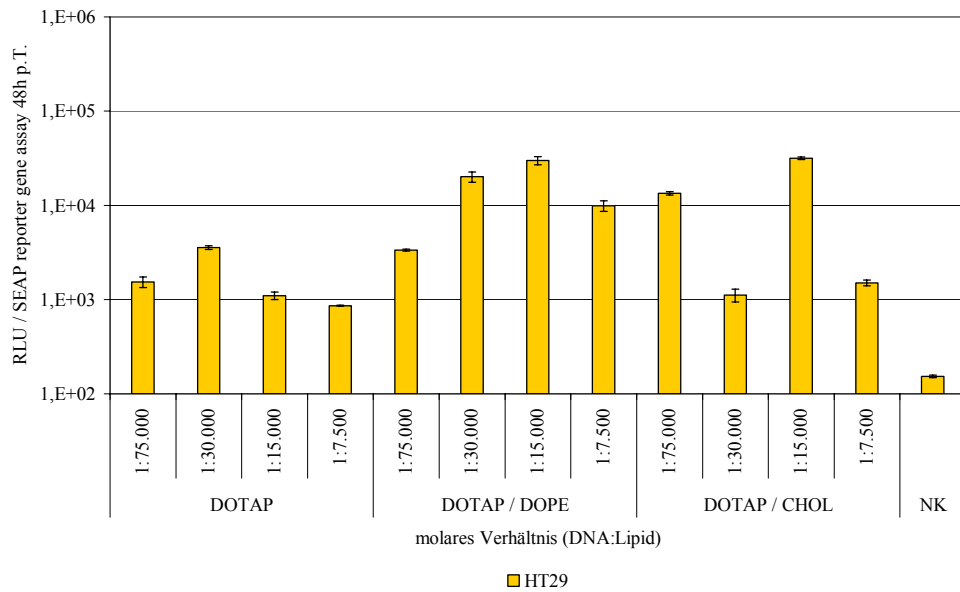


Abb. 4.5: Optimierung des DNA:Lipid-Verhältnisses bei HT29-Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der exprimierten SEAP. 3×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen DNA:Lipid-Verhältnissen erzeugt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die Aktivität der exprimierten SEAP mittels des *SEAP reporter gene assay* bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

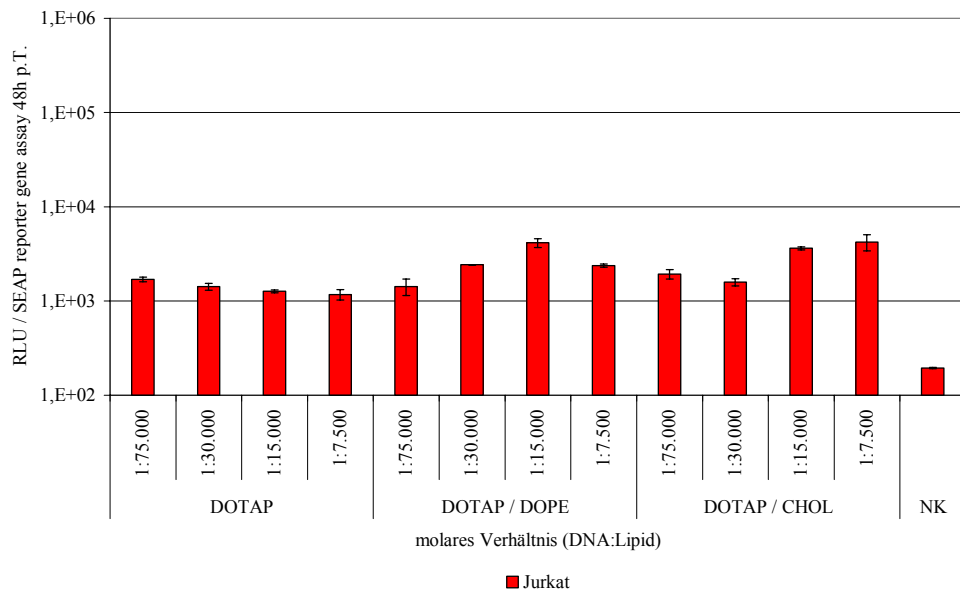


Abb. 4.6: Optimierung des DNA:Lipid-Verhältnisses bei Jurkat-Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der exprimierten SEAP. 3×10^4 Zellen wurden am Tag der Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen DNA:Lipid-Verhältnissen erzeugt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die Aktivität der exprimierten SEAP mittels des *SEAP reporter gene assay* bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Versuche zeigten deutlich, dass auch geringfügige Änderungen des Lipid/DNA-Verhältnisses einen massiven Einfluss auf die Transfektion bewirken und die optimalen Konditionen deshalb vorab bestimmt werden müssen. Folgende optimale Verhältnisse (DNA:kationisches Lipid) wurden bestimmt und für alle weiteren Versuche verwendet:

- 1:30.000 bei Transfektionen mit Dotap
- 1:15.000 bei Transfektionen mit Dotap/Dope und Dotap/Chol

Weiterhin war die unterschiedlich gute Transfizierbarkeit der einzelnen Zelltypen zu Tage getreten. So erreichte die durch den SEAP *reporter gene assay* bestimmte Transgenexpression eine Lumineszenz von etwa 2×10^3 RLU bei der Transfektion von Jurkat. Bei HT29-Zellen war die Expression um Faktor 10 höher und erreichte eine Lumineszenz 2×10^4 RLU. Eine nochmals um Faktor 20 größere Menge an SEAP war bei der Transfektion von Cos7-Zellen nachweisbar. Diese Resultate spiegeln die Einteilung der Zellen bezüglich ihrer Transfizierbarkeit wider (siehe oben) und entsprechen somit den Erwartungen.

4.1.3 Elektroporation

Alle Elektroporationsversuche wurden mit dem Nucleofector I (Fa. Amaxa) unter Verwendung der Herstellerangaben (siehe Kapitel 3) durchgeführt. Die Optimierungsarbeiten konzentrierten sich auf die Bestimmung des besten Elektroporationsprogrammes für die jeweiligen Zelllinien.

Um die optimalen Einstellungen zu finden, wurden die von Amaxa vorgeschlagenen Programme in mehreren Elektroporationsversuchen (Daten nicht gezeigt) getestet und die mit ihnen erreichte Transfektionseffizienz bestimmt. Hierzu wurden Cos7-, HT29- und Jurkatzellen mit einem SEAP- und GFP-Plasmid transfiziert. Dabei erreichten folgende Programme optimale Resultate:

- A-24 für Cos7
- W-17 für HT29
- T-17 für Jurkat

Diese Einstellungen wurden für alle weiteren Elektroporationen verwendet.

4.2 Identifizierung der Hürden einer Transfektion

Um die in Kapitel 2.4 beschriebenen Risiken einer Fehlbewertung zu vermeiden, sollte eine entsprechende Untersuchung aller, die Effizienz bestimmenden Parameter berücksichtigt werden. Zu diesen gehören die zu verwendenden Zelltypen, die genutzten Lipide, der Vergleich verschiedener Methoden wie Elektroporation und Lipofektion. Um den Einfluss von funktionell verschieden wirkenden Peptiden zu evaluieren, wurde ein tetrameres NLS-Peptid, welches die Kerntargetingsequenz des großen SV40-T-Antigenes beinhaltet und ein fusogenes Peptid, das sich vom p10-Protein des avian Reovirus ableitet, bei den Transfektionen verwendet (siehe Tabelle 4.1).

Funktion	Peptid	Quelle (Literatur)
NLS-Peptid	tetramere SV40-Sequenz	Ritter et al., 2003
fusogenes Peptid	p10-protein des avian reovirus	Meanger et al., 1999 Maya Shmulevitz et al., 2003

Tabelle 4.1: Übersicht der bei den screening-Versuchen eingesetzten Peptide.

4.2.1 Screening Lipofektion

Zunächst wurde ein umfangreiches Screening durchgeführt, um die Einflüsse aller Komponenten einer Transfektion, d.h.: Lipide, Zellen sowie Peptide und deren Zusammenwirken bestimmen zu können. Dadurch sollten die kritischen Parameter bestimmt werden können. Dabei wurde mit drei verschiedenen Zelllinien gearbeitet, die hinsichtlich der Transfektion unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Die Transfektionen wurden mit den vorher bestimmten optimalen Bedingungen durchgeführt. Die eingesetzten Peptide wurden an die zu transfizierende DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden. Die DNA wurde dann mit den Lipiden inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Die fertigen Komplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und diese für 48 Stunden inkubiert. Danach wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dies geschah durch Quantifizierung der exprimierten SEAP mittels des SEAP reporter gene assay Kits (Fa. Roche Diagnostics). Die Transfektionsrate, d.h.: die Anzahl transfizierter Zellen wurde durch den Transfer eines GFP codierenden Plasmides, welches die Bestimmung der Anzahl grün fluoreszierender Zellen ermöglichte, erreicht.

Bei den in den Screening Versuchen eingesetzten Lipiden handelt es sich teilweise um nicht bekannte Strukturen (Lipofectamine2000). Damit sind zwar keine funktionellen und strukturellen Aussagen möglich, allerdings ist das Einbeziehen dieser Lipide dennoch sinnvoll und notwendig. Es handelt sich um eines der besten Transfektionsreagenzien, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass die an Hand bekannter Strukturen (Dotap; Dope; Cholesterin) gefundenen Probleme nicht schon gelöst oder umgangen sind. Ziel der Versuche war es, die Faktoren mit dem größten Einfluss auf die Transfektion zu identifizieren und diese dann genauer zu analysieren.

Einfluss des Zelltypes

Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass erwartungsgemäß die erzielten Transfektionseffizienzen je nach Zelltyp stark variierten. Die Transfektionsrate, d.h.: die Anzahl der transfizierten Zellen in Relation der Gesamtzellzahl betrug bei Cos7-Zellen in Abhängigkeit des Reagenz zwischen 40% und 80%. Die höchste Rate konnte mit Lipofectamine2000 erzielt werden. Dotap erzielte nur eine Transfektionsrate von 40%. Durch Dotap/Dope und Dotap/Chol konnten etwa 50%-60% der Zellen erfolgreich transfiziert werden. Während sich Cos7-Zellen generell gut transfizieren ließen, war bei Jurkatzellen ein Gentransfer kaum möglich. Am besten ließ sich dieser noch mit Lipofectamine2000 erreichen, dass bis zu 15% der Jurkatzellen transfizierte. Mit Dotap als Reagenz war keine Transgenexpression detektierbar. Bei den Versuchen mit Dotap/Dope und Dotap/Chol konnten nur weniger als 10% der Zellen transfiziert werden. Bei HT29-Zellen schwankte die Transfektionsrate zwischen 15% mit Dotap als Reagenz und 40%, die mit Lipofectamine2000 erreicht werden konnten. Mit Dotap/Dope und Dotap/Chol exprimierten etwa 25% der Zellen GFP (siehe Tabelle 4.2).

Zelle	L2000	Lipofectamine (Dospa/Dope)	Dotap	Dotap/Dope	Dotap/Chol
Cos7	80%	50%	40%	60%	50%
HT29	40%	15%	15%	25%	25%
Jurkat	15%	<1%	<1%	<10%	<10%

Tabelle 4.2: Erzielte Transfektionsrate bei der Transfektion von Cos7-, HT29- und Jurkatzellen. Die Zellen wurden durch verschiedenen Liposomenmischungen mit 150ng eines GFP-codierenden Plasmides (pcDNA 3.1-eGFP) transfiziert. Gezeigt ist die Anzahl der transfizierten Zellen nach 48 Stunden in Relation zur Gesamtzellzahl. Abkürzungen: L2000, Lipofectamine2000 (Invitrogen); Chol, Cholesterin

Einfluss der Lipide

Entsprechend der Erwartung und in Übereinstimmung der aktuellen Literatur, erwies sich das verwendete Lipid beziehungsweise die Lipidmischung als wichtige Komponente. So war wie oben beschrieben Dotap bei allen 3 Zelllinien das Lipid mit der schlechtesten Transfektionseffizienz. Die Kombinationen aus Dotap und einem neutralen Helferlipid wie Dope oder Cholesterin steigert die Transfektionsrate bei allen Zellen. Eine Erklärung dafür wird in der erhöhten Fusogenität der Lipidbilayer durch Zusatz von PE (siehe Kapitel 2.6) sowie einer geringeren Zytotoxizität durch Cholesterin von vielen Autoren gesehen. Allerdings war bei meinen Versuchen kein Unterschied in der toxischen Wirkung von Dotap, Dotap/Dope und Dotap/Chol zu entdecken. Alle drei Lipide wiesen eine durch den WST-Test (Siehe Kapitel 3) ermittelte geringe Toxizität auf. Eine Ausnahme stellte diesbezüglich Lipofectamine2000 dar. Bereits 48 Stunden nach der Transfektion lag die Vitalität der Zellen bei nur noch 20%. Diese hohe toxische Wirkung ist ein grundlegender Nachteil von Lipofectamine2000, der, bei erforderlicher längerer Inkubation der transfizierten Zellen, eine Anwendung erschwert.

Die durch das Screening bisher ermittelten Zusammenhänge zwischen Transfektionseffizienz, Lipiden und Zelltyp entsprach weitgehend den auf Grund der Arbeit anderer Gruppen erwarteten Ergebnissen.

Einfluss des NLS-Peptids

Die Verwendung von NLS- und fusogenen Peptiden führte zu unterschiedlichen Resultaten (siehe Tabelle 4.3). Die Kombination von Dotap und NLS-Peptid ergab eine geringe Verbesserung der Transgenexpression (SEAP) bei HT29-Zellen. Bei Cos7- und Jurkatzellen hingegen war keine signifikante Steigerung des Gentransfers zu beobachten. Verwendete man Dotap und Dope als Lipide konnte die Transfektion bei allen Zellen durch das Peptid verbessert werden. Zu anderen Resultaten führten die Versuche mit Dotap/Chol als Transfektionsreagenz. Auch hier war, ähnlich zu den Versuchen mit Dotap/Dope bei Cos7 eine Steigerung der exprimierten Menge an SEAP messbar. Die Lipofektion von HT29-, und Jurkatzellen wurde dagegen durch das Peptid sogar gehemmt. Gleiches gilt für die Verwendung des Peptides bei Transfektionen mit Lipofectamine2000. Auch hier wird die Transfektionseffizienz von HT29 und Jurkat durch das Peptid verringert. Bei Cos7-Zellen war keine Wirkung der Kerntargetingsequenz messbar.

Peptid	Zelle	L2000	Dotap	Dotap/Dope	Dotap/Chol
	Cos7	o	o	+	+
NLS- Peptid	HT29	-	+	+	-
	Jurkat	-	o	+	-
	Cos7	-	+	+	+
fusogenes Peptid	HT29	o	+	+	+
	Jurkat	-	o	+	+

Tabelle 4.3: Einfluss verschiedener Peptide auf die Transgenexpression (SEAP-Menge). Cos7-, HT29- und Jurkatzellen wurden mit verschiedenen Liposomenmischungen transfiziert. Gezeigt ist die Veränderung der hergestellten SEAP-Menge durch die Verwendung verschiedener Peptide. Wichtige Akürzungen: o, keine Veränderung; +, Steigerung der Transfektionseffizienz; - Verringerung der Transfektionseffizienz; L2000, Lipofectamine2000 (Invitrogen); Chol, Cholesterin

Einfluss des fusogenen Peptides

Bei den Versuchen den Gentransfer durch fusogene Peptide zu steigern, sind die erzielten Ergebnisse nicht ganz so verschieden. So ist bei der Transfektion mit Dotap/Dope oder Dotap/Chol als Lipiden eine generelle Erhöhung der Transgenexpression zu beobachten, die auch bei jedem der drei Zelltypen zu Tage tritt. In den Versuchen mit Dotap bestätigte sich dieser Befund, allerdings war im Falle der Jurkatzellen keine Verbesserung zu erreichen.

Im Gegensatz dazu zeigten die Transfektionen mit Lipofectamine2000, dass unabhängig vom Zelltyp keine Erhöhung der Transfektionseffizienz zu erreichen war. Bei der Transfektion von Jurkat und Cos7 wirkten die zusätzlich genutzten Peptide sogar hemmend.

Kinetische Untersuchungen

Als nächstes sollte die Wirkung der Peptide auf den Gentransfer genauer charakterisiert werden. Hierzu wurde die Kinetik der Expression des eingeschleusten Transgenes bestimmt, indem die freigesetzte Menge an SEAP zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde. Der Einsatz eines NLS-Peptides führte bei Cos7 erwartungsgemäß zu einem früheren Start der Transgenexpression. So konnte bereits nach 8 Stunden Alkalische Phosphatase im Kulturmedium gemessen werden. Ohne das Peptid dauerte es durchschnittlich 12 Stunden bis die ersten messbaren SEAP-Mengen im Medium zu finden sind (siehe Abbildung 4.7). Es sei noch erwähnt, dass die Expression des

Genes natürlich bereits früher beginnt. Die angegebenen Zeiträume von 8 bzw. 12 Stunden beschreiben die notwendige Zeit bis zur Detektion des Genproduktes.

Die Verwendung des fusogenen Peptides führte hingegen zu keinem früheren Start der Expression. Vielmehr wird eine stärkere Expression erzeugt, so dass nach 24 Stunden die gleiche Menge an Genprodukt synthetisiert wurde. Durch beide Peptide konnte die Expression um etwa Faktor 4 gesteigert werden. Es sei aber erwähnt, dass dies nicht für alle Kombination von Lipid, Peptid und Zelle gilt, wie durch das Screening gezeigt wurde (siehe Tabelle 4.3).

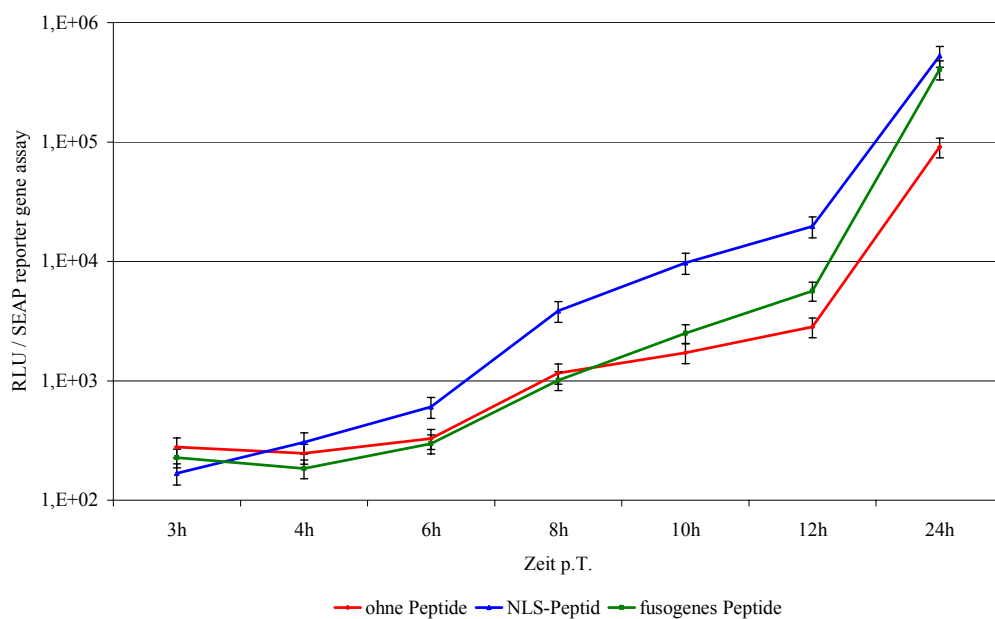


Abbildung 4.7: Transfektion von Cos7 Zellen mit Dotap/Dope als Liposomen und verschiedenen Peptiden.

Dargestellt ist die Aktivität der exprimierten SEAP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. 1×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät und mit 150ng eines SEAP codierenden Plasmids (pM1-SEAP) mit den ermittelten Idealbedingungen transfiziert (siehe Kapitel 3). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und die Aktivität der exprimierten SEAP mittels des *SEAP reporter gene assay* bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Bei der Transfektion von HT29-Zellen mit Liposomen aus Dotap und Cholesterin erreichten die zusätzlich verwendeten Peptide eine andere Wirkung. Im Gegensatz zu Cos7-Zellen reduzierte sich bei HT29 die Transfektionseffizienz bei der Verwendung des NLS-Peptides. Demzufolge konnte auch kein früherer Start der Expression gemessen werden. Das fusogene Peptid erzielte den schon bei Cos7 beobachteten Effekt. Die Expression des transfizierten Genes startet verglichen mit der Kontrolle ohne Peptid zum selben Zeitpunkt (12h nach Transfektion) erzielt

aber eine um Faktor 2-3 höhere Expressionsstärke, welche sich in einer größeren Menge an Genprodukt widerspiegelte. Ein weiterer genereller Unterschied zwischen Cos7- und HT29-Zellen ist, dass bei HT29 Zellen erst nach 24 Stunden eine Transgenexpression zu beobachten war. Bei Cos7-Zellen konnte bereits nach 10 Stunden die alkaline Phosphatase nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 4.7 und 4.8). Die Erklärung hierfür ist die geringere Transfektionsrate der HT29-Zellen, d.h.: da weniger Zellen transfiziert wurden (siehe oben), dauert es länger bis Expression detektiert werden kann.

Bei Jurkatzellen war durch das fusogene Peptid eine Verdoppelung der exprimierten SEAP-Menge nach 24 Stunden zu beobachten, wenn Liposomen verwendet wurden, die neben Dotap noch ein Helferlipid beinhalteten. Das NLS-Peptid bewirkte bei Dotap allein auch keine Veränderung der Expressionsstärke. Es steigerte die Transfektionseffizienz aber, wenn die Lipide Dotap und Dope verwendet wurden. Im Gegensatz dazu hemmten NLS-Peptide die Transgenexpression beim Gentransfer durch Dotap/Chol (siehe Tabelle 4.3). Zusammenfassend zeigte das Screening, dass keine generellen Aussagen über die Transfektionseffizienz von Zellen möglich sind. So hing die Transgenexpression von der Kombination aus verwendetem Lipid, Peptid und der transfizierten Zelle ab.

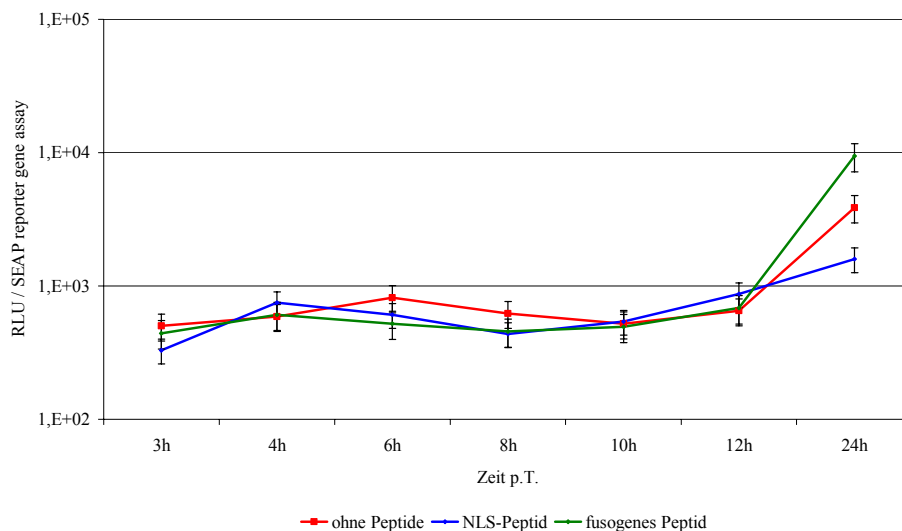


Abbildung 4.8: Transfektion von HT29 Zellen mit Dotap/Chol als Liposomen und verschiedenen Peptiden.

Dargestellt ist die Aktivität der exprimierten SEAP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. 3×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät und mit 150 ng eines SEAP codierenden Plasmids (pM1-SEAP) mit den ermittelten Idealbedingungen transfiziert (siehe Kapitel 3). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und die Aktivität der exprimierten SEAP mittels des *SEAP reporter gene assay* bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Verwendung eines NLS-Peptides oder eines fusogenen Peptides führte nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Transfektion. Die beobachteten Effekte reichten von der Verbesserung bis zur Hemmung der Transfektionseffizienz. Offensichtlich spielt vor allem bei der Auswirkung des NLS-Peptides die Art der Liposomen eine große Rolle. Die mit einer Zelllinie ermittelten Ergebnisse ließen sich nicht auf andere Zellen übertragen. Gleiches galt für die verwendeten Lipide (siehe Tabelle 4.3). Die bisher beschriebenen Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass nicht ein Problem bei der *in vitro* Transfektion eukaryontischer Zellen existiert, sondern dass es mehrere von einander unabhängige Probleme gibt, die je nach Zelltyp und dem verwendetem Lipid unterschiedlich stark zum Tragen kommen.

4.2.2 Genetracking

Um die beim Screening erzielten Ergebnisse genauer erklären und mögliche kritische Punkte identifizieren zu können, wurden mit Fluoreszenz markierter DNA sowie Fluoreszenz markierten Lipiden Transfektionen durchgeführt und ihre intrazelluläre Verteilung untersucht. Neben geeigneten Methoden zur Fluoreszenzmarkierung musste vor allem eine effektive Methode zum Waschen der Zellen sowie zum Verdau der extrazellulär gebundenen DNA, die je nach Zelltyp bis zu 90% der eingesetzten DNA ausmacht, entwickelt werden (siehe Kapitel 2.3).

Zielführend erwies sich eine Kombination aus DNaseI-Verdau und Trypsinbehandlung der Zellen. Dabei wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten wurde frisches Kulturmedium zugegeben. Das Medium enthielt DNaseI mit einer Konzentration von 0,02 µg/µl. Die DNaseI verdaute die durch die Trypsinierung abgelöste DNA. Nach einer Inkubation von 30min bei 37°C wurden die Zellen bei 1000 rpm abzentrifugiert und in neuem Kulturmedium aufgenommen. Dadurch konnte alle extrazellulär gebundene DNA zuverlässig entfernt werden. Um eine intrazelluläre Lokalisierung der markierten DNA und Lipide zu erleichtern, wurde vor jeder Untersuchung der Zellkern mittels Hoechst 33342 (siehe Kapitel 3) angefärbt. Die so behandelten Zellen wurden danach ohne Fixieren unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

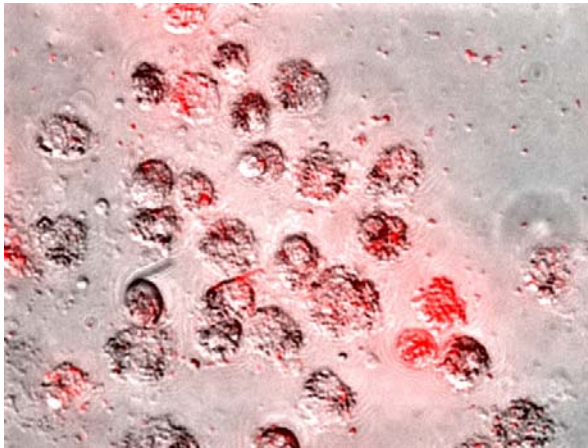
4.2.2.1 Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen

Die Bindung der Lipoplexe an die Zellen wurde zwar bei *in vivo* Transfektionen als ein limitierender Schritt identifiziert, bei *in vitro* Applikationen hingegen als unkritisch gesehen (siehe Kapitel 2.3). Die in den Versuchen ermittelten Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, dass die Adsorption der Komplexe an die Zellen auch *in vitro* ein stark limitierender Schritt ist.

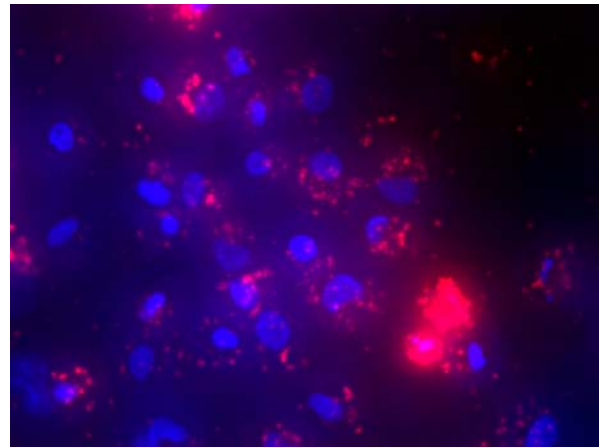
Bei den leicht zu transfizierenden Cos7-Zellen konnte festgestellt werden, dass von 75%-90% der Zellen DNA gebunden wurde. Die Ergebnisse schwankten leicht in Abhängigkeit des verwendeten Lipides. So banden bei mit Dotap hergestellten Lipoplexen nur 75% der Zellen DNA, während bei Lipofectamine2000 90% der Zellen DNA adsorbiert hatten. Auch nach den Wasch- und Verdauschritten war zu sehen, dass die meisten Zellen, die Lipoplexe gebunden hatten, die DNA auch internalisierten. Es war trotzdem auffällig, dass der größte Teil der bei der Transfektion eingesetzten DNA durch die Wasch- und Verdauschritte entfernt werden konnte und somit nicht in die Zellen transportiert beziehungsweise nicht von diesen endozytiert wurde. Die meiste DNA wird demnach nur von den Zellen gebunden und nicht aufgenommen (siehe Abbildung 4.9).

Bei den durchschnittlich gut zu transfizierenden HT29-Zellen variierte die Anzahl der Zellen, die in der Lage war DNA zu binden in Abhängigkeit des genutzten Lipides stärker. So waren bei der Verwendung von Dotap nur 25% der Zellen mit DNA assoziiert, d.h.: das drei Viertel der Zellen gar nicht transfizierbar sind, da sie nicht in der Lage waren, DNA überhaupt zu binden. Wurde mit Liposomen aus Dotap und Cholesterin transfiziert, verdreifachte sich dieser Wert auf 75%. Nach dem Ersetzen des Helferlipides Cholesterin durch Dope banden 60% der Zellen DNA.

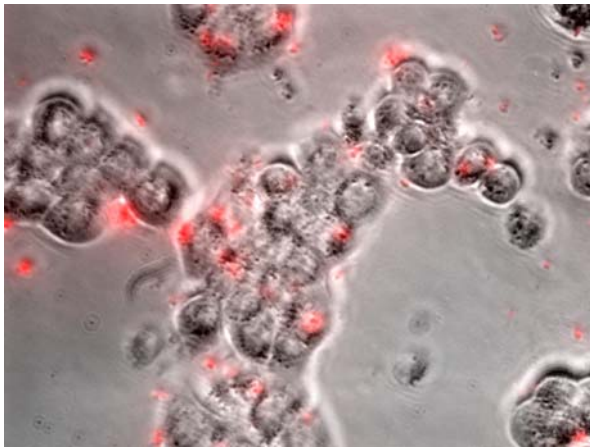
Interessanterweise trat diese Varianz nicht bei allen Zelltypen auf. Im Gegensatz zu HT29 Zellen war der lipidabhängige Unterschied in der Bindungsfähigkeit bei Jurkat und Cos7 deutlich geringer. Genau wie bei den Cos7-Zellen war auch bei den HT29 die meiste DNA nur an die Zellemembran gebunden und wurde nicht aufgenommen. So zeigten die Versuche mit Wasch- und Verdauschritten, dass etwa von 25%-50% der mit DNA assoziierten Zellen auch DNA aufgenommen wurde. Die nach den Waschschrritten fluoreszenzmikroskopisch detektierbare DNA war auch quantitativ um etwa Faktor 10 geringer. Dies zeigte eindeutig, dass nur ein kleiner Teil der gebundenen DNA aufgenommen wird (siehe Abbildungen 4.9 und 4.10).



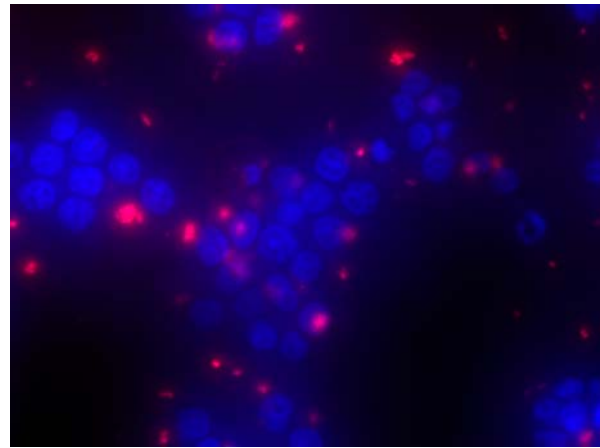
Cos7 (Hellfeld+Cy3), 400fache Vergrößerung



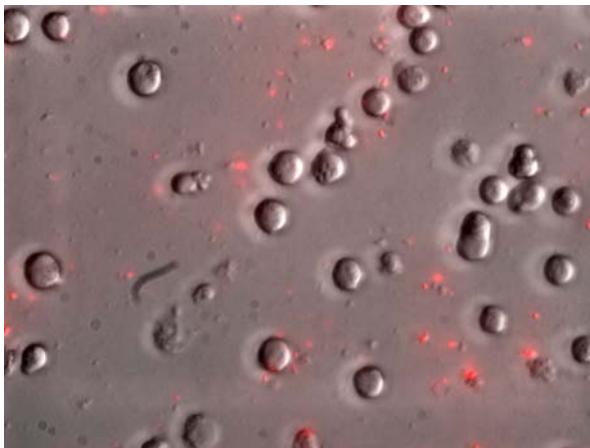
Cos7 (Dapi+Cy3), 400fache Vergrößerung



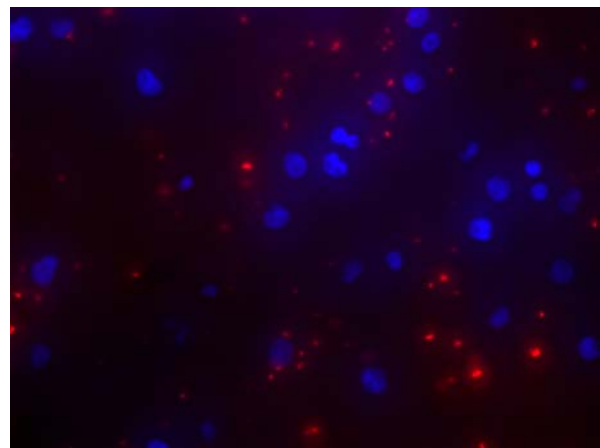
HT29 (Hellfeld+Cy3), 400fache Vergrößerung



HT29 (Dapi+Cy3), 400fache Vergrößerung



Jurkat (Hellfeld+Cy3), 400fache Vergrößerung



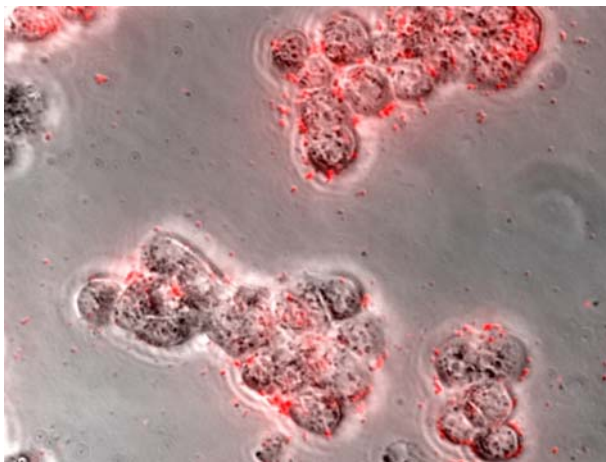
Jurkat (Dapi+Cy3), 400fache Vergrößerung

Abb. 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen.

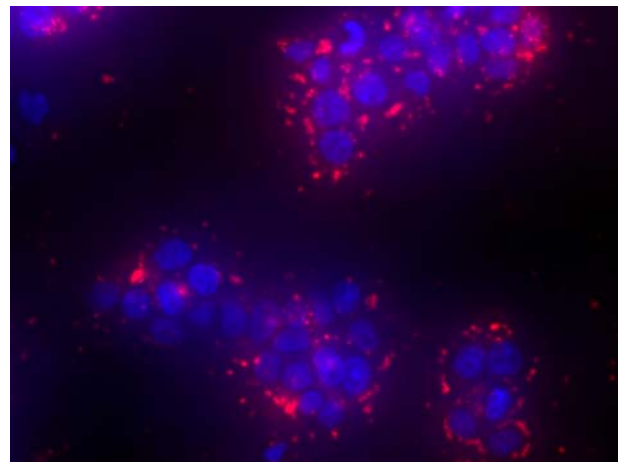
Cos7, HT29 und Jurkatzellen wurden mit 150ng Rhodamin markierter DNA durch Dotap/Dotap transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt.

