Transfektionseffizienz von Lipid/DNA-Komplexen – Charakterisierung und Identifizierung zellulärer Transfektionsbarrieren von DC 30[®]/DNA-Komplexen



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Annette Steinbach

aus Neu-Ulm

2012



Die vorliegende Dissertationsschrift wurde von Januar 2009 bis Oktober 2012 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Regine Süss am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. Andreas Bechthold
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Thorsten Koslowski
Referentin:	Prof. Dr. Regine Süss
Korreferent:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Drittprüfer:	Prof. Dr. Norbert Klugbauer
Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	08.11.2012

Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.

(Winston Churchill)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Publikationen

Annette Steinbach, Regine Süss

Cellular and nuclear uptake of plasmid DNA represent the rate-limiting steps of cell transfection by lipid-mediated gene delivery

Publikation in Vorbereitung

Sebastian Schneider, Annette Steinbach, Regine Süss

Uptake, cellular processing and intracellular dissociation of lipid/DNA complexes in different cellular models

Manuskript fertig gestellt

<u>Detlef Gabel</u>, Alexander Burghardt, Tanja Schaffran, Annette Steinbach, Melinda Bartok, Rolf Schubert, Regine Süss Cellular Interaction of Liposomes Containing Boron Lipids Publikation in Vorbereitung

Vorträge

Annette Steinbach, Regine Süss

Transfection barriers in A-10 SMC and MDCK II cells – A closer look at the intracellular distribution pattern of lipid/DNA complexes 8. *Pharmazie-Workshop, Oberjoch, 2009*

<u>Annette Steinbach</u>, Regine Süss Endocytosis of lipid/DNA complexes – investigation of intracellular processing by fluorescence based methods 20th Mountain/Sea Liposome Workshop, Ameland (Holland), 2009

<u>Annette Steinbach</u>, Regine Süss Nanopartikuläre Gentransfersysteme – Entschlüsselung möglicher Transfektionsbarrieren von Lipid/DNA-Komplexen *Symposium des Fördervereins für Arzneimittelforschung (FAF), Freiburg, 2010*

Annette Steinbach, Regine Süss

Passing through cellular transfection barriers in lipid-mediated gene transfer 21st Mountain/Sea Liposome Workshop, Oberjoch /Allgäu, 2011

Annette Steinbach, Regine Süss

Probing the cellular transfection efficiency of DC 30[®]/DNA complexes 10. *Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), 2012*

Posterpräsentationen

Sebastian Schneider, Annette Steinbach, Regine Süss Processing of lipid/DNA complexes in different cellular models

Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Freiburg, 2009

Annette Steinbach, Regine Süss

Quantifying nuclear import of lipoplex-delivered pDNA in A-10 SMC and MDCK II cells 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Graz (Österreich), 2010

<u>Annette Steinbach</u>, Regine Süss Quantitative Imaging – A new approach to quantify nuclear import of lipoplex-delivered pDNA DPhG Jahrestagung, Braunschweig, 2010

<u>Annette Steinbach</u>, Regine Süss Improving transfection efficiencies of lipid-mediated gene delivery – Influence of the lipid/DNA complex preparation technique *Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Freiburg, 2011*

Annette Steinbach, Regine Süss Studying nuclear uptake of lipoplex-delivered pDNA as potential transfection barrier in lipidmediated gene delivery

8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul (Türkei), 2012

1	Einl	leitung	. 1
1.1	Nan	ocarrier und Gentherapie	. 1
1.2	Lipi	d/DNA-Komplexe	. 3
1.3	Zellı	uläre Barrieren für Lipid/DNA-Komplexe	. 5
	1.3.1	Zelluläre Assoziation	. 5
	1.3.2	Zelluläre Aufnahme	. 6
	1.3.3	Intrazelluläre Prozessierung	10
	1.3.4	Nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA	11
1.4	Einf	führung der verwendeten Methoden und Zelllinien	12
	1.4.1	Durchflusszytometrie	12
	1.4.2	Quantitative Imaging	14
	1.4	.2.1 Konfokale Mikroskopie	14
	1.4	.2.2 Konfokale Kolokalisationsstudien	15
	1.4	.2.3 CellProfilerTM Software	16
	1.4.3	Zelllinien	17
1.5	Ziels	setzung der Arbeit	18
2	Mat	terial und Geräte2	20
2.1	Lipi	de und Transfektionsreagenzien	20
2.2	Plas	mid	20
2.3	Fluo	preszenzfarbstoffe	21
2.4	Anti	ikörperź	22
2.5	Che	mikalien und Reagenzien	23
2.6	Puff	fer	25

2.7	Zell	len	
2.8	Rea	agenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung	
2.9	Ver	rbrauchsmaterialien	
2.10) Ger	räte	
3	Me	ethoden	31
3.1	Her	rstellung von DC 30 [®] -Ausgangsliposomen	
	3.1.1	Herstellung der Lipid-Aliquots	
	3.1.2	Bestimmung des Lipidgehalts nach Bartlett	
	3.1.3	Liposomenherstellung	
3.2	Gev	winnung und Charakterisierung der Plasmid-DNA	
	3.2.1	Herstellung von kompetenten E. coli	
	3.2.2	Transformation von kompetenten E. coli	
	3.2.3	Isolierung des Plasmids	
	3.2.4	Bestimmung der Plasmidkonzentration und –reinheit	35
	3.2.5	Fluoreszenzmarkierung der Plasmid-DNA	35
3.3	Her	rstellung von Lipid/DNA-Komplexen	
3.4	Cha	arakterisierung von DC 30 [®] -Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Kor	nplexen 37
	3.4.1	Größenbestimmung von Liposomen und Lipid/DNA-Komplexen	
		mittels Photonenkorrelationsspektroskopie	
	3.4	4.1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Li Komplexen	pid/DNA- 38
	3.4	4.1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Ko	omplexen 39

	3.4.2	Charakterisierung von Liposomen und Lipid/DNA-Komplexen mittels	
		Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)	39
3.5	Hers	tellung von Lipid/Protamin/DNA-Komplexen (LPD)	40
3.6	Kulti	ivierung von A-10 SMC und MDCK II-Zellen	41
3.7	Durc	hflusszytometrie	41
	3.7.1	Bestimmung der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen	41
	3.7.2	Bestimmung der zellulären Aufnahme von Endozytosemarkern	42
	3.7.3	Bestimmung der Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen	43
	3.7.4	Bestimmung der Transgenexpressionsstärke	43
	3.7.5	Bestimmung des Einflusses der kovalenten Cy3-Markierung auf die Bioaktivität der Plasmid-DNA	43
	3.7.6	Abhängigkeit der Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen von der Zellproliferationsrate	44
	3.7.7	Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen - Einfluss von Endozytoseinhibitoren und – enhancern	45
	3.7.8	Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen nach Modifizierung mit TATp	46
	3.7.9	Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen nach Hemmung der endosomalen Freisetzung durch Bafilomycin A ₁	47
	3.7.10	Bestimmung der Transfektion von MDCK II-Zellen mit Lipid/Protamin/DNA-Komplexen (LPD)	47
3.8	Quar	ntifizierung der intrazellulären Plasmidmenge	48
	3.8.1	Erstellung der Kalibriergeraden für R-PE und Cy3-CTP am	19
	301	Zallvareucha	40 10
	3.8.2 2.9.2		49
	3.8.5	Auswertung	49

IV	Inhaltsverzeichnis
1 1	minutes ver Zerennins

3.9	Fluo	reszenzmikroskopie	51
	3.9.1	Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der nukleären	
		Aufnahme von Cy3-DNA	51
	3.9.2	CellProfiler TM -Analysen	52
	3.9.3	Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der nukleären	
		Aufnahme von Cy3-DNA nach Inkubation mit endozytoseaktiven	
		Substanzen	53
	3.9.4	Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der intrazellulären	
		Prozessierung von Cy3-DNA-Komplexen	53
3.1	0 Besti	immung der Zellviabilität und -toxizität	54
	3.10.1	Zellviabilität	54
	3.10.2	Zelltoxizität	55
3.1	1 Stati	stik	56
4	T.		5 0
4	Erge	ebnisse und Diskussion	58
4 4.1	Erge Chai	ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/– US DC 30 [®] /DNA-Komplexen	58 58
4 4.1	Erge Char 4.1.1	ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/– US DC 30 [®] /DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	 58 58 58
4 4.1	Erge Char 4.1.1 4.1.	ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/– US DC 30 [®] /DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E	 58 58 58 DNA-
4 4.1	Erge Char 4.1.1 4.1.	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen 	 58 58 58 DNA- 59
4	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1.	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen 1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komp 	 58 58 58 DNA- 59 lexen
4	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1.	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/DKomplexen 1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen 	58 58 58 DNA- 59 lexen 60
4	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen 1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) 	58 58 58 DNA- 59 lexen 60 63
4	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.2 4.1.3	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen 1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komp Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) Zusammenfassung und Diskussion 	58 58 58 DNA- 59 lexen 60 63 65
4 4.1 4.2	Erge Chan 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.2 4.1.3 Zellu	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen	58 58 DNA- 59 lexen 60 63 65
4 4.1 4.2	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.2 4.1.3 Zellu 4.2.1	 ebnisse und Diskussion rakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) 1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/E Komplexen	58 58 DNA- 59 lexen 60 63 65 67 68
4 4.1 4.2	Erge Chan 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.2 4.1.3 Zellu 4.2.1 4.2.2	 ebnisse und Diskussion	58 58 DNA- 59 lexen 60 63 65 67 68 71
4 4.1 4.2	Erge Char 4.1.1 4.1. 4.1. 4.1.2 4.1.2 4.1.3 Zellu 4.2.1 4.2.2 4.2.	 ebnisse und Diskussion	58 58 DNA- 59 lexen 60 63 65 67 68 71

4.2	.2.2	Zusammenfassung und Diskussion	75
4.2.3	Transf	ektion von +/– US DC 30 [®] /DNA-Komplexen	76
4.2.4	Quanti	ifizierung der intrazellulären Plasmidmenge	78
4.2	.4.1	Intrazelluläre Quantifizierung von Cy3-DNA-Plasmidkopien mittels QuantiBRITE TM PE-Beads	78
4.2	.4.2	Intrazelluläre Quantifizierung von Cy3-DNA-Plasmidpartikeln mittels CellProfiler TM	81
4.2	.4.3	Zusammenfassung und Diskussion	85
4.2.5	Nukleä	äre Aufnahme von pDNA	86
4.2	.5.1	CellProfilerTM-Analyse 1: Messung der Kernintensität	88
4.2	.5.2	CellProfiler TM -Analyse 2: Bestimmung der Anzahl an nukleären Cy3-DNA- Partikeln	.90
4.2	.5.3	Bewertung der nukleären Aufnahmeeffizienz	92
4.2	.5.4	Zusammenfassung und Diskussion	93
4.2.6	Einflus Kom	ss der Zellteilung auf die Transfektion von DC 30 [®] /DNA-	95
4.2.7	Transg	genexpression nach +/- US DC 30 [®] /pEGFP-Transfektion	97
4.2.8	Steiger Zellı	rung der zellulären Aufnahme von DC 30 [®] /DNA-Komplexen im modell MDCK II	99
4.2	.8.1	Modifizierung von DC 30®/DNA-Komplexen mit TATp 1	100
4.2	.8.2	Einsatz von Endozytoseenhancern 1	101
4.2	.8.3	Zusammenfassung und Diskussion1	105
4.2.9	Bewer	tung der Clathrin-Prozessierung 1	06
4.2	.9.1	Zusammenfassung und Diskussion1	109
4.2.10	Intraze	elluläre Prozessierung von DC 30 [®] /DNA-Komplexen 1	10
4.2	.10.1	Konfokale Kolokalisationsstudien zur Prozessierung von Lipid/DNA- Komplexen über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytosewege 1	110
4.2	.10.2	Zusammenfassung und Diskussion1	14
4.2	.10.3	Endosomale Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen 1	116

VI	Inhaltsverzeichnis
· •	

6	Literaturverzeichnis	128
5	Zusammenfassung und Ausblick	121
	Komplexen (LPD)	118
	4.2.11 Transfektion des Negativmodells MDCK II mit Lipid/Protamin/DN	A-
	4.2.10.4 Zusammenfassung und Diskussion	117