Bei der Transfektion von Jurkatzellen wurde das Problem der ineffizienten Bindung der DNA durch die Zellen noch offensichtlicher. So waren nur etwa 10% der Zellen nach einer Transfektion mit den Lipoplexen assoziiert (siehe Abbildung 4.9). Dies war unabhängig vom verwendeten Lipid und unter idealen Transfektionsbedingungen der Fall.

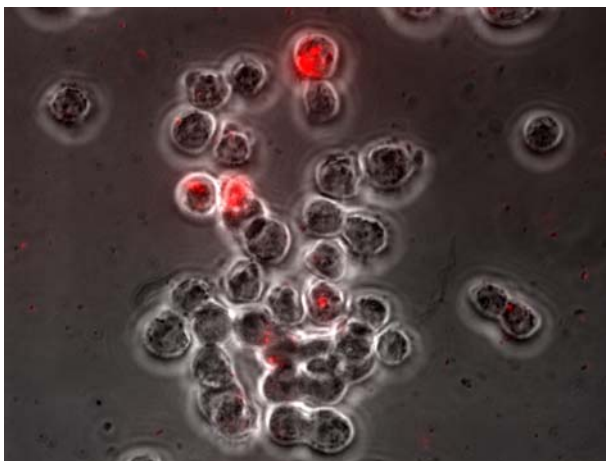
Um die Bedeutung dieses Ergebnisses zu unterstreichen, braucht man sich nur vor Augen zu führen, dass selbst bei einer optimalen Freisetzung aus den Endosomen und einem problemlosen Transport in den Kern nur 10% der Zellen zu transfizieren sind.



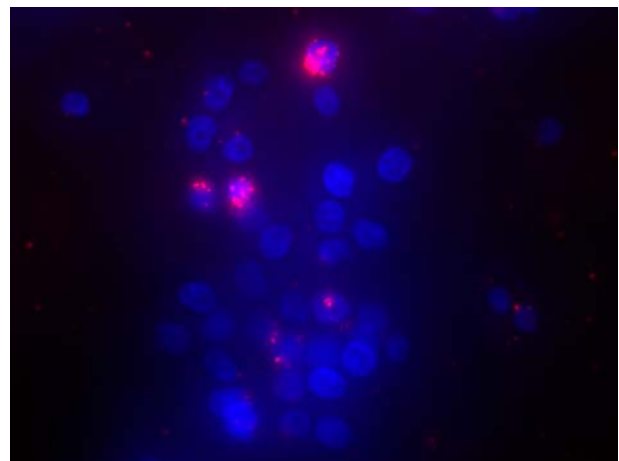
HT29 (Hellfeld+Cy3), unbehandelt, 400fache Vergrößerung



HT29 (Dapi+Cy3), unbehandelt, 400fache Vergrößerung



HT29 (Hellfeld+Cy3), nach Wasch- und Verdauschritten, 400fache Vergrößerung



HT29 (Dapi+Cy3); nach Wasch- und Verdauschritten, 400fache Vergrößerung

Abb. 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen. Gezeigt ist, der Einfluss der Wasch- und Verdauschritte auf die Lokalisierung der transfizierten DNA. HT29-Zellen wurden mit 150 ng Rhodamin markierter DNA durch Dospa/Dope transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und 24 Stunden nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach den Aufnahmen wurden die Zellen den entsprechenden Wasch- und Verdauschritten unterzogen und nochmals mikroskopiert (untere Reihe). Die Aufnahmen wurden wie im Kapitel 3 beschrieben erstellt.

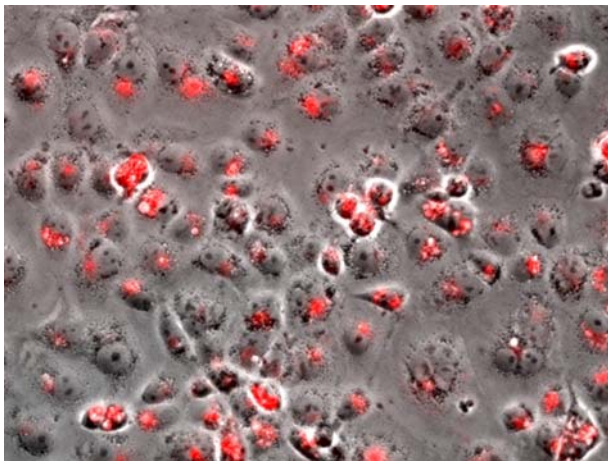
Bei den Jurkatzellen liegt natürlich die Vermutung nahe, dass die geringe Anzahl der mit DNA assoziierten Zellen seine Ursache in ihrer Eigenschaft als Suspensionszellen zu sehen ist. So können die Zellen frei im Medium schwimmen während die zu transfizierende DNA auf den Boden der Zellkulturschale bzw. auf den Boden der Multiwell-Platte sedimentiert (siehe Kapitel 2.3). Um den Einfluss dieser Tatsache zu bestimmen, wurden die Zellen durch Zentrifugation vor der Transfektion auf den Boden der Platten sedimentiert. Die erzielten Ergebnisse bezüglich Bindung der DNA und Transfektionseffizienz waren die gleichen und bestätigten, dass die Lipoplexe nur sehr ineffizient von Jurkatzellen gebunden werden.

Die schlechte Bindung der DNA durch die Zelle bei der Transfektion ist demnach ein großes Problem und eine Erklärung für die hohe Menge an eingesetzter DNA, die benötigt wird, um eine erfolgreiche Transfektion zu erreichen. Es ist weiterhin eindeutig eine Korrelation zwischen der Fähigkeit DNA zu binden und aufzunehmen sowie der Transfektionseffizienz zu beobachten. Dieser Befund konnte durch 6 weitere Zelllinien (A549, CHO-K1, HEK293, HeLa, U937, L8; Daten nicht gezeigt) bestätigt werden. Natürlich ist ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme der DNA durch Endozytose und der Transfizierbarkeit der Zellen nicht überraschend. Aber das diese Einschränkung bereits auf Ebene der Bindung der Komplexe an die Zellen zum Tragen kommt widerspricht dem Großteil der Literatur, die die Adsorption der DNA an die Zellen bei der *in vitro* Transfektion als unproblematisch ansieht.

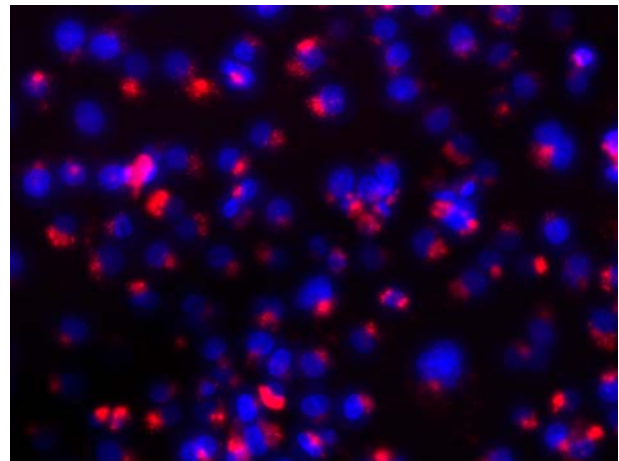
Zelltyp	Kompartiment	Dotap	Dotap / Chol	Dotap / Dope	Dotap / Dope + NLS	L2000
Cos7	Zytoplasma	75%	75%	80%	80%	90%
	Kern	15%	25%	25%	40%	30%
HT29	Zytoplasma	25%	75%	60%	70%	50%
	Kern	<1%	<1%	<1%	25%	5%
Jurkat	Zytoplasma	10%	10%	10%	10%	10%
	Kern	0%	<1%	0%	<1%	<1%

Tabelle 4.4: Übersicht der Ergebnisse der Genetracking-Versuche. Die Zellen wurden mit 150 ng Rhodamin markierter DNA transfiziert (siehe Kapitel 3). Die Transfektionen wurden unter Optimalbedingungen durchgeführt und die Zellen 24h nach Transfektion mikroskopisch untersucht. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (siehe Kapitel 3). Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Anzahl der Zellen bei denen DNA im Zytoplasma bzw. im Kern gefunden wurde.

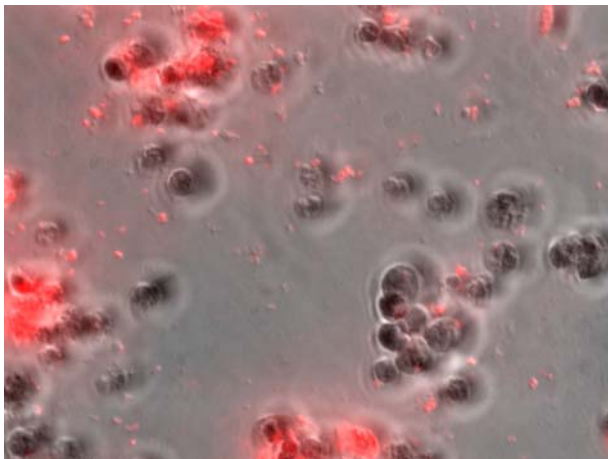
Ein weiteres Problem zeigte sich in Form der geringen endozytotischen Aufnahme der assoziierten Komplexe, die ebenfalls die Transfektion hemmt. So wurde der größte Teil der adsorbierten DNA durch die Wasch- und Verdauschritte von den Zellen entfernt und konnte demnach nicht internalisiert werden. Im Gegensatz dazu spielt Bindung und Aufnahme der DNA bei der Elektroporation keine Rolle. Bei allen getesteten Zellentypen konnte bei etwa 90% der Zellen DNA zumindest im Zytoplasma detektiert werden (siehe Abbildung 4.11). Diese Differenz zwischen Lipofektion und Elektroporation ist nicht überraschend, da bei der Elektroporation durch die kurzzeitige Porenbildung der Zellmembran die Aufnahme der DNA über Diffusion erfolgt. Somit entfallen die bei der Endozytose entstehenden Probleme bezüglich Transport und Freisetzung der DNA ins Zytoplasma.



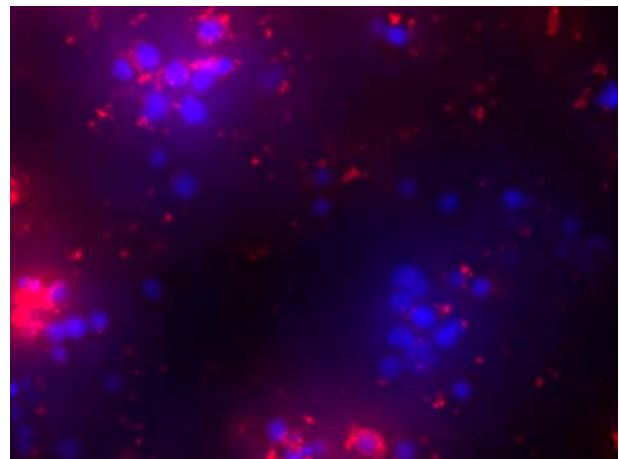
Cos7 (Hellfeld+Cy3), 200fache Vergrößerung



Cos7 (Dapi+Cy3), 200fache Vergrößerung



Jurkat (Hellfeld+Cy3), 200fache Vergrößerung



Jurkat (Dapi+Cy3), 200fache Vergrößerung

Abb. 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Bindung der DNA an die Zellen. Cos7 und Jurkatzellen wurden mit 2 µg Rhodamin markierter DNA elektroporiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transfektion wie im Kapitel 3 beschrieben erstellt.

4.2.2.2 Transport der DNA in den Zellkern

Ein weiterer die Transfektion maßgeblich beeinflussender Punkt ist der Transport der aufgenommenen DNA in den Zellkern. Dieser Transport lässt sich wiederum in zwei Schritte einteilen. Zunächst muss die DNA aus den Endosomen in das Zytosol gelangen, um danach in den Kern transportiert zu werden bzw. durch mitotische Zellteilung passiv in den Kern der Zellen zu gelangen. Die *gene tracking* Versuche bestätigten die Problematik dieses Vorganges eindrucksvoll. So befand sich die von den Zellen aufgenommene DNA nur selten im Kern der Zellen. Dies war bei allen Zelltypen in unterschiedlichem Maße der Fall. So waren bei etwa 15%-30% der Cos7-Zellen DNA im Kern zu finden. Bei HT29 verringerte sich dieser Anteil auf 5%-10%. Bei Jurkatzellen konnte nur in Einzelfällen, d.h.: in weniger als 1% aller Zellen, DNA im Kern detektiert werden. Auch in diesem Punkt spielt das verwendete Lipid eine Rolle, wengleich der Einfluss des Reagenz bei jeder Zelle unterschiedlich stark ausfiel. Während bei HT29 und Jurkat-Zellen die Anzahl der Zellen, die DNA in den Zellkern transportierten unabhängig vom verwendeten Lipid relativ konstant ist und zwischen 5%-10% bzw. 0%-1% bei Jurkat variiert, unterliegt sie bei Cos7-Zellen deutlicheren Schwankungen. So erreicht die Transfektion mittels Lipofectamine2000 bei 30% der Zellen eine Aufnahme der DNA in den Kern. Nutzt man Dotap/Dope oder Dotap/Chol als Liposomen, gelangte bei etwa 25% der Zellen DNA in den Kern. Bei Dotap konnte nur bei 15% der Zellkerne DNA entdeckt werden (siehe Tabelle 4.4). Bei dieser Untersuchung und Quantifizierung spielt natürlich neben dem eigentlichen Kerntransport auch die Fähigkeit der Zellen, Lipoplexe zu binden und diese aufzunehmen eine Rolle. Da nur 10% der Jurkatzellen DNA binden, führt folglich selbst ein optimaler Transport der DNA in den Kern, zu einem Wert von 10%. Da diese bei der Beurteilung des Kerntransportes irreführend ist, wurde als nächstes die so genannte Kerntransportrate bestimmt, d.h.: die Anzahl der Zellen, bei denen DNA im Kern lokalisiert wurde in Relation zur Anzahl der Zellen, die DNA aufgenommen haben. Im obigen fiktiven Beispiel der Jurkatzellen würde sich eine Kerntransportrate von 100% ergeben und somit den Sachverhalt korrekt beschreiben. Der Transport der aufgenommenen DNA ist bei Cos7-Zellen relativ effizient. Fast die Hälfte der Zellen, welche DNA aufgenommen haben, zeigte transfizierte DNA im Zellkern. Die Kerntransportrate schwankte in Abhängigkeit des Lipides zwischen 20% bei Dotap, 30% bei Dotap/Chol und Dotap/Dope sowie 33% bei Lipofectamine2000. Bei HT29-Zellen hingegen ist die Überwindung der Kernmembran ein deutlich größeres Hindernis. So konnten nur bei etwa 5-

10% der DNA beinhaltenden Zellen auch DNA im Zellkern detektiert werden. Bei Jurkatzellen lag die Transportrate nur noch bei etwa 1-5%. Demnach ist der Transport in den Zellkern je nach Zelltyp unterschiedlich kritisch. Die Verwendung des NLS-Peptides verbesserte die Kerntransportrate signifikant. Im Falle der Cos7-Zellen erfolgte eine Erhöhung um 20% auf 50% der Zellen. Bei HT29-Zellen war bei etwa 30% der Zellen ein Kerntransport zu beobachten. Bei Jurkatzellen war hingegen keine Wirkung feststellbar. Die Beobachtungen stützten die Vermutung, dass der Kerntransport überwiegend durch zelleigene Effekte und Vorgänge reguliert wird und durch den Einsatz geeigneter Peptide optimiert werden kann.

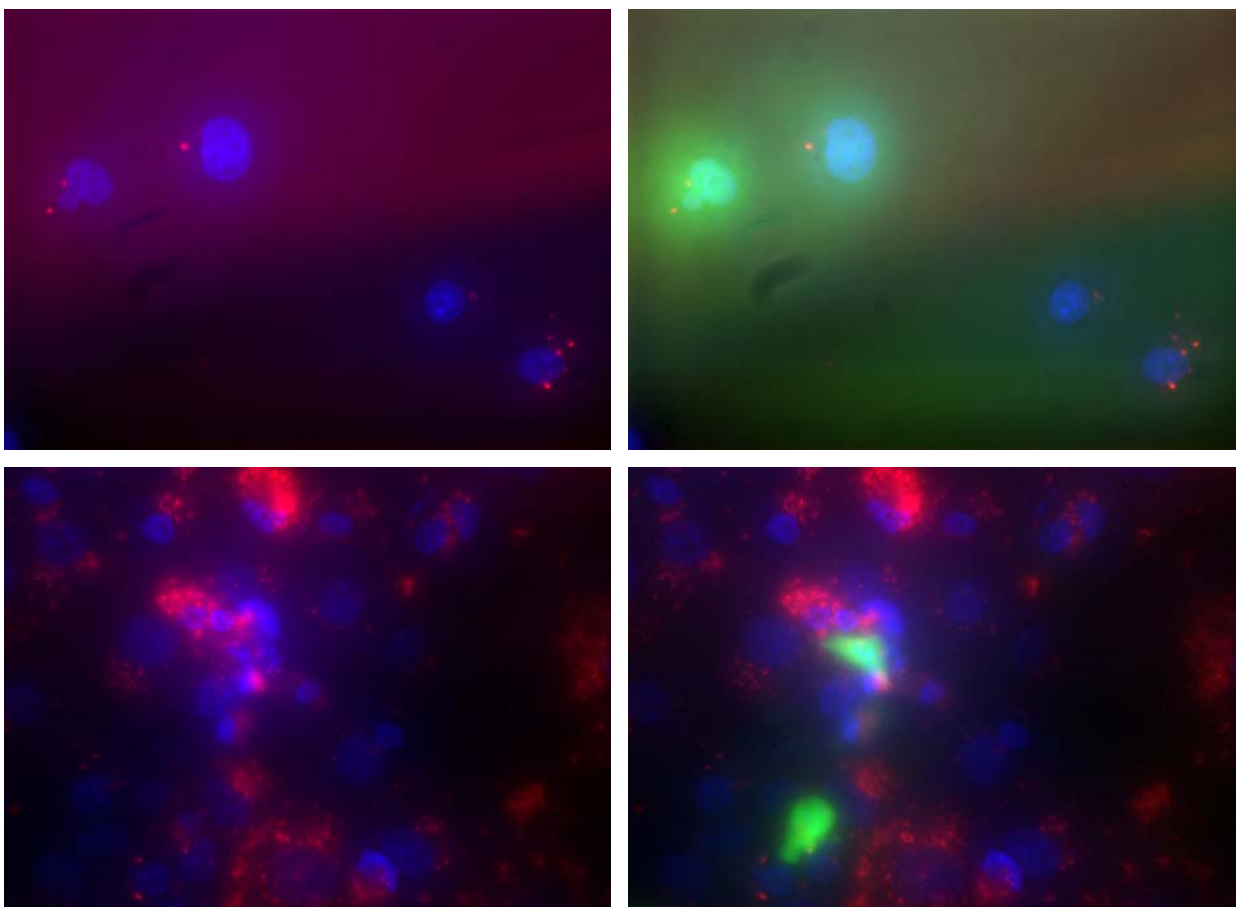
Zelltyp	Dotap	Dotap / Chol	Dotap / Dope	Dotap / Dope + NLS	L2000	Elektroporation
Cos7	20%	30%	30%	50%	33%	80%
HT29	5%	5%	5%	30%	10%	80%
Jurkat	1%	1%	1%	1%	1%	80%

Tabelle 4.5: Kerntransportrate bei der Transfektion von Cos7, HT29 und Jurkat. Gezeigt ist der Anteil der Zellen, die DNA aufgenommen haben und diese in den Kern transportiert haben. Die Ergebnisse wurden mittels gene tracking fluoreszenzmikroskopisch ermittelt.

Bei der Elektroporation zeigte sich ebenfalls, dass die Überwindung der Kernmembran ein die Gentransfereffizienz stark beeinflussender Schritt ist. Im Gegensatz zur Lipofektion spielte dabei der Zelltyp keine entscheidende Rolle. Allerdings war die Transportrate verglichen zur Lipofektion deutlich höher und lag bei etwa 80% (siehe Tabelle 4.5). Das bedeutet zwar, dass bei 80% der Zellen DNA im Kern lokalisiert werden konnte, allerdings war die Menge der im Kern befindlichen DNA sehr gering. Der größte Teil verblieb im Zytoplasma, so dass durch die Verbesserung des Kerntransportes eine quantitative Steigerung auch bei der Elektroporation zu erreichen ist. Der ineffiziente Kerntransport der DNA wird von den meisten Autoren (siehe Kapitel 2.3) durch ein fehlendes Kerntargeting und eine ineffiziente Freisetzung aus den Endosomen erklärt. Dies ist auch an Hand der punktuellen Konzentration der DNA fluoreszenzmikroskopisch sichtbar. Freigesetzte DNA würde zu einer diffusen Verteilung der DNA führen. Demnach müsste die Verwendung eines NLS-Peptides zu einer Verbesserung des Kerntransportes führen. Um dies zu überprüfen wurden *gene tracking* Versuche mit DNA

durchgeführt, die vorher mit NLS-Peptiden nicht kovalent assoziiert wurde. Die Anzahl der Zellen, bei denen unter Einsatz des NLS-Peptides in Kombination mit Dotap/Dope DNA im Kern gefunden wurde, stieg von 25% auf 40%. Auch bei HT29-Zellen steigerte sich die Anzahl der positiven Zellkerne von 1% auf 25%. Bei Jurkat wurde keine Zunahme der Kernakkumulation transfizierter DNA festgestellt (siehe Tabelle 4.5). Die postulierte Wirkung der NLS-Peptide war somit auch fluoreszenzmikroskopisch feststellbar.

4.2.2.3 Phänomen der „falsch negativen“ und „falsch positiven“ Zellen



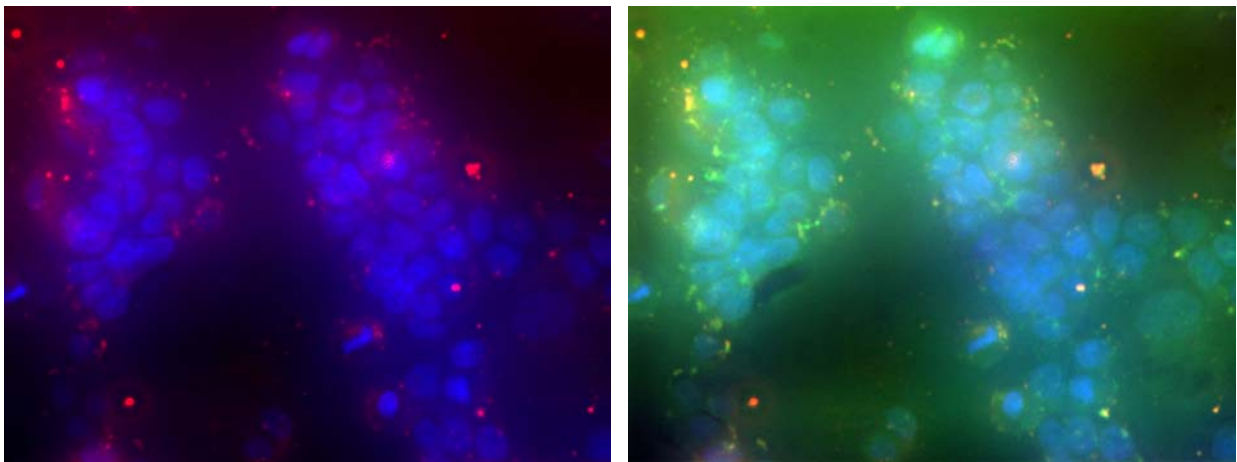
Cos7 (Dapi+Cy3), 63 fache Vergrößerung

Cos7 (Dapi+Cy3+GFP), 63 fache Vergrößerung

Abb. 4.12: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Transgenexpression transfizierter Zellen. Cos7-Zellen wurden mit 150 ng Rhodamin markierter GFP-exprimierender DNA durch Dotap/Dope transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Transgenexpression ist durch das GFP erkenntlich. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach Transfektion wie im Kapitel 3 beschrieben erstellt. Oben: „falsch positive Zellen“, die mittlere Zelle zeigt eine Transgenexpression, obwohl keine DNA im Kern lokalisiert werden konnte; Unten: „falsch negative Zellen“, Mehrere Zellen in der Mitte weisen DNA im Kern auf, aber exprimieren kein GFP

Die Fluoreszenzmikroskopie führte zu zwei interessanten Beobachtungen. So konnten Zellen identifiziert werden, die beim Genetracking keine markierte DNA im Zellkern zeigten, aber trotzdem transfiziert wurden, wie die Expression des GFP-Proteins belegte (siehe Abbildung 4.12). Diese Zellen wurden als „falsch negativ“ bezeichnet. Ein weiteres beobachtetes Phänomen beschreibt im Prinzip das Gegenteil der eben erläuterten Entdeckung. Es handelt sich um die so genannten „falsch positiven“ Zellen. Das sind Zellen, die keine Transgenexpression zeigen, obwohl sich DNA im Zellkern befindet (siehe Abbildung 4.12). Demnach wird möglicherweise die Transkription der transfizierten DNA durch die Lipide inhibiert. Bei Mikroinjektionsexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass komplexierte DNA im Zellkern zu keiner Expression führt (Fritz et al., 1996).

Gemäß der Literatur gelangen bei der Lipofektion keine Lipide in den Kern, sondern werden bei der Freisetzung aus den Endosomen von der DNA bzw. beim Eintritt in den Kern getrennt (siehe Kapitel 2.3). Um dies zu testen, wurden Transfektionen mit markierten Lipiden durchgeführt und deren intrazelluläre Verteilung untersucht. Die mikroskopischen Versuche zeigten zweifelsfrei, dass sich auch Lipide - unabhängig von ihrer Struktur – im Kern der transfizierten Zellen befinden (siehe Abbildung 4.13). Diese Beobachtung trat bei allen getesteten Zelltypen auf.



HT29 (Dapi+Cy3), 40 fache Vergrößerung

HT29 (Dapi+Cy3+GFP), 40 fache Vergrößerung

Abb. 4.13: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen transfizierter Zellen. HT29-Zellen wurden mit 150ng Fluorescein markierter DNA durch Rhodamine markiertes Dotap/Dope transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach Transfektion wie im Kapitel 3 beschrieben erstellt.

Der Widerspruch meiner Ergebnisse zu den oben zitierten Autoren kann in der Fixierung der Zellen und der dadurch bereits ausführlich geschilderten Problematik der Membranamorganisation durch das Fixieren begründet liegen. Dieses Ergebnis legte die

Vermutung nahe, dass die mit Lipiden komplexierte DNA möglicherweise in ihrer Transkription inhibiert ist. Dadurch würde trotz des Transportes der DNA in den Kern keine Transkription erfolgen können. Die „falsch positiven“ Zellen wurden unabhängig vom Zelltyp und dem verwendeten Lipid beobachtet. Die einzige Ausnahme bildete Lipofectamine2000. Dort war bei 95% der Zellen mit DNA im Kern auch eine Expression feststellbar.

4.2.3 Transkribierbarkeit der DNA im Zellkern

Bei Genetracking trat das Phänomen zu Tage, dass auch Lipide in den Zellkern gelangten und es viele Zellen gab, die keine Expression zeigten, obwohl sich transfizierte DNA im Zellkern befand (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass keine vollständige Trennung von Lipid und DNA stattfindet und somit die Transkription durch die Lipide eventuell beeinträchtigt wird. Um diese These zu prüfen, wurde eine *in vitro* Transkription (IVT) der komplexierten DNA durchgeführt. Bei dieser Reaktion wird DNA, welche einen T7-Promotor enthält, von einer T7-Polymerase bei 37°C transkribiert. Die dabei entstehende RNA kann mittels Elektrophorese nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.14). Die Versuche mit komplexierter DNA bestätigen, dass nur die mit Lipofectamine2000 komplexierte DNA transkribierbar ist. Bei allen anderen Lipiden war keine Transkription möglich, d.h.: wenn keine Trennung zwischen Lipid und DNA stattfindet, kann keine Transgenexpression erfolgen. Diese Versuche erklären somit die bei den *gene tracking* Versuchen gefundene Ausnahmesituation bei der Transfektion mit Lipofectamine2000 (siehe 4.2.2.4) und die bessere Transfektionseffizienz. Die Transkribierbarkeit transfizierter DNA ist ein Punkt, der in der Literatur bisher nicht nennenswert diskutiert wurde, da man allgemein davon ausgeht, dass eine Trennung der DNA vom Lipid bei der Freisetzung aus den Endosomen erfolgt. Es gibt lediglich eine Arbeit, die zeigt, dass man bei Versuchen mit siRNA eine deutlich geringere Menge an siRNA für ein Silencing ausreichend ist, wenn man mit Lipofectamine2000 transfiziert (Puebla et al., 2003). Dieses Resultat ist in Anbetracht der eben erläuterten Ergebnisse zu erwarten und erklärbar, da durch Lipofectamine2000 gebundene DNA im Gegensatz zu anderen Lipiden auch im komplexierten Zustand transkribierbar ist. Die Komplexierung der DNA mit Peptiden wie beispielsweise das positiv geladene NLS-Peptid SV4 hemmte die Transkription ebenfalls vollständig (siehe Abbildung 4.14).

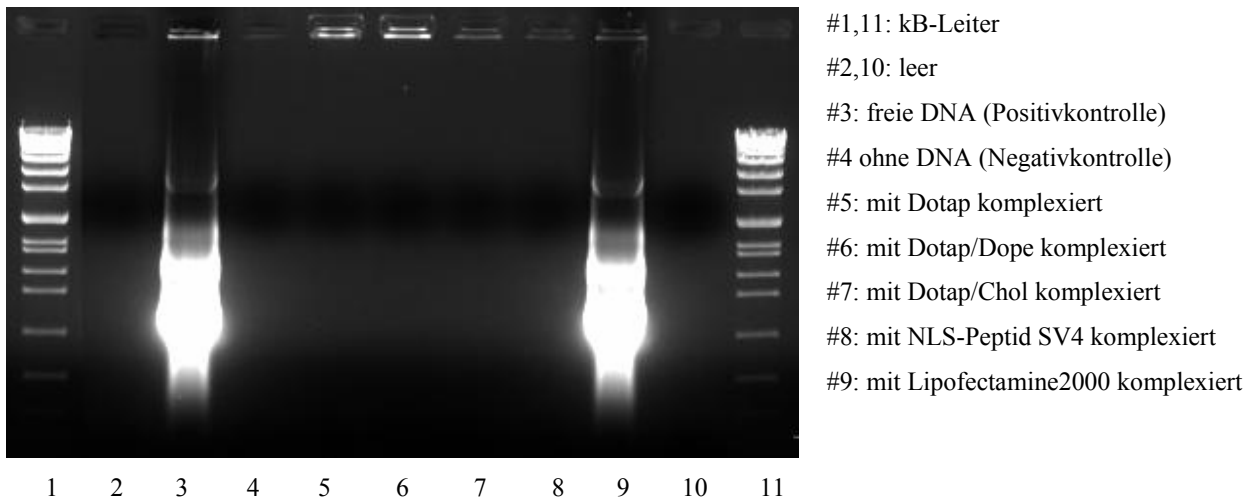


Abb. 4.14: Elektrophorese der In vitro Transkription (IVT) komplexierter DNA. Die 150 ng DNA wurde mit der für die Transfektion optimalen Menge (siehe Kapitel 3) an Lipiden oder Peptid komplexiert und danach für eine IVT eingesetzt. Danach wurde der Reaktionsmix auf ein 1,5%-iges Agarosegel gegeben und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Photo wurde mit dem Lumiimager erstellt (siehe Material und Methoden).

4.2.4 Quantitative Lokalisierung der DNA

Bei den Ergebnissen zum Genetracking handelt es sich um qualitative Aussagen, da eine genaue Quantifizierung durch die Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich ist. Um diese zu erreichen wurde das Quant-iT PicoGreen System von Invitrogen als Basis genutzt und auf die Anwendung bei Transfektionsversuchen adaptiert. Nach Etablierung dieses Nachweissystems war es möglich, DNA-Mengen ab 5 ng unabhängig von Medien oder Puffern zuverlässig zu detektieren.

Um die Menge an aufgenommener DNA zu messen, wurde 24 Stunden nach Transfektion die DNA quantitativ lokalisiert. Die nicht gebundene DNA befindet sich im Kulturmedium und konnte durch den PicoGreenAssay leicht quantifiziert werden. Hierzu wurden 50µl Zellkulturüberstand entnommen und 10µl Triton X-100 zugegeben, um die Liposomen von der DNA zu lösen, so dass diese detektierbar ist. Danach erfolgte die Zugabe des PicoGreen-Reagenz und die fluometrische Bestimmung der DNA-Menge (siehe Kapitel 3). Die an den Zellen gebundene, aber nicht internalisierte DNA wurde durch das Waschen mit PBS entfernt und ebenfalls nach Tritonzugabe vermessen. Die von den Zellen aufgenommene DNA konnte durch Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer freigesetzt werden (siehe Kapitel 3). Das Zelllysat wurde dann zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile von der DNA zu trennen. Der Überstand wurde

abgenommen und analog zu den anderen Proben vermessen. Die Ergebnisse bestätigten die beim Genetracking gefundenen Probleme und zeigten deutlich, dass die Bindung der Lipoplexe an die Zellen ein sehr ineffizienter Schritt ist. So wurde bei Jurkatzellen nur etwa 10% der DNA internalisiert. 90% der DNA wurden nicht durch die Zellen aufgenommen. Bei HT29-Zellen waren 80% der eingesetzten DNA im Überstand der Zellen verblieben. Bei Cos7-Zellen befand sich immerhin 40% der DNA innerhalb der Zellen (siehe Abbildung 4.14). Die bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gefundene Abhängigkeit der Aufnahme der Transfektionskomplexe vom transfizierten Zelltyp konnte somit bestätigt werden. Die geringe Menge an aufgenommener DNA belegt weiterhin, dass die Bindung von DNA und Zellen ein kritischer Schritt der Transfektion ist. Der PicoGreenAssay ist allerdings nicht in der Lage, die intrazelluläre Verteilung der DNA zu quantifizieren, da bei der durch Zellyse freigesetzten DNA nicht unterschieden werden kann, ob sich diese in den Endosomen, im Zytoplasma oder im Kern befunden hatte. Theoretisch kann auch noch DNA an der Außenseite der Zellmembran gebunden sein, doch wurde durch die effizienten Waschrinne versucht, diese Menge so gering wie möglich zu halten.

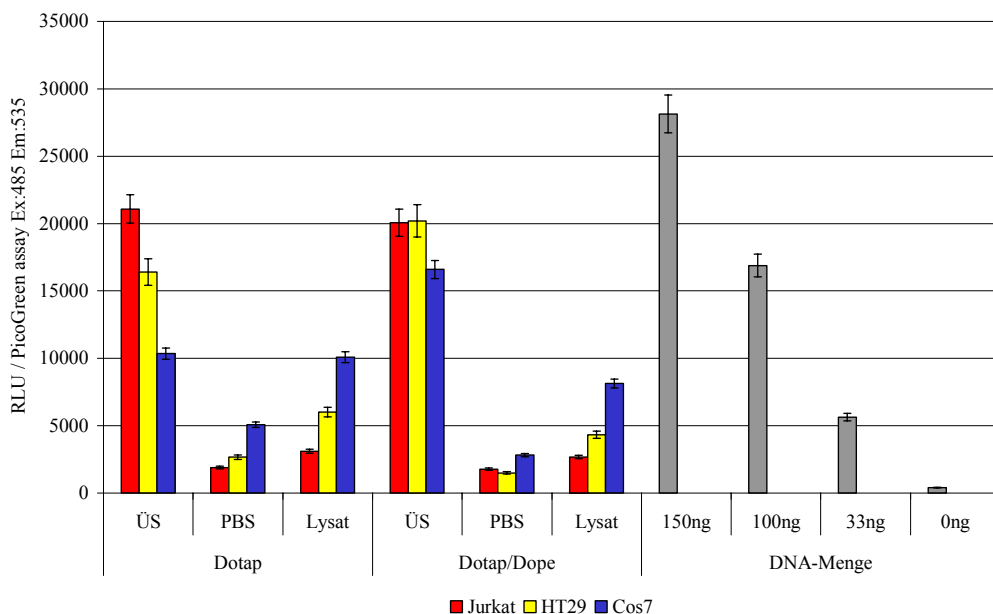


Abb. 4.15: Quantifizierung der aufgenommenen DNA. Cos7, HT29 und Jurkatzellen wurden 150ng DNA mittels Dotap und Dotap/Dope transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Menge der DNA im Medium, an den Zellen adsorbierte sowie die aufgenommenen DNA durch den PicoGreen-Assay (siehe Kapitel 3) bestimmt. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die enthaltene DNA quantifiziert. Danach wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen und die im PBS enthaltene Menge bestimmt. Zum Schluss wurden die Zellen lysiert und die im Lysat enthaltene DNA gemessen. Als Standard wurden verschiedenen DNA-Mengen vermessen (rechte Spalte).