Abkürzungsverzeichnis

А	Absorption
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units
baf1	Bafilomycin A ₁
BP	band pass filter
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Cav-1	Caveolin-1
Chol	Cholesterol
clz	Chlorpromazin
cm	Zentimeter
Cryo-TEM	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
d	hydrodynamischer Durchmesser
Da	Dalton
DC 30 [®]	DC-Cholesterol + DOPE 3/7 (m/m)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DOTAP	Dioctadecenoyltrimethylammoniumpropan
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
Em	Emission
Ex	Excitation
FCS	fetal calf serum
fil	Filipin
FL	Fluoreszenzkanal
×g	x-fache Erdbeschleunigung
g, mg, μg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm

gen	Genistein
GeoMean	Geometrisches Mittel
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
Ι	Fluoreszenzintensität
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
l, ml, µl, nl	Liter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter
Laccer	Lactosylceramid
LAMP1	lysosomal associated membrane protein-1
LP	long pass filter
LPD	Lipid/Protamin/DNA
LSM	laser scanning microscope
m	Masse
m, cm, mm, μm, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
m, cm, mm, μm, nm min	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute
m, cm, mm, μm, nm min M	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient
m, cm, mm, μm, nm min M M, mM, μM	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar
m, cm, mm, μm, nm min M M, mM, μM mol	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar Mol
m, cm, mm, μm, nm min M M, mM, μM mol Mr	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar Mol relative Molmasse
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar Mol relative Molmasse Mittelwert
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW n	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar Mol relative Molmasse Mittelwert
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW n NA	 Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer Minute Manders Kolokalisationskoeffizient molar, millimolar, mikromolar Mol relative Molmasse Mittelwert Anzahl der unabhängigen Wiederholungen eines Experiments Numerische Apertur
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW n NA NALS	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, NanometerMinuteManders Kolokalisationskoeffizientmolar, millimolar, mikromolarMolrelative MolmasseMittelwertAnzahl der unabhängigen Wiederholungen eines ExperimentsNumerische Apertur <i>Non-Negatively constrained Least Squares</i>
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW n NA NALS NLS	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, NanometerMinuteManders Kolokalisationskoeffizientmolar, Kolokalisationskoeffizientmolar, millimolar, mikromolarMolrelative MolmasseMittelwertAnzahl der unabhängigen Wiederholungen eines ExperimentsNumerische AperturNon-Negatively constrained Least Squaresnuclear localization signal
m, cm, mm, µm, nm min M M, mM, µM mol Mr MW n NA NAS NLS Ø	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, NanometerMinuteManders Kolokalisationskoeffizientmolar, millimolar, mikromolarMolrelative MolmasseMittelwertAnzahl der unabhängigen Wiederholungen eines ExperimentsNumerische AperturNon-Negatively constrained Least Squaresnuclear localization signalDurchmesser
m, cm, mm, µm, nm min M M M, mM, µM mol Mr MW n NW n NA NNLS NLS NLS Ø PBS	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, NanometerMinuteManders Kolokalisationskoeffizientmolar, millimolar, mikromolarMolrelative MolmasseMittelwertAnzahl der unabhängigen Wiederholungen eines ExperimentsNumerische AperturNon-Negatively constrained Least Squaresnuclear localization signalDurchmesserphosphate buffered saline

PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s, ms, µs	Sekunde, Millisekunde, Mikrosekunde
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SPIT	sterol-based post insertion technique
Т	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
UV	ultraviolett
V	Volumen
Z _{ave}	Z-average (mittlerer intensitätsgewichteter Partikeldurchmesser)
ζ	Zetapotential

1 Einleitung

1.1 Nanocarrier und Gentherapie

Die Nanotechnologie beschäftigt sich mit Partikeln in der Größenordnung von Nanometern $(1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m})$ und erlangte in den letzten Jahrzehnten unter anderem in den medizinischen und pharmzeutischen Anwendungsbereichen an großer Bedeutung. Ein Meilenstein stellte die Entwicklung von Nanocarriern als Arzneistoffträgersysteme für Wirkstoffe wie Zytostatika, Antiinfektiva, Vakzine oder DNA dar (Biopharmazeutika). In der Praxis bewegen sich Nanocarrier im Partikelgrößenbereich von 10 - 400 nm. Die Anforderungen, die an die Trägersysteme gestellt werden, sind vielfältig (Vercauteren *et al.* 2012):

- hohe Sicherheit der eingesetzten Systeme durch geringe Immunogenität bzw. Toxizität
- ausreichender Schutz des transportierten Arzneistoffes vor enzymatischem Abbau
- Umgehung des angeborenen Immunsystems
- gute Gewebeverteilung
- Reduktion von Nebenwirkungen durch spezifisches Ansteuern der Zielzellen
- effiziente Freisetzung des transportierten Arzneistoffes im gewünschten Zielkompartiment

Der Einsatz von Nukleinsäuren als Biopharmazeutika begründete Ende der 80er Jahre die Gentherapie (www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical). Das Haupteinsatzgebiet für gentherapeutische Ansätze sind Krebserkrankungen, daneben wird der Einsatz bei Infektionskrankheiten, kardiovaskulären Krankheiten oder monogenen Erbkrankheiten untersucht. Genetisch bedingte Erkrankungen wie Mukoviszidose, Muskeldystrophie oder rheumatoide Arthritis sind häufig mit der Überexpression oder fehlerhaften Expression einzelner Gene assoziiert (Opalinska & Gewirtz 2002). Mittels viraler bzw. nicht-viraler Gentransfersysteme sollen therapeutische Nukleinsäuren (Plasmid-DNA oder siRNA) in die Zielzellen bzw. -gewebe eingebracht werden. Durch die Expression und Funktion dieser Gene soll therapeutischer oder präventiver Nutzen vermittelt und somit die Funktionalität der "erkrankten" Gene erhalten werden (Zhang *et al.* 2010).

2 Einleitung

Der Einsatz von viralen Vektoren beschränkt sich dabei auf nicht vermehrungsfähige, attenuierte Viren, die von Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren oder Herpes simplex-Viren abgeleitet sind (Kay *et al.* 2001). Virale Gentransfersysteme zeichnen sich zwar durch ihre hohe Effizienz aus, jedoch ist nach wie vor mit einer erhöhten Gefahr spontaner Mutationen zu rechnen (Ferber 2001, Pouton & Seymour 2001, Simon *et al.* 1993). Die Integrationsstelle der Nukleinsäure in das Genom der Zielzelle ist nicht vorhersehbar und birgt somit das Risiko einer potentiellen Funktionsstörung eines bisher intakten Gens. Beeinträchtigung der normalen Zellwachstumfunktion kann zu ungerichtetem Wachstum und somit zur Tumorbildung führen, wodurch eine neue genetisch bedingte Krankheit ausgelöst werden kann (insertionelle Mutagenese). Aber auch das transfizierte Gen an sich kann an der Tumorentstehung entscheidend beteiligt sein. Weitere häufige Nebenwirkungen nach viraler Gentherapie sind auf die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zurückzuführen (Baum *et al.* 2003, Karmali & Chaudhuri 2007).

Um dieser Problematik zu begegnen, konzentrierte sich die Aufmerksamkeit vermehrt auf den Einsatz nicht-viraler Gentransfersysteme, die eine geringere Toxizität wie auch Immunogenität aufweisen (Hoekstra et al. 2007, Li & Szoka 2007). Neben Polymer- und Nanopartikel-basierten Nanocarriern werden auch kationische Lipide als Vektoren für Plasmid-DNA eingesetzt. In den ersten in-vivo Versuchen im Jahr 1989 konnte das CAT (Chloramphenicol-Transferase)-Gen erfolgreich mittels Lipofektion in pulmonale Zellen von Mäusen transfiziert werden (Brigham et al. 1989). Das therapeutische Potential von Lipid/DNA-Komplexen beim Einsatz in-vivo konnte 1993 in einer ersten klinischen Studie am Menschen gezeigt werden. Dort gelang die erfolgreiche Transfektion des HLA-B7-Gens in HLA-B7-negative Patienten mit fortgeschrittenem Melanom (Stadium IV) und demonstrierte gleichzeitig die Effizienz und Sicherheit des eingesetzten DC-Cholesterol/DOPE-Trägers (Nabel et al. 1993). Trotz erster therapeutischer Erfolge mit nicht-viralen Gentransfersystemen bleiben diese den viralen Strategien bis heute in ihrer Effizienz deutlich unterlegen.

Gentransfer in Keimzellen (Ei- und Samenzellen), sogenannter "Keimbahngentransfer", ist durch das Embryonenschutzgesetz in Deutschland verboten. Der Einsatz von gentherapeutischen Arzneimitteln ist ausschließlich für Körperzellen (somatische Zellen) erlaubt, deren genetische Information nicht weitervererbt werden (somatische Gentherapie). Zum heutigen Zeitpunkt befinden sich weltweit 1786 gentherapeutische Ansätze in klinischen Studien (www.wiley.co.uk/genmed/clinical; Stand 2012), dabei liegt der Anteil der klinischen Phasen III und IV unter 5 %. Zur Gesamtheit der eingesetzten Vektorsysteme tragen lipidbasierte Vektoren lediglich mit 6 % bei.

1.2 Lipid/DNA-Komplexe

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Lipid/DNA-Komplexen als einem Vertreter der nicht-viralen Gentransfersysteme. Lipid/DNA-Komplexe wurden erstmalig durch Felgner et al. im Jahre 1987 eingeführt (Felgner *et al.* 1987). Die Herstellung der Komplexe gestaltet sich denkbar einfach durch Mischen der Einzelkomponenten (kationische Liposomen und anionische Plasmid-DNA). Die Komplexbildung erfolgt spontan durch elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den positiv geladenen Kopfgruppen der Lipide und den negativ geladenem Phosphat-Rückgrat der Plasmid-DNA (Felgner *et al.* 1987). Trotz der einfachen Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen ist der Prozess an sich, und damit die sich bildenden Komplexstrukturen, schwer kontrollierbar und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Elouahabi & Ruysschaert 2005). Als kationisches Lipid wird in der vorliegenden Arbeit die Lipidmischung DC 30[®] (DC-Cholesterol/DOPE 3:7 (w/w)) eingesetzt.



Abbildung 1-1:Strukturformeln der Lipidmischung DC 30®DC-Cholesterol (3β-N[N', N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-Cholesterol-HCl) und
DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) werden im Verhältnis 3:7 (m/m)
eingesetzt.

4 Einleitung

In vorausgehenden Arbeiten konnten mit dieser Lipidmischung akzeptable zelluläre Transfektionsraten bei geringer Toxizität der Komplexe erzielt werden (Gao & Huang 1991, Kiefer *et al.* 2004). Für die zelluläre Toxizität der Komplexe ist die kationische Lipidkomponente verantwortlich (Lv *et al.* 2006). Weiterhin wurde das Ladungsverhältnis +/- (Lipid / DNA) optimiert (Schneider 2010), so dass in der vorliegenden Arbeit Lipid/DNA-Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von 1,6/1 (+/-) eingesetzt werden. Ein leichter kationischer Ladungsüberschuss begünstigt die zelluläre Transfektionseffizienz durch bessere Interaktion des Nanocarriers mit der anionischen Zellmembran (Sakurai *et al.* 2000). Als DNA-Komponente wird der pEGFP-C1-Vektor als Modell-DNA eingesetzt (vergleiche 3.2).



Abbildung 1-2: pEGFP-C1-Vektorkarte

1.3 Zelluläre Barrieren für Lipid/DNA-Komplexe

Die Effizienz eines Gentransfersystems wird primär durch die Fähigkeit, zelluläre Barrieren zu überwinden, bestimmt. Als Hürden sind unter anderem die zelluläre Aufnahme, die intrazelluläre Prozessierung, die Freisetzung der Plasmid-DNA sowie die nukleäre Aufnahme und die Expression des transfizierten Gens zu nennen (Le Bihan *et al.*, Rejman *et al.* 2006). Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist nur wenig über den genauen Ablauf der beteiligten zellulären Prozesse bekannt. Diese variieren je nach betrachtetem Zellsystem nicht nur in der Kinetik der zellulären Aufnahme, sondern auch im Aufnahmemechanismus und der sich daraus ergebenden intrazellulären Prozessierungsroute. Die interzelluläre Individualität wie auch die Eigenschaften des Nanocarriers an sich beeinflussen das zelluläre Verhalten der Trägersysteme (Sahay *et al.* 2010). Um die Effizienz eines Nanocarriers auf den verschiedenen zellulären Stufen analysieren und bewerten zu können bedarf es etablierter und aussagekräftiger Methoden mit Hilfe denen klare Regeln zum Design der Carrier aufgestellt werden können.

1.3.1 Zelluläre Assoziation

Der erste Kontakt zwischen Lipid/DNA-Komplex und Zielzelle erfolgt unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Komplexe mit negativ geladenen Glycosaminoglykanen (GAGs) wie Chondroitinsulfat auf der Zelloberfläche (Mislick & Baldeschwieler 1996). Bei den Proteoglykanen handelt es sich um komplexe Protein-Polysaccharid-Strukturen, die aus einem membranverankerten Teil, einem Kernprotein und einem extrazellulären GAG-Substituenten bestehen (Belting 2003). Heparansulfatproteoglykane spielen eine wichtige Rolle als primäre Bindestelle für kationische Gentransfersysteme wie Lipid/DNA-Komplexe (Kopatz et al. 2004, Mislick & Baldeschwieler 1996, Mounkes et al. 1998). Nach Bindung der Komplexe an die Zelloberfläche wird anschließend die zelluläre Endozytosemaschinerie aktiviert und der Nanocarrier internalisiert.

1.3.2 Zelluläre Aufnahme

Die erste und wichtigste Transfektionsbarriere für Lipid/DNA-Komplexe stellt die Internalisierung des Carriers in die Zielzelle dar. Als Hauptaufnahmemechanismus werden hier endozytotische Prozesse diskutiert (Khalil et al. 2006). Per Definition wird bei der Endozytose das zu internalisierende Gut durch lokales Ein- bzw. Ausstülpen der Plasmamembran umschlossen und nach Abschnürung des gebildeten Vesikels in die Zelle aufgenommen (Mayor & Pagano 2007). Die in Säugetierzellen bekannten Endozytosemechanismen können durch die Anordnung in der Plasmamembran, der zugrundeliegenden Endozytosemaschinerie und der damit verbundenen intrazellulären Prozessierung des aufgenommenen Liganden differenziert werden (Vercauteren et al. 2012). Eine Übersicht über die zum heutigen Zeitpunkt bekannten Endozytosemechanismen ist in Abbildung 1-3 dargestellt.



Abbildung 1-3: Klassifizierung der bekannten Endozytosewege in Säugetierzellen

"Endozytose" lässt sich zunächst einmal in die Unterkategorien "Phagozytose" und "Pinozytose" einteilen. Unter Phagozytose wird die zelluläre Aufnahme von festen großen Partikeln ($25 \text{ nm} - 20 \mu \text{m}$) sowie Bakterien verstanden und ist in der Regel auf spezialisierte Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten oder dendritische Zellen beschränkt (Germain 2004, Swanson 2008). Nach Opsonisierung der Partikel mit IgG-Antikörpern oder Komplementproteinen werden diese durch spezialisierte Zellen erkannt, aufgenommen und lysosomal abgebaut (Aderem & Underhill 1999).

Pinozytose hingegen bedeutet die zelluläre Aufnahme von kleineren Flüssigkeitsmengen sowie darin gelöster Substanzen und ist im Gegensatz zur Phagozytose in sämtlichen Zelltypen ubiquitär vorhanden (Sahay *et al.* 2010). Eine Möglichkeit der Klassifizierung der hier einzuordnenden Endozytosewege beruht auf den beteiligten Proteinen. So können Makropinozytose, Clathrin-abhängige- und Clathrin-unabhängige Endozytose unterschieden werden. Die Clathrin-unabhängige Endozytose kann weiterhin in Caveolae-, Arf 6-, Flotillinund CLIC/GEEC-abhängige Endozytose unterteilt werden. Die verschiedenen Endozytosewege werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Makropinozytose

Makropinozytose dient der Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen in Makropinosomen mit einem Durchmesser von 0,2 – 10 µm (Kirkham & Parton 2005). Charakteristisch ist das Auftreten von Membranausstülpungen, die spontan oder unter Einfluss von Wachstumsfaktoren bzw. bestimmten Bakterien (Shigella, Salmonella) geformt werden. Die genaue Regulation der Makropinozytose ist noch nicht im Detail verstanden, eine Beteiligung von Rezeptortyrosinkinasen an der Aktivierung des Weges konnte allerdings gezeigt werden (Mercer & Helenius 2009). Brefeldin A-ADP ribosyliertes Substrat (BARS), Substrat der p21-aktivierten Kinase (PAK1), konnte eine Schlüsselrolle in der Verschließung der Makropinosomen zugeordnet werden (Liberali et al. 2008). PAK1 ist auf den Makropinosomen lokalisiert und für die Regulierung des Zytoskeletts während der Makropinozytose mitverantwortlich (Dharmawardhane et al. 2000).

Clathrin-abhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Internalisierung von Substanzen verläuft rezeptorvermittelt. So wird beispielsweise Cholesterol in Form von *low density lipoprotein* (LDL) über LDL-Rezeptoren oder Eisen in Form von Transferrin (Tf) über den Tf-Rezeptor aufgenommen. Weiterhin sind Clathrin-abhängige Endozytoseprozesse an der Regulation der zellulären Signaltransduktion durch Internalisierung von Rezeptoren beteiligt (Sahay *et al.* 2010). Im Zuge der Aufnahme polymerisiert das zytosolische Protein Clathrin-1 mit Hilfe der Adapterproteine AP180 und AP-2 und führt somit zur Bildung eines Clathrin-ausgekleideten Vesikels mit einem Durchmesser von etwa 120 nm (*clathrin coated pit*). Diese Vesikel werden Dynaminvermittelt (*small GTPase*) von der Plasmamembran abgeschnürt und mittels des Aktinzytoskeletts intrazellulär zu endosomalen Kompartimenten prozessiert (Pucadyil & Schmid 2009). Nach der Depolymerisation des Clathrin-Gerüsts können die Vesikel mit den

frühen Endosomen fusionieren. Der intravesikuläre pH-Wert wird damit einhergehend auf etwa 6,0 abgesenkt. Die internalisierte Fracht kann über frühe Endosomen zum Golgi-Apparat oder über Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert werden (Rappoport 2008). Die Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen (*"maturation modell"*) wird von der weiteren Acidifizierung der Vesikel (pH 5,0-6,0) sowie intraluminaler Vesikelbildung begleitet. Die Fusion der *multivesicular bodies* mit den Lysosomen resultiert im Abbau der aufgenommenen Fracht durch die Vielzahl an hier vorhandenen Hydrolasen (Luzio *et al.* 2007).

Clathrin-unabhängige Endozytose

Alle unter dem Begriff "Clathrin-unabhängig" eingeordneten Endozytosewege gehen aus hydrophoben, cholesterol- und glykosphingolipidreichen Membrandomänen, sogenannten lipid rafts hervor (Mayor & Pagano 2007). Die genaue Funktion dieser lipid rafts ist nicht abschließend geklärt, sie dienen in der Plasmamembran als "dynamische Membranmikrodomänen", in denen Endozytoseund Signaltransduktionsrezeptoren geclustert werden können (Kirkham & Parton 2005).

Caveolae-abhängige Endozytose

Caveolae stellen eine Untergruppe der lipid rafts dar und weisen eine charakteristische flaschenförmige Struktur mit einer Größe von 60 – 80 nm auf. Sie bestehen hauptsächlich aus dem Protein Caveolin-1 und werden durch sogenannte Cavine stabilisiert (Drab et al. 2001). Neben Caveolin-1 kommen zelllinienabhängig weitere Isoformen des Proteins vor (Caveolin-2 und -3) (Galbiati et al. 2001). Caveolae finden sich vor allem in Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen (Doherty & McMahon 2009). Nachdem die zu internalisierende Fracht an die *lipid rafts* der Plasmamembran gebunden hat, wird diese eingestülpt und die Caveolae-Vesikel ebenfalls Dynamin-abhängig abgeschnürt. Im Folgenden fusionieren die Vesikel entweder mit neutralen Caveosomen oder auch frühen Endosomen (Sharma et al. 2003, Wong et al. 2007). Die Umgehung des Lysosoms bei Caveolae-abhängiger Prozessierung ist daher möglich, aber nicht zwangsläufig gegeben. Zur Aufklärung der Caveolae-Prozessierung trug wesentlich das Simian Virus 40 (SV 40) bei, das selbst über Caveolin-1-positive Vesikel in die Zellen aufgenommen und über neutrale Caveosomen zum Golgi-Apparat transportiert wird (Pelkmans et al. 2001). Caveolae sind neben endozytotischen auch an transzytotischen Prozessen beteiligt (Schnitzer et al. 1994). Caveolae-abhängige Endozytose kann durch die Anwesenheit von Liganden wie SV 40, Choleratoxin-B (CTXB), Shigatoxin oder Lactosylceramid induziert werden (Sharma *et al.* 2004).

Flotillin-abhängige Endozytose

Flotilline sind ubiquitär vorkommende membrangebundene Proteine, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu Caveolin-1 aufweisen. Sie sind in verschiedenste zelluläre Prozesse wie T-Zell-Aktivierung, Membrantransport, Zellbeweglichkeit, etc. miteingebunden (Vercauteren *et al.* 2012). Unverzichtbar scheinen sie bei der zellulären Aufnahme von Glykophosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen wie CD 59 zu sein (Glebov *et al.* 2006). Flotillin-1 und -2 dimerisieren und lösen somit den Endozytosemechanismus aus (Frick *et al.* 2007). Flotilline sind sowohl an Dynamin-abhängigen wie auch –unabhängigen Endozytoseprozessen beteiligt, zum genaueren Verständnis dieser bedarf es allerdings noch weiterer Aufklärung.

CLIC/GEEC-abhängige Endozytose

Glycosphingolipide, bakterielle Toxine und verschiedene GPI-verankerte Proteine werden Dynamin-unabhängig Plasmamembraneinstülpungen Clathrinund über tubuläre (CLICs: clathrin independent carriers) aufgenommen (Lundmark et al. 2008). CLICs zeichnen sich durch Abwesenheit von Caveolin-1 und Flotillin-1 aus, sind allerdings mit der Aktivität der kleinen GTPasen Cdc42 und Arf 1 assoziiert. GPI-abhängige Proteine werden in CLIC-Vesikeln zu GPI-angereicherten frühen endosomalen Kompartimenten (GEECs: GPI-enriched endosomal compartments) prozessiert (Sabharanjak et al. 2002).

Als weitere Clathrin-unabhängige Endozytosewege sind RhoA- sowie Arf 6-abhängige Endozytose beschrieben. RhoA-abhängige Endozytose ist an der Internalisierung des Interleukin-2-Rezeptors beteiligt, Arf 6-abhängige Endozytose spielt bei der Aufnahme von MHC-I-Proteinen sowie Integrinen eine Rolle (Lamaze *et al.* 2001).

Welche Endozytosewege an der zellulären Aufnahme eines Nanocarriers beteiligt sind, hängt unter anderem von den Trägereigenschaften (Carrier-Zusammensetzung, Partikelgröße, Oberflächenladung, Konformation, etc.) als auch vom Zelltyp ab. Die Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider aus der eigenen Arbeitsgruppe beschäftigten sich unter anderem mit der Aufklärung der Endozytosewege, die an der zellulären Aufnahme und der intrazellulären Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytosewege für die Aufnahme und Prozessierung der Komplexe verantwortlich sind (Schneider 2010).

1.3.3 Intrazelluläre Prozessierung

Die intrazellulären Prozessierungsrouten der Clathrin- und Caveolae-abhängigen Endozytosewege wurden im vorherigen Abschnitt bereits kurz erläutert und sind in Abbildung 1-4 zusammenfassend dargestellt. Als Markerproteine für die beteiligten Endozytosewege dienen LAMP1 (*lysosomal membrane associated protein-1*) als Clathrinund Caveolin-1 (*Cav-1*) als Caveolae-Marker (Andrejewski *et al.* 1999, Cai *et al.* 2008, Eskelinen *et al.* 2003, Karlsson & Carlsson 1998, Parton & Simons 2007, Swetha *et al.*).



Abbildung 1-4: Beteiligte Endozytosewege bei der Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen

Eine weitere Barriere auf dem Weg zur zellulären Transfektion ist die Freisetzung der Komplexe aus den endosomalen Strukturen (*endosomal escape*), um dem Abbau im Lysosom zu umgehen, sowie die Dissoziation der Plasmid-DNA aus dem Komplex mit dem kationischen Lipid. Für die intrazelluläre Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen aus den frühen und späten Endosomen sowie den Caveosomen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Vorstellbar ist die Fusion der Komplexe mit der endosomalen Membran und der dadurch bedingten Freigabe der Plasmid-DNA ins Zytoplasma (Elouahabi & Ruysschaert 2005). Die endosomale Komplexfreisetzung kann durch Zusatz eines fusogenen Helferlipids wie DOPE positiv beeinflusst werden (Fasbender *et al.* 1997, Koltover *et al.* 1998). Eine weitere Hypothese zur endosomalen Freisetzung wurde von Xu et al. aufgestellt (Xu & Szoka 1996). Hier wird ein Flip-Flop der anionischen Phospholipide der äußeren in die innere endosomale Membran unterstellt. Im Zuge dieser Umverteilung bilden sich mit den kationischen Kopfgruppen der Komplexlipide neutrale Ionenpaare, die Anziehungskräfte zwischen Lipid und DNA werden abgeschwächt und die endosomale Membran destabilisiert, was letztendlich in der Freisetzung der Plasmid-DNA resultiert (Duan *et al.* 2009, Hafez *et al.* 2001, Rejman *et al.* 2006).

1.3.4 Nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA

Nach der Freisetzung der Plasmid-DNA in das Zytoplasma stehen einer erfolgreichen Transfektion zunächst der Transport zum Zellkern und die Aufnahme in diesen als nächste Barrieren entgegen. Die Mobilität von freier DNA im Zytoplasma ist gering. Vor allem das Zytoskelett mit seiner netzartigen Struktur und die hohen zytosolischen Proteinkonzentrationen (bis 100 mg/ml) behindern die freie Diffusion von Makromolekülen wie DNA (Luby-Phelps 2000). Die Überwindung der Kernhülle stellt eine weitere Herausforderung dar: Sie enthält kleine Öffnungen (nuclear pore complex, NPC), durch die kleine Moleküle mit einer Größe bis zu 50 kDa (entsprechend einem Durchmesser von 10 nm) frei diffundieren können (Mattaj & Englmeier 1998). Größere Moleküle müssen hingegen aktiv in den Zellkern aufgenommen werden. Diese Translokation wird durch die Proteinfamilie der Importine vermittelt (Paschal 2002). Importin-α erkennt und bindet am Transportmolekül an eine spezifische Kernlokalisierungssequenz (NLS) und bildet im Folgenden einen Komplex mit Importin-B. Dieser ternäre Komplex wird dann über die GTPase ran energieabhängig durch die Kernporen transportiert (Gorlich et al. 1996, Zanta et al. 1999). Wie die nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA genau abläuft, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Der Zellteilung wird hier ebenfalls eine wichtige Rolle zugeschrieben. Die Zellkernmembran wird in der Mitosephase vorübergehend abgebaut und somit die passive Diffusion von Plasmid-DNA in den "Zellkern" ermöglicht (Brunner et al. 2000). Beim Wiederaufbau der Kernmembran können dann Plasmid-DNA-Kopien zufällig in den Kern miteingeschlossen werden (Symens et al. 2012).