4.2.5 Zusammenfassung der Identifikation kritischer Schritte

Die Screening Versuche ergaben, dass die Transfektionseffizienz von folgenden Komponenten abhängig ist:

- der Zelltyp
- das verwendete Lipid
- das DNA:Lipid-Verhältnis

Diese Parameter waren bereits als kritische Faktoren bei der Transfektion bekannt und die erzielten Resultate bestätigten deren Bedeutung. Ferner ergab das screening, dass die Wirkung von Peptiden, die zur Verbesserung der Transfektion eingesetzt wurden (NLS-Peptid, fusogenes Peptid) abhängig ist vom:

- Zelltyp
- Lipid

Es zeigte sich, dass die Wirkung der NLS-Peptide unterschiedlich waren. So führte beispielsweise die Kombination von Dotap/Chol und dem NLS-Peptid bei Cos7-Zellen zu einer Verbesserung der Transfektion und bei HT29-Zellen zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz. Ohne Helferlipid (nur Dotap) konnte bei Cos7-Zellen keine Verbesserung erzielt werden, dafür aber bei HT29-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich keine generelle Vorhersage über den Einfluss des Peptides auf die Transfektion machen lässt. Das ist auch eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse anderer Gruppen (siehe Kapitel 2).

Durch das Genetracking konnten 3 kritische Schritte bei der Transfektion eukaryontischer Zellen identifiziert werden:

- die Bindung der Lipoplexe an die Zellen
- der Transport der DNA in den Zellkern
- die Transkription der DNA im Zellkern

Die endosomale Freisetzung der DNA sowie der Transport in den Kern wurden bereits von vielen Autoren als Problemschritt identifiziert. Allerdings konnte in den beschriebenen Versuchen gezeigt

werden, dass die Bedeutung dieser beiden Schritte von den verwendeten Lipiden und den zu transfizierenden Zellen abhängig sind. Die schlechte Freisetzung in das Zytoplasma erklärt auch, warum der Einsatz des endosomenlytischen Peptides bei fast allen getesteten Lipiden (außer Lipofectamine2000) und Zellen zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führte.

4.3 Verbesserung der Aufnahme der DNA in die Zellen

Der erste Schritt bei der Transfektion eukaryontischer Zellen ist die Anheftung der DNA an die Zellen. In der Literatur wird die Bindung der Transfektionskomplexe beim Gentransfer *in vitro* nicht als limitierender Schritt gesehen (siehe Kapitel 2.3). Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass je nach Transfektionsbedingungen 75-100% der Zellen die DNA binden. Die von vielen Gruppen unternommenen Versuche der Kopplung von Liganden an die Transfektionskomplexe ist für ein so genanntes primäres targeting, also der Transfektion definierter Zielzellen, bei *in vivo* Anwendungen in der Diskussion. Die bisher erzielten Ergebnisse meiner Arbeit zeigten jedoch eindeutig, dass auch bei der Transfektion *in vitro* die Bindung der Komplexe durch die Zellen und somit der erste Schritt für eine erfolgreiche Transgenexpression in Abhängigkeit des Zelltypes eine herausragende und in der Literatur stark unterschätzte Bedeutung hat. Eine Möglichkeit der Verbesserung der Bindung von Transfektionskomplex und Zelle sehen mehrere Gruppen in der Verwendung von Liganden, die an zelluläre Rezeptoren binden können. Die Liganden können entweder kovalent an die Lipoplexe gebunden oder über elektrostatische Wechselwirkungen mit diesen assoziiert werden. Nach erfolgter Bindung der Komplexe an die Zelle gelangt die DNA dann mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zellen.

4.3.1 Liganden

Um die Bindung zwischen Komplex und Zellen zu verbessern, wurden Versuche mit zwei beschriebenen Liganden durchgeführt und die Transfektionseffizienz sowie die Bindung zwischen Komplex und Zellen untersucht. Dabei sollten Transferrin (siehe Abbildung 4.16) und die so genannten integrinbindenden Peptide (siehe Tabelle 4.6) zum Einsatz kommen.

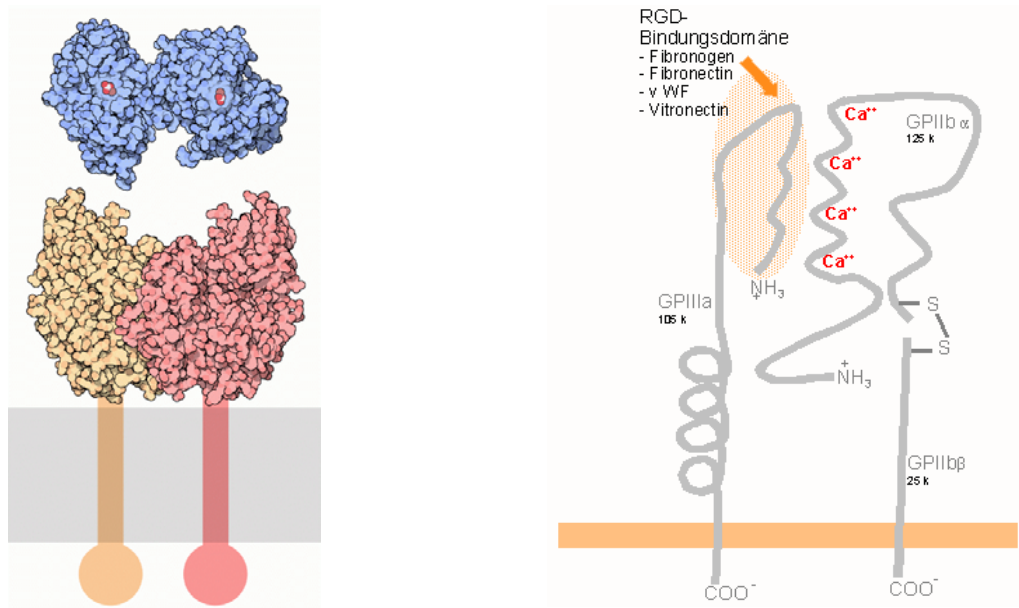


Abb. 4.16: Schematische Darstellung zellulärer Rezeptoren. Links: der Transferrinrezeptor ist gelb-rosa und des Transferrin ist blau dargestellt. Die Zellmembran ist grau; das gebundene Eisen des Transferrins ist rot dargestellt (David S. Goodsell, Scripps Research Institute, 2002) sowie von Integrinen). Rechts: Integrine (Zeichnung von Jürgen Bode, 2004)

Peptid	Motif	Sequenz	Quelle (Literatur)
RRE	RRE	K ₁₆ GACRRETAWACG	Lee et al., 2003
RRE zyklisch	RRE	K ₁₆ GA-Cys*-RRETAWA-Cys*	Koivunen et al., 1994
RGD	RGD	K ₁₆ GGCRGDMFGC	Hart et al., 1994
RGD zyklisch	RGD	K ₁₆ GG-Cys*-RGDMFG-Cys*	Hart et al., 1994

Tabelle 4.6: Übersicht der verwendeten Integrin bindenden Peptide. Das * markiert die durch die Zyklisierung verknüpften Aminosäuren.

Transferrin ist ein im Blut vorkommendes Transportprotein, das für die Eisenversorgung der Körperzellen verantwortlich ist. Der Transferrinrezeptor 1 (TfR1) wird von allen Zellen exprimiert. Daher eignet sich dieser Rezeptor als Ziel für Liganden, die bei möglichst allen Zelltypen eine verbesserte Bindung erreichen sollen. Integrine sind Transmembranproteine, die in fast allen Zellen vorkommen. Der extrazelluläre Anteil einiger dieser Transmembranproteine hat Bindungsstellen mit dem bekannten, so genannten RGD-Erkennungsmotiv (Arg-Gly-Asp) und bindet beispielsweise an Fibronectin. Andere Integrine binden an nicht-RGD Proteine wie interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs), Kollagene und Laminin (bei Epithelzellen).

4.3.1.1 Transferrin

Um den Einfluss von Transferrin als Liganden zu testen, wurden Transfektionen mit verschiedenen Mengen an Transferrin (Sigma-Aldrich) in Kombination mit den Lipiden Dotap, Dotap/Dope und Dotap/Chol durchgeführt. Hierzu wurde das Transferrin zu den Lipiden gegeben und für 10 min inkubiert. Danach erfolgte die DNA-Zugabe. Dieses Protokoll wurden von anderen Gruppen etabliert und ist bei anderen Versuchen mit Transferrin erfolgreich genutzt wurden (Zhong et al., 2007; da Cruz et al., 2004). Bei Cos7 und HT29-Zellen führte der Zusatz von Transferrin zu keiner signifikanten Steigerung der Transfektionseffizienz. Dies war bei allen Konzentrationen und den unterschiedlichen Lipiden gleichermaßen der Fall. Sehr hohe Konzentrationen von Transferrin in Verbindung mit dem Lipid Dotap führten sogar zu einer deutlichen Reduktion (bei Cos7 bis zu Faktor 5) der Transgenexpression (siehe Abbildungen 4.17 und 4.18). Im Gegensatz dazu konnte bei Jurkatzellen eine Verbesserung des Gentransfers durch die Verwendung von Transferrin gemessen werden. Unabhängig von der Art der verwendeten Liposomen erreichte die Zugabe von 30 ng Transferrin bei 150 ng eingesetzter DNA eine Steigerung der Expression um Faktor 3-4 (siehe Abbildung 4.19). Bei höherer bzw. niedrigerer Menge des Proteins war die erzielte Wirkung geringer, aber noch immer vorhanden.

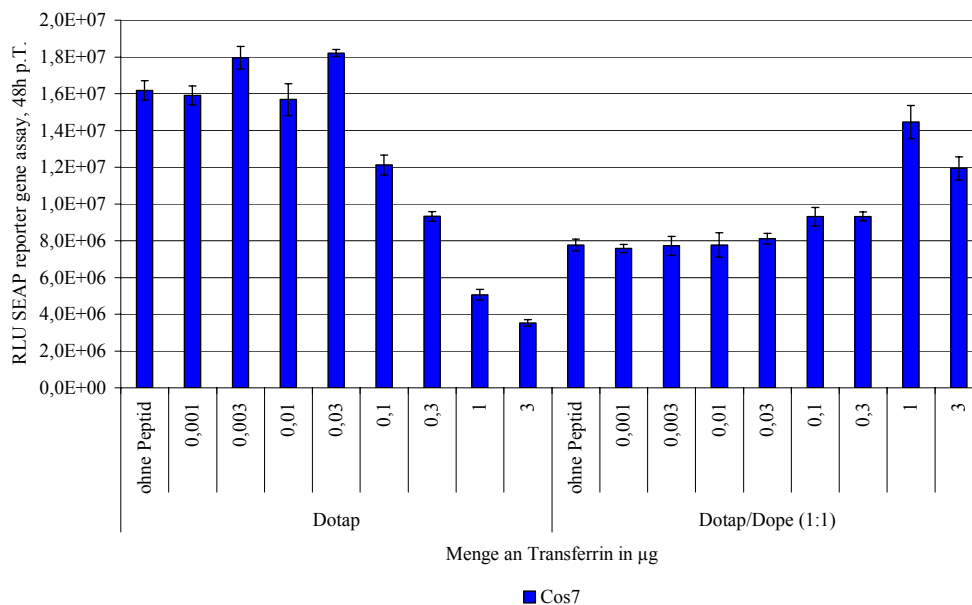


Abb. 4.17: Anwendung von Transferrin bei der Transfektion von Cos7-Zellen. 1×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit 150ng DNA (pM1-SEAP) und unterschiedlichen Mengen an Transferrin erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

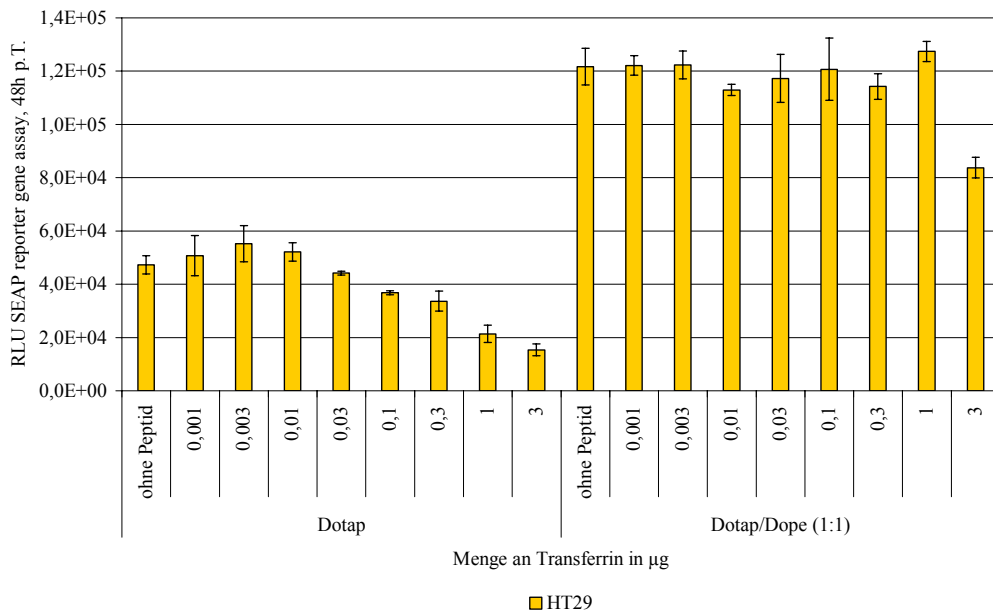


Abb. 4.18: Anwendung von Transferrin bei der Transfektion von HT29-Zellen. 3×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit 150ng DNA (pM1-SEAP) und unterschiedlichen Mengen an Transferrin erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

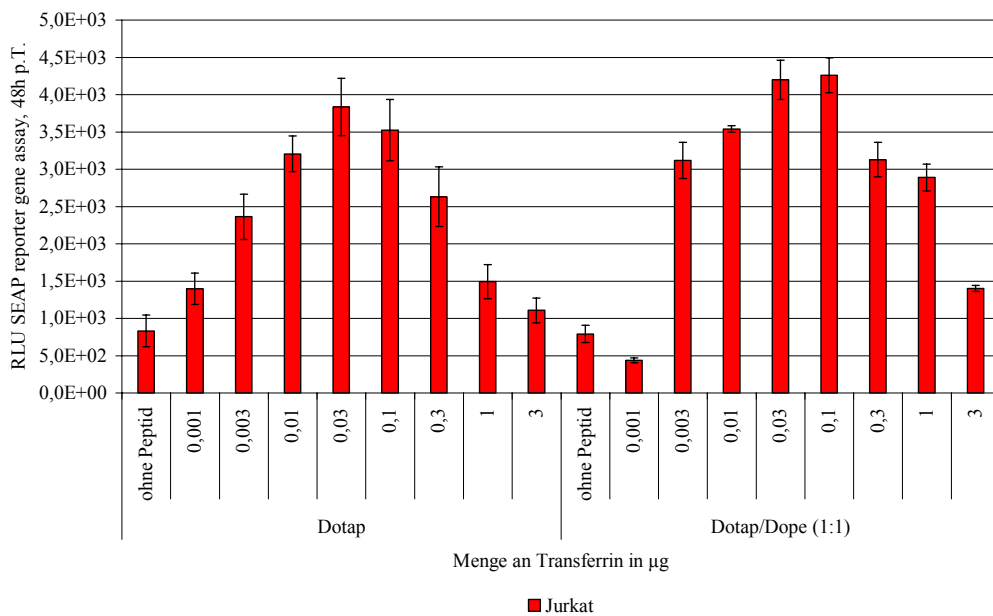


Abb. 4.19: Anwendung von Transferrin bei der Transfektion von Jurkat-Zellen. 3×10^4 Zellen wurden am Tag der Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit 150ng DNA (pM1-SEAP) und unterschiedlichen Mengen an Transferrin erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

4.3.1.2 Integrinbindende Peptide mit RRE-Motif

Die in den Versuchen verwendeten Integrin bindenden Peptide kann man auf Grund ihres Bindungspartners in 2 Gruppen einteilen. Die Integrine, die das sogenannte RRE-Motif besitzen binden spezifisch an Integrine, die sich aus den $\alpha 5$ - $\beta 1$ -Untereinheiten zusammensetzen. Im Gegensatz dazu binden Peptide mit der bekannteren RGD-Sequenz unspezifischer, nämlich an jedwedes Integrin, das eine $\beta 1$ Untereinheit besitzt.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Versuche bezüglich der idealen Struktur der Liganden. So wurden in manchen Arbeiten die lineare Form des Peptides genutzt, während andere Gruppen die zyklisierte Form bevorzugen (Meyer und Kessler, 2006). In den Versuchen wurden jeweils beide Formen getestet (siehe Tabelle 4.6). Die Bindung der Peptide an den Transfektionskomplex bestehend aus Lipid und DNA erfolgte über die bekannte so genannte DNA-Bindedomäne, die aus 16 Lysinen besteht und somit durch die resultierende positive Ladung die DNA binden kann. Die Bindung durch diesen Lysinschwanz verhindert auch eine Maskierung der DNA, die sich bei den ersten Versuchen mit NLS-Peptiden als problematisch erwiesen hatten (u.a. Ritter et al., 2003). Als geeignete Methode für die Bindung der Peptide und der DNA erwies sich eine Inkubation von DNA und Peptid in H_2O von 15 Minuten. Dieser Vorgang wird folgend als Vorkomplexierung bezeichnet. Die Bindung von Peptid und DNA wurde durch den PicoGreenAssay überprüft. Es war deutlich zu sehen, dass mit zunehmender Konzentration der Peptide die Fluoreszenz der DNA abnahm. Da für die Fluoreszenz ein Einbau des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA notwendig ist, kann die Abnahme der Fluoreszenz durch die Bindung der Peptide an die DNA erklärt werden, da durch die Bindung die DNA für den Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr zugänglich ist. Da weniger Farbstoff interkaliert, reduziert sich die gemessene Fluoreszenz. Dieser Effekt ist ab einem molaren Verhältnis von DNA zu Peptid von 1:300 zu beobachten. Bei den geringeren Verhältnissen ist eine Bindung durch diesen Test nicht mehr nachweisbar. Die durch den PicoGreenAssay belegte Bindung konnte mittels Elektrophorese bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Ab einem molaren Verhältnis von 1:300 war keine DNA durch Ethidiumbromid mehr nachweisbar, was ebenfalls auf eine Bindung der DNA durch die Peptide hindeutet, die dann ein Interkalieren des Ethidiumbromides verhindern.

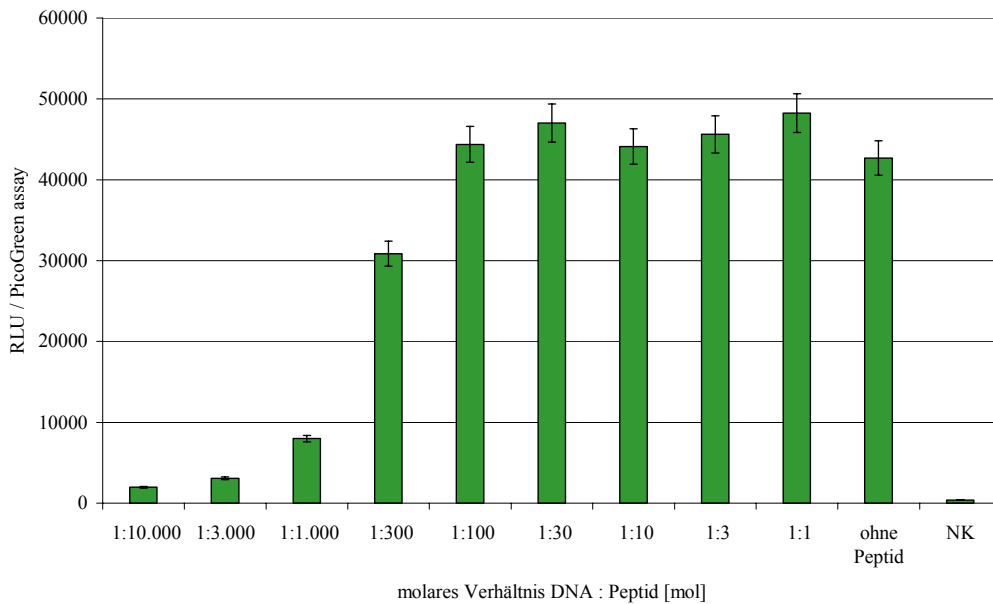


Abb. 4.20: Nachweis der Bindung von DNA und RGD-Peptiden. DNA und entsprechende Menge an Peptid wurden für 15min in H₂O inkubiert. Danach wurde der PicoGreenAssay durchgeführt (siehe Kapitel 3). Gezeigt ist die beim PicoGreenAssay ermittelte Lumineszenz.

Die Kombination von Lipid und linearem RRE-Peptid erzielte bei Cos7- und Jurkatzellen eine höhere Transfektionseffizienz. So war bei Cos7 eine Steigerung um Faktor 5 zu erreichen, wenn als Lipid Dotap/Dope genutzt wurde (siehe Abbildung 4.21). Mit Dotap/Chol war die Verbesserung mit Faktor 2 deutlich geringer und mit Dotap konnte keine Erhöhung gemessen werden (siehe Abbildung 4.22). Das zyklische RRE-Peptid erzielte die gleichen Resultate wie die lineare Form. Im Falle der HT29-Zellen führte die Verwendung der RRE-Peptide zu keiner Erhöhung der Transfektionseffizienz. Dies war auch erwartet worden, da HT29-Zellen über keine alpha5-beta1-Integrin verfügen und somit keine Bindung mit dem RRE-Peptid möglich ist.

Auf Grund der postulierten Wirkungsweise der Liganden bei der Transfektion, sollte die bessere Transfektionseffizienz auf die vergrößerte Anzahl transfizierter Zellen zurück zu führen sein. Der Einsatz der Liganden sollte die Bindung der Komplexe an die Zellen verbessern, wodurch mehr Zellen DNA binden können und in der Folge mehr Zellen transfiziert werden sollten. Die Auswertung der Transfektionsrate bestätigt diese These, da bei Nutzung der RRE-Peptide mehr Zellen transfiziert wurden. So konnte die Transfektionsrate bei Cos7 um etwa 20% gesteigert werden und bei Jurkat um etwa 10%.

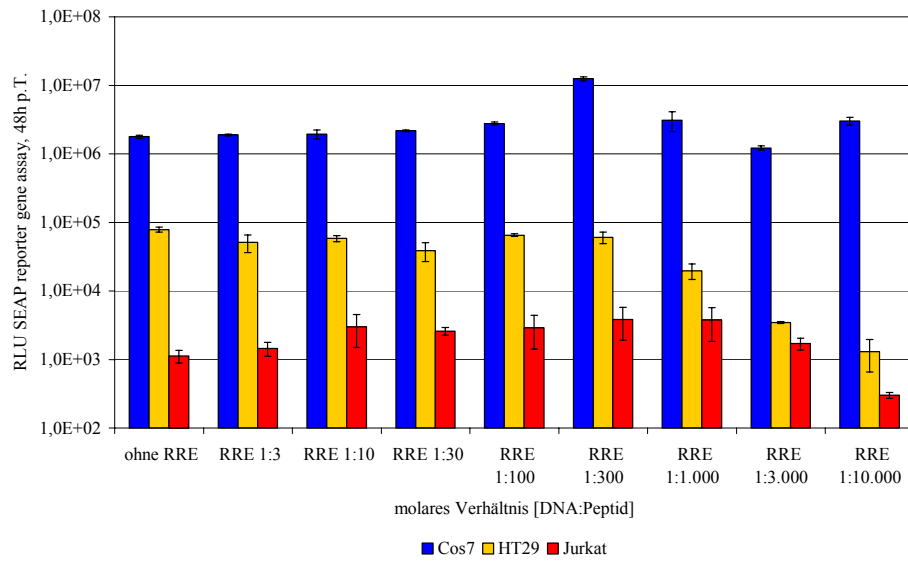


Abb. 4.21: Anwendung von Integrin bindenden Peptiden (linear, RRE-Motif) bei der Transfektion von Cos7, HT29 und Jurkat-Zellen mit Dotap/Dope. 1×10^4 (Cos7) bzw. 3×10^4 (HT29) wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. 3×10^4 Jurkatzellen wurden am Tag der Transfektion eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an linearen RRE-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

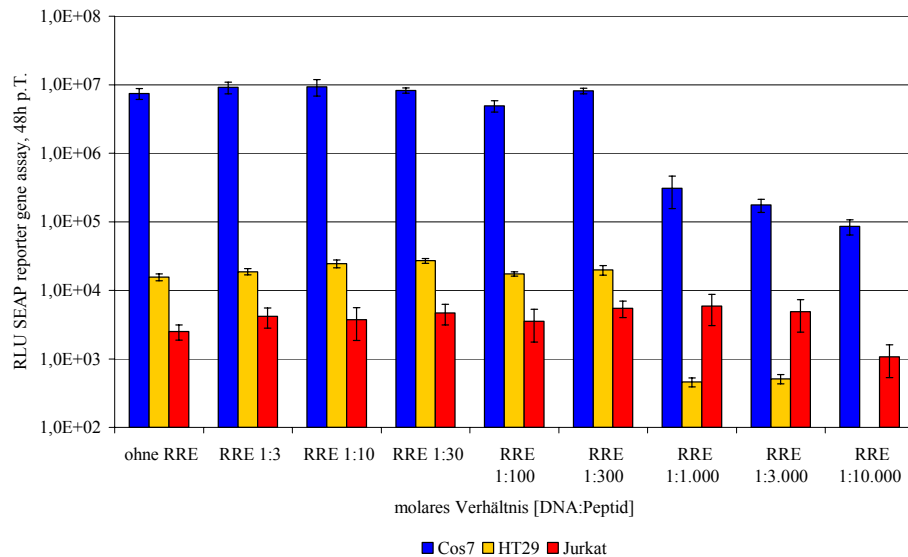


Abb. 4.22: Anwendung von Integrin bindenden Peptiden (linear, RRE-Motif) bei der Transfektion von Cos7, HT29 und Jurkat-Zellen mit Dotap. 1×10^4 (Cos7) bzw. 3×10^4 (HT29) wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. 3×10^4 Jurkatzellen wurden am Tag der Transfektion eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an linearen RRE-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

4.3.1.3 Integrine mit RGD-Motif

Bei den Peptiden mit dem so genannten RGD-Motif (siehe Tabelle 4.6) handelt es sich um Integrin bindende Peptide, die an eine größere Anzahl von Integrinen binden können, da die Voraussetzung für eine Interaktion nur das Vorhandensein der beta1-Untereinheit ist. Diese Einheit ist bei allen drei Zelllinien vorhanden, so dass auch bei den HT29-Zellen ein Effekt zu erwarten war.

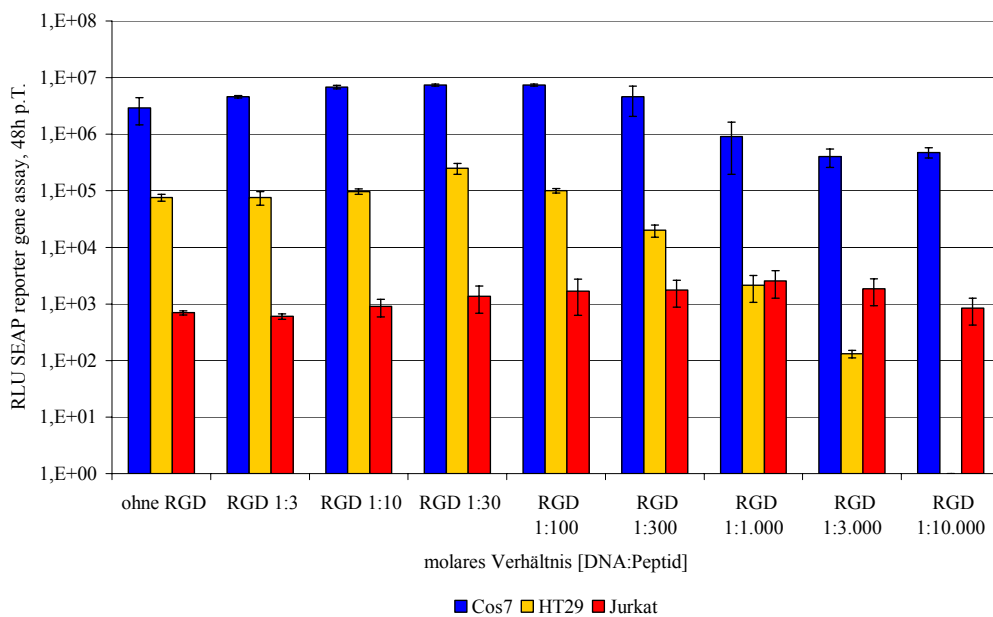


Abb. 4.23: Anwendung von Integrin bindenden Peptiden (linear, RGD-Motif) bei der Transfektion von Cos7, HT29 und Jurkat-Zellen mit Dotap/Dope. 1×10^4 (Cos7) bzw. 3×10^4 (HT29) wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. 3×10^4 Jurkatzellen wurden am Tag der Transfektion eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an linearen RGD-Peptiden erstellt. Hierfür wurden die DNA mit linearen RGD-Peptiden vorkomplexiert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

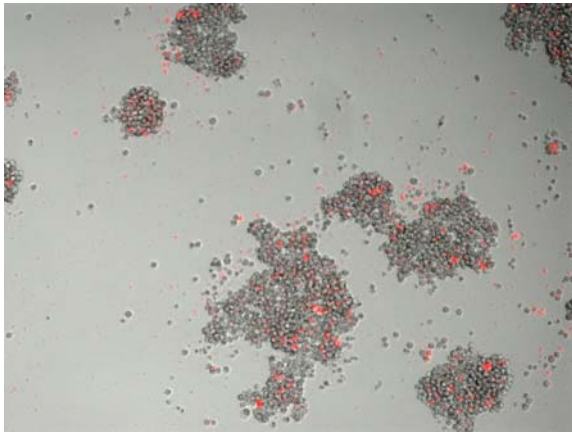
Bei diesen Versuchen wurde analog zu den oben beschriebenen mit linearen und zyklischen Peptiden gearbeitet, die ebenso wie die RRE-Peptide mittels 16 Lysinresten als Bindedomäne mit der DNA elektrostatisch interagieren können. Die Resultate unterschieden sich nur geringfügig von den mit RRE-Peptiden erzielten Ergebnissen. So war bei Cos7-Zellen eine Verbesserung der Transgenexpression mit Dotap/Dope als Lipid um Faktor 2-3 möglich (siehe Abbildung 4.23). Die gleiche Steigerung wurde bei Liposomen bestehend aus Dotap und Cholesterin realisiert, wohingegen mit Dotap allein keine Verbesserung erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Auch bei den Jurkatzellen war durch die RGD-Peptide eine Steigerung möglich. Die lineare Form des Peptides führten mit Dotap/Dope als Liposomen zu einer Erhöhung der Effizienz um Faktor 2-3 (siehe Abbildung 4.23). Mit Dotap sowie Dotap/Chol konnte eine um Faktor 2 gesteigerte Transfektionseffizienz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Falle der HT29 Zellen verdoppelte sich die durch Dotap/Dope erreichte Transgenexpression durch die Verwendung der linearen RGD-Peptide (siehe Abbildung 4.23). Die gleiche Erhöhung wurde mit den Lipiden Dotap und Dotap/Chol ermöglicht (Daten nicht gezeigt). Da HT29 Zellen die beta1 Untereinheit an der Zelloberfläche präsentieren, war der erzielte Effekt zu erwarten.

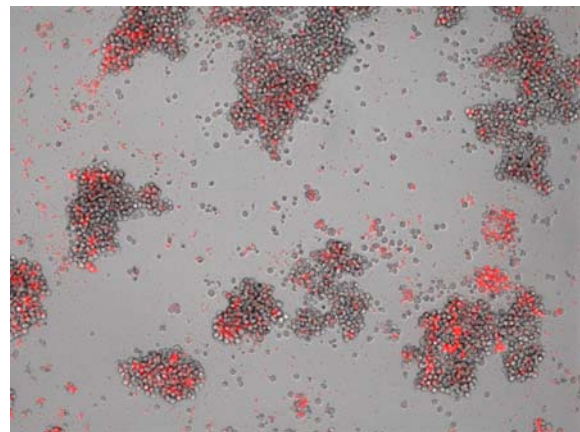
Bei allen Versuchen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der zyklischen und der linearen Form der RGD-Peptide ermittelbar (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

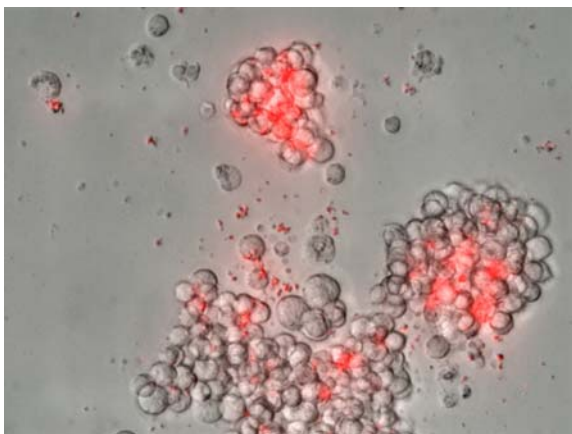
Um die bei oben beschriebene Steigerung der Transfektionseffizienz genauer zu charakterisieren, wurden mikroskopischen Untersuchungen mit markierter DNA und markierten Lipiden durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob sich die Anzahl der Zellen, die DNA binden können, durch Einsatz der Peptide erhöht. Die Transfektionen wurden mit markierter DNA durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde die Verteilung der DNA mikroskopisch bestimmt. Danach wurden die Zellen mit Trypsin und DNaseI behandelt, um die extrazellulär gebundenen aber nicht internalisierte DNA zu entfernen. Besonders bei Jurkatzellen war der durch die Integrin bindenden Peptide erzielte Effekt deutlich. Während ohne Peptid nur etwa 10% der Zellen DNA banden, erhöhte sich dieser Wert auf etwa 40% durch den Einsatz der Liganden (siehe Abbildung 4.24). Auch bei HT29 Zellen konnte bei der Verwendung der RGD-Peptide eine größere Anzahl DNA gebundener Zellen entdeckt werden. Bei Cos7-Zellen war dagegen mikroskopisch keine Verbesserung der Bindung festzustellen. Eine weitere Auffälligkeit ist die Größe der Komplexe, die erwartungsgemäß durch die Peptide größer werden. Man kann dies mikroskopisch durch die granulärere Form der DNA-Verteilung erkennen. Diese Größenzunahme wird durch die DNA-Bindedomäne hervorgerufen, die zu einer Komplexierung mehrerer Lipoplexe führt.