1.4 Einführung der verwendeten Methoden und Zelllinien

1.4.1 Durchflusszytometrie

Die zelluläre Aufnahme sowie die Transfektion von DC $30^{\mbox{\sc y}}(Cy3-)$ DNA-Komplexen werden durchflusszytometrisch bestimmt. Eine schematische Darstellung des eingesetzten FACSCaliburTM ist in Abbildung 1-5 gezeigt. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung verschiedener zellulärer Parameter während die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom perlschnurartig durch einen Laserstrahl (488 bzw. 635 nm) geleitet werden (Mandy *et al.* 1995). Hat eine Zelle fluoreszenzmarkierte Lipid/DNA-Komplexe aufgenommen bzw. wurde sie erfolgreich transfiziert und exprimiert das fluoreszierende Transgen, werden die in der Zelle vorhandenen Fluorophore beim Passieren des Lasers angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe geeigneter Strahlenteiler und Filter in verschiedenen Kanälen detektiert (FL 1 – 3). Das von der Zelle gestreute Laserlicht wird in zwei Kanälen detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt Hinweise auf die Zellgröße, das Seitwärtstreulicht (SSC) auf die Zellgranularität. Korrelation von FSC gegen SSC ermöglicht die Differenzierung in vitale und tote Zellen (*gating*).



Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des FACSCalibur[™]-Durchflusszytometers (nach M. Rahman "Introduction to flow cytometry"; www.ab-direct.com)

Als Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse wird der Anteil der Zellen (in %) angegeben, deren Fluoreszenzintensität den Schwellenwert der unbehandelten Kontrollzellen überschreitet. Man erhält also primär Informationen darüber, wie viele Zellen Lipid/DNA-Komplexe aufgenommen haben bzw. erfolgreich transfiziert wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellpopulation (*mean fluorescence intensity*) lässt zudem Schlüsse auf die Menge der pro Zelle aufgenommenen Komplexe bzw. die Transgenexpressionsstärke zu.



Abbildung 1-6: Durchflusszytometrie - Zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/(Cy3-) DNA-Komplexen in A-10 SMC A-10 SMC wurden 5 h mit Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch bestimmt. A, B: Histogramm bzw. Dotplot-Darstellung der unbehandelten Kontrollzellen. C, D: Verschiebung der Zellpopulation im Kanal FL2 (Histogramm- bzw. Dotplot-Darstellung).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht somit eine quantitative Analyse von Zellpopulationen, allerdings werden keine Informationen über die zelluläre Lokalisation des Fluorophors erhalten. Eine Unterscheidung in internalisiert oder zellulär assoziiert ist mittels Durchflusszytometrie nicht möglich.

1.4.2 Quantitative Imaging

1.4.2.1 Konfokale Mikroskopie

Das erste konfokale Mikroskop wurde 1957 von Marvin Minsky entwickelt und zum Patent angemeldet (Minsky 1957, 1988). Durch viele technische Weiterentwicklungen steht zum heutigen Zeitpunkt ein breites Sortiment an Systemen für verschiedenste Fragestellungen und Anforderungen zur Verfügung.

Bei einem herkömmlichen Lichtmikroskop entsteht das Bild aus der Überlagerung der Abbildungen der beleuchteten Bildpunkte. Dabei werden Punkte in der Fokalebene der Probe scharf abgebildet, sämtliche Punkte außerhalb davon unscharf. Im Gegensatz dazu wird bei der konfokalen Mikroskopie das Anregungslicht in die Probe fokussiert und somit eine punktförmige Beleuchtung der Probe ermöglicht. Die Auflösung entlang der optischen Achse, die sogenannte Tiefenschärfe, wird somit verbessert. Eine schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 1-7 gezeigt.



Abbildung 1-7: Schematische Darstellung eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (www.univie.ac.at)

Anregung und Detektion liegen übereinander, also konfokal. Kondensor-Linse und Objektiv sind so angeordnet, dass sie einen gemeinsamen Brennpunkt bilden. In diesem befindet sich die Probe, die senkrecht zur optischen Achse Punkt für Punkt abgerastert wird. Durch das Objektiv wird das eingestrahlte Auflicht in einer bestimmten Probentiefe fokussiert (Fokusebene). Das von der Probe reflektierte Licht wird durch das Objektiv auf eine Lochblende (pinhole) geleitet und somit nur die relevanten Lichtsignale von einem dahinter angeordneten Photomultiplier detektiert. Punktweise wird dann ein Schnittbild zusammengesetzt. Die Dicke des optischen Schnitts wird durch den Durchmesser der Lochblende, dem Objektiv und seiner numerischen Apertur (NA) bestimmt. Eine hohe numerische Apertur (NA) des Objektivs garantiert einen möglichst steilen Einfallwinkel des Lichts auf die Probe. Dieser bestimmt die Ausdehnung des Fokuspunktes entlang der optischen Achse, die für eine hohe Tiefenschärfe möglichst gering sein muss. Störlichtsignale, die ober- und unterhalb der Fokusebene entstehen, werden zum einen durch die punktförmige Beleuchtung der Probe im Fokus und zum anderen durch die Einstellung der Lochblende auf 1 AU (airy unit) minimiert. Eine dreidimensionale Darstellung der Probe ist durch Rastern von aufeinanderfolgenden Ebenen und Stapelung der entstehenden Schnittbilder möglich (z-stack). In der vorliegenden Arbeit wird für die Mikroskopaufnahmen ein konfokales Laser-Rastermikroskop (confocal laser scanning microscope CLSM) verwendet. Die Anregung der Fluorophore erfolgt hier mit einem Laser (Corle 1996, Paddock 1999, Stelzer 1991).

1.4.2.2 Konfokale Kolokalisationsstudien

Kolokalisationsstudien stellen eines von vielen Einsatzgebieten der konfokalen Mikroskopie dar. Die hohe räumliche Auflösung ermöglicht die exakte Lokalisierung von Fluorophoren in der Probe. In der vorliegenden Arbeit wird die intrazelluläre Prozessierung von fluoreszenzmarkierten Lipid/DNA-Komplexen entlang gefärbter zellulärer Kompartimente verfolgt. Das Ausmaß der Kolokalisation wird computergestützt ermittelt. Der Pearsons Koeffizient PC korreliert die Intensität der Pixel im ersten Bild linear gegen die des anderen Bildes und bewegt sich folglich zwischen 0 (0 % Korrelation) und 1 (100 % Korrelation). Der Manders Kolokalisationskoeffizient M basiert auf dem Pearsons Koeffizient. Hier wird das Verhältnis der summierten Intensität der Pixel des ersten Bildes, die im zweiten Bild eine Intensität > 0 haben, zur Gesamtintensität des ersten Bildes gebildet. Angegeben wird also der Anteil der Signale des ersten Bildes, die mit dem zweiten Bild kolokalisieren (M = 0 - 1) (Bolte & Cordelieres 2006).

1.4.2.3 CellProfilerTM Software

Zur Quantifizierung der nukleären Aufnahme von Plasmid-DNA werden die konfokalen Bilder mit der *open source* Software CellProfilerTM quantitativ ausgewertet. Die Software wurde 2006 von Carpenter et. al für verschiedenste biologische Fragestellungen entwickelt (Carpenter et al. 2006). Im Vordergrund steht neben einer benutzerfreundlichen Oberfläche die einfache Bedienung der Software. Nach dem Baukastenprinzip wird aus verschiedenen Modulen eine Pipeline aufgebaut, mit der die eingespeisten Bilder automatisch prozessiert, analysiert und ausgewertet werden. Jedes Modul ist je nach Fragestellung individuell einstellbar. Mit CellProfilerTM können Standard-Assays wie Ermittlung von Zellzahlen, Größenmessung von Zellen, Analyse von zellulären Proteinleveln, etc. aber auch komplexere Untersuchungen wie Bestimmung von Zellstrukturen oder subzellulärer Verteilung von DNA durchgeführt werden. Die Software ermöglicht eine quantitative Bildanalyse im Niedrig-(<100 Bilder) bis Hochdurchsatz, die theoretisch nur durch die Leistung des verwendeten Computers limitiert wird. In der vorliegenden Arbeit wird die nukleäre Aufnahme von komplexfreigesetzter fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA mit Hilfe von Intensitätsmessungen im Zellkern quantifiziert. Die verwendete Pipeline und das Analysenprinzip ist in Abschnitt 3.9.2 erklärt.
1.4.3 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit werden die Zelllinien A-10 SMC und MDCK II für die Untersuchungen zur Transfektionseffizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen verwendet. Die beiden Zellmodelle wurden in Vorgängerarbeiten bereits hinsichtlich ihrer Transfektionseigenschaften nach Lipofektion mit DC 30[®]/DNA-Komplexen sowie ihres Endozytoseprofils charakterisiert. In beiden Zelllinien sind die Clathrin- wie auch die Caveolae-abhängige Endozytose in die zelluläre Aufnahme und Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen involviert (Schneider 2010).

Bei den A-10 SMC handelt es sich um glatte Muskelzellen der Ratte, die ursprünglich aus embryonalen Aortenzellen abstammen. Die Zelllinie wurde als Clathrin-dominant charakterisiert und zeigt gute Transfektionseigenschaften für Lipid/DNA-Komplexe (Kiefer *et al.* 2004, Parton & Simons 2007, Schneider 2010). Die mittlere Verdopplungszeit von A-10 SMC beträgt etwa 100 Stunden.

Als zweites zelluläres Modell wird die Zelllinie MDCK II verwendet. Hierbei handelt es sich um Zellen aus den proximalen Nierentubuli eines Cockerspaniels. MDCK II-Zellen zeichnen sich durch Caveolae-Dominanz (Bush *et al.* 2006) sowie relativ schlechte Transfizierbarkeit nach Lipofektion aus (Schneider 2010). Die mittlere Verdopplungszeit beträgt hier etwa 11 Stunden.

Mit A-10 SMC und MDCK II-Zellen stehen somit zwei Zellmodelle mit gegensätzlichen Eigenschaften zur Verfügung: Clathrin-dominante, gut transfizierbare A-10 SMC und Caveolae-dominante, schlecht transfizierbare MDCK II-Zellen. Mit Hilfe der beiden Modelle sollen intrazelluläre Transfektionsbarrieren von DC 30[®]/DNA-Komplexen identifiziert und der Einfluss der Endozytoseroute auf die Effizienz der Lipid/DNA-Komplexe geprüft werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ein großes Problem beim Einsatz von Lipid/DNA-Komplexen als nicht-virale Gentransfersysteme ist die mangelnde Effizienz in einigen Zelllinien (z.B. Primärzellen). Das transportierte Gen soll nicht nur in die Zielzelle aufgenommen, sondern in dieser auch in den Zellkern transportiert und letztendlich exprimiert werden.

Die Effizienz von Lipid/DNA-Komplexen wird durch verschiedene zelluläre Barrieren reduziert. Hier sind neben der zellulären Aufnahme und der intrazellulären Prozessierung die Dissoziation der DNA vom Lipid-Träger, der Transport der DNA in den Zellkern sowie die Expression des Transgens zu nennen. Inwiefern diese Stationen die Effektivität von Lipid/DNA-Komplexen reduzieren wurde bereits in Vorgängerarbeiten am Lehrstuhl mit Hilfe zweier Zellmodelle mit unterschiedlichen Transfektionseigenschaften für DC 30[®]/DNA-Komplexe (A-10 SMC und MDCK II-Zellen) untersucht (Schneider 2010).

Die zelluläre Aufnahme der Komplexe via Clathrin- und Caveolae-abhängiger Endozytose konnte als erste entscheidende und gleichzeitig wichtigste Transfektionsbarriere identifiziert werden, da hierdurch die für die weitere Prozessierung zur Verfügung stehende Komplexmenge unmittelbar beeinflusst wird. Die Dissoziation von Lipid und DNA leistet ohne Frage einen weiteren wichtigen Beitrag zum Transfektionsprozess, denn nur freie DNA kann letztendlich in den Zellkern transportiert und dort transkribiert werden. FRET-basierte Untersuchungen zur intrazellulären Dissoziation von DC 30[®]/DNA-Komplexen ergaben, dass der Dissoziationsgrad zwar von der betrachteten Zelllinie abhängig ist, dass die erreichten Level jedoch für eine effiziente Transfektion ausreichend sein sollten. Die intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen ist demnach in ihrer Relevanz als Transfektionsbarriere hinter der zellulären Aufnahme einzuordnen.

Die vorliegende Arbeit baut auf diesen Vorgängerarbeiten auf und beschäftigt sich tiefergehend mit der Identifizierung weiterer intrazellulärer Transfektionsbarrieren für DC 30[®]/DNA-Komplexe in den zwei Zellmodellen A-10 SMC und MDCK II. Augenmerk wird zunächst erneut auf die zelluläre Aufnahme als wichtigste Transfektionsbarriere gelegt und diese mittels verschiedener Methoden (Durchflusszytometrie, CellProfilerTM) detaillierter charakterisiert und quantifiziert.

Als weitere potentielle Transfektionsbarriere wird die nukleäre Aufnahme von dissoziierter Plasmid-DNA mittels *Quantitative Imaging* untersucht, quantifiziert und bewertet. Diese Methodik kombiniert konfokale Laser-Rastermikroskopie mit quantitativer computergestützter Bildanalyse.

Weiterhin soll die Effizienz der intrazellulären Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen via Clathrin- und Caveolae-abhängiger Endozytosewege überprüft werden. Die Bedeutung der intrazellulären Prozessierungsroute für eine erfolgreiche Transfektion der Zielzelle wird mit Hilfe von endozytoseaktiven Substanzen sowie konfokalen Kolokalisationsstudien analysiert.

Außerdem werden Untersuchungen zur Transgenexpressionsstärke nach erfolgreicher zellulärer Transfektion durchgeführt, um die Effizienz der postnukleären Prozessierung (Transkription der Plasmid-DNA und Translation in das codierte Protein) in beiden Zellmodellen miteinander zu vergleichen. Ob sich Unterschiede in der Zellproliferationsrate auf die Transfektion von DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen auswirken, wird nach Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus durchflusszytometrisch bestimmt.