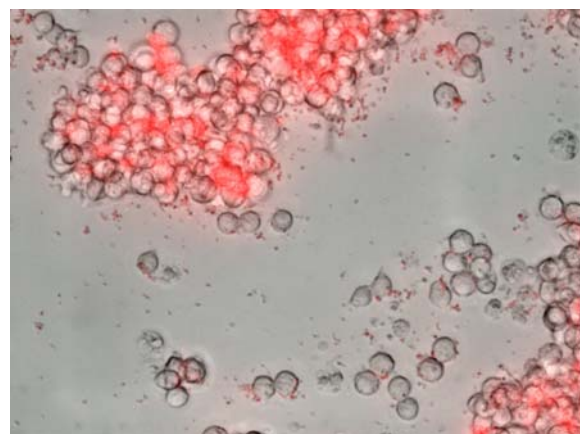
A) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 100fache Vergrößerung



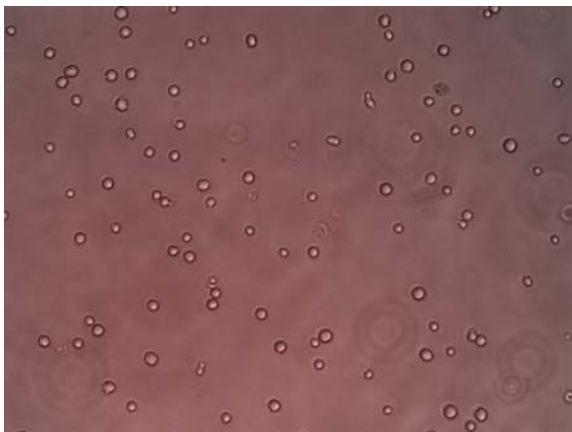
D) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 100fache Vergrößerung, +RGD-Peptid



B) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 400fache Vergrößerung



E) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 400fache Vergrößerung, +RGD-Peptid



C) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 200fache Vergrößerung,



F) Jurkat (Hellfeldi+Cy3), 200fache Vergrößerung, +RGD-Peptid

Abb. 4.24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von RGD-Peptiden. 3×10^4 Zellen wurden am Tag der Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit RGD-Peptiden und Rhodamin markierter DNA erstellt. 24 Stunden nach Transfektion mit Dotap/Dope wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Danach wurden die Wasch- und Verdauschritte durchgeführt, um die nicht internalisierte DNA zu entfernen (siehe Kapitel 3). A-C: Kontrollversuch ohne RGD-Peptid; D-F: Komplexe mit RGD-Peptiden. Filter in Klammern angeben; C und F nach Wasch- und Verdauschritten.

Es konnte durch verschiedene Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, dass dieser Effekt allein keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat. Hierzu wurden Lipoplexe mit Peptiden, die aus 16 Lysinen bestanden hergestellt und deren Transfektionseigenschaften bestimmt. Dallüge und Mitarbeiter zeigten, dass die Lysine keinen Einfluss auf die Effizienz des Transfers, sondern nur auf die Struktur der Komplexe haben (Dallüge et al., 2002).

Während sich die Anzahl der Zellen, die DNA binden durch die Liganden zwar erhöht, konnten bei Betrachtung der intrazellulären Verteilung der DNA keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. So erschien die Anzahl der Zellen, die DNA aufgenommen haben nur leicht erhöht. Um dies zu prüfen, wurden die Zellen gewaschen und die extrazelluläre DNA verdaut. Nach dieser Prozedur wurden die Zellen erneut untersucht (siehe Abbildung 4.24). Es zeigte sich, dass die Anzahl der DNA internalisierenden Zellen durch den Einsatz der Liganden nur minimal erhöht wurde. Dies war bei allen Zelltypen der Fall.

4.3.3 Zusammenfassung

Auf Grund des systematischen Screening und der Betrachtung aller bei der Transfektion genutzter Komponenten konnte gezeigt werden, dass die Transfektionseffizienz von der Kombination der Zelle, des Lipides und des zur Verbesserung eingesetzten Peptides abhängig ist. Ergebnisse, die durch Versuche mit einer Zelllinie gewonnen wurden, lassen sich nicht auf andere Zelllinien übertragen. Gleiches gilt für die verwendeten Lipide. Die Wirkung eines Peptides, wie beispielsweise das NLS-Peptid, ist je nach Zelltyp und Lipid verschieden. Allgemeingültige Aussagen sind nicht möglich.

Die gene tracking Versuche zeigten, dass die Bindung von Zellen und DNA ein kritischer Schritt bei der Transfektion eukaryontischer Zellen ist. Besonders bei den Jurkatzellen war die Adhäsion der DNA an die Zellen nur bei 10% der Zellen erfolgt. Der Einsatz von Liganden sollte die Bindung von DNA und Zellen verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Integrin bindenden Peptiden zu einer Erhöhung der Anzahl der Zellen führt, die DNA binden. Allerdings stieg die erzielte Transfektionsrate nicht im gleichen Maße, was zu der Vermutung führte, dass neben der Bindung noch die geringe endozytotische Aufnahme der Transfektionskomplexe ein hemmender Schritt ist. Ein Verdau der extrazellulär gebundenen DNA belegte diese Vermutung. Die Zahl der Zellen, die DNA internalisiert hatten war nur

geringfügig durch den Einsatz der RGD- bzw. RRE- Peptide erhöht worden. Demnach ist neben der Bindung vor allem die endozytotische Aufnahme ein Problem.

Damit ist auch zu erklären, dass bei der Transfektion pro Zelle etwa 1×10^5 DNA Moleküle eingesetzt werden müssen, um eine optimale Effizienz zu erreichen.

4.4 Verbesserung des Transport der DNA in den Kern

Eine grundlegende Überlegung zur Verbesserung der Transfektionseffizienz ist, die zelleigenen Kernimport-Mechanismen zu nutzen, um die Aufnahme der transfizierten DNA in den Zellkern zu verbessern. Dieses Ziel soll durch die Nutzung so genannter Kern targeting Sequenzen erreicht werden. Hierzu gibt es eine Vielzahl an Versuchen mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. In den Versuchen wurden verschiedene NLS-Peptide verwendet. Die meisten Sequenzen basieren auf der gut bekannten und häufig genutzten NLS-Sequenz des großen SV40 T-Antigens. Es wurden zyklische Peptide, Monomere und Polymere dieser Sequenz verwendet um auch mögliche Maskierungen der positiv geladenen NLS-Peptide durch die DNA zu verhindern. Ein großer Teil der Arbeiten zu diesem Thema ist äußerst kritisch zu betrachten. Oftmals fehlt ein definitiver Nachweis durch geeignete Kontrollen, dass der erzielte Effekt auf die Sequenz des Peptides zurückzuführen ist (siehe Kapitel 2). Einige der mikroskopischen Arbeiten verwenden fixierte Zellen, was zu der oben ausführlich beschriebenen Problematik der Umlagerung der Lipide führt. Bei der Auswahl der zur Verbesserung des Kerntransportes verwendeten Peptide sollten deshalb folgende Kriterien erfüllt werden:

- von mehreren Autoren belegter sequenzabhängiger Effekt
- gezeigte Verbesserungen beim Einsatz von kationischen Lipiden

Ein ideales System zur Evaluierung von NLS-Peptiden ist die Elektroporation. Bei dieser physikalischen Transfektionsmethode ist keine Aufnahme mittels Endozytose notwendig, so dass die DNA frei in das Zytoplasma der Zellen diffundieren kann. Dadurch ist als einzig limitierender Schritt einer erfolgreichen Transgenexpression die Überwindung der Kernmembran vorhanden. Demnach sollte eine Anwendung von NLS-Peptiden zu einer Steigerung der Expression führen.

4.4.1 getestete NLS-Peptide

Um den Einfluss der NLS-Peptide auf die Transfektionseffizienz wirklich zuverlässig bestimmen zu können, ist eine Untersuchung mit verschiedenen Peptiden, Lipiden und Zelllinien erforderlich, da bereits das Screening zeigte, dass die Verwendung eines NLS-Peptides in Abhängigkeit der genannten Faktoren zu unterschiedlichen Ergebnissen führt (siehe Kapitel 4.2). Deshalb sollten bei den Versuchen verschiedene NLS-Peptide verwendet werden. Als eigentliches Kern targeting Signal diente dabei die Sequenz des großen T-Antigenes des SV40. Die Bindung an die DNA erfolgt über elektrostatische Wechselwirkung mit der DNA. Diese Art der Bindung birgt natürlich die Gefahr der Maskierung der für den Transport wichtigen Sequenz auf Grund der überwiegend basischen Aminosäuren. Dieses Problem ist mehrfach beschrieben und durch unterschiedliche Methoden umgangen worden. Zum einen kann durch den Einsatz eines Polymeres die Chance einer freien und zugänglichen Sequenz erhöht und die Funktionalität des Peptides gewährleistet werden (Ritter et al., 2003), zum anderen besteht in der Kopplung der NLS an eine DNA-Bindedomäne bestehend aus einem Lysinschwanz die Möglichkeit zum Schutz der NLS. Zusätzlich wurde die Sekundärstruktur der Erkennungssequenz variiert. So wurde neben der linearen Form noch ein zyklisiertes NLS-Peptid getestet, da der Autor bei seiner Arbeit einen besseren Kerntransport durch die zyklisierte Form des Peptides nachweist (Cartier et al., 2002).

Peptid	NLS-Motif	Sequenz	Quelle (Literatur)
KSV	SV40	K ₁₆ GAPKKR ₁₆ KV	
SV4	SV40	(PKKKR ₁₆ KVG) ₄ C	Ritter et al., 2003
zNLS	SV40	K ₁₆ C V*KLKVYPLKKR ₁₆ KP*	Cartier und Reszka, 2002

Tabelle 4.7: Übersicht der verwendeten NLS-Peptide. Das * markiert die durch die Zyklisierung verknüpften Aminosäuren.

Ein weiteres Problem der Arbeiten vieler Autoren ist der Nachweis der Verbesserung der Transfektion durch NLS-Peptide bei mehreren Zelltypen. In der Regel beschränken sich die Versuche auf nur eine Zelllinie und eine Art von Lipiden. Die Screening Versuche offenbarten jedoch, dass die Wirkung des in den Versuchen getesteten NLS-Peptides abhängig von der transfizierten Zelle und des genutzten Lipids ist (siehe Kapitel 4.2), so dass die getroffenen

Aussagen und Ergebnisse zumindest kritisch beurteilt werden müssen. Dieser Umstand macht die systematische Untersuchung der Wirkung von NLS-Peptiden auf die Transfektionseffizienz erforderlich. Dabei müssen neben den unterschiedlichen Zelltypen und Lipiden auch die verwendeten Methoden berücksichtigt werden, um stichhaltige Aussagen treffen zu können.

4.4.1.1 Lipofektion

Die NLS-Peptide wurden zunächst mit verschiedenen Lipiden und Lipidkombinationen bei der Transfektion von Cos7-, HT29- und Jurkatzellen getestet. Dabei wurden die Peptide durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA assoziiert (siehe Kapitel 4.3). Die Bindung der Peptide an die DNA wurde jeweils durch den PicoGreenAssay überprüft. Die vorkomplexierte DNA wurde dann – analog nicht behandelte DNA - zur Bildung der Transfektionskomplexe eingesetzt.

Versuche mit Peptid KSV

Das Peptid KSV besteht aus der NLS des großen T-Antigens des SV40 Virus und ist mit einer DNA-Bindedomäne (16 Lysine) gekoppelt, um eine Assoziation der Peptide mit der DNA zu ermöglichen (siehe Tabelle 4.7). Es wurden bei der Vorkomplexierung unterschiedliche molare Verhältnisse von DNA und Peptid eingesetzt. Diese reichten von 1:3 bis 1:10.000 Peptidmoleküle pro Plasmid. Die Ergebnisse bei der Transfektion mit diesem Peptid waren eindeutig. Es konnte unabhängig von der verwendeten Zelllinie und des genutzten Lipides keine Verbesserung der Transfektion erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die Transgenexpression blieb verglichen mit der Kontrolle ohne Peptid konstant. Eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandene Wirkung konnte in einer Einschränkung der Funktion des Peptides durch die Komplexierung der DNA liegen. Durch den Lysinschwanz als Bindedomäne sollte eine Maskierung der Kerntransport Sequenz zwar verhindert werden, doch ist in Anbetracht der erzielten Ergebnisse diese nicht auszuschließen. Diese These wird auch von einigen Autoren unterstützt (siehe Kapitel 2.3).

Versuche mit Peptid SV4

Um die Maskierung weiter zu erschweren sollte als nächstes eine Tetramer der SV40-NLS getestet werden. Sicherlich kommt es auch bei diesem Peptid zu Maskierungen der NLS durch die DNA. Allerdings ist bei einem Tetramer die Chance höher, dass eine der 4 NLS-Motive unmaskiert und das Peptid in seiner Wirkung intakt bleibt (Ritter et al., 2003). Das NLS-Peptid SV4 wurde bereits beim Screening und *genetracking* eingesetzt (siehe Kapitel 4.2). Bei der Transfektion von Cos7-Zellen zeigte sich, dass die Ergebnisse der Anwendung des SV4-Peptides unterschiedlich sind. So konnte durch Zusatz des NLS-Peptides beim Gentransfer mittels Dotap keine Verbesserung der Transfektionseffizienz erzielt werden (siehe Abbildung 4.25).

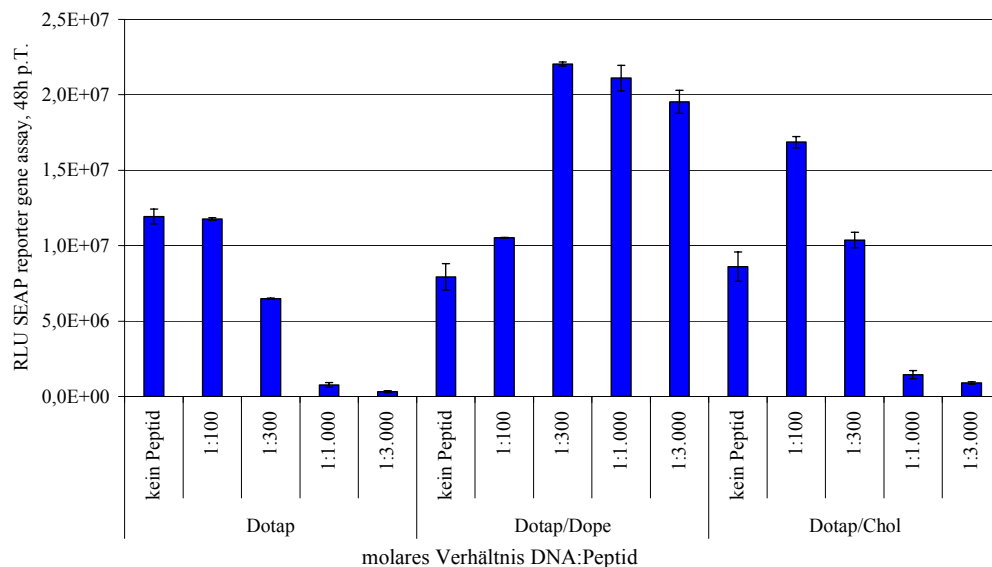


Abb. 4.25: Einfluss des tetrameren NLS-Peptides (SV4) auf die Transfektion von Cos7-Zellen. 1×10^4 Cos7-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an NLS-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Bei Transfektionen mit Dotap und Dope als Liposomen bewirkte ein molares Verhältnis von 1:300 (DNA:Peptid) eine Steigerung der Transfektion um Faktor 3-4 (siehe Abbildung 4.25). Ab einer Konzentration von 1:1.000 fiel die Verbesserung mit zunehmender Konzentration stetig geringer aus. Aber auch bei höheren Konzentrationen war eine minimale Erhöhung des Gentransfer messbar. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Nutzung von Dotap und Cholesterin

als Liposomen. Auch hier führte das NLS-Peptid zu einer Steigerung der Transfektion. Bei einem molaren Verhältnis von 1:100 war eine Verdoppelung der Transfektionseffizienz zu beobachten. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Dotap/Dope wurde bei der Verwendung von Cholesterin als Helferlipid der Gentransfer mit zunehmender Konzentration der Peptide stark reduziert. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Transfektionsrate wider. So konnte die Anzahl der transfizierten Zellen bei der Transfektion mit Dotap/Dope je nach Peptidkonzentration auf das 2-fache erhöht werden. Bei Liposomen bestehend aus Dotap/Chol bewirkten die Peptide ein leichtes Ansteigen der transgenexprimierenden Zellen um Faktor 1,5. Somit ist ein Teil der erzielten Verbesserung auf die erhöhte Anzahl der exprimierenden Zellen zurückzuführen. Allerdings war die bei der SEAP-Expression bestimmte Verbesserung noch größer, so dass neben der Transfektionsrate auch die Expressionsstärke der bereits transfizierten Zellen erhöht wurde. Beides ist durch den gesteigerten Transport der DNA in den Zellkern zu erklären.

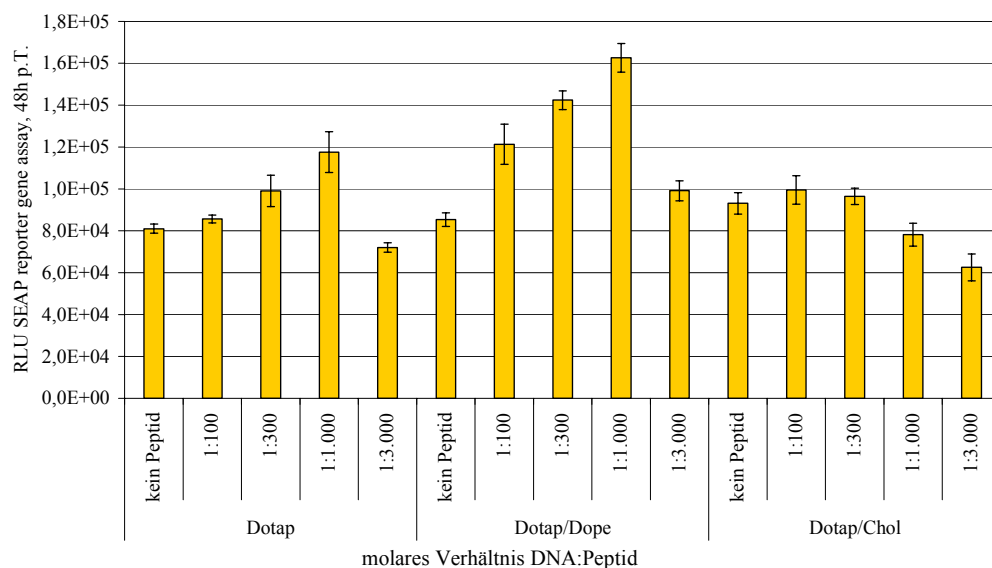


Abb. 4.26: Einfluss des tetrameren NLS-Peptides (SV4) auf die Transfektion von HT29-Zellen. 3×10^4 HT29-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an NLS-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Bei den Versuchen mit HT29-Zellen stellte sich einmal mehr heraus, dass die bei einer Zelllinie ermittelten Daten nicht auf andere Zellen übertragbar sind. Verwendet man das tetramere NLS-

Peptid bei der Lipofektion von HT29-Zellen zeigt sich, dass die Transfektionseffizienz geringfügig gesteigert werden konnte. In Verbindung mit Dotap wurde die Transgenexpression um Faktor 1,5 gesteigert (siehe Abbildung 4.26). Als optimal stellte sich eine Konzentration von 1000 Peptiden pro Plasmid heraus. Eine weitere Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde bei der Transfektion mit Dotap/Dope erreicht, bei der eine Steigerung auf das 2-fache festgestellt werden konnte. Liposomen aus Dotap und Cholesterin erreichten durch das NLS-Peptid bei Cos7-Zellen eine Verdoppelung der Transfektionseffizienz. In den Versuchen mit HT29-Zellen hingegen führte die Nutzung der Peptide zu keiner Verbesserung. Es trat sogar mit zunehmender Konzentration der Peptide eine leichte Hemmung des Gentransfers ein. Auch bei der Transfektionsrate konnte keine gesteigerte Anzahl transfizierter Zellen beobachtet werden, so dass das NLS-Peptid nur einen geringen Effekt in Verbindung mit Dotap/Dope bei der Transfektion von HT29-Zellen offenbart (Daten nicht gezeigt). Bei der Transfektion von Jurkatzellen konnte ebenso wie mit dem Peptid KSV auch mit dem Tetramer in Verbindung mit Dotap und Dotpa/Chol keine Steigerung der Transfektionsrate oder der Expressionsstärke quantifiziert werden. Aus Dotap und Dope bestehende Liposomen führten zu einer geringen Verbesserung der Transfektion um bis zu Faktor 2. Im Unterschied zu allen anderen Zelllinien konnte durch die Verwendung der Peptide in hoher Konzentration keine Hemmung des Gentransfers nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Versuche mit zNLS

Um eine andere Sekundärstruktur zu testen wurden die Transfektionen mit einem zyklischen NLS-Peptid durchgeführt. Wie bei den Versuchen mit SV4 war eine Abhängigkeit der Wirkung des NLS-Peptides von der verwendeten Zelle und dem Lipiden festzustellen. Zunächst wurden die Zellen mit Dotap als Reagenz transfiziert. Bei HT29- und Jurkatzellen konnte durch eine Vorkomplexierung der DNA mit dem zyklischen NLS-Peptid keine Verbesserung der Transfektionseffizienz erreicht werden. Bei Cos7-Zellen konnte eine geringfügige Steigerung um Faktor 1,5 bei einem Verhältnis DNA:Peptid von 1:100 gemessen werden. Mit weiter steigender Peptidkonzentration konnte eine Hemmung des Gentransfers beobachtet werden. So war bei einem molaren Verhältnis von 1:1.000 eine Reduktion der Transgenexpression um Faktor 20 messbar, die auch bei noch weiter steigender Konzentration erhalten blieb (siehe Abbildung 4.27).

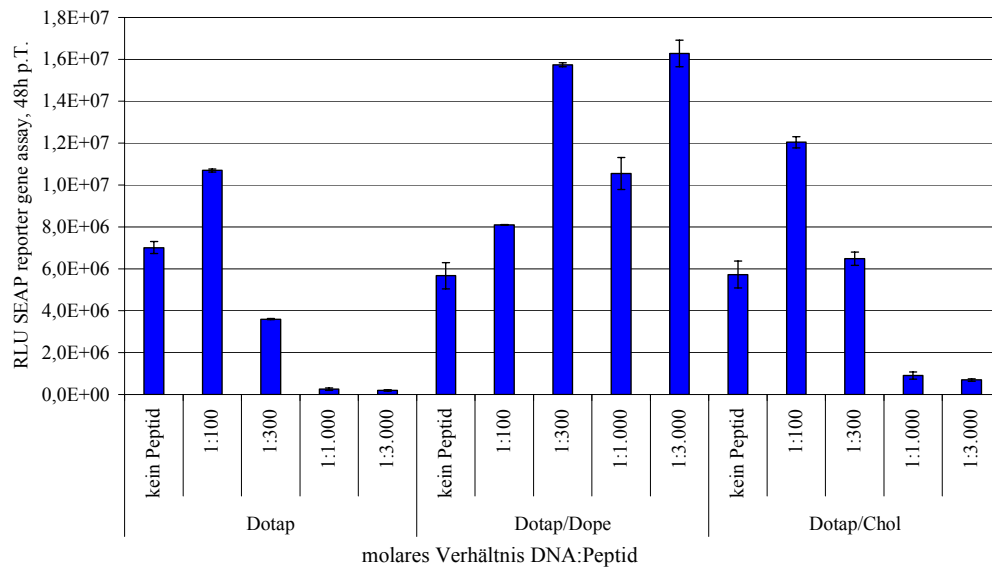


Abb. 4.27: Einfluss des zyklischen NLS-Peptides (zNLS) auf die Transfektion von Cos7-Zellen. 1×10^4 Cos7-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an NLS-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

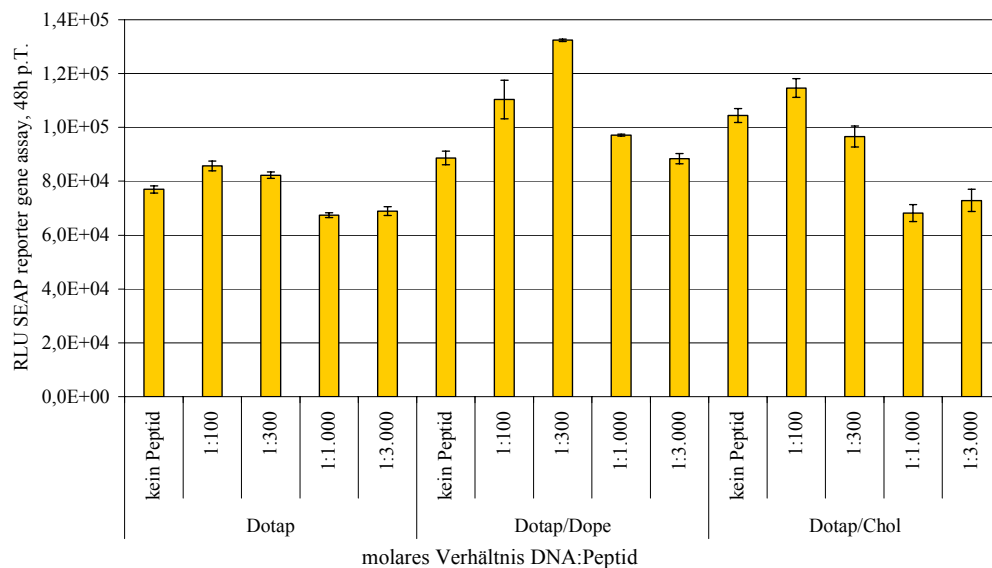


Abb. 4.28: Einfluss des zyklischen NLS-Peptides (zNLS) auf die Transfektion von HT29-Zellen. 3×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Komplexe mit unterschiedlichen Mengen an NLS-Peptiden erstellt. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Durch Zusatz des neutralen Helferlipides Dope änderte sich die Wirkung der Peptide. Transfizierte Cos7-Zellen erreichten eine dreifache Steigerung der Transgenexpression bei einer Peptidkonzentration von 300 Molekülen pro Plasmid. Bei HT29-Zellen konnte die Expression nur minimal (~Faktor 1,5) gesteigert werden (siehe Abbildung 4.28). Im Gegensatz zu Cos7-Zellen führte hier eine weitere Erhöhung der Konzentration zu einer generellen Abnahme der Transfektionseffizienz. Bei Cos7-Zellen war wie bei den Versuchen mit dem Peptid SV4 der Effekt zu beobachten, dass die Effizienz bei einer Konzentration von 1:1.000 (DNA:Peptid) fast halbiert wurde und bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 1:3.000 (DNA:Peptid) wieder auf das ursprüngliche Niveau ansteigt. Bei der Suspensionszelle Jurkat führte die Anwendung des NLS-Peptides zu keiner Steigerung der Transgenexpression. Mit zunehmender Peptidmenge erfolgte eine kontinuierliche Hemmung des Transfers (Daten nicht gezeigt).

Ersetzte man das Helferlipid Dope durch Cholesterin änderte sich der Einfluss des NLS-Peptides abermals. Bei der Transfektion von Cos7-Zellen erreicht das NLS-Peptid bei einem molaren Verhältnis von 1:100 (DNA:Peptid) eine Erhöhung der Transfektionseffizienz um Faktor 2. Eine größere Menge an Peptid führt zu einer kontinuierlichen Verminderung der Transfektion bis zu Faktor 10. Bei HT29 und Jurkat-Zellen war keine Verbesserung zu beobachten. Auch hier sank die Transfektionseffizienz mit zunehmender Peptidkonzentration ab.

4.4.1.2 Elektroporation

Ein einfaches Transfektionssystem zur Beurteilung der Wirkung von NLS-Peptiden stellt die Elektroporation dar. Im Gegensatz zur Lipofektion können bei dieser physikalischen Methode mögliche Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Peptiden ausgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil ist die Vermeidung des endosomalen Aufnahmeweges, der bei der Lipofektion den Kerntransport durch die ineffiziente Freisetzung der DNA zusätzlich erschwert.

In den Versuchen (siehe Abbildung 4.29) zeigte sich überraschenderweise, dass durch Zusatz der NLS-Peptide die Transfektionseffizienz von Cos7-Zellen nicht verändert wird. So blieb die Transgenexpression bei allen 3 getesteten Peptiden KSV, SV4 und zNLS konstant. Die Ursache für das Resultat liegt einfach darin begründet, dass bei der Elektroporation von Cos7-Zellen auch ohne unterstützende Peptide die erzielte Transfektionseffizienz nahezu optimal ist. Die Transfektionsrate beträgt über 95%, so dass einfach keine weitere Steigerung mehr möglich ist. Bei einer hohen Konzentration an Peptiden verringert sich die Effizienz. Zwar gelangt die meiste

DNA auch bei der Elektroporation nicht in den Kern der Zellen (siehe gene tracking Versuche), doch ist dies in Anbetracht der großen Menge von etwa 1×10^6 DNA Molekülen an eingesetzter DNA nicht limitierend. Bei der Elektroporation von Jurkat- und HT29-Zellen hingegen konnte die Transgenexpression um Faktor 2 gesteigert werden. Als ideal erwies sich eine Konzentration von 30 Peptiden pro DNA-Molekül. Größere Mengen an Peptid reduzieren die Effizienz zunehmend. Elektroporationen mit dem tetrameren NLS-Peptid (SV4) sowie dem NLS-Peptid mit DNA-Bindedomäne (KSV) führten zu den gleichen Resultaten und erzielten eine geringfügige Verbesserung der Transfektionseffizienz bei HT29- und Jurkatzellen.

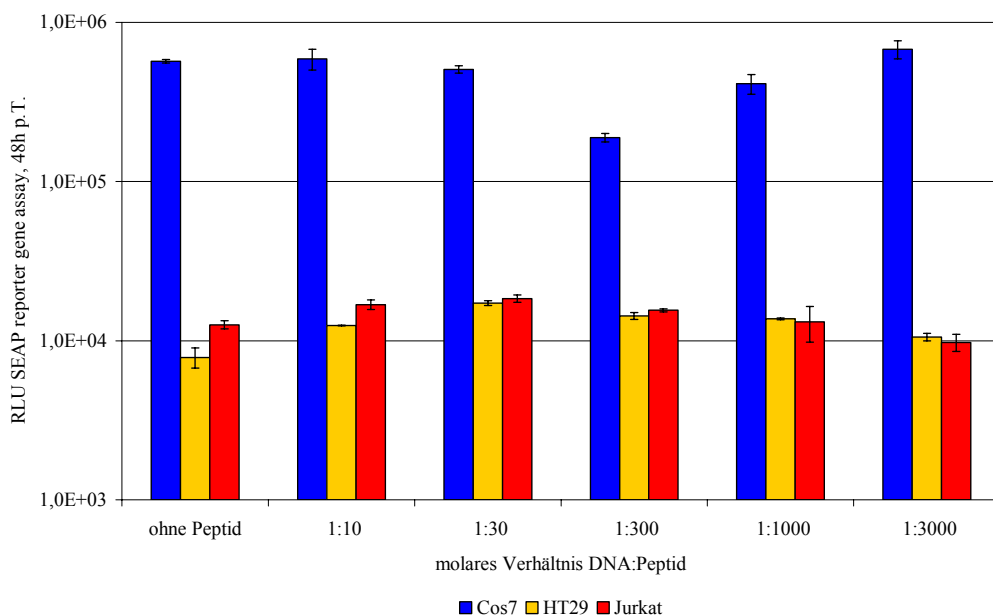


Abb. 4.29: Einfluss des zyklischen NLS-Peptides (zNLS) auf die Elektroporation. 1×10^6 Zellen (2×10^6 Zellen bei Jurkat) wurden unter idealen Bedingungen mit $2 \mu\text{g}$ des SEAP-Plasmides elektroporiert und in einem 6well in 2ml Kulturmedium ausgesät (siehe Kapitel3). Die eingesetzte DNA wurde vorher mit verschiedenen Mengen des NLS-Peptides vorkomplexiert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

4.4.2 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass der Einsatz von Peptiden mit Kerntransport Sequenzen die Transfektionseffizienz bis Faktor 4 verbessern kann. Dabei spielte das verwendete Lipid eine wichtige Rolle. So war eine Steigerung bei der Verwendung von Dotap nur in sehr

geringem Maße möglich. Nutzte man hingegen Dotap in Verbindung mit Dope als Lipid, dann kann man die Expression bis Faktor 3-4 erhöhen.

Bei der Wirkung der NLS-Peptide auf die Transfektionseffizienz ist auch der Zelltyp von großer Bedeutung. So war bei Cos7-Zellen eine Steigerung der Transgenexpression auf das 4-fache zu beobachten, während bei HT29-Zellen lediglich eine Verdopplung gemessen werden konnte. Bei Jurkatzellen konnte durch den Einsatz der NLS-Peptide eine geringe Verbesserung der Transfektion durch kationische Lipide erreicht werden. Demnach war bei den ohnehin schon gut zu transfizierenden Cos7-Zellen die größte Verbesserung erreicht worden. Bei HT29- und Jurkatzellen waren nur vergleichsweise geringe Steigerungen möglich. Diese konnte auch bei der Elektroporation erreicht werden. Im Gegensatz zur Lipofektion waren bei der Elektroporation alle NLS-Peptide gleichermaßen wirksam.

4.5 Verbesserung der Freisetzung der DNA aus den Endosomen

Das Screening (siehe Kapitel 4.2.1) ergab unter anderem, dass die Verwendung eines fusogenen Peptides zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führt. Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung mehrerer Autoren, die durch Zusatz von beispielsweise Chloroquine eine Steigerung des Gentransfers erzielen (siehe Kapitel 2.3). Diese Resultate deuten auf eine Hemmung der Transfektion durch eine ineffiziente Freisetzung der DNA aus den Endosomen hin. Diese These wird durch zahlreiche mikroskopische Untersuchungen bestätigt (Lehmann 2003, Zhong et al., 2006, Rudolph et al., 2003). Auch die Resultate des *gene tracking* unterstützt diese These. So ist die von den Zellen internalisierte DNA geclustert. Diese definierte, punktuelle Anhäufung der DNA deutet nach Meinung fast aller Autoren auf sich in Endosomen befindliche DNA hin, die somit keiner freien Diffusion im Zellplasma unterliegt (Lehmann 2003, Zhong et al., 2006, Rudolph et al., 2003). Ganz augenscheinlich wird dieser Befund, wenn man die bei der Lipofektion erzielten Transfektionsraten mit der Elektroporation vergleicht. Die Methode der Elektroporation umgeht die Aufnahme der DNA durch Endozytose und erreicht deutlich höhere Transfektionsraten, d.h.: eine höhere Anzahl transfizierter Zellen. Im Falle der Jurkatzellen kann dieser Befund natürlich durch die schlechte Bindung der Komplexe an die Zellen erklärt werden. Aber bei HT29- und vor allem Cos7-Zellen ist bei der Lipofektion der endozytotische Aufnahmeweg ein klar ermitteltes Hemmnis bei der Transfektion. Für eine Verbesserung der

Freisetzung der DNA aus den Endosomen wurde von mehreren Autoren mit endosomolytischen Peptiden wie INF7 oder Melittin gearbeitet, die kovalent oder elektrostatisch mit den Transfektionskomplexen assoziiert wurden. Die dabei erzielte Steigerung war in Abhängigkeit der Bedingungen sowie der verwendeten Zellen und Reagenzien unterschiedlich (siehe Kapitel 2.3.2). Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung der Freisetzung aus den Endosomen ist die Verwendung pH-abhängiger fusogener Peptide. Durch die Peptide soll eine Fusion zwischen der endosomalen Membran und den Lipidbilayern der Liposomen erreicht werden. Dadurch würde mehr DNA in das Zytosol der Zellen entlassen und könnte in den Kern der Zellen transportiert bzw. von diesem während der Mitose aufgenommen werden.

Zielführend erschien die Herstellung so genannter fusogener Liposomen zu sein. Dabei handelt es sich um Liposomen, die durch Einbau bzw. Zugabe fusogener Peptide in der Lage sind, Fusionen zwischen Lipidbilayern zu unterstützen. Um für die Transfektion nutzbar zu sein, müssen fusogene Liposomen folgende Eigenschaften aufweisen:

- erhöhte Fusogenität
- Fähigkeit zur Bindung von DNA
- Fähigkeit zur Transfektion von DNA

4.5.1 fusogene LV-Peptide

Die LV-Peptide (siehe Tabelle 4.8) bestehen aus einer hydrophoben Kernsequenz aus Aminosäuren, die verschiedene Sekundärstrukturen ausbilden. So bildet Leucin die alpha-Helix-Struktur während Valin zu beta-Faltblättern aggregiert. Die Idee im Design dieser Peptide besteht in der Beobachtung, dass Fusogenität mit struktureller Flexibilität korreliert. Diese Flexibilität kann durch Einbau eines Glycin-Prolin-Paares noch erhöht werden (Hofmann et al., 2004).

Die Kernsequenz wird durch 3 Histidinreste auf beiden Seiten flankiert. Da die fusogene Wirkung der Peptide nur bei protonierten Histidinen gegeben ist, setzt die Aktivität erst bei einem pH-Wert von unter 5 ein. Obwohl die LV-Peptide noch nie bei Transfektionen oder der Verbesserung endosomaler Freisetzung verwendet wurden, scheinen sie auf Grund der genannten Eigenschaften ideal geeignet, die Freisetzung der DNA in das Zytoplasma durch Fusionen zwischen Endosomen und Lipoplexen und in deren Folge die Transfektionseffizienz bei der Lipofektion zu verbessern (siehe Kapitel 2).

Peptid	Sequenz	Quelle (Literatur)
LV8GP	NH ₂ -HHHLVLGPVLVHHH-COOH	
LV12GP	NH ₂ -HHHLVLVLGPVLVLVHHH-COOH	Hofmann et al., 2004
LV16GP	NH ₂ -HHHLVLVLVLGPVLVLVHHH-COOH	Hofmann et al., 2004
LV20GP	NH ₂ -HHHLVLVLVLVLGPVLVLVHHH-COOH	Hofmann et al., 2004
LV12GP-K	NH ₂ -KKKLVLVLGPVLVLVKKK-COOH	Hofmann et al., 2004
LVL	NH ₂ -HHHLLLLLLLLLLLLLHHH-COOH	Hofmann et al., 2004
LVV	NH ₂ -HHHVVVVVVVVVVVVHHH-COOH	Hofmann et al., 2004
LVH	NH ₂ -HHHHHHHHHHH-COOH	

Tabelle 4.8: Übersicht der verwendeten LV-Peptide. Die Kernsequenz der fusogenen LV-Peptide besteht in einer alternierenden Folge von Leucin und Valin, die in der Mitte durch ein Glycin-Prolin-Paar unterbrochen wird. Flankiert werden die pH abhängig fusogenen Peptide durch 3 Histidine. Die mit Lysin flankierten Peptide sind pH unabhängig fusogen. Die Oligo-Valin bzw. Oligo-Leucin Formen dienen ebenso wie das aus Histidinen bestehende Peptid als Kontrollen.

4.5.2 Herstellung fusogener Liposomen

Die für Transfektionen potentiell geeigneten, fusogenen Liposomen können zwei Strukturen aufweisen (small unilamellar vesicles (SUV) und multilamellare Strukturen (MLV) [siehe Kapitel 2]). Um für den Gentransfer geeignet zu sein mussten folgende Eigenschaften erfüllt sein:

- durch die Peptide vermittelte, erhöhte Fusogenität
- Fähigkeit zur Bindung von DNA
- Eignung für die Transfektion

4.5.2.1 Inkorporation fusogener Peptide in Liposomen (SUV)

Aus den Lipiden Dotap und Dope wurden Liposomen erzeugt, die pH-abhängig fusogene Peptide (LV12GP, LV16GP, LV20GP) enthalten. Dabei musste das Peptid in die doppelschichtige Lipidhülle transmembran eingebaut werden. Um das für diesen Einbau ideale Peptid zu bestimmen, wurden verschiedene Längen getestet. Die Herstellungen erfolgte durch die Lipidfilmmethode (siehe Kapitel 3). Dabei wurden die Lipide mit der entsprechenden Menge an Peptidlösung vermischt und unter Stickstofftrocknung ein Lipidfilm hergestellt. Nach

Hydratisierung bildeten sich zunächst multilamellare Liposomen, die zur Herstellung von unilamellaren Liposomen mit Ultraschall behandelt wurden (siehe Kapitel 3). Mittels eines Fusionstests (siehe Kapitel 3) wurde dann die Fusogenität der hergestellten Liposomen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Einbau der Peptide die Fusogenität bei einem pH von 4,5 der Dotap/Dope Liposomen deutlich erhöht. So erreichte das Peptid LV12GP nach einer Stunde eine Rate von 38 % und somit eine Steigerung von Faktor 2 verglichen mit der Kontrolle ohne Peptid (siehe Abbildung 4.31), bei der auf Grund der fusogenen Eigenschaften des Helferlipides Dope auch Fusionsereignisse zu beobachten sind. Allerdings sind diese pH unabhängig und deshalb für die Transfektion nicht ideal, da man eine möglichst späte Freisetzung aus den Endosomen fördern will (siehe Kapitel 2).

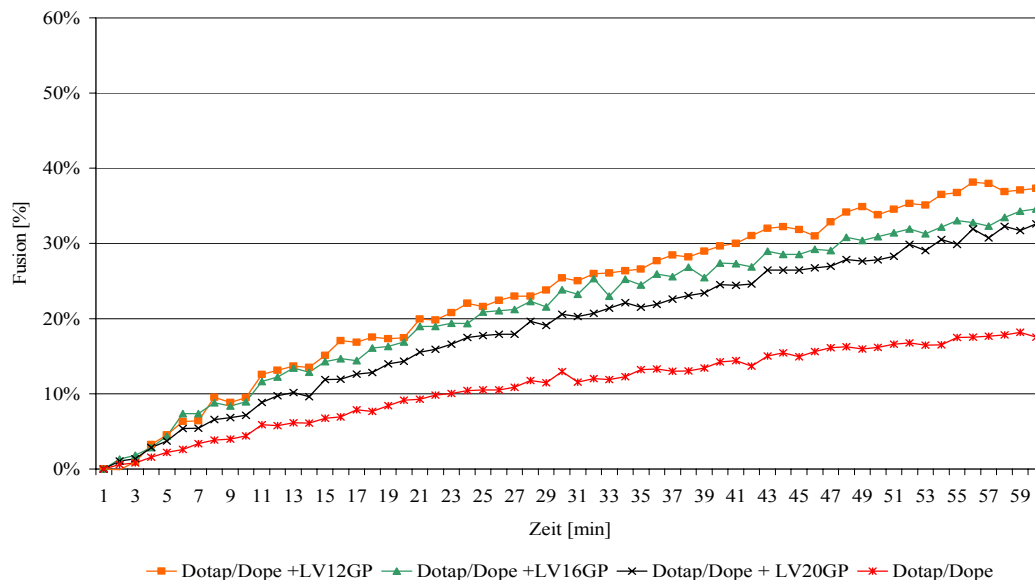


Abb. 4.30: Bestimmung der Fusogenität von Liposomen aus Dotap/Dope mit transmembranen LV-Peptiden.

Es wurden Liposomen aus den Lipiden Dotap und Dope hergestellt, in die unterschiedliche fusogene Peptide eingebaut wurden. Diese Liposomen wurden in Fusionsversuchen bei pH 4,5 mit fluoreszenzmarkierten Liposomen gemischt, so dass sich Fusionsereignisse durch einen FRET (siehe Kapitel 3) messen lassen. Dargestellt ist die erfolgte Fusion. Der 100%-Wert entspricht der vollständigen Lyse mittels Triton-X100.

Die ebenfalls getesteten längeren Varianten des Peptides (LV16GP, LV20GP) erhöhen die Fusogenität der Liposomen bei pH 4,5 ebenfalls. Die Effizienz der Verschmelzung sinkt dabei mit zunehmender Länge der Peptide leicht ab. So beträgt die Fusionsrate bei LV16GP knapp 35% und ist somit um 3% geringer als die durch LV12GP erzielte. Um weitere 2% fällt die Rate bei

dem Peptid LV20GP (siehe Abbildung 4.30). In allen Fällen ist die Fusion durch die Verwendung der fusogenen Peptide auch bei Liposomen, die aus Dotap und Dope bestehen erleichtert worden. Dieser Effekt ist pH-abhängig. So war keine Steigerung bei neutralem pH zu messen (Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass die Peptide auch bei den für Transfektionen etablierten Lipiden wirksam sind. Für eine erfolgreiche Transfektion ist es essentiell, dass die Liposomen DNA binden können. Um das zu überprüfen, wurden die hergestellten fusogenen Liposomen mit Plasmid-DNA für 15 min inkubiert. Zur Überprüfung der Bindung von Liposomen und DNA wurde der PicoGreenAssay angewendet (siehe Kapitel 3).

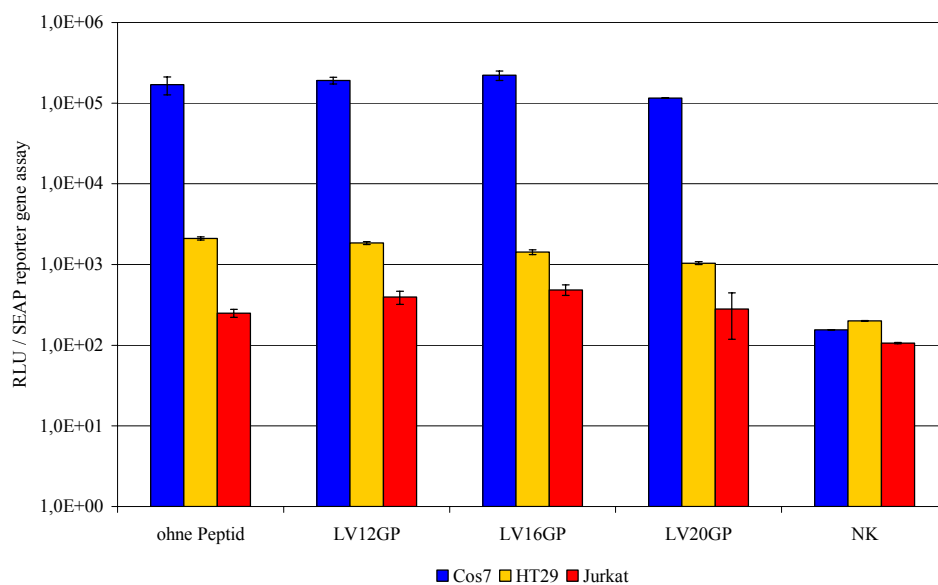


Abb. 4.31: Ergebnis der Transfektion mit fusogenen Liposomen. 1×10^4 (Cos7) bzw. 3×10^4 (HT29) wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. 3×10^4 Jurkatzellen wurden am Tag der Transfektion eingesät. Zur Transfektion wurden fusogene Liposomen mit eingebauten LV-Peptiden erstellt und zur Komplexierung der DNA verwendet. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Die hergestellten fusogenen Liposomen waren unabhängig vom eingebauten Peptid in der Lage, DNA zu binden. Bei allen Liposomen war die Fluoreszenz erst nach Zugabe von Triton X-100 messbar. Somit wird die DNA durch die Liposomen unabhängig eines eingebauten Peptides kompakt gebunden. Da Triton die Liposomenstruktur zerstört und die DNA somit wieder ungebunden vorlag, war die Fluoreszenz messbar. Damit wurden erstmals Liposomen aus kationischen Lipiden und fusogenen LV-Peptiden hergestellt, die eine erhöhte Fusogenität

aufwiesen und DNA binden konnten. Die Voraussetzungen für eine Verbesserung der Transfektion waren somit erfüllt, so dass im nächsten Schritt Transfektionen durchgeführt und die Transfektionseffizienz bestimmt werden konnte. Die Versuche mit GFP als Reportergen ergaben, dass die Transfektionsrate durch den Einsatz der Peptide nicht erhöht werden konnte. So wurde unabhängig vom eingebauten fusogenen Peptid die Anzahl der transfizierten Zellen nicht verändert. Die Bestimmung der SEAP-Expression bestätigte das Resultat. Unabhängig des Peptides erreichten die fusogenen Liposomen keine signifikante Steigerung der Expression. Dies war bei allen getesteten Liposomen der Fall (siehe Abbildung 5.31).

4.5.2.2 Hemifusion

Da die hergestellten fusogenen Liposomen zwar eine erhöhte Fusogenität offenbarten, aber keine Verbesserung der Transfektionseffizienz erreichten, sollte versucht werden, die fusogenen Peptide in multilamellaren Lipoplexe zu integrieren und sich den Effekt der Hemifusion zu Nutze zu machen. Dabei handelt es sich um einen Zwischenschritt der Fusion, bei der nur die äußeren Membranen fusionieren.

Einfluss der verschiedenen Peptidvarianten

Um die für die Transfektion am besten geeigneten Lipide zu bestimmen, wurden die LV-Peptide mit unterschiedlicher Länge getestet. Als Kontrollen für eine sequenzspezifische Verbesserung dienten ein nur aus Leucinen bestehendes Peptid und eine Version, bei der alle Leucine durch Valine ersetzt wurden. Zusätzlich wurde noch ein Histidinoligomer getestet, um einen Einfluss durch die Pufferung der Endosomen auszuschließen, der durch die in den Peptiden enthaltenen Histidine entsteht. Es wurden ferner verschiedene Protokolle getestet, um eine optimale Wirkungsweise erzielen zu können. Als Lipid wurde eine 1:1 Mischung von Dotap und Dope verwendet. Die Ergebnisse hingen von den verwendeten Zellen und dem genutzten Peptid ab. So konnte die Transfektionseffizienz mittels der Peptide LV12GP und LV16GP bei Cos7- Zellen um Faktor 4 und bei HT29-Zellen um Faktor 2-3 gesteigert werden (siehe Abbildungen 4.32 und 4.33). Diese Erhöhung nimmt mit zunehmender Konzentration der LV-Peptide zu.

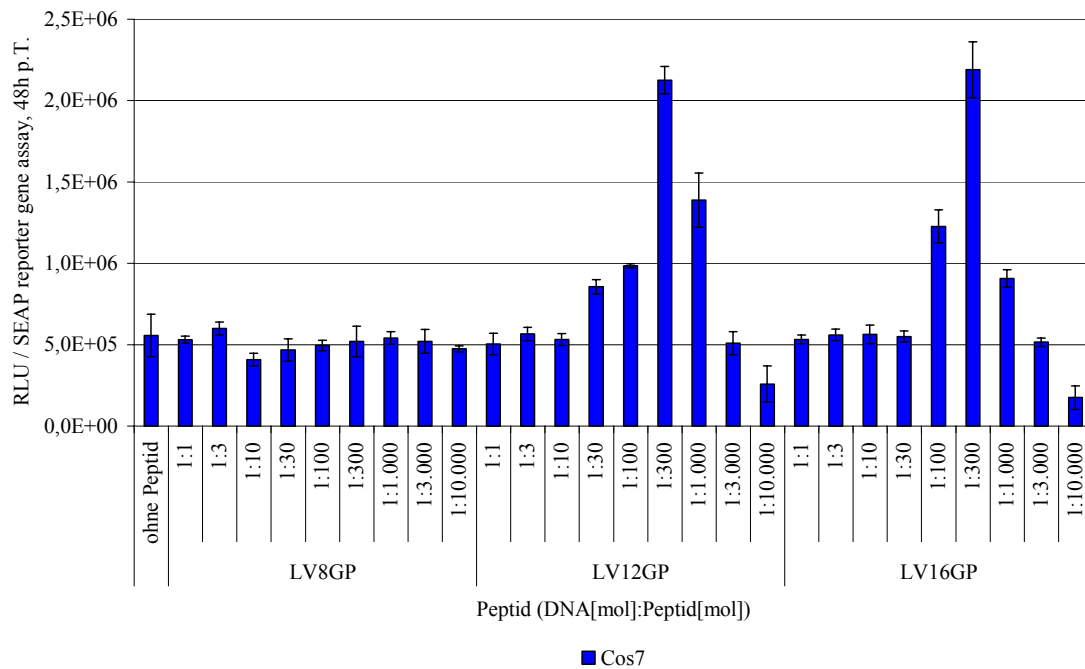


Abb. 4.32: Ergebnis der Transfektion mit fusogenen LV-Peptiden und Dotap/Dope. 1×10^4 Cos7 wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Als Optimal erwies sich ein molares Verhältnis von Lipid zu Peptid von etwa 1:50. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von DNA zu Peptid von 1:300. DNA und Lipid wurden wie oben beschrieben 1:15.000 eingesetzt. Eine noch höhere Konzentration der fusogenen Peptide führte zu einer deutlichen Reduktion der Transfektionseffizienz um Faktor 20.

Bei Jurkatzellen konnte die erzielte Verbesserung nicht genau quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ursächlich dafür ist die äußerst geringe Transgenexpression, die nur minimal über dem Hintergrund liegt. Dadurch kommt es innerhalb eines Versuches oft zu unterschiedlichen Ergebnissen, wenn beispielsweise ein Ansatz keine Transgenexpression zeigt, wohingegen ein anderer eine Verbesserung um Faktor 10 erreicht. Dies ist leider ein Problem der Jurkatzellen, da die Transfektionsrate sowie die Expression nahe der Nachweisgrenze liegen. Deshalb ist eine seriöse Quantifizierung des erzielten Effektes bei Jurkatzellen generell sehr schwierig.

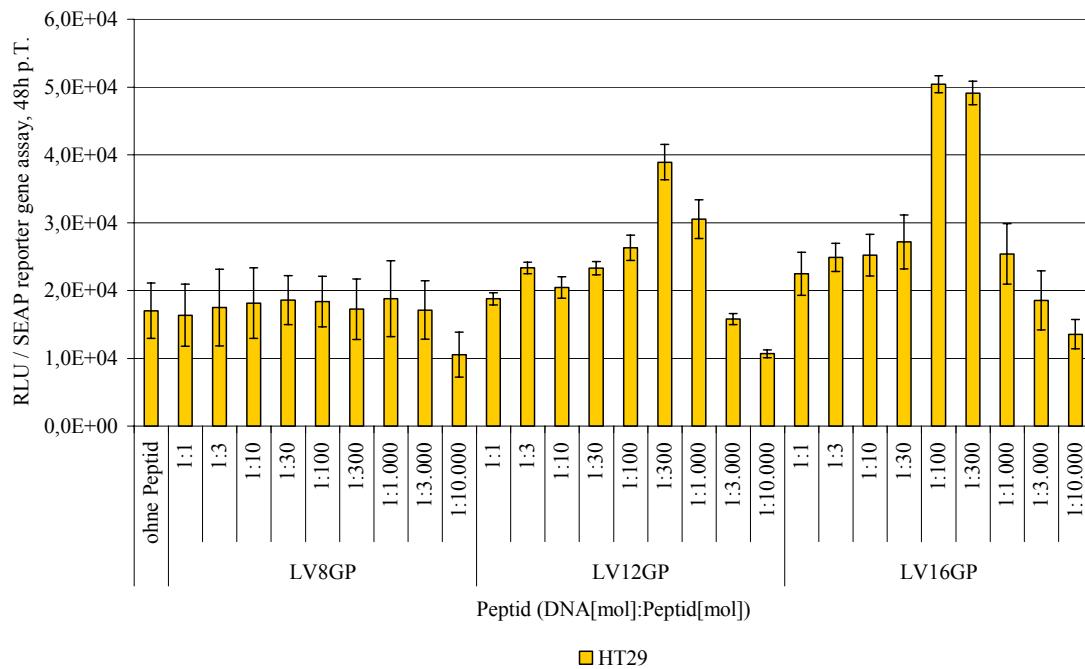


Abb. 4.33: Ergebnis der Transfektion mit fusogenen LV-Peptiden und Dotap/Dope. 3×10^4 HT29 wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Die durch die LV-Peptide erreichte Verbesserung war sequenzabhängig. So zeigten die Kontrollpeptide Steigerung der Transfektionseffizienz (siehe Abbildung 4.34). Es wurden Peptide getestet, die nur aus Leucinen, nur aus Valinen bestanden. Lediglich bei den Peptiden aus Leucinen war eine geringe Steigerung der Transgenexpression um Faktor 1,5 zu beobachten. Diese ist möglicherweise in der durch die Peptide bedingten veränderten Struktur der Lipoplexe zu begründen. Um einen Effekt durch die Pufferung des endosomalen pH durch die Histidine ausschließen zu können, wurden auch Peptide die nur aus Histidinen bestehen bei der Transfektion getestet. Auch mit diesen Peptiden war keine Steigerung der Transfektionseffizienz beobachtet worden. Die Bedeutung der pH abhängigen Fusion konnte durch Versuche mit pH unabhängig fusogenen LV-Peptiden, die mit Lysinen statt Histidinen flankiert waren, gezeigt werden, da keine signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz durch die mit Lysin flankierten Peptide zu erreichen war (siehe Abbildung 4.35).

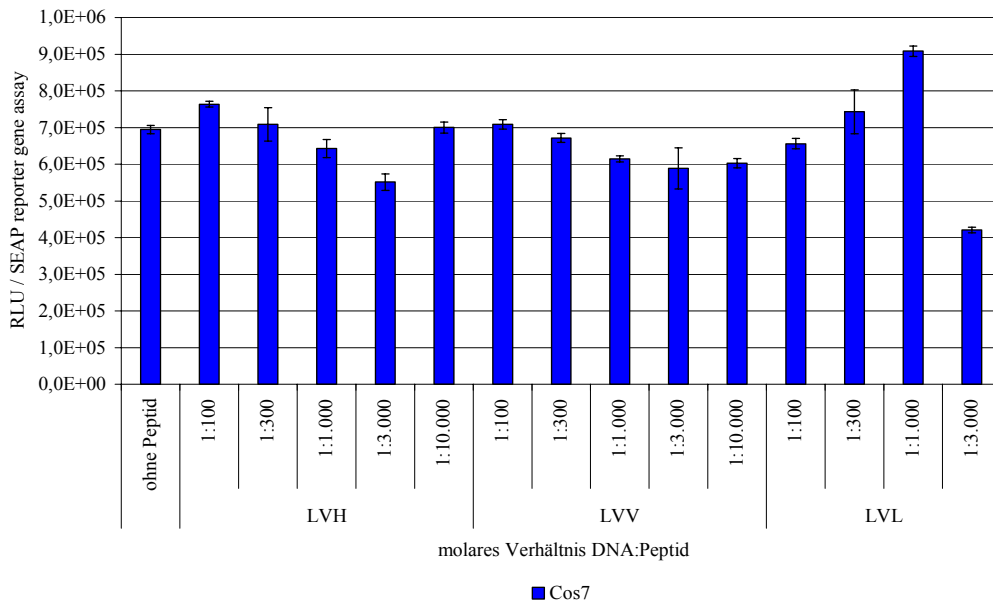


Abb. 4.34: Ergebnis der Transfektion mit LV-Kontrollpeptiden und Dotap/Dope. 1×10^4 Cos7 wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

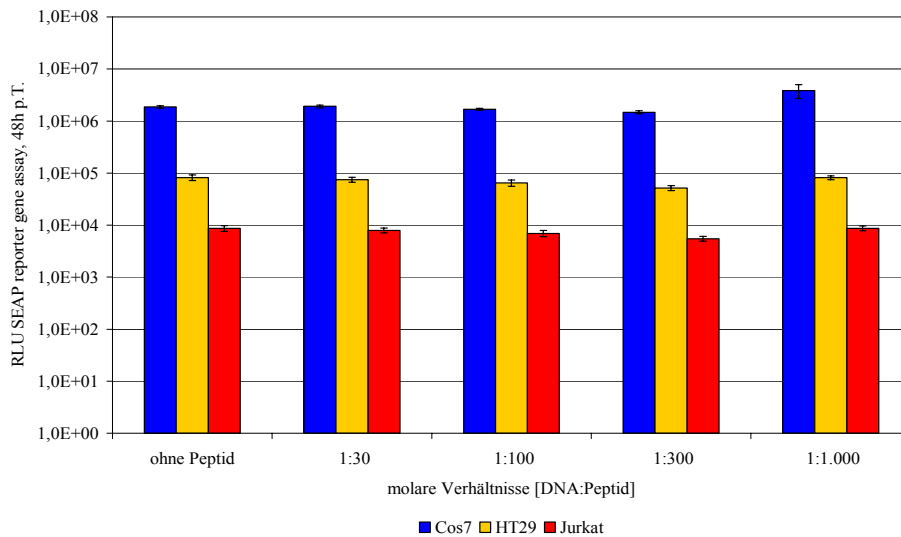


Abb. 4.35: Ergebnis der Transfektion mit dem pH unabhängig fusogenen Peptid LV12GP-K und Dotap/Dope. 1×10^4 (Cos7) bzw. 3×10^4 (HT29) wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. 3×10^4 Jurkatzellen wurden am Tag der Transfektion eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der SEAP durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Da die Endosomen während ihrer Reifung ins Zellinnere transportiert werden (Alberts, 1995) führt eine möglichst späte Freisetzung aus den Endosomen zu einer kernnahen Verfügbarkeit der DNA im Zytoplasma. Dadurch kann die DNA einfacher in den Kern transportiert werden bzw. während der Mitose in den Kern gelangen. Dies wird nur durch Peptide erreicht, die eine pH abhängige Fusogenität aufweisen. Die bei der Transfektion mit Dotap/Dope erzielten Fortschritte durch die Verwendung der fusogenen LV-Peptide, sollten hinsichtlich Ihrer Übertragbarkeit auf andere Liposomenzusammensetzungen überprüft werden. Hierzu wurden Cos7-, HT29- und Jurkatzellen mit verschiedenen Lipiden transfiziert. Zur Anwendung kamen Dotap sowie Dotap/Chol. Zusätzlich wurden die Lipide Dotap und Dope in verschiedenen Verhältnissen zueinander und zur DNA getestet.

Die Transfektionen mit Dotap/Chol als Lipiden ergaben, dass die erzielte Verbesserung durch die fusogenen Peptide deutlich geringer ist, als bei der Nutzung von Dotap/Dope. So konnte bei Cos7-Zellen lediglich eine Steigerung um Faktor 2 durch das fusogene Peptid LV12GP festgestellt werden. Die längeren und kürzeren Varianten der LV-Peptide führten zu keinem Anstieg der Transfektionseffizienz. Der Effekt war zudem auf die Cos7-Zelle beschränkt. Der Gentransfer konnte weder bei HT29, noch bei Jurkat durch die Peptide erhöht werden (siehe Tabelle 4.9). Bei den Versuchen mit Dotap als Lipid war keine Verbesserung der Transfektion durch die LV-Peptide zu beobachten. Dabei war es unerheblich, welches Peptid genutzt oder welche Zelle transfiziert wurde. Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise eine ungenügende Bindung von Lipiden mit dem Peptid. Da die LV-Peptide durch die flankierenden Histidine leicht positiv geladen sind, ist eine Bindung mit dem kationischen Lipid Dotap möglicherweise erschwert. Ist in den Liposomen noch ein neutrales Helferlipid wie Dope enthalten kann eine Bindung stattfinden. Bei der Verwendung von Dotap/Dope als Liposomen erlangten die fusogenen Peptide den größten Effekt. Sie verbesserten die Transfektion bis zu Faktor 4 bei Jurkat, Cos7 und HT29. Dabei stellte sich das anfänglich genutzte Verhältnis zwischen Dotap und Dope von 1:1 als am besten geeignet heraus. Ein Abweichen davon führte zu keiner Verbesserung der Transfektionseffizienz. Erhöht man den Anteil des Helferlipides Dope wird der Gentransfer bei Cos7 stark inhibiert. HT29- und Jurkatzellen konnten bei dem Verhältnis von 1:3 (Dotap:Dope) überhaupt nicht mehr transfiziert werden. Eine Erklärung ist die mangelnde Bindefähigkeit der dann relativ neutralen Liposomen mit der negativ geladenen DNA. Eine Steigerung des Dotap Anteils auf ein Verhältnis von 3:1 (Dotap:Dope) reduzierte bei allen getesteten Zellen die Transfektionseffizienz ebenfalls (Daten nicht gezeigt).

Lipid	Zelle	LV8GP	LV12GP	LV16GP	LV20GP
Dotap	Cos7	0	0	0	0
	HT29	0	0	0	0
	Jurkat	0	0	0	0
Dotap/Dope	Cos7	0	4	5	2
	HT29	0	2	3	1,5
	Jurkat	0	5	5	2
Dotap/Chol	Cos7	0	2	2	0
	HT29	0	2	2	0
	Jurkat	0	2	2	0

Tabelle 4.9: Wirkungen der pH abhängig fusogenen LV-Peptiden auf die Transfektion. Die dargestellten Werte sind die Faktoren der erzielten Verbesserung. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Verbesserung der Transfektion durch die Verwendung der LV-Peptide ist bei einem niedrigen Verhältnis von DNA zu Lipid, d.h.: einer geringeren Menge an kationischen Lipiden noch größer. Setzt man nur ein Drittel der optimalen Lipidmenge von Dotap, Dotap/Dope oder Dotap/Chol ein, so reduziert sich die Transfektionseffizienz beispielsweise bei Cos7-Zellen um Faktor 20. Durch Zusatz der Peptide lässt sich der Gentransfer dann wieder um Faktor 10-20 steigern und erreicht somit fast die gleiche Transfektionseffizienz wie bei idealen Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die gesteigerte Fusogenität der Transfektionskomplexe in Folge der eingesetzten Peptide eine geringere Menge an Lipiden benötigt wird, um eine Freisetzung aus den Endosomen zu erreichen. Diese wird sonst durch die Lipide selbst vermittelt (siehe Kapitel 2).

4.5.3 Zusammenfassung

Die pH-abhängig fusogenen LV-Peptide wurden zum ersten Mal bei Transfektionen eingesetzt. Sie erreichen eine Verbesserung der Transfektionseffizienz bei allen Zelllinien. Somit ist eine Verbesserung realisiert worden, die die Transfektionseffizienz generell erhöht. Bei den Versuchen konnten Steigerungen der Transfektionseffizienz bis Faktor 5 erzielt werden. Die Erhöhung hing vom verwendeten Lipid, sowie der Zelle ab. So konnte bei der Nutzung von Dotap ohne Helferlipid keine Verbesserung erreicht werden. Gleiches gilt für Liposomen

bestehend aus Dotap und Cholesterin. Auch hier konnte kein positiver Effekt durch Zusatz der Peptide bestimmt werden. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Mischung von Dotap und Dope je nach Peptid eine Verbesserung bis Faktor 5 erreicht. Als die am besten geeigneten Peptide erwiesen sich LV12GP und LV16GP. Die kürzere sowie die längere Variante (LV8GP bzw. LV20GP) konnten die Transfektionseffizienz nicht steigern. Die erzielte Verbesserung ist sequenzspezifisch, wie die Versuche mit den Kontrollpeptiden belegten. Die gesteigerte Transfektionseffizienz ist auf Fusionen zwischen den Lipsomen und der endosomalen Membran zurückzuführen, wie der Fusionsassay zeigen konnte. Diese gezeigte Steigerung bis Faktor 5 bezieht sich auf Versuche unter optimalen Transfektionsbedingungen. Wurden bei den Versuchen weniger Lipide eingesetzt, konnte eine Steigerungsrate von bis zu Faktor 20 erzielt werden. Zwar war die dann erreichte Transfektionseffizienz nicht höher, als die bei optimalen Transfektionsbedingungen, aber die Nutzung der LV-Peptide ermöglicht somit den Einsatz einer geringeren Menge an Lipiden. Dies ist von Vorteil, da kationische Lipide für die Zellen zytotoxisch sind und eine geringere Menge an Lipiden zu einer geringeren Toxizität führt (u.a.: Nguyen et al. 2007). Dies ist besonders für Anwendungen mit langen Inkubationen oder bei der Transfektion empfindlicher Zelllinien von Bedeutung.

4.6 Kombination von fusogenen Peptiden mit NLS-Peptiden

Die Ergebnisse des Genetracking zeigten, dass eine Hürde der Transfektion der Transport der DNA in den Zellkern ist. Durch die Verwendung von NLS-Peptiden (siehe Kapitel 4.4) konnte die Transfektionseffizienz je nach Zelltyp und Lipid bis Faktor 3 verbessert werden. Allerdings war diese Verbesserung in Anbetracht der Versuche zum Genetracking geringer als erwartet. Vor allem bei Jurkat- und HT29-Zellen war der Transport der transfizierten DNA in den Kern ein äußerst ineffizienter Schritt, wie die bestimmten Kerntransportraten zeigten (siehe Kapitel 4.2).

Der Transport der aufgenommenen DNA in den Kern besteht aus zwei Schritten. Zunächst muss die endozytotisch aufgenommene DNA aus den Endosomen in das Zytoplasma der Zellen freigesetzt werden (siehe Kapitel 2.3). Danach muss die DNA in den Kern gelangen. Dies kann entweder durch zufälligen Einschluss während der Mitose geschehen, oder die DNA wird aktiv, durch NLS-Peptide vermittelt, durch die Kernporen in den Kern transportiert (siehe Kapitel 2.3).

Die NLS-Peptide unterstützen lediglich den zweiten Schritt des Kerntransportes und können ihre Wirkung nur bei aus den Endosomen freigesetzter DNA entfalten, d.h.: dass die Wirkung des NLS-Peptides und somit der verbesserte Transport in den Kern nur möglich ist, wenn sich die DNA frei im Zytoplasma der Zelle befindet. So lang sich die Plasmide in den Endosomen befinden, kann der Kerntransport nicht unterstützt werden. Deshalb spielt eine verbesserte Freisetzung aus den Endosomen für die Funktion der NLS-Peptide und somit der Verbesserung der Transfektionseffizienz eine entscheidende Rolle. Die Freisetzung aus den Endosomen kann durch die fusogenen LV-Peptide vermittelt werden.

Daher sollte die Kombination von NLS-Peptiden und fusogenen Peptiden zu einer verbesserten Freisetzung der DNA aus den Endosomen führen und gleichzeitig einen effizienten Transport der DNA in den Kern ermöglichen.

4.6.1 Struktur der Komplexe für eine Kombination

Um die Wirkung beider Peptide optimal zu nutzen, mussten Transfektionskomplexe erzeugt werden, die die Funktion beider Komponenten sicherstellen. Die intrazellulären Abläufe beim Gentransfer erfordern zunächst die unterstützende Wirkung der pH abhängig fusogenen Peptide, um die Freisetzung der DNA aus den Endosomen zu erleichtern. Sobald die DNA frei im Zytoplasma der Zellen vorliegt, beschleunigen die NLS-Peptide deren Transport in den Zellkern. Demnach erschien es zielführend, das NLS-Peptid an die DNA zu koppeln und die LV-Peptide mit den Lipiden zu kombinieren. Zur Herstellung der Transfektionskomplexe wurde zunächst die DNA mit den NLS-Peptiden für 20min bei RT in Wasser vorkomplexiert (siehe Kapitel 3). Die LV-Peptide wurden zu der Lipidlösung gegeben und für 5min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der vorkomplexierten DNA zu den Liposomen. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden die Transfektionskomplexe zu den Zellen gegeben und die Transfektionseffizienz nach 48 Stunden bestimmt. Bei den Versuchen zur Verbesserung des Kerntransportes erwies sich das tetramere NLS-Peptid SV4 als am besten geeignet (siehe Kapitel 4.4). Die Peptide LV12GP und LV16GP unterstützten die Freisetzung aus den Endosomen optimal (siehe Kapitel 4.5). Deshalb wurden auch zunächst mit diesen Peptiden die Versuche durchgeführt. Als Liposomen wurde eine 1:1-Mischung von Dotap und Dope genutzt. Bei den Versuchen zur Wirkung der NLS- bzw. LV-Peptide wurden die optimalen Verhältnisse von DNA, Lipiden und Peptiden bestimmt. Da

diese nicht zwangsläufig auch bei der Kombination beider Peptide optimal sein müssen, wurden, ausgehend von den bei den vorherigen Versuchen (siehe Kapitel 4.3 bzw. 4.4) ermittelten idealen Konzentrationen, verschiedenen Mengen an Peptiden eingesetzt, um die optimalen Verhältnisse zu ermitteln. Die Transfektionseffizienz von Cos7-Zellen konnte durch die Kombination beider Peptide die um Faktor 10 gesteigert werden (siehe Abbildung 4.36).