Abschließend und als Ausblick auf zukünftige Arbeiten wird das Lipoplex-basierte System (Lipid/DNA-Komplex) mit einem Nanopartikel-basierten System (Lipid/Protamin/DNA-Partikel, LPD) verglichen. Die Arbeiten hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Maximilian Wittmann im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. Das LPD-System bietet neben der standardisierten und reproduzierbaren Herstellung die Option auf zahlreiche Modifizierungsmöglichkeiten der Partikeloberfläche. So kann die Lipidhülle mit spezifischen Liganden versehen werden, um bestimmte Zielstrukturen selektiv anzusteuern. Ein aktives Targeting mittels LPD-Partikeln wäre somit möglich.

Alle Studien werden mit zwei DC 30[®]/DNA-Komplexpräparationen durchgeführt. Neben der klassischen Herstellung von DC 30[®]/DNA-Komplexen wird der Einfluss einer Ultraschallspitzenbehandlung der Ausgangsliposomen auf die Charakteristika der Komplexpräparationen untersucht. Die Auswirkungen der Herstellungsweise und der damit einhergehenden Unterschiede in Partikelgröße und –morphologie auf das intrazelluläre Verhalten und somit die Transfektionseffizienz der Komplexe sind ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

2 Material und Geräte

2.1 Lipide und Transfektionsreagenzien

Tabelle 2-1: Lipide und Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	M [g/mol]	Abkürzung	Hersteller
Cholesterol	387	Chol	Sigma-Aldrich, Steinheim
DC-Cholesterol (3β-N[N', N'- Dimethylaminoethan)-carbamoyl]- Cholesterol-HCI / DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) 3:7 (m/m), lyophilisiert	667	DC 30 [®]	Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA
DOTAP (1,2-di-(9Z-octadecenoyl)- 3-trimethylammonium-propan)	699	DOTAP	Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA
Fugene [®] HD	-	Kationische Lipidmischung unbekannter Zusammensetzung	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

2.2 Plasmid

Tabelle 2-2: Plasmid

Plasmid	Bezugsquelle
pEGFP-C1	BD Clontech, Heidelberg

2.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2-1:	Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Anregung [nm]	Emission [nm]	M [g/mol]	Bezugsquelle
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	546	647	1270	Becton Dickinson, Heidelberg
BD QuantiBRITE TM PE Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit	565, 539, 498	578	-	Becton Dickinson, San Jose, USA
Bodipy [®] FL C₅ Lactosylceramid komplexiert mit BSA	505	511	~ 66 000	Molecular Probes, Oregon, USA
Cy [™] 3-CTP	550	570	1267	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Label IT [®] Cy ^{IM} 3 Nucleic Acid Labeling Kit	550	570	-	Mirus, Madison, USA
R-Phycoerythrin	565, 539, 498	578	~ 240 000	AnaSpec, Inc, Freemont, USA
SYTOX [®] Green Nucleic Acid Stain	504	523	-	Molecular Probes, Eugene, USA
Transferrin aus humanem Serum, Alexa Fluor [®] 488	495	519	_	Molecular Probes, Leiden, NL

2.4 Antikörper

Tabelle 2.4.1: Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Spezifikation	Bezugsquelle
Mouse-anti Caveolin-1 IgM	Monoklonaler Antikörper gegen Caveolin-1, Klon C060	Becton Dickinson, Heidelberg
Rabbit anti-LAMP1	Monoklonaler Antikörper gegen LAMP1	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 2.4.2: Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Anregung [nm]	Emission [nm]	Bezugsquelle
Goat anti-mouse IgG (H+L) Chromeo [™] 642	642	660	Abcam, Cambridge, UK
Goat anti-mouse IgG (H+L) MFP 488	501	523	MoBiTec, Göttingen
Goat anti-rabbit IgG (H+L) Chromeo [™] 546	540	565	Abcam, Cambridge, USA
Goat anti-rabbit IgG (H+L) MFP 488	501	523	MoBiTec, Göttingen

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Reinheitsg rad	Abkürzung oder Summenformel	M [g/mol]	Bezugsquelle
Albumin Bovine essential fatty acid free	> 96 %	DF-BSA	~ 66 000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	p.a.	NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	1235.86	Merck, Darmstadt
Bafilomycin A₁ von Streptomyces griseus	> 90 %	$C_{35}H_{58}O_9$	622,83	Sigma-Aldrich, Steinheim
BD FACS Clean Solution	-	FACS Clean	-	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS Rinse Solution	-	FACS Rinse	-	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS Flow Sheath Fluid	-	FACS Flow	-	Becton Dickinson, Heidelberg
CellScrub [™] Puffer	-	CellScrub	-	Genlantis, San Diego, USA
Cell-Titer-Glo [®] Luminescent Viability Assay	-	CTG	-	Promega, Mannheim
Chloroform	Ph.Eur.	ChCl ₃	119,4	Roth, Karlsruhe
Chlorpromazin HCI	USP	C ₁₇ H19CIN ₂ S HCI	355,33	Sigma, Deisenhofen
Clathrin-Enhancer aus Glypsophila paniculata L.	-	-	-	M. F. Melzig, Freie Universität, Berlin
Dimethylsulfoxid	Zellkultur getestet	C ₂ H ₅ OS / DMSO	78,13	Sigma-Aldrich, Steinheim
1 kb DNA ladder	-	-	-	Qiagen, Hilden
Endo Free [®] Plasmid Mega Kit	-	-	-	Qiagen, Hilden
Ethanol	HPLC	C ₂ H ₅ OH / EtOH	46,01	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäur e, Natriumsalz	> 99 %	EDTA	372,24	Merck, Darmstadt
Fiske-Subbarow-Reducer	-	-	-	Fluka, Buchs, Schweiz
Gelatine	Zellkultur getestet	-	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Genistein	> 98 %	$C_{15}H_{10}O_5$	270,24	A.G. Scientific, Inc., San Diego, USA
L-Histidin	> 99 %	His	155,16	Fluka, Neu-Ulm
Isopropanol	p.a.	C ₃ H ₈ O	60,1	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (Phosphorstandard)	> 99 %	KH ₂ PO ₄	100,11	Fluka, Deisenhofen
Kupfer(II)sulfat, wasserfrei	> 99 %	CuSO ₄	159,61	Roth, Karlsruhe
Lactosylceramid	> 98 %	C ₅₃ H ₁₀₁ NO ₁₃ / LacCer	960,0	Merck, Darmstadt
Methanol	p.a.	CH₃OH / MeOH	32,01	Roth, Karlsruhe
Methyl-β-Cyclodextrin	Zellkultur getestet	MβCD	1310	Sigma-Aldrich, Steinheim
MobiGLOW [®]	-	MobiGLOW®	-	MoBiTec, Göttingen

24 Material und Geräte

Bezeichnung	Reinheitsg rad	Abkürzung oder Summenformel	M [g/mol]	Bezugsquelle
Natriumchlorid	Ultra	NaCl	58,44	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	> 99 %	NaOH	40,01	Merck, Darmstadt
Maleinimid-PEG ₂₀₀₀ -Chol- Anker	GPC gereinigt	Mal-PEG ₂₀₀₀ -Chol	2400	Synthetisiert nach Mayenfels, Zimmer (2011), Uni Freiburg
Paraformaldehyd	> 95 %	(CH ₂ O) _n	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protaminsulfat	Grade X	-	~ 5,1 kDa	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	> 99,5 %	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	30 %	HCI	36,46	Merck, Darmstadt
Saponin	8-25 % Sapogenin	-	-	Fluka, Buchs, Schweiz
Schwefelsäure	p.a.	H_2SO_4	98,08	Merck, Darmstadt
SH-TAT-Peptid	95,38 %	ТАТр	1663,0	LifeTein LLC, South Plainfield, USA
4- (1, 1, 3, 3 Tetramethyl- butyl) phenylpolyethylenglykol	Für Molekularbi ologie	Triton X-100	576,6	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid 30 % (m/m)	ACS Qualität	H ₂ O ₂	34,0	Sigma, St. Louis, USA

2.6 Puffer

Bezeichnung	Substanzen	Molarität	Einwaagen [g/l]
HEPES-Puffer pH 7 4 ^a	HEPES	10 mM	2,4
	NaCl	140 mM	8,18
HSS-Puffer pH 7 1^{a}	HEPES	20 mM	4,8
	Saccharose	270 mM	92,43
	Trypton	-	10,0
LB-Medium pH 7,4 ^a	Hefeextrakt	-	5,0
	NaCl	-	5,0
	NaCl	137 mM	8
DPS above Co^{2+}/Ma^{2+} pH 7.4	KCI	2,68 mM	0,2
PBS onne Ca /ivig pH 7,4	Na₂HPO₄	7,81 mM	1,11
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,2
	NaCl	137 mM	8
	KCI	2,68 mM	0,2
DDC mit Co^{2+}/Ma^{2+} pH 7.4	Na ₂ HPO ₄	7,81 mM	1,11
PBS IIII Ca /ivig pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,2
	CaCl ₂	1 mM	0,1
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	500 µM	0,1
TE Duffer pH 7 4 ^a	Tris-HCI	10 mM	1,211
TE-Puller pH 7,4	EDTA	1 mM	0,372
Transfoktionsmodium pH 7 4 ^a	NaCl	25 mM	1,46
	Saccharose	250 mM	85,58

Tabelle 2-6: Pufferzusammensetzungen

^a Der pH-Wert der Lösungen wird bei Bedarf mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf den Sollwert eingestellt.

2.7 Zellen

Тур	Beschreibung	Kulturmedien und Zusätze	Bezugsquell
A-10 SMC	Glatte Muskelzellen der Ratte	DMEM + 20 % FCS + 1 % Natriumpyruvat	DSMZ, Braunschweig
MDCK II	Distale Tubuluszellen des Hundes	DMEM + 10 % FCS	ATTC (American Type Culture Collection), Manassas, USA

Tabelle 2-7: Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

2.8 Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung

Bezeichnung	Bezugsquelle / Herstellung und Lagerung
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom, Berlin
FCS (fetales Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
DF-BSA Lösung (1 % (m/m))	Frisch hergestellt
Gelatinelösung (0,2 % (m/V))	Sigma Aldrich, München
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd (4 % (m/m) pH 7,4 ^{a, b}	Hergestellt und Aliquots bei –20 °C gelagert
PBS (Phosphate buffered saline) mit/ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Saponinlösung (1 mg/ml)	Hergestellt und bei 4 °C gelagert
Triton X-100 (0,1 % (v/v))	Hergestellt und bei 4 °C gelagert
Trypsin 0,5 % / EDTA 0,25 %	Biochrom, Berlin

Tabelle 2-8:	Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung

^a Der pH-Wert der Lösungen wird bei Bedarf mit 1 N NaOH auf den Sollwert eingestellt.

^b Bei der Herstellung der Lösung nicht > 50 °C erhitzen, sonst Depolymerisation des PFAs. Alle Lösungen werden in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) hergestellt.

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-9 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläschen (8, 12 mm) und Objektträger	Langenbrinck, Teningen
Einmalküvetten für PCS, Polystyrol 1,5 ml halbmikro	Brand, Wertheim
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einmalspritzen (1, 5, 10, 20, 30 ml)	Braun, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
F 96 MicroWell [™] Platten (Polystyrol, weiß) für Luminometer	Nunc, Wiesbaden
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon [®] Röhrchen aus PP (15, 50 ml / steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
HPLC Vials (1,5 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanülen (Größe 1 und 20 / steril)	Braun, Melsungen
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 Well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm M [®]	Pechniney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Braun, Melsungen
Petrischalen (100 x 200 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Schraubkappen mit Loch, schwarz, mit Septum aus Silicon PTFE 1,3 mm, rot	VWR International GmbH, Darmstadt
Sterilfilter 0,2 µm Rotilabo [®] Sterilfilter 0,2 µm Acrodisc [®] 13 mm mit HA	Roth, Karlsruhe Pall, Dreieich

2.10 Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
CCD-Kamera	C4880-80	Zeiss, Jena
Inverses Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop	LSM I-UV 510 Meta	Zeiss, Jena
Objektiv	20 x Plan-Apochromat 63 x Plan-Apochromat 100 x Plan-Neofluar	Zeiss, Jena
Quecksilberdampflampe	HBO 200	Zeiss, Jena
Vorschaltgerät	-	Zeiss, Jena
	LSM Image Browser Rel. 4.0	Zeiss, Jena
	Zen 2009	Zeiss, Jena
Software	ImageJ 1.45	National Institute of Health, USA
	CellProfiler [™]	Broad Institute, USA

Tabelle 2-10 Konfokales Mikroskop

Tabelle 2-11: Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskop

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Cryo-Kammer	Cryo-Box 340719	Zeiss, Jena
Kamera TEM	Proscan HSC 2	Oxford Instruments, Abingdon, USA
Cryo-Probenbehälter	Model 626-DH	Gatan, Warrendale, USA
Grids (Kupfer mit Kohlefilm)	Quantifoil [®] s7/2 Cu 400 mesh, holey carbon films	Quantifoil Micro Tools, Jena
Transmissionselektronenmikroskop	Leo 912 Ω-mega	Leo, Oberkochen
Software	iTEM 5.0 (Bulid 1054)	Soft Imaging System, Münster

Tabelle 2-12: Sonstige Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	BP 301 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 3850 EL	Systec, Wettenberg
Durchflusszytometer Software	FACSCalibur [™] CellQuest [™] Pro	Becton Dickinson, Heidelberg

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Evaporationszentrifuge (SpeedVac)	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Fluorimeter	LS 50 B	Perkin-Elmer, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop mit: Quecksilberdampflampe Vorschaltgerät	Axiovert 40 CFL HBO 50 Mbq 52 ac-z	Zeiss, Jena
Hamiltonspritzen	10, 50, 100, 500, 1000 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock	Liebisch SON/D Aich	Gebr. Liebisch, Bielefeld
Inkubatoren	APT Line CB Hera cell 150	Binder, Tuttlingen Heraeus Instruments, Fellbach
Laborschüttler	Vibramax 100, Heidolph Instruments	Neo Lab, Heidelberg
Laborwaage	LP 3200 D	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 3002	Heidolph, Kelheim
Microplate Luminometer Software	Microlumat Plus LB 96 V Win Glow	EG & Berthold, Bad Wildbad
Minischüttler	Vortexer Reax control	Heidolph, Kelheim
Nanodrop-Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer		Multimed, Kirchheim
pH-Meter	CG 843 P	Schott, Mainz
Photonenkorrelationsspektroskop	BI-90 Plus [®]	BIA-Brookhaven Instruments, Wien, Österreich
Pipetten	Pipetman, Gilson	Laborshop Neolab [®] , Freiburg
Präzisionsküvette 115F-QS	Quarzglas Suprasil	Hellma, Müllheim
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwede
Sicherheitswerkbänke	Herasafe HSP 18 (Zellkultur) Herasafe KSP 18 (Zellkultur)	Heraeus Instruments, Fellbach
Thermostatierter Schüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallspitze	Sonoplus GM70	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
UV/VIS-Spektrophotometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech (Biochrom), Cambridge, GB
Wasseraufbereitung	Milli-Q Academic	Millipore GmbH, Schwalbach
Zentrifugen	Centrifuge 5804 R	Eppendorf,
	Centrifuge 5417 R	Hamburg

30 Material und Geräte

3 Methoden

3.1 Herstellung von DC 30[®]-Ausgangsliposomen

3.1.1 Herstellung der Lipid-Aliquots

Die Ausgangsliposomen für die Lipid/DNA-Komplexe werden aus der kommerziell erhältlichen Lipidmischung DC $30^{\text{(B)}}$ (DC-Cholesterol/DOPE 3:7 (m/m)) über die modifizierte Filmmethode hergestellt (Schneider 2010). DC $30^{\text{(B)}}$ wird vom Hersteller lyophilisiert in 10 mg-Ampullen geliefert. Das Lipid wird in 3,3 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung im Verhältnis 3:1 (V/V) gelöst und davon Lipidaliquots à 100 µl hergestellt. Über den Aliquotierprozess verteilt werden fünf Proben à 50 µl für den Bartlett-Assay gezogen (siehe 3.1.2). Das Lösungmittelgemisch wird mit der Evaporationszentrifuge bei Raumtemperatur abgedampft und die Lipidaliquots bei –80 °C gelagert.

3.1.2 Bestimmung des Lipidgehalts nach Bartlett

Die Quantifizierung des Lipidgehalts der nach 3.1.1 hergestellten Aliquots erfolgt mit Hilfe des Bartlett-Assays (Bartlett 1959). Nach oxidativer Veraschung der in der Probe enthaltenen Phosphoratome werden die entstehenden Phosphationen photometrisch im Komplex mit Ammoniummolybdat quantifiziert. Aus der Lipidmischung DC 30[®] kann demnach nur das Phospholipid DOPE direkt bestimmt werden.

Zur Herstellung aller benötigten Lösungen und Reagenzien wird phosphatfreies Millipore[®]-Wasser verwendet. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wird in phosphatfrei gespülte Reagenzgläser 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 μ l des 1 mM Phosphatstandards (KH₂PO₄) eingewogen. Über den Aliquotierprozess der DC 30[®]-Lipidmischung wurden jeweils fünf Proben für den Bartlett-Assay gezogen. Da die Kalibratorkonzentrationen den erwarteten Phosphatgehalt der Proben einschließen müssen, ist die theoretische maximale Phosphatmenge der Probe für den Bartlett-Assay mit 35 μ M begrenzt. Das Probenzugsvolumen wurde entsprechend gewählt, direkt in die phosphatfrei gespülten Reagenzgläser einpipettiert und das Lösungsmittelgemisch bei RT abgedampft. Zu den Proben und Kalibratoren werden jeweils 500 μ l 1 N H₂SO₄ pipettiert, kurz gevortext und 3 h bei 160 °C verascht. Anschließend folgt die Zugabe von je 200 µl 30 %iger H₂O₂-Lösung (V/V) und weitere 1,5stündige Inkubation bei 160 °C. Nach dem Abkühlen werden zu den Ansätzen zunächst 4,5 ml frisch hergestellte 0,22 %ige (m/V) Ammoniummolybdatlösung pipettiert und gemischt, danach wird mit je 200 µl 14,8 %igem (m/V) Fiske-Subarrow-Reducer versetzt und gevortext. Die Reagenzgläser werden mit Glasmurmeln verschlossen und für exakt 10 Minuten im Heizblock bei 96 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT und erneutem Vortexen wird die Absorption der Proben sowie der Kalibratoren bei $\lambda = 830$ nm gegen den Leerwert vermessen und eine Kalibriergerade erstellt. Der Phosphatgehalt der Proben (in µmol) wird über die Kalibriergerade durch Extrapolation bestimmt. Die ermittelte Phosphatmenge entspricht der Stoffmenge an DOPE pro Aliquot. Über das bekannte Massenverhälntis von DOPE/DC-Cholesterol von 7:3 in der Lipidmischung DC 30[®] kann nun auf den Gesamtlipidgehalt der Aliquots hochgerechnet werden.

3.1.3 Liposomenherstellung

Für die Herstellung der Ausgangsliposomen für die Lipid/DNA-Komplexe werden zwei Protokolle (+/– US) verfolgt. Die DC 30[®]-Lipidaliquots aus 3.1.1 werden zunächst mit sterilem Transfektionsmedium (TM, pH 7,4) versetzt und für 30 Minuten bei RT quellen gelassen (c = 1 $\mu g/\mu l$). Anschließend wird der Lipidfilm im Ultraschallbad für 3 Sekunden redispergiert. Die Ausgangsliposomen werden mit sterilem Transfektionsmedium auf eine Endkonzentration von 0,08 $\mu g/\mu l$ verdünnt (Protokoll 1: unbehandelte Ausgangsliposomen mit der Ultaschallspitze vor. Die Liposomen werden im Pulsbetrieb (50 %) in 5 Zyklen à 30 Sekunden mit der US-Spitze beschallt (Protokoll 2: US-behandelte Ausgangsliposomen "+ US"). Zwischen den Zyklen erfolgt jeweils eine Pause von 2 Minuten. Um eine übermäßige Erwärmung der Lipiddispersion während der US-Behandlung zu vermeiden, wird mit Eis gekühlt.

Methoden 33

3.2 Gewinnung und Charakterisierung der Plasmid-DNA

Das pEGFP-C1-Plasmid hat eine Größe von 4,7 kb und codiert CMV-Promotor-kontrolliert für eine Variante des Wildtyp-Fluoreszenzproteins GFP. Das Wildtyp-Protein mit einer Größe von 26,9 kDa wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert (Shimomura 2005). Durch Mutation konnte eine 35-fach gesteigerte Fluoreszenzintensität sowie eine stärkere Expression des Proteins in Säugetierzellen erzielt werden (*enhanced green fluorescent protein, EGFP*). Neben EGFP codiert pEGFP-C1 zusätzlich für das Enzym Phosphotransferase, welches nach erfolgreicher Transformation und Expression in kompetenten E. coli Kanamycin-Resistenz vermittelt.

Die Herstellung kompetenter E. coli sowie Transformation der Zellen wurde von Herrn Andreas Präg (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Freiburg) durchgeführt. Die Plasmidisolierung und -charakterisierung erfolgte durch Frau Birgit Erhard (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg).

3.2.1 Herstellung von kompetenten E. coli

Zur Erzeugung kompetenter Zellen wird E. coli in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 28 °C angezogen. Am Folgetag werden 500 ml LB-Medium mit der Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 – 0,5 kultiviert. Die Bakterienkultur wird in einen sterilisierten Zentrifugenbecher überführt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, 2500 rpm) wird das Pellet in 50 ml TSS-Puffer (85 % LB-Medium, 10 % PEG 6000 bzw. 8000, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂) aufgenommen. PEG, DMSO und MgCl₂ führen zur Störung und somit Permeabilitätserhöhung der Bakterienmembran, so dass diese für die spätere Transformation vorbereitet wird (Chung *et al.* 1989). Der Ansatz wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von kompetenten E. coli

Zu den auf Eis gelagerten kompetenten E. coli werden $1 - 2 \mu l$ (5 ng) der Plasmidlösung gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Transformation des Plasmids in die Bakterienzellen zu beschleunigen wird ein Hitzeschock durchgeführt (42 °C, 90 sec) und die Zellen anschließend wieder auf Eis zurückgestellt. Es werden 800 μl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. 200 μl der Bakteriensuspension werden auf LB-Platten mit Kanamycin als Selektionsmarker über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag werden die wachsenden Kolonien geerntet und subkultiviert. Zu der Bakterienkultur wird Glycerol als Cryoprotektivum (Endkonzentration 20 %) zugesetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und der Glycerolstock bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Isolierung des Plasmids

Für die Anzucht bzw. Vermehrung des Plasmids wird zunächst eine 4 ml Vorkultur in kanamycinhaltigem Medium (50 µg/ml) mit einer Kolonie des Glycerolstocks des transformierten E. coli-Stamms aus 3.2.2 beimpft und bei 37 °C für 6 h im Flachbettschüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wird die Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 550 ml kanamycinhaltigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 170 rpm weiter inkubiert. Am Folgetag wird das pEGFP-Plasmid mit Hilfe des Endofree Plasmid Mega Kits von Qiagen[®] nach Angaben des Herstellers isoliert: Die Bakterien werden zunächst durch Zentrifugation pelletiert (6000 x g, 15 min, 4 °C) und lysiert. Das Zelllysat wird nun über eine Anionenaustauschersäule gegeben um zelluläre Verunreinigungen, wie Proteine oder RNA, abzutrennen. Nach mehreren Waschschritten wird die Plasmid-DNA von der Säule eluiert, mit Ethanol präzipitiert, pelletiert (4500 x g, 60 min, 4 °C) und mit autoklaviertem TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen.

3.2.4 Bestimmung der Plasmidkonzentration und -reinheit

Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA werden photometrisch bestimmt. ds-DNA zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei 260 und 280 nm. Die isolierte Plasmid-DNA aus 3.2.3 wird mit TE-Puffer 1:100 verdünnt und im Photometer bei 260 und 280 nm vermessen. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt Hinweise auf den Reinheitsgrad der Plasmid-DNA und sollte zwischen 1,8-2,0 liegen, um weitgehende Protein- und Kohlenhydratfreiheit zu gewährleisten (Mülhardt 2003). Aus den Absorptionsmessungen berechnet sich die Konzentration der Plasmid-DNA-Lösung nach:

 $c_{pDNA} = A_{260} \cdot 0.05 \cdot Verdünnungsfaktor$

c_{pDNA} Konzentration der Plasmid-DNA (mg/ml)

A₂₆₀ Absorption bei 260 nm

3.2.5 Fluoreszenzmarkierung der Plasmid-DNA

Die erfolgreiche Transfektion von Zielzellen mit pEGFP-C1 kann durch die fluorimetrische Analyse der GFP-Expression bestimmt werden. Um der Genexpression vorgeschaltete zelluläre Prozesse, wie zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung der Plasmid-DNA verfolgen zu können, muss diese visualisiert werden. Dafür wird die Plasmid-DNA mit Hilfe des LabelIT[®] CyTM 3 Kits der Firma MIRUS mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Um die Bioaktivität der Plasmid-DNA durch die kovalente Markierung so wenig wie möglich zu beeinflussen, wird das Färbeprotokoll des Herstellers zum LabelIT® TrackerTM Intracellular Nucleic Acid Localization Kit befolgt (Cy3/DNA 0,3/1 (V/w)). Zunächst wird das Cy3-Pellet mit 100 µl Rekonstitutionslösung (DMSO) resuspendiert, gevortext und kurz abzentrifugiert. In einem 500 µl-Eppendorfgefäß werden 38,5 µl steriles, RNase/DNase-freies Wasser (Millipore-Wasser) vorgelegt. Es werden 5 µl Labeling Buffer A (10 X), $5 \mu l$ Plasmid-DNA-Lösung (c = 1 mg/ml) sowie 1,5 μl LabelIT[®]-Reagenz dazugegeben, vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz lichtgeschützt für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um den Verdampfungseffekt zu minimieren und die Konzentrationen der Reaktionspartner im passenden Bereich zu halten, wird der Färbeansatz nach der Hälfte der Inkubationszeit kurz zentrifugiert. Das Cy3-DNA-Konjugat wird über die im Kit enthaltene und zuvor vorbereitete *microspin* Säule aufgereinigt (3000 rpm, 2 min) und bei –20 °C gelagert.