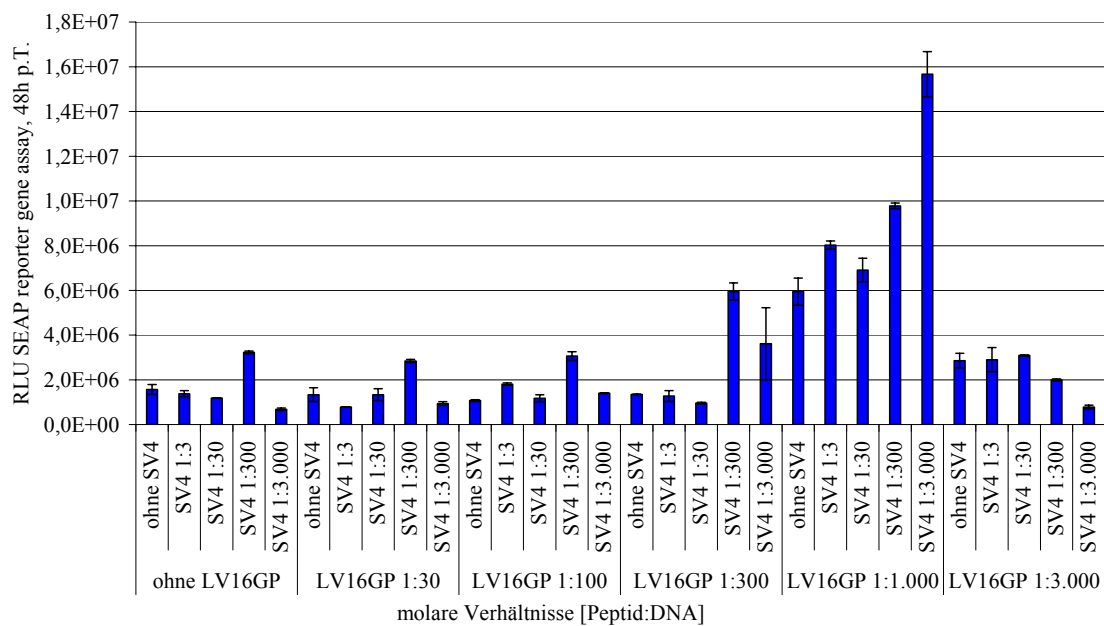


Abb. 4.36: Ergebnis der Transfektion mit dem pH abhängig fusogenen Peptid LV16GP, dem NLS-Peptid SV4 und Dotap/Dope. 1×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng eines SEAP codierenden Plasmides mit unterschiedlichen Mengen des Peptids SV4 vorkomplexierter DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die Aktivität der SEAP wurde 48h nach Transfektion durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Dabei war ein synergistischer Effekt beider Peptide zu beobachten, da die jeweiligen Einzelverbesserungen multiplikatorisch zusammenwirken. So erreichte das NLS-Peptid allein ein Verbesserung von Faktor 2-3 und das LV-Peptid eine Steigerung um das 4-fache. Die Gesamtverbesserung von Faktor 10 entspricht somit dem Produkt beider Faktoren. Die LV-Peptide zeigten ab einer molaren Konzentration von 1:300 (DNA:Peptid) einen Effekt. Bei dieser Konzentration wird die durch die NLS-Peptide gesteigerte Transfektionseffizienz nochmals erhöht. Bei konstanter Konzentration der LV-Peptide führte eine steigende Menge an NLS-Peptiden zu einer weiteren Erhöhung der Transgenexpression. Dabei zeigte sich, dass die ideale

Konzentration von SV4 von 1:300 auf 1:1000 Moleküle pro Plasmid stieg. Als ideale Kombination bei der Transfektion von Cos7-Zellen erwies sich eine Konzentration von 1000 LV-Peptiden und 3000 NLS-Peptiden pro Plasmid. Höhere und niedrigere Konzentration führten zu einer Reduktion der SEAP-Expression (siehe Abbildung 4.36).

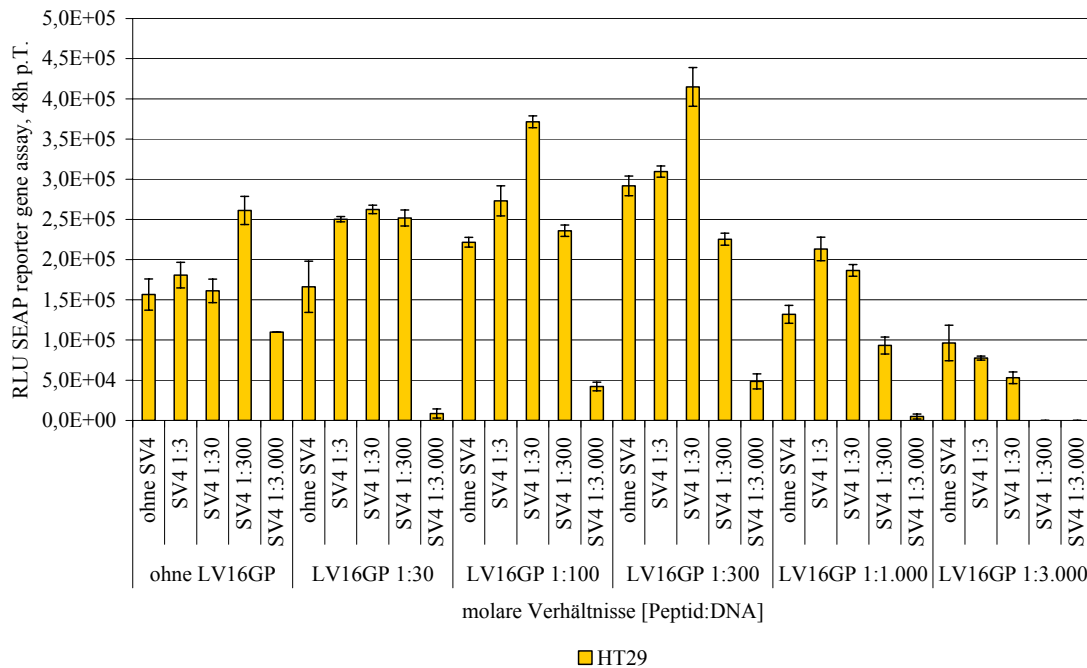


Abb. 4.37: Ergebnis der Transfektion mit dem pH abhängig fusogenen Peptid LV16GP, dem NLS-Peptid SV4 und Dotap/Dope. 3×10^4 HT29-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150µl Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng eines SEAP codierenden Plasmides mit unterschiedlichen Mengen des Peptids SV4 vorkomplexierter DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die Aktivität der SEAP wurde durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Auch bei der Transfektion von HT29-Zellen verbesserte die Kombination von pH abhängig fusogenen mit Kerntargeting-Peptiden die Effizienz des Gentransfers. Allerdings war die erreichte Steigerung geringer als bei Cos7-Zellen. So wurde eine Verbesserung von Faktor 3 erreicht und somit die Einzelverbesserung der Peptide von jeweils Faktor 2 nur geringfügig verbessert. Auffällig war zudem, dass sowohl bei den fusogenen LV-Peptiden, als auch beim NLS-Peptid die ideale Konzentration mit 1:300 bzw. 1:30 deutlich geringer war. Größere

Konzentrationen verringerten besonders im Falle des NLS-Peptides die Transfektionseffizienz bis zu Faktor 100 und inhibierten die Transfektion fast vollständig (siehe Abbildung 4.37).

Ähnliche Resultate wurden bei der Transfektion von Jurkatzellen gewonnen. Auch hier war eine Steigerung der Transgenexpression um Faktor 5 möglich und analog zu den HT29-Zellen fiel die durch die Kombination beider Peptide realisierte Optimierung des Gentransfers geringer als bei Cos7 Zellen aus. Schon die Anwendung des fusogenen Peptides allein vervierfachte die Transgenexpression, so dass die erzielte Verbesserung von Faktor 6 zwar deutlich, aber geringer als bei Cos7 war. Analog zur Transfektion von HT29-Zellen war zu beobachten, dass vor allem die Konzentration des NLS-Peptids verringert werden musste. Eine hohe Konzentrationen von 1:1000 war bei alleiniger Anwendungen von NLS-Peptiden problemlos möglich, führte aber bei der Kombination mit den fusogenen LV-Peptiden zur vollständigen Hemmung des Gentransfers (siehe Abbildung 4.38).

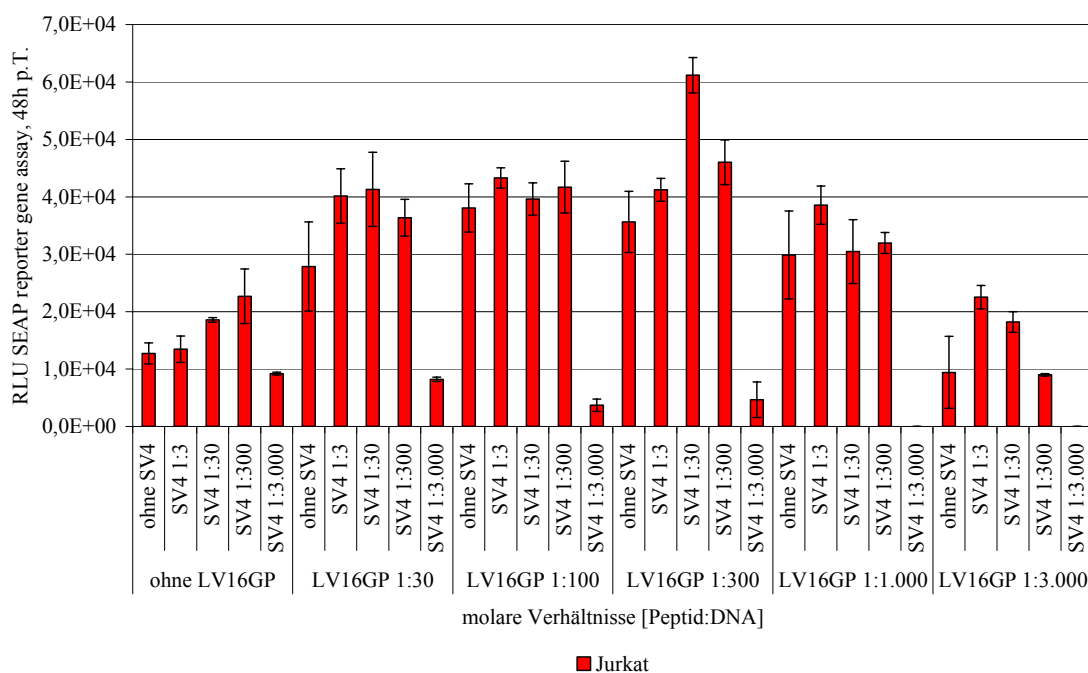


Abb. 4.38: Ergebnis der Transfektion mit dem pH abhängig fusogenen Peptid LV16GP, dem NLS-Peptid SV4 und Dotap/Dope. 3×10^4 Zellen wurden am Tag der Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng eines SEAP codierenden Plasmides mit unterschiedlichen Mengen des Peptids SV4 vorkomplexierter DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die Aktivität der SEAP wurde durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

Neben der Transgenexpression wurde auch die Transfektionsrate bestimmt. Die Kombination beider Peptide führte zu einer geringen Erhöhung der Anzahl transfizierter Zellen. Bei Cos7-Zellen stieg die Transfektionsrate um etwa 20%, und bei HT29 um 5%. Bei Jurkatzellen konnte keine Veränderung der Zahl GFP exprimierender Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 4.39). Dies und die relativ geringe Steigerung bei Cos7-Zellen zeigten, dass der durch die beiden Peptide erzielte Effekt überwiegend auf intrazelluläre Verbesserungen zurück zu führen war. Verdeutlicht werden konnte dies bei der Betrachtung der SEAP-Expression pro transfizierter Zelle (siehe Abbildung 4.40). Die Daten ergaben, dass die SEAP-Produktion pro Zelle durch die Peptide vervierfacht wurde. Somit ist eine intrazelluläre Verbesserung erreicht worden. Bei HT29 und Jurkatzellen war die Steigerung der SEAP Expression pro Zelle noch deutlicher, da sich im Gegensatz zu Cos7-Zellen die Transfektionsrate durch die Peptide nur minimal erhöht hatte.

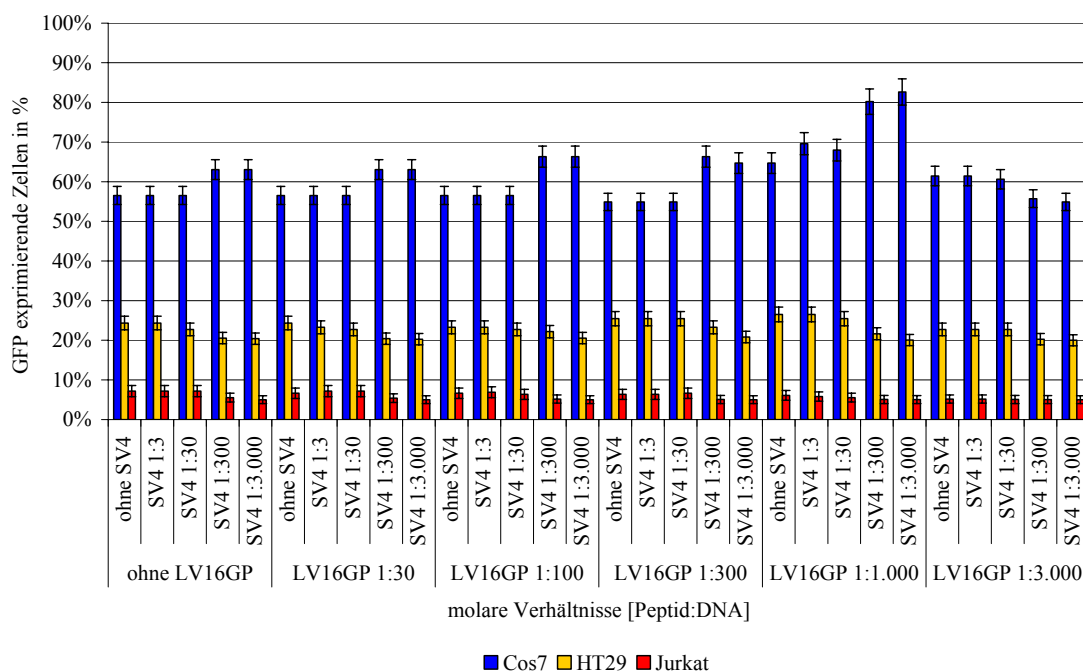


Abb. 4.39: Ergebnis der Transfektion mit dem pH abhängig fusogenen Peptid LV16GP, dem NLS-Peptid SV4 und Dotap/Dope. 1×10^4 Cos7 bzw. 3×10^4 HT29-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät 3×10^4 Jurkat-Zellen wurden am Tag der Transfektion in einem 96well in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng eines SEAP codierenden Plasmides mit unterschiedlichen Mengen des Peptids SV4 vorkomplexierter DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die Aktivität der SEAP wurde durch den SEAP reporter gene assay bestimmt (siehe Kapitel 3).

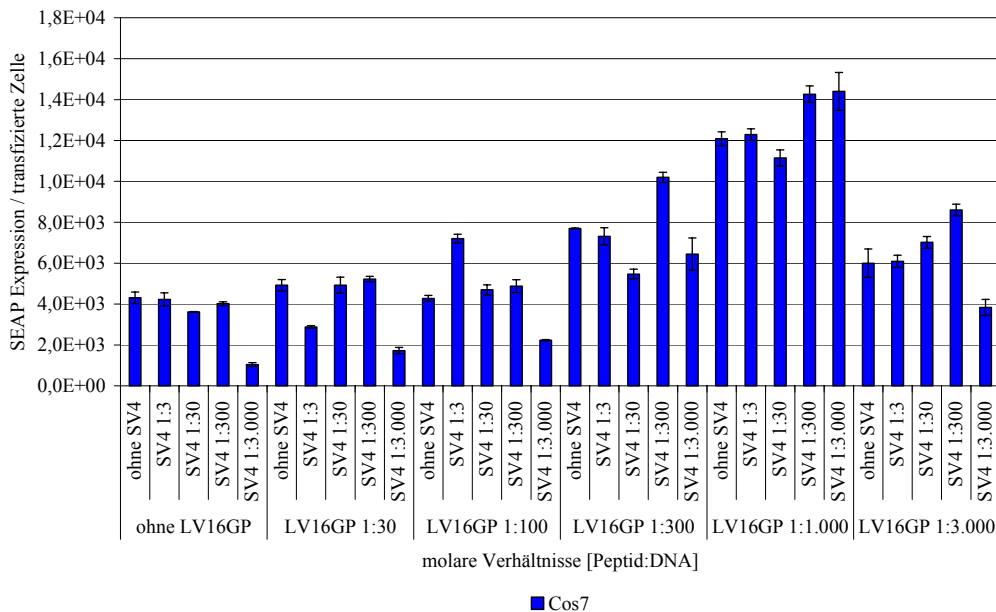


Abb. 4.40: Ergebnis der Transfektion mit dem pH abhängig fusogenen Peptid LV16GP, dem NLS-Peptid SV4 und Dotap/Dope. 1×10^4 Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einem 96well in 150 μ l Kulturmedium eingesät. Zur Transfektion wurden Liposomen aus Dotap/Dope mit verschiedenen Mengen an LV-Peptiden gemischt und für 5min inkubiert. Danach wurden 150ng eines GFP codierenden Plasmides mit unterschiedlichen Mengen des Peptids SV4 vorkomplexierter DNA zugegeben und für 15min inkubiert. Die fertigen Lipoplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die Menge der transfizierten Zellen wurden fluoressenzmikroskopisch bestimmt (siehe Kapitel 3).

4.6.2 Testen verschiedener Peptide

Die Kombination des fusogenen Peptids LV16GP und des NLS-Peptids SV4 führte zu einer weiteren Verbesserung der Transfektionseffizienz bei Cos7, HT29 und Jurkat. Es sollte nun getestet werden, ob eine Verbesserung auch mit anderen Kombinationen von fusogenen und Kerntargeting Peptiden zu erreichen ist. Hierzu wurden Versuche mit dem zyklischen NLS-Peptid (zNLS) und weiteren LV-Peptiden unter Optimalbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die ideale Kombination von der zu transfizierenden Zelle abhing. Bei der Transfektion von Cos7 Zellen erwiesen sich das fusogenen Peptid LV16GP und das NLS-Peptid SV4 als am besten geeignet. Mit ihnen wurden die höchsten Steigerungen erzielt (siehe Tabelle 4.10). Bei der Transfektion von Jurkatzellen erreichte das Peptid LV12GP eine Verbesserung um Faktor 8 und somit eine größere Steigerung als das Peptid LV16GP. Bei beiden

Zelllinien erreichte das NLS-Peptid SV4 unabhängig vom fusogenen Peptid optimale Resultate. Bei HT29 hingegen war das zyklische Kerntargeting-Peptid besser geeignet und steigerte die Transfektionseffizienz von Faktor 3 auf Faktor 4. Es war somit durch die Kombination von NLS-Peptiden mit den pH abhängig fusogenen LV-Peptiden generell eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht worden, die in allen Fällen über die der einzelnen Peptide hinausging. Diese Verbesserung war bei allen getesteten Zellen realisiert worden. Es ergab sich ein multiplikativer Effekt, der die Transgenexpression auf das 10-fache erhöhte.

Lipid	Zelle	LV12GP	LV16GP
SV4	Cos7	8	10
	HT29	3	3
	Jurkat	8	6
zNLS	Cos7	7	8
	HT29	4	4
	Jurkat	7	6

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Transfektion mit Dotap/Dope bei der Kombination verschiedener Peptide. Die dargestellten Werte sind die Faktoren der erzielten Verbesserung. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

4.6.3 Testen verschiedener Lipide

Alle bisherigen Versuche wurden mit Liposomen aus Dotap und Dope durchgeführt, da diese Lipidkombination die besten Transfektionseffizienzen ermöglichte (siehe Kapitel 4.1). Um die Wirkung der Kombination von NLS-Peptid und fusogenem LV-Peptid auch bei der Transfektion durch andere Lipide festzustellen, wurden analog zu den unter den 4.6.1 beschriebenen Versuchen Cos7, HT29 und Jurkat transfiziert und die Effizienz des Gentransfers ermittelt.

Es stellte sich heraus, dass eine Verbesserung der Transfektion mit Dotap durch Kombination beider Peptide nicht möglich war (siehe Tabelle 4.11). Dies war bei allen Zelltypen der Fall. Im Gegensatz dazu konnte die Transgenexpression von Liposomen aus Dotap und Cholesterin durch Kombination beider Peptide verbessert werden. Bei Jurkatzellen war analog zu den Lipiden Dotap und Dope eine Steigerung bis Faktor 8 möglich. Bei HT29 und Cos7-Zellen dagegen war

die erzielte Verbesserung mit Faktor 5 (Cos7) bzw. Faktor 3 (HT29) geringer als bei den Versuchen mit Dotap/Dope (siehe Tabelle 4.11). Demnach spielt die Zusammensetzung der Liposomen auch bei Kombination der Peptide eine entscheidende Rolle bei der Optimierung der Transfektionseffizienz. Nichtsdestoweniger war auch mit Liposomen aus Dotap und Cholesterin ein synergistischer Effekt durch beide Peptide zu beobachten, der in einer signifikanten Erhöhung der Transgenexpression mündete.

Lipid	Zelle	Verbesserung
Dotap	Cos7	0
	HT29	0
	Jurkat	0
Dotap / Chol	Cos7	5
	HT29	3
	Jurkat	8

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Transfektion mit Dotap und Dotap/Chol bei der Kombination von NLS (SV4) - und fusogenen (LV16GP) Peptiden. Die dargestellten Werte sind die Faktoren der erzielten Verbesserung. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

4.6.4 Zusammenfassung

Der Transport aufgenommener DNA in den Zellkern besteht aus zwei Schritten, die durch jeweilige Peptide unterstützt und verbessert werden konnten. Dazu gehört die Optimierung des Transportes der DNA in den Kern, der durch verschiedene Kerntargeting-Peptide erleichtert und die Transgenexpression gesteigert werden konnte (siehe Kapitel 4.3). Für den Eintritt der DNA in den Zellkern ist die vorherige Freisetzung aus den Endosomen essentiell (siehe Kapitel 2.3). Durch die Verwendung speziell synthetisierter pH abhängig fusogener Peptide war es möglich auch diesen Schritt gezielt zu verbessern (siehe Kapitel 4.4).

Da beide Prozesse zusammenwirken müssen, erschien eine Kombination beider Peptide durch die Herstellung geeigneter Lipoplexe sinnvoll. Die Ergebnisse der Transfektion ergaben, dass eine deutliche Verbesserung bei allen Zelllinien erreicht wurde. Dabei spielten die verwendeten Lipide und Peptide eine wichtige Rolle. Als optimal stellten sich Liposomen aus einer 1:1-

Mischung von Dotap und Dope heraus und die Kombination mit den Peptiden SV4 und LV16GP. Bei HT29-Zellen erwies sich das zyklische NLS-Peptid besser geeignet. Durch diese Lipoplexe konnte die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Zelllinie bis Faktor 10 gesteigert werden. Aber auch bei der Kombination nicht optimaler Peptide war ein multiplikativer Effekt durch beide Peptide nachweisbar.

Durch diese neu entwickelte Methode der Kombination pH abhängig fusogener Peptide mit NLS-Peptiden ist somit eine generelle Verbesserung der Transfektionseffizienz erreicht worden. Für diese Verbesserung ist vor allem eine Verbesserung der intrazellulären Vorgänge beim Transport der DNA aus den Endosomen in den Zellkern verantwortlich, wie die gesteigerte SEAP Produktion der transfizierten Zellen belegten. Diese Methode war anwendbar bei allen getesteten Zelltypen und den verschiedenen Lipiden.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung kritischer Prozesse bei der Transfektion eukaryontischer Zellen und die Verbesserung der Transfektionseffizienz. Die publizierten Arbeiten sind in der Beschreibung der problematischen und limitierenden Schritte des Gentransfers oftmals widersprüchlich. Die von den Autoren vorgeschlagenen Lösungen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen (siehe Kapitel 2.3 sowie Cartier et al., 2002; Rettig und Rice, 2007; Martin und Rice, 2007). Deshalb war es zwingend erforderlich, die für die Transfektionseffizienz entscheidenden Schritte bei der Lipofektion zu ermitteln. Um durch entsprechende Versuche aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war dabei ein ganzheitlicher Ansatz erforderlich, der verschiedene Zelltypen sowie die Verwendung unterschiedlicher Lipide und Peptide einschloss. Bei der Auswahl der Zelltypen wurde darauf geachtet, dass bei allen Versuchen Zellen verwendet wurden, die hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz unterschiedlichen Gruppen angehören (siehe Kapitel 4.1). Dies war für eine grundlegende Untersuchung der Probleme bei der Transfektion erforderlich, da es in Anbetracht der Vielzahl an Zelltypen und ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften unwahrscheinlich erscheint, die bei einem Zelltyp identifizierten Probleme auf andere Zellen übertragen zu können. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigten von Anfang an eindrucksvoll, dass Art und Auswirkung der identifizierten Probleme wie beispielsweise die schlechte Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen primär vom verwendeten Zelltyp abhängt und bestätigten die Notwendigkeit, verschiedene Zellen zu untersuchen. Viele Publikationen konzentrieren sich aber nur auf einen Zelltyp oder Zelllinien einer Gruppe (u.a.: Hagstrom et al., 1997; Escriou et al., 1997; Belting et al., 1999; Bieber et al., 2002; Almofti et al., 2002; Haberland et al., 2005; Veldhoen et al., 2006). Dadurch sind die abweichenden und oftmals widersprüchlichen Resultate unterschiedlicher Gruppen erklärbar (siehe Kapitel 2). Diese fehlende Systematik vieler Autoren betrifft auch die bei den Versuchen eingesetzten Lipide und Peptide. Oftmals wurde nur ein Lipid bzw. eine Lipidmischung verwendet (u.a.: Zabner et al., 1995; Mislick et al., 1996; Kamiya et al., 2002; Nguyen et al., 2007). Meine Ergebnisse belegen zweifelsfrei, dass nicht nur die Transfektionseffizienz von den genutzten Lipiden abhängig ist, sondern je nach Zusammensetzung der Liposomen auch die Wirkung von fusogenen und NLS-Peptiden zu abweichenden Ergebnissen führt (siehe Kapitel 4). Bei einigen Arbeiten zur Unterstützung der

Transfektion durch diverse Peptide fehlen häufig geeignete Kontrollen, die die sequenzspezifische Wirkung beweisen (u.a.: Singh et al., 1998; Ruponen et al., 1999; Zhang et al., 1999; Morris et al., 1999; Kichler et al., 2001). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die Funktion der Peptide, sondern vielmehr ihr Einfluss auf die Struktur der Transfektionskomplexe für eine eventuell gesteigerte Transfektionseffizienz ursächlich ist. Derartige Wechselwirkungen wurden beispielsweise von Cartier und Mitarbeitern bei der Untersuchung von NLS-Peptiden gezeigt und diskutiert (Cartier et al., 2002).

Ein weiterer Kritikpunkt bei einigen Publikationen ist die Verwendung nicht optimaler Bedingungen bei der Transfektion eukaryontischer Zellen. So verwendeten beispielsweise Chabaud und Mitarbeiter bei ihren Versuchen mit Lipofectamine2000 2,5 µg DNA pro well einer 24well-Platte. Damit wird die 7fache Menge der vom Hersteller (Fa. Invitrogen) als optimal empfohlenen DNA-Menge eingesetzt (Chabaud et al., 2006). Auch Zuhorn und Mitarbeiter verwendeten in ihren Versuchen mit RGD-Peptiden eine 3mal größere DNA-Menge als vom Hersteller empfohlen (Zuhorn et al. 2007). Beide Autoren geben keine Erklärung für die Verwendung dieser Bedingungen an und zeigen auch nicht, dass die von Ihnen beschriebenen Effekte beispielsweise durch RGD-Peptide auch unter idealen Bedingungen zu beobachten ist. Meine Ergebnisse zeigten kohärent, dass die Wirkung aller getesteten Peptide maßgeblich von den Bedingungen und insbesondere von der Menge des eingesetzten Lipides und der DNA abhängig war (siehe Kapitel 4.2 ff.). Die von den Autoren (s.o.) gewonnenen Resultate sind somit zumindest zweifelhaft. Die Abhängig der Transfektionseffizienz von den Versuchsbedingungen wie Zelldichte, Medium, Verhältnis von DNA zu Lipid sowie der Menge an eingesetzter DNA ist auch ursächlich für die vom Hersteller als notwendig beschriebene Optimierung dieser Parameter, um eine ideale Transfektionseffizienz zu erreichen (siehe Kapitel 2).

5.1 Identifizierung der Hürden bei der Transfektion

Die Identifizierung der bei der Transfektion eukaryontischer Zellen kritischen Schritte erfolgte in zwei Schritten. Auf Grund der unsicheren Literaturlage wurde zunächst ein umfangreiches Screening durchgeführt, um den Einfluss aller bei einer Transfektion eingesetzten Komponenten auf die Transfektionseffizienz zu bestimmen. Dabei fanden neben mehreren Zelllinien auch unterschiedliche Transfektionsmethoden, eine Vielzahl von Peptiden und verschiedene

kationische und neutrale Lipide Anwendung. Obwohl sich bereits in den ersten Versuchen ein komplexes Zusammenwirken mehrere Faktoren bezüglich der erreichten Transfektionseffizienz offenbarte (siehe Kapitel 4.2), wurde ein derart umfangreiches und systematisches Screening bisher noch nicht durchgeführt. Als nächstes wurden die intra- und extrazellulären Vorgänge der Lipofektion mittels Fluoreszenzmikroskopie genauer untersucht. Hierdurch wurden vor allem zelluläre Hemmnisse erkannt und das Ausmaß ihrer Wirkung bestimmt.

Die Ergebnisse der Transfektionen offenbarten, dass die Effizienz des Gentransfers vom Zusammenwirken aller eingesetzten Komponenten abhängig ist. Es zeigte sich ferner, dass keine generellen Aussagen über die Wirkung einzelner Komponenten möglich waren. Vielmehr war deren Wirkung vom Zusammenspiel aller Komponenten abhängig. So führte beispielsweise die Anwendung von NLS-Peptiden je nach Zelltyp zu einer Steigerung oder Senkung der Transgenexpression. Zusätzlich war die Wirkung der NLS-Peptide auch noch von der Zusammensetzung der Liposomen abhängig. Aus dem Screening ergab sich somit die Hypothese, dass je nach Zelltyp unterschiedliche Probleme existieren müssen bzw. die kritischen Schritte unterschiedlich stark die Transfektionseffizienz beeinflussen. Dies erklärt auch warum verschiedene Autoren, die sich auf eine Zelle oder eine Lipidkomposition beschränken, zu unterschiedlichen Resultaten und abweichenden Schlussfolgerungen gelangen (siehe Kapitel 2.3).

5.2 Bindung der Transfektionskomplexe an die Zellen

Ein wichtiger und essentieller Schritt zu einer genauen Lokalisierung von Lipiden, Peptiden und der transfizierten DNA war die Entwicklung einer geeigneten Waschprozedur, um alle nicht internalisierten Transfektionskomplexe effizient entfernen zu können. Als geeignete Methode erwies sich das Trypsinieren der Zellen und anschließendem Verdau der DNA mit DNaseI enthaltendem Medium. Erst dadurch waren verlässliche *gene tracking* Studien möglich. Diese Notwendigkeit kommt auch bei Analysen mittels Durchflusszytometrie zum Tragen, die von mehreren Autoren für Internalisierungsstudien verwendet wurden (u.a.: Schwarze et al., 1999; Silhol et al., 2002; Chugh et al., 2006). Jedoch zeigten Richard und Mitarbeiter sowie Lundberg und Mitarbeiter eindeutig, dass durch unzureichende Waschschrte, beispielsweise mehrmaliges Waschen mit PBS, keine annähernd exakte Identifizierung von DNA internalisierenden Zellen

möglich ist, weil nicht alle extrazellulär gebundene DNA entfernt wird, so dass falsche Ergebnisse generiert werden (Richard et al., 2002; Lundberg et al., 2002).

Bindung der Lipoplexe an die Zellen

Der erste Schritt der Lipofektion ist die Bindung der Lipoplexe an die zu transfizierende Zelle. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben eine Korrelation zwischen der Transfizierbarkeit der Zelllinien und ihrer Fähigkeit Lipoplexe zu binden. So vermochten 75%-100% der Cos7-Zellen Lipoplexe zu binden während nur etwa 10% der Jurkatzellen DNA binden konnten. Da die Lipoplexe nach Zugabe zum Zellkulturmedium auf den Boden der wells sedimentieren (u.a. Lehmann, 2003), erscheint es möglich, dass die Lipoplexe nur auf Grund des Absinkens schlecht an die frei im Medium schwimmenden Suspensionszellen binden können, da diese nicht wie adhärente Zellen am Boden der wells wachsen. Um diese These zu prüfen, wurden Jurkatzellen vor Zugabe der Transfektionskomplexe auf den Boden der Zellkulturplatten abzentrifugiert. Dadurch sollten die Jurkatzellen die Transfektionskomplexe problemlos aufnehmen können. Allerdings führte der Zentrifugationsschritt zu keiner Verbesserung der Bindung von Lipoplexen und Zellen. Folglich sind nicht alle Zelltypen in der Lage, Lipoplexe effizient zu binden. Die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen konnten durch den PicoGreenAssay bestätigt werden, die die unterschiedliche Bindefähigkeit der Zelllinien auch quantitativ belegte. Die Problematik dieses Schrittes bei der Transfektion *in vitro* ist bisher kaum von anderen Autoren beschrieben worden. Die in der Literatur publizierten Bindungsraten, d.h.: die Anzahl der Zellen, welche Lipoplexe binden, in Relation zur Gesamtzellzahl, schwanken je nach Zelltyp zwischen 70-95% (Zabner et al., 1995; Tseng et al., 1997; James und Giorgio, 2000). Somit ist die Bedeutung dieses Schrittes auch für die *in vitro* Transfektion bisher weitgehend unterschätzt worden. Beim Gentransfer *in vivo* ist die Bindung von Komplex und Zelle zwar als Problem beschrieben (Schatzlein et al., 2003; Martin und Rice, 2007; Rettig und Rice, 2007), allerdings steht bei diesen Arbeiten das so genannte targeting der gewünschten Zielzellen im Vordergrund. Hinzu kommt bei *in vivo* Applikationen das Erschwernis, dass die positive Ladung der Lipoplexe maskiert werden muss, um unkontrolliertes Aggregieren der Komplexe mit Serumbestandteilen während der Zirkulation im Blutsystem zu verhindern. Hierfür werden die Komplexe kovalent mit PEG, einem Polyether ($\text{HO}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n-\text{H}$), gekoppelt. Neben der Maskierung der positiven Ladung werden die Lipoplexe durch die so genannte PEGylierung auch

stabilisiert, besitzen außerdem eine höhere Löslichkeit und eine geringere Immunogenität (Ryan et al., 2008). Alle diese Eigenschaften sind für effiziente Anwendungen *in vivo* notwendig. Jedoch wird die durch PEG neutralisierte Oberflächenladung bei der Adhäsion der Komplexe an die Zellen auf Grund der fehlenden elektrostatischen Interaktionen (siehe Kapitel 2) problematisch, so dass die PEGylierung zu einer geringeren Transfektionseffizienz führt (Blessing et al., 2001; Malek et al., 2008). Um diesen Nachteil zu kompensieren, werden die Komplexe mit Liganden wie beispielsweise Transferrin gekoppelt, wodurch wieder eine effiziente Bindung durch die Zellen erreicht wird (Ogris et al., 1999; Ogris und Wagner 2002). Bei *in vitro* Transfektionen spielen die eben beschriebenen Besonderheiten keine Rolle. Eine Maskierung der Komplexe ist hier nicht nötig und auch nicht üblich. Eine weitere Erklärung für die unterschätzte Bedeutung der Bindung von Zelle und Lipoplexe auch bei *in vitro* Versuchen, ist sicherlich die fehlende systematische Untersuchung verschiedener Zelltypen (siehe Kapitel 2) sowie die bereits diskutierten ineffizienten Waschschrte einiger Autoren, die zu einer inkorrekten Lokalisierung transfizierter DNA führt (Richards et al., 2002; Lundberg et al., 2002).