Für die Quantifizierung der zellulären und nukleären Aufnahme von Cy3-pDNA muss das Färbeverhältnis (*labeling ratio*) von Cy3/DNA bekannt sein. Die Aufreinigung des Cy3-DNA-Konjugats für die Bestimmung des *labeling ratios* erfolgt mittels ethanolischer Präzipitation, da die Aufreinigung über die im Kit enthaltenen *microspin* Säulen laut Hersteller erhöhte Absorptionswerte im UV-Bereich verursachen kann. Das Cy3-DNA-Konjugat wird unter Zusatz von NaCl 5 M mit Ethanol abs. für 1 h bei –20 °C präzipitiert, pelletiert, mit 70% igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in TE-Puffer resuspendiert. Das Verhältnis DNA/Farbstoff wird photometrisch durch Absorptionsmessung des Konjugats bei 260 ($\lambda_{max,DNA}$) und 550 nm ($\lambda_{max,Cy3}$) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Zunächst wird die gemessene Absorption der DNA bei 260 nm um den Beitrag des Cy3-Farbstoffs korrigiert:

$$A_{DNA} = A_{260} - (A_{Cy3} \cdot CF_{260})$$

A_{DNA}	Absorption der DNA
A ₂₆₀	Absorption der DNA bei 260 nm
A _{Cy3}	Absorption Cy3 bei $\lambda_{\max,Cy3}$ (550 nm)
CF ₂₆₀	Korrekturfaktor für Cy3 (0,08)

Anschließend wird das Färbeverhältnis (labeling ratio) DNA-Basen/Cy3 berechnet:

$$\frac{DNA}{Cy3} = \frac{(A_{DNA} \cdot \boldsymbol{\varepsilon}_{Cy3})}{(A_{Cy3} \cdot \boldsymbol{\varepsilon}_{DNA})}$$

 \mathcal{E}_{DNA} Extinktionskoeffizient der DNA (6600 l·mol⁻¹·cm⁻¹)

 ε_{Cy3} Extinktionskoeffizient des Cy3-DNA-Konjugats (150 000 l·mol⁻¹·cm⁻¹)

3.3 Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen

DC 30[®]/DNA-Komplexe werden nach den Arbeiten von Sebastian Schneider im Verhältnis Lipid/DNA von 8/1 (m/m) hergestellt (Schneider 2010). Die resultierenden Komplexe weisen ein Ladungsverhältnis Lipid/DNA (+/–) von 1,6 auf. Die nach 3.1.3 hergestellten +/– US Ausgangsliposomen sowie die DNA-Lösung werden mit sterilfiltriertem Transfektionsmedium auf eine Endkonzentration von 0,08 µg/µl bzw. 0,01 µg/µl verdünnt. Für die Komplexierung von pEGFP mit DC 30[®]-Liposomen werden gleiche Volumina der Lipiddispersion und der DNA-Lösung auf einem Vortexer bei 1000 rpm tropfenweise zusammenpipettiert und anschließend für 3 Sekunden bei 2400 rpm intensiv gemischt. Je nach Größe des Versuches wird die herzustellende Komplexgesamtmenge durch Variation der 1:1-Lipid-/DNA-Volumina angepasst. Die hergestellten +/– US Komplexe werden für 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend charakterisiert bzw. im Zellversuch eingesetzt.

3.4 Charakterisierung von DC 30[®]-Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Komplexen

3.4.1 Größenbestimmung von Liposomen und Lipid/DNA-Komplexen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Größe der nach 3.1 bzw. 3.3 hergestellten Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Komplexe wird mittels Photononkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Das Prinzip der Größenbestimmung beruht auf der Messung von Streulichtintensitätsschwankungen. Auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung diffundieren die Partikel in der Messzelle. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist dabei von der Größe der Partikel abhängig, kleine Partikel bewegen sich schneller als große. Die Probe wird mit einem Laser ($\lambda = 635$ nm) bestrahlt und das von den Partikeln gestreute Laserlicht im 90°-Winkel zur Einstrahlrichtung detektiert. streuen große Partikel stärker als kleine. Durch die unterschiedliche Dabei Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel interferieren die Streulichtwellen auf dem Weg zum Detektor, SO dass an diesem zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Streulichtintensitäten gemessen werden. Die Fluktuation des Messsignals ist von der Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel und somit von deren Größe abhängig. Dieser Zusammenhang gilt streng genommen nur für kugelförmige Partikel und wird durch die Stokes-Einstein Gleichung beschrieben:

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d}$$

- D Diffusionskoeffizient $(m^2 \cdot s^{-1})$
- k Boltzmann-Konstante ($N \cdot m \cdot K^{-1}$)

T Temperatur (K)

- η dynamische Viskosität (N·s·m⁻²)
- d hydrodynamischer Durchmesser (m)

Die Größenbestimmung von +/– US Ausgangsliposomen und der resultierenden Lipid/DNA-Komplexe erfolgt in sterilfiltriertem Transfektionsmedium in einem BI-90 Plus[®] bei 25 °C. Standardgemäß wird der intensitätsgewichtete Z-average (Z_{ave}) als Maß für den mittleren hydrodynamischen Teilchendurchmesser d_H bestimmt und anhand des Polydispersitätsindex (PDI) die Breite der Partikelgrößenverteilung abgeschätzt. In der vorliegenden Arbeit wird die mittlere Größenverteilung (MSD) der Proben mittels des NNLS-Algorithmus (*Non Negatively constrained Least Squares*) für einen Brechungsindex n von 1,339 und einer Viskosität η von 1,211 mPa·s für Liposomen bzw. n = 1,203 und η = 1,346 mPa·s für Lipoplexe bestimmt (Clement *et al.* 2005).

3.4.1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen

Die Partikelgrößenentwicklung von +/– US DC $30^{\mbox{\sc von}}$ /DNA-Komplexen soll in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur bestimmt werden. Dazu werden +/– US DC $30^{\mbox{\sc von}}$ /DNA-Komplexe nach 3.3 mit einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA) hergestellt und die Komplexausgangsgrößen nach 20-minütiger Äquilibrierphase mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt. Anschließend werden die Proben bei 4, 20 und 37 °C eingelagert und die Partikelgrößen über 30 h mittels PCS verfolgt. Mit Hilfe des NNLS-Algorithmus wird der intensitätsgewichtete Z-average (Z_{ave}) der Partikel bestimmt.

3.4.1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen

Bei der intrazellulären Prozessierung der Komplexe über endosomale Strukturen erfolgt eine kontinuierliche Absenkung des intravesikulären pH-Werts durch vesikuläre Protonenpumpen Der Einfluss (Simoes et al. 1999). dieser pH-Wert-Absenkung auf die Partikelgrößenentwicklung von DC 30[®]/DNA-Komplexen soll im Folgenden untersucht werden. +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexe werden nach 3.3 hergestellt und die Ausgangskomplexgrößen analog zu 3.4.1.1 bestimmt. Zur Simulation der frühendosomalen Bedingungen wird der pH-Wert der Komplexdispersion zunächst auf pH 5,5-6 und zur Simulation der spätendosomalen Bedingungen auf 4,5-5 eingestellt und die Partikelgrößen mittels PCS bestimmt.

3.4.2 Charakterisierung von Liposomen und Lipid/DNA-Komplexen mittels Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Die Cryo-TEM-Untersuchungen der +/– US Ausgangsliposomen und der resultierenden Lipid/DNA-Komplexe wurden von Frau Sabine Barnert (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) durchgeführt.

DC 30[®]-Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Komplexe (8/1 (m/m)) werden nach 3.1.3 bzw. 3.3 hergestellt und unmittelbar für die Cryo-TEM-Aufnahmen weiterverarbeitet. Etwa 5 µl der Liposomen bzw. Lipoplexe werden auf ein mit Kohle bedampftes Kupfergrid aufgetragen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Unmittelbar danach wird die Probe in flüssigem Ethan bei 90 K schockgefroren. Alle nun folgenden Arbeitsschritte werden unter Einsatz von Flüssigstickstoff bei etwa 90 K in einer klimakontrollierten Cryo-Präparationskammer durchgeführt. Das probenhaltige Kupfergrid wird mit einem Probenstab in das Transmissionselektronenmikroskop eingebracht und anschließend Aufnahmen der gefrorenen Proben mit Vergrößerungen zwischen 2898 x und 6300 x gemacht.

3.5 Herstellung von Lipid/Protamin/DNA-Komplexen (LPD)

Die eingesetzten Lipid/Protamin/DNA-Komplexe (LPD) werden im Rahmen der Diplomarbeit von Maximilian Wittmann (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) hergestellt und gegen das bestehende Lipid/DNA-Komplex-System getestet.

Die Protamin/DNA-Partikel werden im Verhältnis 1/5 (m/m) hergestellt. Dafür werden 5 μ g Protaminsulfat (in HSS-Puffer, pH 7,4) und 25 μ g pEGFP (in TE-Puffer, pH 7,4) mit sterilem HSS-Puffer auf je 50 μ l, entsprechend einer Endkonzentration von 0,1 bzw. 0,5 μ g/ μ l, verdünnt. Anschließend wird die DNA-Lösung tropfenweise zu der Protaminlösung gegeben, durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert.

Für die Herstellung der Liposomen werden zunächst je 20 mmol DOTAP und Cholesterol (Verhältnis 1/1 (mol/mol)) in ein Eppendorfcup eingewogen, in Ethanol abs. gelöst und das Lösungsmittel in der Evaporationszentrifuge bei RT abgezogen. Der Lipidfilm wird mit sterilem HSS-Puffer aufgenommen (Zielkonzentration c = 40 mmol/l), gevortext und über Nacht im Thermomixer redispergiert (1000 rpm, RT). Anschließend werden die Liposomen durch Behandlung mit der US-Spitze zerkleinert (5 Zyklen à 30 sec im Pulsbetrieb (50 %), ein Zyklus à 30 sec (100 %)). Zwischen den Zyklen erfolgt jeweils eine Pause von einer Minute. Die Liposomen werden mit sterilem HSS-Puffer auf ein Endvolumen von 100 μ l verdünnt.

Zur Herstellung der LPD-Komplexe werden $100 \,\mu$ l Liposomendispersion zu $100 \,\mu$ l Protamin/DNA-Partikeln pipettiert, vorsichtig gemischt und die LPD-Komplexe für 10 Minuten bei RT inkubiert. Für die Zellversuche werden drei LPD-Partikelpräparationen mit Lipid/DNA-Verhältnissen (nmol/µg) von 12/1, 14/1 und 16/1 hergestellt. Die Lipidkonzentration wird entsprechend angepasst, so dass stets gleiche Volumina an Liposomen und Protamin/DNA-Partikeln zusammenpipettiert werden.

3.6 Kultivierung von A-10 SMC und MDCK II-Zellen

Beide Zelllinien werden subkonfluent bei 37 °C, 95 % rF und 5 % CO₂ auf 100 mm Petrischalen kultiviert. Das Zellmedium wird alle 2 - 3 Tage gewechselt und die Zellen bei 80% iger Konfluenz subkultiviert. Dafür werden die Zellen zunächst mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺, 6 ml, 37 °C) gewaschen. A-10 SMC werden auf Grund des höheren Serumanteils im Medium zwei Mal mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, MDCK II-Zellen werden zusätzlich mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02 % (w/V)) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C im Inkubator von der Zellkulturplatte abgelöst. Dies dauert bei A-10 SMC etwa 4 – 5 Minuten, bei MDCK II-Zellen 8 – 10 Minuten. Durch Zugabe von 5 ml Medium wird die Trypsinreaktion abgestoppt. MDCK II-Zellen werden 1/6 – 1/10 (V/V), A-10 SMC 1/10 (V/V) mit Medium verdünnt und auf eine neue Petrischale überführt.

3.7 Durchflusszytometrie

3.7.1 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Aufnahme von Cy3-DNA-Komplexen werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen 24 h vor dem Versuch in Mikrotiterplatten (24-Well-Platten) mit einer Zelldichte von 40 000 pro Well ausplattiert. Am Versuchstag erfolgt ein Medienwechsel und nach einer Stunde werden die Zellen mit nach 3.3 hergestellten +/– US Cy3-DNA-Komplexen (Zielkonzentration 1 µg DNA/Well) für 5 h inkubiert. Um eine optimale Verteilung der Komplexe im Zellmedium zu gewährleisten werden die Multititerplatten für 8 Minuten bei 80 rpm auf der Schüttelplatte inkubiert und anschließend in den Inkubator zurückgesetzt.

Für die durchflusszytometrische Aufarbeitung werden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} , 1 ml, 4 °C) gewaschen. Um bei den Aufnahmeversuchen zwischen zellulärer Assoziation und Internalisierung der Cy3-DNA-Komplexe zu unterscheiden werden extrazelluläre Lipid/DNA-Komplexe durch zusätzliches Waschen der Zellen mit CellScrubTM Puffer (300 µl, 10 min, RT) entfernt. Nach erneutem 2-maligen Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} , 1 ml, 4 °C) werden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02 % (w/V), 200 µl, 4 °C) geerntet,

mit 800 µl Medium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden pelletiert (1200 rpm, 4 min, 4 °C), mit 1 ml PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} , 4 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 4 min, 4 °C). Anschließend wird das Zellpellet in 200 µl PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+} , 4 °C) aufgenommen, auf Eis bei 4 °C lichtgeschützt gelagert und innerhalb von 30 Minuten am Durchflusszytometer vermessen.

Am FACS-CaliburTM werden pro Probe 10 000 Zellen analysiert. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt dabei durch einen Argon-Laser (488 nm) und das emittierte Licht wird in 3 Fluoreszenzkanälen (FL-1 - 3) detektiert. Um nur intakte, lebende Zellen zu analysieren wird die Zellpopulation mit Hilfe der Zellwolke (Detektion des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts) entsprechend eingegrenzt. Für die Aufnahmeversuche wird die Verschiebung im Kanal FL-2 (Cy3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgewertet.