5.3 Verbesserung der Bindung von Transfektionskomplexen und Zellen

Um die Bindung der Lipoplexe durch die Zellen zu erleichtern, wurde die DNA mit Liganden assoziiert. Dabei wurde Transferrin und die so genannten Integrin bindenden Peptide (RGD-Peptide) verwendet. Die von mir verwendeten Peptide bestanden im Falle der RGD-Peptide aus dem Bindemotiv (RGD oder RRE) und einer DNA-Bindedomände (16 Lysine). Da Cruz und Mitarbeiter setzten derartige Peptide bereits erfolgreich bei der Transfektion mit Dotap und Dotap/Chol ein (da Cruz et al., 2004). Die Peptide wurden mit der DNA vorkomplexiert und der entstandene DNA/Peptid Komplex zur Herstellung der Lipoplexe verwendet. Bei den Versuchen mit Transferrin als Ligand wurde das Protein nicht mit der DNA, sondern mit den Lipiden assoziiert (siehe Kapitel 3) Beide Methoden wurden bereits von anderen Autoren erfolgreich verwendet und führten zu einer Steigerung der Transgenexpression um Faktor 2 bis 4 (da Cruz et al., 2004; Zhong et al., 2007).

Meine Versuche ergaben, dass eine Steigerung durch Transferrin nur bei Jurkatzellen möglich war. Dies erscheint dadurch erklärbar, dass bei Jurkatzellen auf Grund der schlechten Bindung von Lipoplexen und Zellen (nur 10%) verglichen mit Cos7- und HT29-Zellen auch die größte Steigerung zu erwarten war. Bei Cos7-Zellen hingegen sind bereits bis zu 90% der Zellen auch

ohne Liganden mit DNA assoziiert. Folgerichtig würde man auch bei HT29-Zellen durch den Verwendung von Transferrin eine, wenn auch geringere, Verbesserung der Transfektionseffizienz vermuten. Dass diese nicht eintrat, könnte dadurch erklärt werden, dass die Interaktion von Transferrin mit dem Transfektionskomplex möglicherweise den intrazellulären Transport der Lipoplexe beeinflusst. Ebenso könnte eine Inhibierung der Transkription, wie sie durch alle an die DNA bindenden Lipide oder Peptide beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.2.3) den Vorteil der besseren Bindung von DNA und Zellen kompensiert haben. Da bei Jurkatzellen das Verbesserungspotential durch eine gesteigerte Bindung ungleich höher ist, fallen hier diese Nachteile weniger ins Gewicht.

Die Versuche mit den RGD-Peptiden führten zu anderen Ergebnissen und zeigten damit ein mal mehr, wie wichtig die systematische Untersuchung der einzelnen Schritte ist. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Transferrin wurde bei den RGD-Peptiden die größte Steigerung der Transfektion bei Cos7-Zellen beobachtet. Dies ist überraschend, da diese Zellen die Lipoplexe auch ohne Liganden am besten banden (siehe Kapitel 4). Dadurch sollte eine verbesserte Bindung der Lipoplexe bei Cos7-Zellen keinen großen Effekt hervorrufen. Das somit auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnis kann mit dem unterschiedlichen intrazellulären Schicksal von Transferrin und RGD-Peptiden begründet werden. Transferrin ist ein Protein, das im Blut vorkommt und hauptsächlich für die Eisenversorgung der Körperzellen verantwortlich ist (Laurell, 1951). Bindet eisenbeladenes Transferrin an einen Transferrinrezeptor, wird das Eisen über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen und in den Endosomen transportiert. Dort löst sich wegen des sauren Milieus das Fe^{3+} vom Transferrin, welches, jetzt als Apotransferrin bezeichnet, an seinen Rezeptor gebunden bleibt. Der Rezeptor/Ligand-Komplex wird zur Plasmamembran transportiert und im neutralen Milieu der extrazellulären Flüssigkeit dissoziiert das Apotransferrin wieder vom Rezeptor (Klausner et al., 1983; Dautry-Versat et al., 1983; Stoorvogel et al., 1989). Demnach muss DNA, um in das Zytoplasma zu gelangen, aus den Endosomen freigesetzt werden. Geschieht dies nicht, würde die DNA wieder aus den Zellen transportiert. Möglicherweise kompensiert also der Transport der DNA aus den Zellen die durch die verbesserte Bindung der Komplexe an die Zellen die gesteigerte Transfektionseffizienz bei Cos7- und HT29-Zellen wieder.

Im Gegensatz dazu werden die RGD-Peptide nicht nach außen transportiert. Vielmehr wandern die sie internalisierenden Endosomen in Richtung Zellinneres (Hart et al., 1999). Dadurch wird die DNA nicht aktiv nach außen transportiert und kann auch noch während und nach der Reifung

der Endosomen in das Zytoplasma entlassen werden. Damit stellt sich aber noch immer die Frage, warum durch die RGD-Peptide die größte Verbesserung bei Cos7-Zellen erzielt wurde (Faktor 7), obwohl das die Zellen sind, die die Lipoplexe ohnehin am besten binden (75%). Eine Erklärung ist, dass durch die Liganden zwar nicht mehr Zellen transfiziert werden, aber die transfizierten Zellen durch die verbesserte Bindung mehr DNA aufnehmen, wodurch die Expression des transfizierten Genes gesteigert wird. Dies war auch fluoreszenzmikroskopisch zu beobachten, da die Zellen durch die RGD-Peptide mehr DNA banden als ohne Liganden, was zu einer erhöhten Fluoreszenz bei konstanter Belichtungszeit der Kamera führte. Folgerichtig wäre die Art der Endozytose für die Wirkung der Liganden und somit die Transfektionseffizienz von großer Wichtigkeit. Die enorme Bedeutung der endozytotischen Aufnahme wurde durch eine weitere Beobachtung bestätigt. Wenn die Zellen 24 Stunden nach Zugabe der Lipoplexe der etablierten Waschprozedur unterzogen wurden, um nicht internalisierte DNA zu entfernen, führte der Einsatz der Liganden zwar zu einer gesteigerten Anzahl an Zellen mit gebundenen Lipoplexen, welche aber sehr ineffizient von den Zellen aufgenommen wurden (siehe Kapitel 4). So konnten nach Entfernen der extrazellulär gebundenen DNA nur minimal mehr Zellen mit aufgenommener DNA entdeckt werden. Vielmehr war die aufgenommene Menge an DNA geringfügig größer, was abermals durch eine intensivere Fluoreszenz bei konstanter Belichtungszeit der Kamera deutlich wurde. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Bindung der Lipoplexe sondern vor allem die endozytotische Aufnahme durch die Zellen ein kritischer Schritt ist, da die Liganden zwar eine bessere Bindung von Lipoplex und Zellen erreichten, aber nur eine geringfügig gesteigerte Aufnahme in die Zellen erreicht wurde. Dies ist auch der Grund, warum die Anzahl DNA bindender Zellen nicht mit der Transfektionsrate, d.h.: mit der Anzahl transgenexprimierender Zellen korreliert (siehe Kapitel 4), denn für eine Expression des Transgenes ist die Aufnahme der DNA in die Zellen essentiell.

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse der getesteten Liganden, dass die Fähigkeit der Zellen Lipoplexe zu binden, ein entscheidendes Kriterium für die Transfektionseffizienz auch bei der *in vitro* Transfektion ist. Besonders kritisch war die Internalisierung der Lipoplexe mittels Endozytose. So korrelierte die Transfektionseffizienz eines Zelltypes mit der Fähigkeit der Zelle, die zu transfizierende DNA aufzunehmen (siehe Kapitel 4). Rejman und Mitarbeiter stellten fest, dass Lipoplexe hauptsächlich über die Clathrin vermittelte Endozytose (CME) aufgenommen werden (Rejman et al., 2006). Diese Art der Endozytose ist hochreguliert und führt zum lysosomalen Abbau. Sie ist außerdem abhängig vom Zellzyklus der Zellen (Wadhwa et al., 1995;

Bellocq et al., 2003). Andere Autoren zeigten, dass eine Aufnahme auch über Macropinozytose oder bei manchen Zellen durch Phagozytose möglich ist (Wolschek et al., 2002; Khalil et al., 2005; Yuan et al., 2007). Bei den Versuchen wurde festgestellt, dass bestimmte Peptide die Art der Aufnahme beeinflussen können. Beispielsweise wird das SV40-T-Antigen, welches als NLS-Peptid von vielen Gruppen verwendet wird (siehe Kapitel 2) durch Caveolae vermittelte Endozytose internalisiert (Chen et al., 1999; Conner et al., 2003). Das TAT-Peptid wiederum wird hauptsächlich über Macropinozytose aufgenommen (Nakase et al., 2004; Duchardt et al., 2007). Möglicherweise ist eine Steigerung des Gentransfers durch diese Peptide auch auf unterschiedliche Endozytosearten zurück zu führen. Dies könnte auch erklären, warum die TAT-Peptide eine Verbesserung der Transfektion erreichen, obwohl die in den ersten Versuchen ermittelte und postulierte membrandurchdringende Eigenschaft (Ruben et al., 1989; Fawell et al., 1994; Vives et al., 1997) der so genannten *cell penetrating peptides* (zu denen das TAT-Peptid gehört) inzwischen durch Richards und Mitarbeiter (Richards et al., 2002) sowie anderen Autoren (Vives et al., 2003; Brooks et al., 2005) klar widerlegt wurden. Komplexe aus Polykationen wie PEI werden vorwiegend über die CME und Caveolae vermittelte Endozytose internalisiert. Es ist allerdings noch strittig, welcher Aufnahmeweg für die Transfektion am produktivsten ist. Manche Autoren sind noch immer der Meinung, dass die Aufnahme der Lipoplexe durch die Zellen unproblematisch sei, sondern nur die Freisetzung ins Zytoplasma limitierend ist (Bieber et al., 2002; Almofti et al., 2003). Diese Meinung ist durch meine Ergebnisse aber eindeutig widerlegt. Zweifelsohne ist die Endozytose in Zusammenhang mit der Transfektionseffizienz ein noch zu wenig beachtetes Feld und es offenbart sich hier bei der Beurteilung der Transfizierbarkeit von Zellen in Form der „Endozytoseleistung“ möglicherweise ein neues Kriterium für weitergehende Untersuchungen.

5.4 Transport der DNA in den Kern

Ein weiteres Problem zeigte sich erwartungsgemäß bei der Überwindung der Kernmembran. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass nur sehr geringe Mengen DNA in den Zellkern gelangten. Der überwiegende Teil der aufgenommenen DNA verbleibt im Zytoplasma bzw. in den Endosomen der Zellen. Dies war bei allen getesteten Zelltypen der Fall und deutet somit auf ein generelles Problem hin wie es auch von anderen Autoren bereits mehrfach beschrieben wurde (u.a.: Hagstrom et al., 1997; Ludtke et al., 1999; Bieber et al., 2002; Kamiya

et al., 2002). Die von mir ermittelte Kerntransportrate, d.h.: die Anzahl der Zellen, die DNA in den Kern transportierten in Relation zur Anzahl der Zellen, welche DNA aufgenommen hatten, verdeutlichte zusätzlich, dass zwischen den verschiedenen Zelllinien quantitative Unterschiede bestehen (siehe Kapitel 4.2). Der Transport der transfizierten DNA in den Zellkern korrelierte mit der Transfizierbarkeit des Zelltypes und bestätigte, dass dieser Schritt besonders bei Jurkatzellen (Rate etwa 1%) ein großes Problem darstellt. Selbst bei den leicht zu transfizierenden Cos7-Zellen wird nur eine Kerntransportrate von 30%-40% erreicht (siehe Kapitel 4.2). Interessanterweise entsteht hier bei der Betrachtung meiner Ergebnisse ein Widerspruch zwischen der Kerntransportrate und der Transfektionsrate. Da für eine Transgenexpression die transfizierte DNA im Kern der Zelle vorhanden sein muss, ergibt sich folgerichtig, dass die Transfektionsrate nicht größer als die Kerntransportrate sein kann. Jedoch war bei allen Zelltypen die Kerntransportrate geringer, als die Transfektionsrate. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass für die Expression theoretisch ein einziges intaktes DNA-Molekül ausreichend ist. Ein einzelnes DNA-Molekül, das mit nur einem Fluorophor gekoppelt ist (pGeneGrip-Plasmide) ist aber fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar. Dadurch wird in den Zellkernen nur dann DNA detektierbar, wenn sich eine ausreichende Anzahl an Fluorophoren und somit Plasmiden im Kern befindet. Eine Lösung dieses Problems bestand in einer stärkeren Markierung der Plasmide. Hierfür wurden Plasmide chemisch markiert, so dass ein DNA-Molekül mit etwa 100 Fluorophoren gekoppelt war (siehe Kapitel 3). Dadurch waren zwar auch geringe Mengen an DNA mikroskopisch zu sehen, allerdings war die so modifizierte DNA nicht mehr transkribierbar. Die Korrelation zwischen Kerntransportrate und Transfektionsrate wurde durch diese Markierungsmethode zwar besser, allerdings entstand der Nachteil, dass keine Identifizierung der erfolgreich transfizierten Zellen mehr möglich war. Trotz dieser Einschränkungen konnte aber deutlich gezeigt werden, dass es sich beim Transport in den Kern um ein entscheidendes Hindernis handelt.

5.5 Verbesserung des Kerntransportes

Eine Möglichkeit der Verbesserung des Transportes transfizierter DNA in den Zellkern wird von allen Autoren in der Verwendung der so genannten Kern-Lokalisations-Sequenzen gesehen (Lanford et al., 1986; Collas et al., 1996; Cartier et al., 2002; Ritter et al., 2003). Hierzu wurden in den letzten Jahren viele Versuche durchgeführt, die zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen

fürten (siehe Kapitel 2.3.2). Meine Ergebnisse zeigten, dass durch die Verwendung von NLS-Peptiden eine Verbesserung der Transfektion bis Faktor 4 möglich war. Die Wirkung der Peptide war von der Zusammensetzung der Liposomen abhängig. Während bei Lipoplexen mit dem Lipid Dotap allein keine Verbesserung erzielt werden konnte, war durch Zusatz des Helferlipides Dope eine gesteigerte Transfektionseffizienz detektierbar (siehe Kapitel 4.1). Eine Erklärung wäre, dass Dope als Helferlipid die Fusogenität der Liposomen erhöht (Winterhalter und Lasic et al., 1993) und somit eine bessere Freisetzung aus den Endosomen erreicht. Die Freisetzung der DNA in das Zytoplasma ist der erste Schritt des Kerntransportes, da nur im Zytoplasma befindliche DNA in den Kern gelangen kann (siehe Kapitel 2). Diese Problematik wird später noch eingehender diskutiert.

Als ungeeignet erwies sich das Peptid KSV, welches aus einer DNA-Bindedomäne und der eigentlichen NLS besteht. Unabhängig vom transfizierten Zelltyp und der Zusammensetzung der Lipide konnte keine Verbesserung der Transgenexpression erreicht werden (siehe Kapitel 4). Die Erklärung hierfür ist, dass die NLS auf Grund ihrer positiven Ladung mit der DNA interagieren kann und es somit zur Maskierung der funktionalen Signalsequenz kommt. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Zanta et al., 1999; Cartier et al., 2002; Ritter et al., 2003; Kamiya et al., 2002). Allerdings zeigte sich bei der Elektroporation, dass das Peptid KSV eine – wenn auch geringe – Verbesserung der Transfektion erzielte und somit die Maskierung der NLS durch die DNA nicht absolut ist. Demnach scheint nicht die Interaktion zwischen Peptid und DNA allein, sondern die gesamte Struktur der Lipoplexe mit der Wirkung der Peptide zu interferieren. Möglicherweise wird die NLS nicht nur durch DNA allein maskiert, sondern erst durch die Struktur der multilamellaren Komplexe der kationischen Lipide. Durch diese Interferenz muss bei der Auswahl geeigneter NLS-Peptide auf eine freie Zugänglichkeit der eigentlichen NLS geachtet werden, wie sie beispielsweise durch die Anwendung von Oligomeren (Peptid SV4) gewährleistet werden kann (Ritter et al., 2003). Eine andere Möglichkeit eine Maskierung der NLS zu verhindern, ist die Zyklisierung der NLS wie sie im Peptid zNLS vorgenommen wurde. Diese Strukturänderung führt zu einer geringeren Maskierung und somit zu einer gesteigerten Funktionalität des Peptides (Cartier et al., 2002).

Generell erscheint die erzielte Verbesserung der Transfektion durch die NLS-Peptide geringer als sie durch die *gene tracking* Versuche zu erwarten wäre. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten ferner, dass auch bei der Verwendung von NLS-Peptiden der größte Teil der DNA nicht in den Kern transportiert wird. Hagstrom und Mitarbeiter entwickelten daher 1997 die These,

dass die mit der DNA assoziierten NLS-Peptide an mehrere NPC-Komplexe gleichzeitig binden, wodurch ein Eintritt der DNA in den Kern unmöglich wird (Hagstrom et al., 1997). Auch Zanta stellte 1999 diese Vermutung auf, da DNA-Stücke von mehr als 2 kb Länge nicht mehr in den Kern transportiert wurden. Diese Länge entspräche genau dem Abstand zweier NPC-Komplexe voneinander (Zanta et al., 1999). Dieser Hypothese widerspricht zum einen, dass DNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 2 kb bei allen Zellen zu einem reduzierten Kerntransport führen, aber die Dichte der NPC-Komplexe je nach Zelltyp sehr unterschiedlich ist (Keminer und Peters, 1999). Ludtke widerlegte die von Hagstrom und Zanta aufgestellte Vermutung endgültig, als er mit DNA-Molekülen, die kovalent am 3'-Ende mit nur einem NLS-Peptid verknüpft wurden, die gleichen Ergebnisse reproduzierte (Ludtke et al., 1999). Eine gleichzeitige Bindung mehrere NLS-Peptide an verschiedene NPC's war durch die endständige Bindung der NLS nicht möglich. Mittlerweile konnten von anderen Gruppen gezeigt werden, dass DNA Moleküle ab einer Länge von 2 kb durch die hohe Viskosität des Zytoplasmas nahezu unbeweglich sind (Lukacs et al., 2000; Kamiya et al., 2002; Rea et al., 2008). Allerdings gibt es auch Autoren, die der Meinung sind, dass die Mobilität und der Transport der DNA in den Kern kein Problem darstellt (Zuhorn et al., 2007). Einschränkend ist bei dieser Arbeit aber zu erwähnen, dass die Untersuchungen mit fixierten Zellen durchgeführt wurden. Richards zeigte bereits 2002, dass das Fixieren von Zellen zu falschen Lokalisierungen transfizierter DNA führt (Richards et al., 2002).

Interessanterweise war die größte Verbesserung der Transfektionseffizienz bei Cos7-Zellen zu beobachten. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, doch zeigten die *gene tracking* Versuche, dass im Gegensatz zu HT29 oder Jurkatzellen bei Cos7-Zellen, nicht nur mehr Zellen DNA internalisieren, sondern diese Zellen auch eine größere Menge an DNA endozytotisch aufnehmen, so dass im Zytoplasma der Zellen eine mehr DNA vorliegt, als bei HT29 oder Jurkatzellen (siehe Kapitel 4.2). Diese kann durch die NLS-Peptide effizienter in den Kern transportiert werden und führt in Folge dessen zu einer Steigerung der Expression. Wenn wenig DNA im Zytoplasma der Zellen vorliegt kann nur eine geringere Verbesserung erzielt werden, da nur geringe Mengen an DNA in den Kern transportiert werden könnten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer effizienten endosomalen Freisetzung für die Transfektionseffizienz. Lehmann und Mitarbeiter zeigten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass die DNA überwiegend (90%) in den Endosomen verbleibt. Dieser Befund korreliert mit meinen bereits diskutierten Ergebnissen zum *gene tracking* (siehe oben) und den Ergebnissen anderer Autoren (Escriou et al., 1998; Lehmann, 2003).

5.6 Freisetzung der DNA aus den Endosomen

Die Schwierigkeiten des Transportes der DNA in den Zellkern konnten durch meine Versuche auf den endosomalen Aufnahmeweg zurückgeführt werden. Bei allen Zelllinien wurde bei den Elektroporationsversuchen eine Kerntransportrate von 80% erreicht. Dies zeigt, dass der Transport der DNA in den Kern möglich ist, wenn die DNA frei im Zytoplasma vorliegt. Dieser Befund wird durch die Arbeiten anderer Gruppen bestätigt, die einstimmig in der endosomalen Aufnahme eine Hauptschwierigkeit bei der Lipofektion sehen (Coonroad et al., 1997; Khalil et al., 2005; Rejman et al., 2006). Dabei wird insbesondere die Freisetzung aus den Endosomen als ein entscheidender Schritt diskutiert (u.a.: Escriou et al., 1998; Bieber et al., 2002; Almofti et al., 2003). Eine effiziente Freisetzung der DNA aus den Endosomen ist für eine erfolgreiche Transfektion aus mehreren Gründen zwingend erforderlich. Zum einen muss die DNA frei im Zytoplasma vorliegen, um in den Zellkern gelangen zu können wie meine eigenen Versuche (siehe Kapitel 4) und die Ergebnisse anderer Gruppen (Martin und Rice, 2007) zeigten, zum anderen wird nicht freigesetzte DNA nach Verschmelzen der Endosomen mit den Lysosomen abgebaut (Alberts, 1995).

Dass die Freisetzung aus den Endosomen ein problematischer Schritt ist, belegten Versuche mit endosomolytischen Agenzien wie Chloroquine bereits vor 15 Jahren (siehe Kapitel 2). Die durch die Verwendung des Helferlipides DOPE gesteigerte Transfektionseffizienz, erklären einige Autoren auch durch die fusogenen Eigenschaften des Lipids, die zu einer gesteigerten Freisetzung der DNA führt (Rettig und Rice, 2007). Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Gold markierter DNA ergaben jedoch, dass es sich dabei um ein sehr seltenes Ereignis handelt (Lehmann, 2003). Die Autorin konnte fast keine freigesetzte DNA außerhalb der Endosomen lokalisieren und postulierte als Alternative eine Verschmelzung von Endosomen und Kernmembran, um einen Transport der DNA in den Kern zu erklären (Lehmann, 2003). Hierbei kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die DNA auf Grund der Markierung einem anderen Verhalten unterliegt. Allerdings zeigen auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, dass die meiste DNA in den Endosomen verbleibt. Zuhorn und Kollegen veranschaulichte, dass die im Mikroskop punktiert erscheinende, markierte DNA in den Endosomen verkapselt ist, während frei im Zytoplasma befindliche DNA ein eher diffuses Fluoreszenzsignal erzeugt (Zuhorn et al., 2007). Auch meine Ergebnisse belegten, dass der größte Teil der DNA in den Endosomen der Zellen verbleibt (siehe Kapitel 4.2).

5.7 Verbesserung der endosomalen Freisetzung

Mehrere Autoren lokalisierten den Großteil der freigesetzten DNA in der äußeren Peripherie des Zytoplasmas, nahe der Zytoplasmamembran (Thierry et al., 1997; Helbling-Leclerc et al., 1999; Lehmann, 2003). Da die im Zytoplasma freigesetzte DNA auf Grund ihrer Größe fast unbeweglich ist (Lukacs et al., 2000; Kamiya et al., 2002; Rea et al., 2008), ist es notwendig, eine möglichst kernnahe endosomale Freisetzung zu erreichen. Dadurch wäre der aktive Transport, beispielsweise durch NLS-Peptide, der DNA in den Kern leichter. Aber auch bei dem durch Zellteilung zufälligen Einschluss der im Zytoplasma lokalisierten DNA hätte eine kernnahe Freisetzung Vorteile, da die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme größer ist. Da die Endosomen während ihrer Reifung zu späten Endosomen aus der Peripherie Richtung Zellkern wandern (Alberts, 1995; Nakata et al., 1998), kann dies durch ein spätes Verlassen der Vesikel realisiert werden. Hierzu erschien der Einsatz von Peptiden, die ihre fusogene Wirkung erst bei einem niedrigen pH-Wert entfalten als zielführend.

Zunächst wurden fusogene Liposomen erstellt, bei denen die pH abhängig fusogenen LV-Peptide transmembran eingebaut wurden (siehe Kapitel 4.5). Wie meine Versuche zeigten, war eine Verbesserung der Transfektionseffizienz mit derartigen Liposomen nicht möglich, obwohl die Fusogenität durch den Einbau der Peptide nachweislich erhöht wurde (siehe Kapitel 4.5). Dafür gibt es zwei mögliche Ursachen. Es ist nicht auszuschließen, dass die fusogenen Peptide durch die Komplexbildung der Liposomen mit der DNA maskiert oder zumindest in ihrer Funktion eingeschränkt werden. Eine elegante Lösung zur Verhinderung der Maskierung wäre die DNA im Inneren der Liposomen zu verpacken. Leider ist dies bei Plasmiden nicht möglich, da die Liposomen sonifiziert werden müssen, um die klassische, kugelartige Liposomenstruktur zu erhalten (Hofmann et al., 2004). Um die DNA im Inneren der Liposomen einzubauen, muss sie bereits während der Sonifizierung in der Liposomendispersion vorliegen. Durch die Ultraschallbehandlung würde sie aber fragmentiert und eine Transkription der DNA unmöglich werden. Deswegen musste eine andere Möglichkeit gefunden werden, um die Wirkung der Peptide auch bei gebundener DNA zu gewährleisten. Hierzu wurden keine klassischen Liposomen verwendet, sondern multilamellare Komplexe. Die Gruppe von Prof. Langosch zeigte bereits, dass auch dann eine durch die Peptide erhöhte Fusogenität von Lipidbilayern erzielt wird, wenn die Peptide erst nach Herstellung der Liposomen zugegeben wurden (persönliche

Kommunikation). Die Zunahme der Fusogenität solcher Strukturen beruht auf der so genannten Hemifusion, einem Zwischenschritt bei der Fusion von Lipidbilayern (siehe Abbildung 5.1).

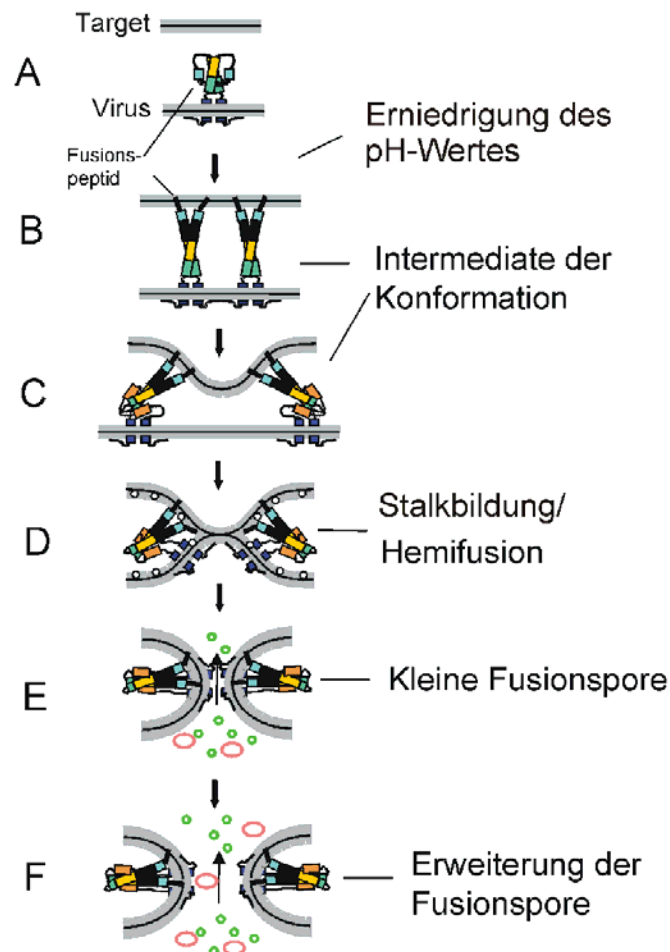


Abb. 5.1: Ablauf der endosomalen Freisetzung von Influenzaviren (nach Baljinnyam 2003). Damit das HA Protein eine Fusion vermitteln kann, bedarf es zwingend einer Konformationsänderung. Diese Strukturumwandlung wird durch eine pH-Erniedrigung während der Reifung der Endosomen induziert (*White et al., 1982*). Im nächsten Schritt der Konformationsänderung beugt sich das Fusionsprotein um eine "Scharnierregion" durch einen Helix-zu-Loop-Übergang im HA2. Dabei binden sich α -Helices am N-terminalen Ende des HA-Trimers an α -Helices am C-terminalen Ende und bilden ein Sechs-Helix-Bündel aus antiparallelen "coiled-coil" (*Bullough et al., 1994; Chen et al., 1999*). Das nächste identifizierte Fusionsintermediat ist die Hemifusion (D). Dabei verschmelzen die jeweils äußeren Lipidmonolayer der beiden Membranen miteinander und bilden ein sogenanntes Stalk, eine halsähnliche Struktur mit einer negativen Krümmung. Die noch nicht fusionierten inneren Lipidlayer formen eine "Diaphragma". Anschließend folgt die Bildung einer frühen Fusionspore mit einer Porengröße von 1-2 nm (E) (*Spruce et al., 1991*). Schließlich findet eine irreversible Erweiterung der Fusionsporen statt (F), wobei auch mehrere kleine Poren zu einer größeren Pore verschmelzen können. Der genaue Mechanismus der Porenerweiterung ist jedoch unklar.

Natürlich kommt es auch bei dieser Struktur zu Maskierungen der Peptide durch die DNA, aber durch die alternierende Abfolge von Lipidbilyern und DNA-Molekülen ist es wahrscheinlicher, dass auch funktionell intakte Peptide vorliegen, als wenn die DNA außen herum an klassische Liposomen bindet (siehe Abbildung 5.2).

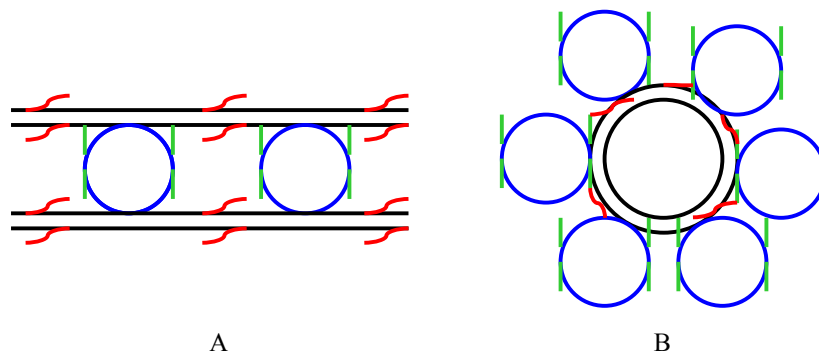


Abb. 5.2: Schematisches Modell des möglichen Aufbaus der Lipoplexe bei der Verwendung von fusogenen und NLS-Peptiden. Die NLS-Peptide (grün) werden durch die Vorkomplexierung elektrostatisch an die DNA (blau) gebunden. Die fusogenen LV-Peptide (rot) werden vor Zugabe der DNA mit den Lipiden (schwarz) assoziiert. Die Kombination (siehe Kapitel 2) von Lipiden und DNA führt zur Bildung von multilamellaren Komplexen (A). Erfolgt vor Zugabe der komplexierten DNA eine Sonifizierung der Lipidlösung (siehe Kapitel 3), entstehen die „klassischen“, liposomalen Vesikel (B).

Die Effizienz des Gentransfers konnte durch die Verwendung der pH abhängig fusogenen Peptide gesteigert werden. Dies war bei allen Zelllinien der Fall (siehe Kapitel 4.5). Versuche mit entsprechenden Kontrollpeptiden bewiesen eindeutig, dass diese Steigerung sequenzabhängig ist. Experimente mit sequenzidentischen pH unabhängig fusogenen Peptiden erreichten eine nur geringe Verbesserung der Transfektionseffizienz (siehe Kapitel 4.5). Dies ist auch zu erwarten, da nur pH abhängig fusogene Peptide die für die Transfektionseffizienz wichtige und bereits diskutierte späte Freisetzung aus den Endosomen ermöglichen (siehe oben). Interessant ist die Erklärung der verbesserten endosomalen Freisetzung auf Grund der Hemifusion (siehe Abbildung 5.1). Dabei handelt es sich um einen Zwischenschritt der vollständigen Fusion, bei der nur die äußeren Membranen verschmelzen und die beiden inneren ein so genanntes Diaphragma bilden (Baljinnyam et al., 2003). Auf den ersten Blick ist es nicht leicht, in diesem Vorgang eine mögliche verbesserte Freisetzung der DNA zu sehen, da durch diesen Vorgang ja keine DNA direkt freigesetzt würde, wie bei einer kompletten Fusion mit verkapselter DNA. Im Falle der für Transfektionen verwendeten Lipoplexe handelt es sich aber um vielschichtige Strukturen, die alternierend aus DNA und Lipidbilyern bestehen (Rädler et al., 1997; Boukhnikachvili et al.,

1997; Henry und Washington, 2001; Lehmann et al. 2003). Durch diese mehrschichtige Struktur ist ein Freisetzen durch die Hemifusion möglich wie das von mir entwickelte Modell in Abbildung 5.3 verdeutlicht. Die Verschmelzung der inneren Lipidschicht der endosomalen Membran mit äußeren Lipidschichten der multilamellaren Lipoplexe wird durch die mit den Lipiden assoziierten fusogenen Peptiden unterstützt. Danach kann die äußere, dem Zytoplasma zugewandte Lipidschicht der Endosomen mit der inneren Schicht der Lipoplexe fusionieren, da diese im Unterschied zu klassischen Liposomen bei offenen Lipidbilayern auf Grund der fehlenden Kugelform zugänglich vorliegt. Durch diese zweite Fusion entsteht ein Kanal zwischen den fusionierten Bilayern der multilamellaren Komplexe durch den die DNA in das Zytoplasma gelangen kann (siehe Abbildung 5.3). Damit wird eine effiziente Freisetzung der zwischen den Lipidbilayern befindlichen DNA (siehe Kapitel 2.2) erreicht.

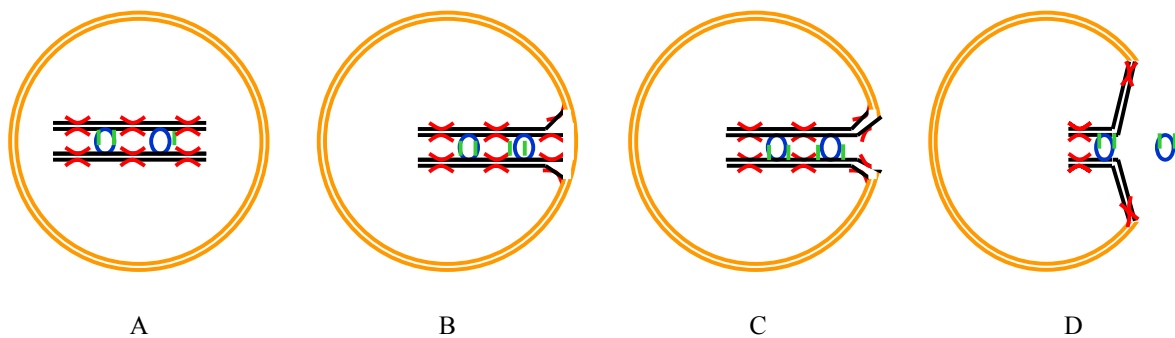


Abb. 5.3: Entwickeltes Modell der endosomalen Freisetzung von Lipoplexen mittels Hemifusion. Nach der Aufnahme der Lipoplexe durch Endozytose befinden sich diese innerhalb der Endosomen (A). Der erste Schritt der Freisetzung besteht in der durch die LV-Peptide (rot) vermittelten Fusion der äußeren Liposomenmembran (schwarz) mit der inneren endosomalen Membran (orange [B]). Danach fusioniert die innere Schicht der Liposomen mit der äußeren Membran der Endosomen (C). Dadurch entsteht zwischen zwei Bilayern der Lipoplexe eine Öffnung der Endosomen durch die die mit NLS-Peptiden (grün) komplexierte DNA (blau) in das Zytoplasma der Zellen gelangen kann.

5.8 Kombination mehrerer Strategien

Da für eine effiziente Wirkung der NLS-Peptide die DNA frei im Zytoplasma vorliegen muss, erschien es sinnvoll die pH abhängig fusogenen LV-Peptide mit der Anwendung von NLS-Peptiden zu kombinieren. Dadurch sollte eine weitere Verbesserung der Transgenexpression zu erzielen sein. Bei den Transfektionsversuchen war bei allen Zelllinien ein synergistischer Effekt zu beobachten. Es konnten Verbesserungen um Faktor 10 erreicht werden (siehe Kapitel 4.6).

Damit wurde eine signifikante Verbesserung erzielt, die bei allen Zelltypen eine gesteigerte Transfektionseffizienz ermöglichte. Zwar war die Verbesserung auch hier wieder abhängig vom verwendeten Zelltyp, allerdings waren die Schwankungen verglichen mit der jeweiligen Einzelanwendung der Peptide deutlich geringer (Faktor 8-10). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine grundlegende Optimierung des Gentransfers gelang, die bei allen getesteten Zelltypen den intrazellulären Transport der DNA in den Zellkern verbesserte. Diese Steigerung der Transfektionseffizienz konnte mit Kombinationen unterschiedlicher fusogener und NLS-Peptide erzielt werden. Wenngleich die Steigerung nicht bei allen Kombinationen gleich groß war, bestätigen die Resultate die grundlegende Optimierung des intrazellulären Transportes der DNA. Die größte Verbesserung war durch die Kombination der Peptide erreichbar, die bereits bei der alleinigen Anwendung die höchste Steigerung erzielten. Kontrollversuche mit pH unabhängig fusogenen Peptiden zeigten keine synergistischen Effekte (Daten nicht gezeigt). Anscheinend ist auch bei der kombinatorischen Anwendung nur eine durch die pH abhängig fusogenen Peptide vermittelte späte Freisetzung aus den Endosomen Effizienz steigernd. Ursächlich hierfür ist die bereits oben diskutierte geringe Mobilität der Plasmide im Zytoplasma (Lukacs et al., 2000; Kamiya et al., 2002; Rea et al., 2008). Analog zu allen anderen Versuchen war auch bei der Kombination von NLS- und fusogenen Peptiden die Steigerung der Transfektionseffizienz abhängig von der Zusammensetzung der Lipidosomen. So war bei Transfektion mit Dotap ohne Helferlipide nur ein sehr geringer Effekt messbar. Offensichtlich sind die strukturellen Eigenschaften nur aus Dotap bestehender Lipoplexe nicht geeignet für die Wirkung beider Peptide. Es wurde von mehreren Autoren gezeigt, dass die Struktur der Lipoplexe maßgeblich von der Zusammensetzung der Liposomen abhängt und die Struktur wiederum eine entscheidende Rolle bei der Transfektionseffizienz spielt (Winterhalter und Lasic, 1993; Hong et al., 1997; Rädler et al., 1997). Der Zusatz von Helferlipiden führt zu größeren und heterogeneren Strukturen (Groth et al., 2000; Lehmann, 2003). Anscheinend sind derartige Strukturen für die Wirkung beider Peptide notwendig. Ein von mir vorgeschlagenes Strukturmodell der multilamellaren Lipoplexe, welches das Zusammenwirken von Lipiden, Peptiden und DNA erklärt ist in Abbildung 5.3 gezeigt. Die Anwendung beider Peptide erlaubte zudem, die benötigte Menge an kationischen Lipiden und Helferlipiden zu reduzieren. Dadurch kann die durch die Lipide verursachte Zytotoxizität (Nguyen et al., 2007) verringert werden. Dies ist ein positiver Effekt der Peptide, der besonders für lange Inkubationen von Transfektionskomplexen und Zellen und für wenig robuste Zelllinien vorteilhaft ist.

5.9 Ausblick

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigten, dass es mehrere Probleme bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA gibt. Ein entscheidender limitierender Schritt war die Internalisierung der transfizierten DNA. Dies war besonders bei den so genannten *hard to transfect cells* ein großes Problem. Zukünftige Entwicklungen sollten neben der Suche nach geeigneten Liganden die Verbesserung der endozytotischen Aufnahme zum Schwerpunkt haben. Hierzu gehört zunächst die Identifizierung der für die Transfektion produktiven Aufnahmewege. An dieser Fragestellung wird zurzeit zumindest gearbeitet (Wasungu und Hoekstra, 2006; Yuan et al., 2007; Rettig und Rice, 2007). Noch wichtiger erscheint mir die Endozytose der Zellen zu steigern, um eine verbesserte Aufnahme zu erzielen. Möglicherweise ist dabei auch die Entwicklung geeigneter Liganden hilfreich, die zu unterschiedlichen Aufnahmerrouten führen kann (siehe Kapitel 5.3). Erfolgversprechend könnte in diesem Zusammenhang auch die von mir angewandte Kombination mehrere funktional unterschiedlicher Peptide sein. Beispielsweise erreichten Khalil und Mitarbeiter eine höhere Aufnahme transfizierter DNA durch Oktaarginine, die auch zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz führte. Er begründete die Ergebnisse mit der durch die Peptide vermittelten Induktion der Makropinozytose (Khalil et al., 2005). Almofti und Mitarbeiter zeigten durch Hemmung von Membranfusionen, dass für eine effiziente endozytotische Aufnahme von DNA die Fusionen zwischen der Zytoplasmamembran und den Lipoplexen notwendig sind (Almofti et al., 2002). Deshalb habe ich während meiner Arbeit versucht, RGD-Peptide und fusogene Peptide zu kombinieren (Daten nicht gezeigt). Dabei traten aber zwei Probleme auf. Zum einen war eine Anwendung der pH abhängig fusogenen Peptide nicht erfolgreich, was am neutralen pH im Umfeld der Zytoplasmamembran liegt. Dadurch konnten die Peptide nicht fusogen wirken. Die Verwendung von pH unabhängig fusogenen Peptiden führte zu Fusionen zwischen den Transfektionskomplexen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass dadurch sehr große Transfektionskomplexe entstanden, die von den Zellen nicht mehr aufgenommen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise lassen sich zukünftig Liganden und entsprechend designte fusogene Peptide aber derart kombinieren, dass eine deutlich gesteigerte Internalisierung erreicht werden kann.

Ein weiterer Punkt für eine mögliche Verbesserung der Transfektion ist die Transkribierbarkeit der DNA im gebundenen Zustand. Durch die Komplexierung der DNA mit kationischen Lipiden oder Peptiden war die Transkription des Gens nicht mehr möglich (siehe Kapitel 4.2). Dieses

Problem wurde auch bei Mikroinjektionsversuchen mit komplexierter DNA beschrieben (Fritz et al., 1996). Bisher ging man allerdings davon aus, dass sich die DNA vom Lipid während des intrazellulären Transportes trennt (siehe Kapitel 2). Versuche von Zhang und Mitarbeitern mit fixierten Zellen zeigten auch, dass die Lipide nicht in den Kern gelangen (Zhang et al., 2006). Meine mikroskopischen Untersuchungen mit markierten Lipiden führten zu gegenteiligen Ergebnissen. Unabhängig vom Zelltyp und des verwendeten Lipides waren auch in den Zellkernen Lipide detektierbar. Dabei handelte es sich nicht um Ausnahmen, sondern dies war vielmehr der Regelfall und führte zu dem beschriebenen Phänomen der falsch negativen Zellen (siehe Kapitel 4.2). Meine Versuche zeigten ferner, dass mit Lipiden komplexierte DNA nicht transkribierbar ist. Lediglich Lipofectamine2000 stellte eine Ausnahme dar (siehe Kapitel 4.2). Somit könnte die Entwicklung von Lipiden, die trotz Bindung der DNA auch eine Transkription des Transgens ermöglichen (wie Lipofectamine2000) zu einer Verbesserung des Gentransfers führen.

Zweifelsohne können auch noch die Freisetzung aus den Endosomen und der Transport der DNA in den Kern verbessert werden. Die von mir entwickelte Kombination der pH abhängig fusogenen LV-Peptide und den NLS-Sequenzen erreichte bei allen getesteten Zelltypen eine signifikante Verbesserung der Transgenexpression. Diese Methode ist wie gezeigt mit verschiedenen Kombinationen von fusogenen und NLS-Peptiden anwendbar, so dass bei der Entwicklung von neuen und besseren Peptiden eine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz zu erwarten ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Konzentration
°C	Grad Celsius
CHOL	Cholesterin
cm	Zentimeter
CFTR-Gen	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Gen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEAE-Dextran	diethylaminoethyl-dextran
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Hydrolase mit DNA als Substrat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOCSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(N5-carbamoyl-spermine)- propan
DOPE	1,2-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane
DOTMA	N-[1-2,3-Dioleoxy-propyl]-N,N,N- trimethylammoniumchlorid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Em	Wellenlänge der Emission
Ex	Wellenlänge der Anregung

Fa.	Firma
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Stunde
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
IVT	in vitro Transkription
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LV-Peptide	Peptide aus den AS Leucin und Valin
MEM	modifiziertes Eagles Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLV	multilamellares Vesikel
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
PAMAM	Polyamidoamin-Dendrimere
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pH	potentia Hydrogenii
PLL	Poly-L-Lysin
p.T.	nach Transfektion
RGD	Bindemotif von Integrin bindenden Peptiden
RNA	Ribonukleinsäure
RLU	relative Lichteinheiten
rpm	Rotationen pro Minute

RPMI	Zellkulturmedium
RRE	Bindemotif von Integrin bindenden Peptiden
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sekretorische alkaline Phosphatase
siRNA	Small interfering RNA
SUV	kleine unilamellare Vesikel
SV40	Simianes Virus 40
TAT	Transactivator of transcription
TFE	Trifluorethanol
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜS	Überstand
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
v	Volumen
V	Volt
w	Gewicht

7. Literaturverzeichnis

Agutter PS, Prochnow D. Nucleocytoplasmic transport. *Biochem J* 1994; **300 (Pt 3)**: 609-618.

Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* 2005; **7(5)**: 657-663.

Alberts, B, Bray,D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD: Molekularbiologie der Zelle, 1995. **3 Auflage**, VCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinheim

Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Baba Y, Kiwada H. Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch Biochem Biophys* 2003; **410(2)**: 246-253.

Assael BM, Castellani C, Ocampo MB, Iansa P, Callegaro A, Valsecchi MG. Epidemiology and survival analysis of cystic fibrosis in an area of intense neonatal screening over 30 years. *Am J Epidemiol* 2002; **156(5)**: 397-401.

Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 2003; **14(6)**: 1122-1132.

Belting M, Petersson P. Protective role for proteoglycans against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro. *Biochem J* 1999; **342 (Pt 2)**: 281-286.

Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, Elsasser HP. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release* 2002; **82(2-3)**: 441-454.

Bigger B, Coutelle C. Perspectives on gene therapy for cystic fibrosis airway disease. *BioDrugs* 2001; **15(9)**: 615-634.

Blessing T, Kursa M, Holzhauser R, Kircheis R, Wagner E. Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 2001; **12**(4): 529-537.

Bloomfield VA. DNA condensation. *Curr Opin Struct Biol* 1996; **6**(3): 334-341.

Boletta A, Benigni A, Lutz J, Remuzzi G, Soria MR, Monaco L. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1997; **8**(10): 1243-1251.

Boukhnikachvili T, Aguerre-Chariol O, Airiau M, Lesieur S, Ollivon M, Vacus J. Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes. *FEBS Lett* 1997; **409**(2): 188-194.

Boulikas T. Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993; **3**(3): 193-227.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(16): 7297-7301.

Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M *et al.* Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**(1): 9-16.

Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**(4): 559-577.

Brown BD, Lillicrap D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 2002; **100**(4): 1133-1140.

Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994; **371**(6492): 37-43.

Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980; **22**(2 Pt 2): 479-488.

Caplen NJ, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D *et al.* In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther* 1995; **2**(9): 603-613.

Cartier R, Reszka R. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther* 2002; **9**(3): 157-167.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; **288**(5466): 669-672.

Chabaud P, Camplo M, Payet D, Serin G, Moreau L, Barthelemy P *et al.* Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug Chem* 2006; **17**(2): 466-472.

Chan CK, Jans DA. Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(10): 1695-1702.

Chan CK, Senden T, Jans DA. Supramolecular structure and nuclear targeting efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines. *Gene Ther* 2000; **7**(19): 1690-1697.

Chemin I, Moradpour D, Wieland S, Offensperger WB, Walter E, Behr JP *et al.* Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo. *J Viral Hepat* 1998; **5**(6): 369-375.

Cho YW, Kim JD, Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J Pharm Pharmacol* 2003; **55**(6): 721-734.

Chu Q, Tousignant JD, Fang S, Jiang C, Chen LH, Cheng SH *et al.* Binding and uptake of cationic lipid:pDNA complexes by polarized airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(1): 25-36.

Chugh P, Fan S, Planelles V, Maggirwar SB, Dewhurst S, Kim B. Infection of human immunodeficiency virus and intracellular viral Tat protein exert a pro-survival effect in a human microglial cell line. *J Mol Biol* 2007; **366**(1): 67-81.

Collas P, Alestrom P. Nuclear localization signal of SV40 T antigen directs import of plasmid DNA into sea urchin male pronuclei in vitro. *Mol Reprod Dev* 1996; **45**(4): 431-438.

Collas P, Husebye H, Alestrom P. The nuclear localization sequence of the SV40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. *Transgenic Res* 1996; **5**(6): 451-458.

Collins L, Fabre JW. A synthetic peptide vector system for optimal gene delivery to corneal endothelium. *J Gene Med* 2004; **6**(2): 185-194.

Collins L, Gustafsson K, Fabre JW. Tissue-binding properties of a synthetic peptide DNA vector targeted to cell membrane integrins: a possible universal nonviral vector for organ and tissue transplantation. *Transplantation* 2000; **69**(6): 1041-1050.

Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; **422**(6927): 37-44.

Coonrod A, Li FQ, Horwitz M. On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 1997; **4**(12): 1313-1321.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML. High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(13): 6094-6098.

da Cruz MT, Simoes S, de Lima MC. Improving lipoplex-mediated gene transfer into C6 glioma cells and primary neurons. *Exp Neurol* 2004; **187**(1): 65-75.

Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**(8): 2258-2262.

Debs RJ, Freedman LP, Edmunds S, Gaensler KL, Duzgunes N, Yamamoto KR. Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. *J Biol Chem* 1990; **265**(18): 10189-10192.

Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**(16): 1839-1849.

Dowty ME, Williams P, Zhang G, Hagstrom JE, Wolff JA. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(10): 4572-4576.

Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 2007; **8**(7): 848-866.

Duzgunes N, Goldstein JA, Friend DS, Felgner PL. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1989; **28**(23): 9179-9184.

Escriou V, Carriere M, Bussone F, Wils P, Scherman D. Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* 2001; **3**(2): 179-187.

Escriou V, Ciolina C, Helbling-Leclerc A, Wils P, Scherman D. Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 1998; **14**(2): 95-104.

Fasbender A, Zabner J, Zeiher BG, Welsh MJ. 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 Ther* 1997; **4**(11): 1173-1180.

Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(2): 664-668.

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; **269**(4): 2550-2561.

Felgner PL. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am* 1997; **276**(6): 102-106.

Felgner PL. Prospects for synthetic self-assembling systems in gene delivery. *J Gene Med* 1999; **1**(4): 290-292.

Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L *et al.* Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; **8**(5): 511-512.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(21): 7413-7417.

Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989; **337**(6205): 387-388.

Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther* 2000; **7**(14): 1183-1192.

Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1278**(1): 41-50.

Fritz JD, Herweijer H, Zhang G, Wolff JA. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1996; **7**(12): 1395-1404.

Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1995; **2**(10): 710-722.

Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 1993; **32**(28): 7143-7151.

Gill DR, Southern KW, Mofford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F *et al.* A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; **4**(3): 199-209.

Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; **23**(1): 175-182.

Goodsell DS. The molecular perspective: cadherin. *Stem Cells* 2002; **20**(6): 583-584.

Gorlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 607-660.

Gourbatsi E, Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Scott SJ, Underhill MF, Smales CM. Noncovalently linked nuclear localization peptides for enhanced calcium phosphate transfection. *Mol Biotechnol* 2006; **33**(1): 1-11.

Graham FL, van der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 1973; **54**(2): 536-539.

Grot, D.: Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf der Grundlage optimierter kationischer Lipide, 2000. Digitale Dissertation, FU Berlin.

Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**(4): 637-651.

Gustafsson J, Arvidson G, Karlsson G, Almgren M. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1235**(2): 305-312.

Haberland A, Cartier R, Heuer D, Zaitsev S, Paulke BR, Schafer-Korting M *et al.* Structural aspects of histone H1-DNA complexes and their relation to transfection efficiency. *Biotechnol Appl Biochem* 2005; **42**(Pt 2): 107-117.

Hacein-Bey-Abina S, de Saint Basile G, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Methods Mol Biol* 2003; **215**: 247-259.

Haensler J, Szoka FC, Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 1993; **4**(5): 372-379.

Hagstrom JE, Ludtke JJ, Bassik MC, Sebestyen MG, Adam SA, Wolff JA. Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells. *J Cell Sci* 1997; **110** (Pt 18): 2323-2331.

Hagstrom JE, Sebestyen MG, Budker V, Ludtke JJ, Fritz JD, Wolff JA. Complexes of non-cationic liposomes and histone H1 mediate efficient transfection of DNA without encapsulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1284**(1): 47-55.

Han S, Mahato RI, Sung YK, Kim SW. Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther* 2000; **2**(4): 302-317.

Hart SL. Integrin-mediated vectors for gene transfer and therapy. *Curr Opin Mol Ther* 1999; **1**(2): 197-203.

Harvey BG, Worgall S, Ely S, Leopold PL, Crystal RG. Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(17): 2823-2837.

Helbling-Leclerc A, Scherman D, Wils P. Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1418**(1): 165-175.

Hofmann MW, Poschner BC, Hauser S, Langosch D. pH-Activated fusogenic transmembrane LV-peptides. *Biochemistry* 2007; **46**(13): 4204-4209.

Hofmann MW, Weise K, Ollesch J, Agrawal P, Stalz H, Stelzer W *et al.* De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(41): 14776-14781.

Hong K, Zheng W, Baker A, Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett* 1997; **400**(2): 233-237.

Huang CJ, Spinella F, Nazarian R, Lee MM, Dopp JM, de Vellis J. Expression of green fluorescent protein in oligodendrocytes in a time- and level-controllable fashion with a tetracycline-regulated system. *Mol Med* 1999; **5**(2): 129-137.

Huang, L und E. Viroonchatapan (1999). „Introduction“ in: Nonviral Vectors for Gene Therapy. L.Huang, M.Hung und E.Wagner. San Diego, Academic Press: **3-4**.

Hui SW, Langner M, Zhao YL, Ross P, Hurley E, Chan K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J* 1996; **71**(2): 590-599.

Hui SW, Stoicheva N, Zhao YL. High-efficiency loading, transfection, and fusion of cells by electroporation in two-phase polymer systems. *Biophys J* 1996; **71**(2): 1123-1130.

Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE *et al.* Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 2000; **7**(13): 1156-1165.

James MB, Giorgio TD. Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol Ther* 2000; **1**(4): 339-346.

Jans DA, Chan CK, Huebner S. Signals mediating nuclear targeting and their regulation: application in drug delivery. *Med Res Rev* 1998; **18**(4): 189-223.

Kamiya H, Fujimura Y, Matsuoka I, Harashima H. Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **298**(4): 591-597.

Karmali PP, Kumar VV, Chaudhuri A. Design, syntheses and in vitro gene delivery efficacies of novel mono-, di- and trilysinated cationic lipids: a structure-activity investigation. *J Med Chem* 2004; **47**(8): 2123-2132.

Keminer O, Peters R. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 1999; **77**(1): 217-228.

Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem* 2006; **281**(6): 3544-3551.

Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001; **3**(2): 135-144.

Kim HS, Kim JS, Lee YK, Koo KH, Park YS. An efficient liposomal gene delivery vehicle using Sendai F/HN proteins and protamine. *Cancer Gene Ther* 2008; **15**(4): 214-224.

Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T *et al.* Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 1997; **4**(5): 409-418.

Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W *et al.* Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* 1999; **1**(2): 111-120.

Klausner RD, Van Renswoude J, Ashwell G, Kempf C, Schechter AN, Dean A *et al.* Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. *J Biol Chem* 1983; **258**(8): 4715-4724.

Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P *et al.* An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; **3**(11): 1010-1017.

Lanford RE, Kanda P, Kennedy RC. Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 1986; **46**(4): 575-582.

Laurell CB. What is the function of transferrin in plasma? *Blood* 1951; **6**(2): 183-187.

Lehmann, C.: Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen Liposomen-DNA-Komplexen für den Gentransfer, 2003. Universitätsverlag Potsdam, URN: urn:nbn:de:kobv:517-

Lee CH, Kim EY, Jeon K, Tae JC, Lee KS, Kim YO *et al.* Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection. *Stem Cells Dev* 2008; **17**(1): 133-141.

Liu X, Tian PK, Ju DW, Zhang MH, Yao M, Cao XT *et al.* Systemic genetic transfer of p21WAF-1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**(7): 529-539.

Ludtke JJ, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 1999; **112** (Pt 12): 2033-2041.

Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000; **275**(3): 1625-1629.

Lundberg M, Johansson M. Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **291**(2): 367-371.

Lyons RH, Ferguson BQ, Rosenberg M. Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol Cell Biol* 1987; **7**(7): 2451-2456.

Malek A, Czubyko F, Aigner A. PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy. *J Drug Target* 2008; **16**(2): 124-139.

Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(16): 6077-6081.

Martin ME, Rice KG. Peptide-guided gene delivery. *AAPS J* 2007; **9**(1): E18-29.

Matsui H, Johnson LG, Randell SH, Boucher RC. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**(2): 1117-1126.

Matsuoka H, Shimoda S, Ozaki M, Mizukami H, Shibusawa M, Yamada Y *et al.* Semi-quantitative expression and knockdown of a target gene in single-cell mouse embryonic stem cells by high performance microinjection. *Biotechnol Lett* 2007; **29**(3): 341-350.

Midoux P, Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem* 1999; **10**(3): 406-411.

Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(22): 12349-12354.

Modrow S, Falke D, Truyen U: *Molekulare Virologie* 2003, **2.Auflage**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Morris MC, Chaloin L, Mery J, Heitz F, Divita G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**(17): 3510-3517.

Murphy JE, Uno T, Hamer JD, Cohen FE, Dwarki V, Zuckermann RN. A combinatorial approach to the discovery of efficient cationic peptoid reagents for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(4): 1517-1522.

Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y *et al.* Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther* 2004; **10(6)**: 1011-1022.

Nakata T, Terada S, Hirokawa N. Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol* 1998; **140(3)**: 659-674.

Narita M, Bahar R, Hatano M, Kang MM, Tokuhisa T, Goto S *et al.* Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene. *Cancer Gene Ther* 2001; **8(12)**: 997-1002.

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; **1(7)**: 841-845.

Neves C, Escriou V, Byk G, Scherman D, Wils P. Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 1999; **15(3)**: 193-202.

Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H. Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol Pharm Bull* 2007; **30(4)**: 751-757.

Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; **6(4)**: 595-605.

Ogris M, Wagner E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat Cell Mol Genet* 2002; **27(1-6)**: 85-95.

Old, R.W. und Primrose, S.B. (1980). "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, University of California Press.

Orrantia E, Chang PL. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Exp Cell Res* 1990; **190(2)**: 170-174.

Pagano JS, Vaheri A. Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Arch Gesamte Virusforsch* 1965; **17**(3): 456-464.

Parente RA, Nir S, Szoka FC, Jr. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* 1990; **29**(37): 8720-8728.

Pari GS, Xu Y. Gene transfer into mammalian cells using calcium phosphate and DEAE-dextran. *Methods Mol Biol* 2004; **245**: 25-32.

Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 1994; **269**(17): 12918-12924.

Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; **273**(13): 7507-7511.

Puebla I, Esseghir S, Mortlock A, Brown A, Crisanti A, Low W. A recombinant H1 histone-based system for efficient delivery of nucleic acids. *J Biotechnol* 2003; **105**(3): 215-226.

Radler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 1997; **275**(5301): 810-814.

Rea JC, Barron AE, Shea LD. Peptide-mediated lipofection is governed by lipoplex physical properties and the density of surface-displayed amines. *J Pharm Sci* 2008.

Rejman J, Conese M, Hoekstra D. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *J Liposome Res* 2006; **16**(3): 237-247.

Rettig GR, Rice KG. Non-viral gene delivery: from the needle to the nucleus. *Expert Opin Biol Ther* 2007; **7**(6): 799-808.

Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 2003; **278**(1): 585-590.

Ritter W, Plank C, Lausier J, Rudolph C, Zink D, Reinhardt D *et al.* A novel transfecting peptide comprising a tetrameric nuclear localization sequence. *J Mol Med* 2003; **81**(11): 708-717.

Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R *et al.* Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 1989; **63**(1): 1-8.

Rudolph C, Plank C, Lausier J, Schillinger U, Muller RH, Rosenecker J. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* 2003; **278**(13): 11411-11418.

Rüger, R.: Methoden der Genübertragung. In: Handbuch der molekularen Medizin, **Band I**, Herausgeber: D.Ganten und K.Ruckpaul, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1997

Ruponen M, Yla-Herttuala S, Urtti A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1415**(2): 331-341.

Ryan SM, Mantovani G, Wang X, Haddleton DM, Brayden DJ. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; **5**(4): 371-383.

Sakai Y, Kiyotani K, Fukumura M, Asakawa M, Kato A, Shioda T *et al.* Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Lett* 1999; **456**(2): 221-226.

Schatzlein AG. Targeting of Synthetic Gene Delivery Systems. *J Biomed Biotechnol* 2003; **2003**(2): 149-158.

Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 1977; **19**(5): 621-626.

Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Scherman D, Behr JP, Demeneix BA. Lipospermine-based gene transfer into the newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio. *Hum Gene Ther* 1995; **6**(12): 1515-1524.

Schwartz B, Ivanov MA, Pitard B, Escriou V, Rangara R, Byk G *et al.* Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther* 1999; **6**(2): 282-292.

Schwarze CP, Neu S, Beck J, Mavridou K, Ranke MB, Binder G. Influence of IGF-I and cell density on MDR1 expression in the T-lymphoblastoid cell line CCRF-CEM. *Horm Res* 1999; **52**(4): 192-199.

Sebestyen MG, Ludtke JJ, Bassik MC, Zhang G, Budker V, Lukhtanov EA *et al.* DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotechnol* 1998; **16**(1): 80-85.

Seki M, Komeda Y, Iida A, Yamada Y, Morikawa H. Transient expression of beta-glucuronidase in *Arabidopsis thaliana* leaves and roots and *Brassica napus* stems using a pneumatic particle gun. *Plant Mol Biol* 1991; **17**(2): 259-263.

Serafino AL, Novelli G, Di Sario S, Colosimo A, Amicucci P, Sangiuolo F *et al.* Cellular uptake and delivery monitoring of liposome/DNA complexes during in vitro transfection of CFTR gene. *Biochem Mol Biol Int* 1999; **47**(2): 337-344.

Shen YM, Hirschhorn RR, Mercer WE, Surmacz E, Tsutsui Y, Soprano KJ *et al.* Gene transfer: DNA microinjection compared with DNA transfection with a very high efficiency. *Mol Cell Biol* 1982; **2**(9): 1145-1154.

Shoji F, Yonemitsu Y, Okano S, Yoshino I, Nakagawa K, Nakashima Y *et al.* Airway-directed gene transfer of interleukin-10 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplant fibrous airway obliteration in mice. *Gene Ther* 2003; **10**(3): 213-218.

Shubeita HE, Thorburn J, Chien KR. Microinjection of antibodies and expression vectors into living myocardial cells. Development of a novel approach to identify candidate genes that regulate cardiac growth and hypertrophy. *Circulation* 1992; **85**(6): 2236-2246.

Sikes ML, O'Malley BW, Jr., Finegold MJ, Ledley FD. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 1994; **5**(7): 837-844.

Silhol M, Tyagi M, Giacca M, Lebleu B, Vives E. Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur J Biochem* 2002; **269**(2): 494-501.

Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M *et al.* Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 1993; **4**(6): 771-780.

Singh D, Kiarash R, Kawamura K, LaCasse EC, Garipey J. Penetration and intracellular routing of nucleus-directed peptide-based shuttles (oligomers) in eukaryotic cells. *Biochemistry* 1998; **37**(17): 5798-5809.

Spruce AE, Iwata A, Almers W. The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(9): 3623-3627.

Stacey DW, Allfrey VG. Microinjection studies of duck globin messenger RNA translation in human and avian cells. *Cell* 1976; **9**(4 PT 2): 725-732.

Sternberg B, Sorgi FL, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett* 1994; **356**(2-3): 361-366.

Stoorvogel W, Geuze HJ, Griffith JM, Schwartz AL, Strous GJ. Relations between the intracellular pathways of the receptors for transferrin, asialoglycoprotein, and mannose 6-phosphate in human hepatoma cells. *J Cell Biol* 1989; **108**(6): 2137-2148.

Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL, Gallo RC. Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther* 1997; **4**(3): 226-237.

Tigyi G, Parker I. Microinjection into *Xenopus* oocytes: a precise semi-automatic instrument and optimal parameters for injection of mRNAs. *J Biochem Biophys Methods* 1991; **22**(3): 243-252.

Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem* 1997; **272**(41): 25641-25647.

Vain P, De Buyser J, Bui Trang V, Haicour R, Henry Y. Foreign gene delivery into monocotyledonous species. *Biotechnol Adv* 1995; **13**(4): 653-671.

van der Aa MA, Koning GA, d'Oliveira C, Oosting RS, Wilschut KJ, Hennink WE *et al.* An NLS peptide covalently linked to linear DNA does not enhance transfection efficiency of cationic polymer based gene delivery systems. *J Gene Med* 2005; **7**(2): 208-217.

Veldhoen S, Laufer SD, Trampe A, Restle T. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(22): 6561-6573.

Vives E. Cellular uptake [correction of uptake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J Mol Recognit* 2003; **16**(5): 265-271.

Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997; **272**(25): 16010-16017.

von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst* 1975; **55**(3): 555-560.

Wadhwa MS, Collard WT, Adami RC, McKenzie DL, Rice KG. Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug Chem* 1997; **8**(1): 81-88.

Wadhwa MS, Knoell DL, Young AP, Rice KG. Targeted gene delivery with a low molecular weight glycopeptide carrier. *Bioconjug Chem* 1995; **6**(3): 283-291.

Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(17): 7934-7938.

Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos H, Mechtler K, Curiel DT *et al.* Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(13): 6099-6103.

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(9): 3410-3414.

Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 2006; **116**(2): 255-264.

White J, Helenius A, Gething MJ. Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. *Nature* 1982; **300**(5893): 658-659.

Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursu M *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2001; **3**(4): 362-372.

Winterhalter M, Lasic DD. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem Phys Lipids* 1993; **64**(1-3): 35-43.

Wolfert MA, Seymour LW. Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. *Gene Ther* 1998; **5**(3): 409-414.

Wolschek MF, Thallinger C, Kursa M, Rossler V, Allen M, Lichtenberger C *et al.* Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice. *Hepatology* 2002; **36**(5): 1106-1114.

Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997; **8**(1): 37-44.

Wrobel I, Collins D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1235**(2): 296-304.

Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC, Jr. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 1997; **36**(10): 3008-3017.

Yang JP, Huang L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 1997; **4**(9): 950-960.

Yang K, Mu XS, Hayes RL, Qiu YH, Sorgi FL, Huang L *et al.* DC-Chol liposome-mediated gene transfer in rat spinal cord. *Neuroreport* 1997; **8**(9-10): 2355-2358.

Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(24): 9568-9572.

Ye GN, Daniell H, Sanford JC. Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* 1990; **15**(6): 809-819.

Yei S, Mittereder N, Wert S, Whitsett JA, Wilmott RW, Trapnell BC. In vivo evaluation of the safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lung. *Hum Gene Ther* 1994; **5**(6): 731-744.

Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, Farley R, Griesenbach U, Judd D *et al.* Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* 2000; **18**(9): 970-973.

Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; **270**(32): 18997-19007.

Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(1): 91-96.

Zhang Y, Rong Qi X, Gao Y, Wei L, Maitani Y, Nagai T. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J Control Release* 2007; **117**(2): 281-290.

Zhong F, Zhong ZY, Liang S, Li XJ. [Transfection of GFP mRNA in dendritic cells and analysis of some factors involved]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2006; **22**(6): 716-719.

Zhong ZR, Zhang ZR, Liu J, Deng Y, Fu Y, Song QG *et al.* Characterization of transferrin-modified procationic-liposome protamine-DNA complexes. *Yakugaku Zasshi* 2007; **127**(3): 533-539.

Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1189**(2): 195-203.

Zuhorn IS, Kalicharan D, Robillard GT, Hoekstra D. Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery. *Mol Ther* 2007; **15**(5): 946-953.

Zuidam NJ, Barenholz Y. Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1368**(1): 115-128.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung vieler Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden herzlich bedanken möchte.

Herrn Prof. D. Langosch möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung sowie sein Interesse an dieser Arbeit bedanken. Bei Herrn Prof. W. Neubert und Herrn Prof. A. Gierl bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, bei meiner Arbeit als Prüfer bzw. Prüfungsvorsitzender mitzuwirken.

Herrn Dr. M. Watzel danke ich für die bereitgestellten Mittel sowie seinen Einsatz und die Unterstützung bei allen nötigen Anschaffungen, die für diese Arbeit unerlässlich waren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Lieblingskolleginnen und Kollegen Elvira Bantle, Claudia Kirr, Marcus Schmid, Thomas Nikolaus und Claudia Vorwerk für die hilfreiche Unterstützung in technischen und praktischen Fragen, sowie für ein sehr angenehmes Arbeitsklima, welches die wenigen schwierigen Momente zu überwinden half. Auch die aufmunternden Worte sowie unzählige, leckere Kuchen versüßten den Alltag ungemein. Danken möchte ich natürlich auch meinen beiden Praktikantinnen Ana Villalba Izquierdo und Ulrike Weirauch, die mir beide sehr geholfen haben und hoffentlich auch einiges lernen konnten.

Herrn Dr. M. Gütlich danke ich für seine große Hilfe bei der Herstellung verschiedener Liposomen und für die hilfreichen Anregungen und vielen Tipps, wodurch ich nicht nur viel Zeit sparen, sondern auch einiges lernen konnte.

Diese Arbeit wäre jedoch ohne die Hilfe meiner Eltern und meines Bruders nicht möglich gewesen, welche mich in jeder Phase unterstützten und es mir ermöglichten, mich auf meine Arbeit zu konzentrieren. Dies gilt natürlich besonders für meine Freundin Barbara. Bei ihr konnte ich mir meine Gedanken, Ideen und auch Sorgen bei dieser Arbeit von der Seele reden.

Ich bedanke mich natürlich auch bei allen Freunden und Bekannten, die stets für ausreichend geistige und physische Abwechslung die Jahre über sorgten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Michael Schurig
Geburtsdatum 22.06.1978
Geburtsort Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

Promotion

06/2005-07/2008 Promotion zum Dr. rer. nat. am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere der TU München in Freising

Studium

11/1999-02/2005 Molekularbiologie an der TU München mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, medizinische Virologie und Genetik
Abschluss mit Diplom (Note 1,4)
Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit dem Titel: „Herstellung rekombinanter Viren für die Impfstoffentwicklung“ (Note 1,3).

Schulausbildung

1992-1999 Herder-Oberschule (Gymnasium) in Berlin-Charlottenburg,
Abschluss Abitur (Note 1,7)

Weiterbildungen

10/2007 2-tägiger Basiskurs DIN ISO 9001 bei der PromoCell Academy
07/2007 6-tägiges Intensivseminar „QS/GMP-Beauftragter in der pharmazeutischen Industrie“ bei der concept Heidelberg GmbH
Abschluss Zertifikat mit Prüfung