3.7.2 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Endozytosemarkern

Um das Endozytoseprofil der verwendeten Zelllinien A-10 SMC und MDCK II zu charakterisieren, werden diese mit so genannten "Endozytosemarkern" inkubiert. Dabei handelt es sich um fluoreszenzmarkierte Substanzen, deren zelluläre Aufnahmeroute und Prozessierung bekannt ist. Als Endozytosemarker werden nach Vorgängerarbeiten Transferrin-488 als Clathrin-Marker und C₅-Bodipy-Lactosylceramid als Caveolae-Marker eingesetzt und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch bestimmt (Schneider 2010). A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden am Tag vor dem Versuch in Mikrotiterplatten (24-Well-Platten) mit einer Zelldichte von 40 000 pro Well ausplattiert. Am Versuchstag erfolgt ein Medienwechsel und eine Stunde danach Inkubation der Endozytosemarker nach Tabelle 3-1 über 5 h. Die durchflusszytometrische Aufarbeitung entspricht 3.7.1. Um die zelluläre Aufnahme der Marker von zellulärer Assoziation abzugrenzen wird parallel zu jedem Aufnahmeversuch ein 4 °C-Versuch durchgeführt.

Substanz	Zielkonzentration pro Well
Transferrin aus humanem Serum, Alexa Fluor [®] 488	1,5 µg
$Bodipy^{ extsf{B}}$ FL C ₅ Lactosylceramid komplexiert mit BSA	1 µg

Tabelle 3-1: Eingesetzte Endozytosemarker

3.7.3 Bestimmung der Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen

Zur Bestimmung der Transfektion von DC 30[®]/DNA-Komplexen werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen 24 h vor dem Versuch mit einer Zelldichte von 20 000 pro Well ausplattiert. Am Versuchstag werden die Zellen mit ungefärbten +/– US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen (1 µg DNA/Well) für 5 h inkubiert. Anschließend erfolgt ein Medienwechsel sowie weitere Kultivierung. Für die Kinetikversuche wird die Transfektion der Zellen nach 12, 24, 48, 72 und 96 h durchflusszytometrisch analysiert. Für die Folgeversuche wird die Transfektion in MDCK II nach 24 h und in A-10 SMC nach 48 h bestimmt. Die durchflusszytometrische Aufarbeitung entspricht dabei 3.7.1. Für die Transfektionsversuche wird die Verschiebung im Kanal FL-1 (EGFP) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgewertet.

3.7.4 Bestimmung der Transgenexpressionsstärke

Das Design der Kinetikversuche zur Bestimmung der Proteinexpressionsstärke über die Zeit entspricht 3.7.3. Die Aufarbeitung der Zellen entspricht 3.7.1. Über die Verschiebung der Zellen im Kanal FL-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle werden zunächst die erfolgreich transfizierten Zellen detektiert und gegatet. Die EGFP-Expressionsstärke wird mittels des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität dieser Zellpopulation bewertet.

3.7.5 Bestimmung des Einflusses der kovalenten Cy3-Markierung auf die Bioaktivität der Plasmid-DNA

Der Einfluss der Cy3-Markierung der Plasmid-DNA auf die Integrität dieser wird in einem Transfektionsversuch in der Zelllinie A-10 SMC untersucht. A-10 SMC werden dafür nach 3.7.3 vorbereitet und zum Zeitpunkt t = 0 mit Cy3-gefärbten sowie ungefärbten + US DC 30[®]/DNA-Komplexen für 5 h inkubiert. Danach erfolgt ein Medienwechsel sowie weitere für 43 h. 48 h Transfektion Inkubation Nach wird die der Zellen durchflusszytometrisch nach 3.7.3 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Bei Anregung der GFP-Fluoreszenz ist eine gleichzeitige Anregung des Cy3-Farbstoffs durch den 488-Laser nicht zu umgehen. Das GFP-Signal der Zellen wird im Kanal FL-1 (515-545 nm) detektiert. Das Emissionsmaximum von Cy3 liegt bei 570 nm, der zusätzliche Beitrag zum EGFP-Signal im Kanal FL-1 ist daher als geringfügig anzusehen. Nichtsdestotrotz wird dieser mittels Cy3-Einzelfärbungen durch entsprechende Detektoreinstellungen am Durchflusszytometer kompensiert. Ausgewertet wird die relative Transfektseffizienz der Cy3-DNA-Komplexe im Vergleich zu ungefärbten Lipid/DNA-Komplexen.

3.7.6 Abhängigkeit der Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen von der Zellproliferationsrate

Um den Einfluss der Zellproliferationsrate auf die Transfektion von DC 30° /DNA-Komplexen zu bestimmen, werden zunächst Wachstumskurven der Zelllinie A-10 SMC erstellt. Durch FCS-Verarmung wird eine Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus provoziert. A-10 SMC werden dazu 24 h vor Versuchsbeginn mit einer Zelldichte von 50 000/Well in einer Multititerplatte (12-Well-Platte) ausplattiert. Zum Zeitpunkt t = 0 werden die Zellen 2-mal mit 1 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und das Medium gewechselt (Kontrolle: + 20 % FCS, Proben: 0,75 % FCS (V/V)) und die Zellen weiter bei 37 °C kultiviert. Nach 24, 48 und 72 h wird die Zellzahl pro Well mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu werden die Zellen mit 1 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02 % (w/V), 200 µl, 37 °C) geerntet und mit 800 µl des entsprechenden Mediums aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension werden anschließend in die Zählkammer eingebracht, ausgezählt und die Zellzahl pro Well berechnet.

Um für den Transfektionsversuch vergleichbare Zelldichten in Kontroll- sowie arretierten Zell-Wells zu gewährleisten werden A-10 SMC für den G_0/G_1 -Block 48 h vor dem Versuch mit einer Zelldichte von 25 000/Well in Multiwell-Platten (24-Well-Platten) ausplattiert, die Kontrollzellen werden 24 h vor dem Versuch mit einer Zelldichte von 20 000/Well ausplattiert. Nach 24 h werden die zu arretierenden Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und mit FCS-verarmtem Medium (0,75 % (V/V)) für 36 h inkubiert. Anschließend erfolgt bei Kontroll- sowie arretierten Zellen ein Mediumwechsel 1 h bevor sie mit den nach 3.3 hergestellten DC 30[®]/pEGFP-Komplexen inkubiert werden. Nach 5 h erfolgt ein Medienwechsel (20 % FCS für Kontrollzellen und 0,75 % FCS für arretierte Zellen (V/V)). Die Transfektion der Zellen wird nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Aufarbeitung hierfür entspricht 3.7.1.

3.7.7 Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen - Einfluss von Endozytoseinhibitoren und –enhancern

Das Versuchsdesign für Aufnahme- und Transfektionsversuche entspricht 3.7.1 bzw. 3.7.3. Als Endozytoseinhibitoren werden als Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin (clz), als Caveolae-Inhibitor Genistein (gen) und als Clathrin- und Caveolae-Inhibitor Methyl-β-Cyclodextrin (mbcd) eingesetzt. Als Endozytoseenhancer kommen Lactosylceramid (laccer) als Caveolae-Enhancer und der Clathrin-Enhancer (ce) Saponinum album zum Einsatz. Die Inhibitoren und Enhancer werden nach Tabelle 3-2 bzw. Tabelle 3-3 prä- und anschließend mit den Lipid/DNA-Komplexen für 5 h koinkubiert. Die Aufarbeitung für die durchflusszytometrische Analyse entspricht 3.7.1.

Inhibitor	Konzentration	Präinkubationszeit [min]	Mechanismus
Chlorpromazin	28 µM	60	Clathrin-Interaktion (Wang et al. 1993)
Genistein	200 µM	60	Tyrosinkinasehemmung (Parton <i>et al.</i> 1994)
Methyl-β- Cyclodextrin	2,5 ^ª bzw. 5 mM ^b	15	Bildung einer Einschlussverbindung mit Cholesterol (Kilsdonk <i>et al.</i> 1995)

Tabelle 3-2: Eingesetzte Endozytoseinhibitoren

^a eingesetzte Konzentration in A-10 SMC

^b eingesetzte Konzentration in MDCK II

Tabelle 3-3: Eingesetzte Endozytoseenhancer

Enhancer	Konzentration	Präinkubationszeit [min]	Mechanismus
Clathrin- Enhancer	10 µg/ml	0	Steigerung des Clathrin-vermittelten Ligandentransports am Rezeptor (Weng <i>et al.</i> 2009)
Lactosylceramid	4 µg/ml	0	Selektive Caveolae-Stimulation (Sharma et al. 2004)

3.7.8 Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen nach Modifizierung mit TATp

Das zellpenetrierende Peptid TATp (transactivating transcriptional activator peptide, 11 AS) aus HIV-1 vermittelt unspezifisch die Transduktion von gebundenen Molekülen in die Zelle. Um die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen in MDCK II zu steigern, werden DC 30[®]/DNA-Komplexe mit dem TATp nach der im Lehrstuhl etablierten SPIT-Methode (sterol-based post-insertion technique) modifiziert (Lewrick 2008). Das TAT-Peptid wird zunächst im Verhältnis 1:10 (mol/mol) zum Mal-PEG-Chol-Anker pipettiert, im US-Bad gemischt, gevortext und anschließend im Thermomixer bei 20 °C, 1000 rpm über Nacht inkubiert. Bei der Kopplung reagiert der Cystein-Rest des TATp mit der Maleinimid-Gruppe des Ankers. Für die Einlagerung des TATp-Anker-Konjugats in die Komplexe werden zwei Protokolle verfolgt: Zum einen wird das TATp-Anker-Konjugat in nach 3.1.3 hergestellte Ausgangsliposomen eingelagert und diese anschließend mit der Plasmid-DNA komplexiert (DC 30/TATp + DNA). Für das zweite Protokoll werden DC 30[®]/DNA-Komplexe nach 3.3 hergestellt und das TATp-Anker-Konjugat anschließend in die Komplexe eingelagert (DC 30/DNA + TATp). Es wird jeweils 5 - 20 mol % Anker bezogen auf das Gesamtlipid eingesetzt. Die Einlagerung des TATp-Anker-Konjugats erfolgt für jeweils 30 Minuten im Thermomixer bei 20 °C. 1000 rpm. Die Durchführung der Aufnahmeund Transfektionsversuche in MDCK II erfolgt nach 3.7.1 bzw. 3.7.3. TATp-modifizierte DC 30[®]/DNA-Komplexe werden 5 h inkubiert und anschließend die zelluläre Aufnahme von Cy3-gefärbten modifizierten Komplexen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transfektion von MDCK II-Zellen wird nach Inkubation von ungefärbten modifizierten Komplexen nach 24 h analysiert.

3.7.9 Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen nach Hemmung der endosomalen Freisetzung durch Bafilomycin A₁

Die endosomale Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen wird in der Zelllinie A-10 SMC durch Einsatz des Makrolidantibiotikums Bafilomycin A₁ gehemmt. Die endosomale Komplexfreisetzung beruht auf dem Effekt des Helferlipids DOPE, welches unter sauren Bedingungen eine Phasenumkehr (Bilayer – invers hexagonal) eingeht. Bafilomycin A₁ blockiert selektiv die vakuoläre Protonenpumpe (V-ATPase) und somit die Acidifizierung der Endosomen (Bowman *et al.* 1988, Drose & Altendorf 1997). Durch den erhöhten intraendosomalen pH-Wert wird die Phasenumkehr von DOPE erschwert und somit die Komplexfreisetzung gehemmt. Für die Versuche werden A-10 SMC nach 3.7.1 bzw. 3.7.3 vorbereitet. Bei den mit Bafilomycin A₁ zu behandelnden Zellen wird das Medium nach einem Waschschritt mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Die Zellen werden mit Bafilomycin A₁ 100 nM für 45 Minuten bei 37°C präinkubiert. Anschließend erfolgt ein Medienwechsel mit FCS-haltigem Medium und Inkubation der Zellen mit DC 30[®]/(Cy3-) DNA-Komplexen für 5 h. Die zelluläre Aufnahme von Cy3-DNA-Komplexen wird nach 5 h, die zelluläre Transfektion ungefärbter Komplexe nach 48 h durchflusszytometrisch analysiert. Die Aufarbeitung der Zellen entspricht dabei 3.7.1.

3.7.10 Bestimmung der Transfektion von MDCK II-Zellen mit Lipid/Protamin/DNA-Komplexen (LPD)

Das Versuchsdesign zur Bestimmung der Transfektion von Lipid/DNA/Protamin-Komplexen entspricht 3.7.1 bzw. 3.7.3. MDCK II-Zellen werden 24 h vor dem Versuch mit einer Zelldichte von 20000 pro Well ausplattiert. Am Versuchstag werden die Zellen mit DOTAP/Protamin/DNA-Komplexen verschiedener Lipid/DNA-Verhältnisse (12/1, 14/1, 16/1 (n/m)) mit einer Zielkonzentration von 1 µg DNA/Well für 5 h inkubiert. Anschließend erfolgt ein Medienwechsel. Die Transfektion der Zellen wird nach 24 h durchflusszytometrisch analysiert und entspricht 3.7.1.

3.8 Quantifizierung der intrazellulären Plasmidmenge

In Anlehnung an die Arbeiten von James et al. 2000 (James & Giorgio 2000) wird die Anzahl der intrazellulären Cy3-DNA-Plasmidkopien in A-10 SMC und MDCK II-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Fluorimetrie bestimmt. Die intrazelluläre Plasmid-DNA-Menge wird dabei über das BD QuantiBRITETM PE *Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit* quantifiziert. Das Kit enthält lyophilisierte PE-Beads vier unterschiedlicher Färbegrade. Werden diese mit den gleichen Einstellungen wie für den Zellversuch am Durchflusszytometer vermessen, kann über die Verschiebung im FL-2-Kanal auf die Anzahl an Fluoreszenzmolekülen pro Zelle geschlossen werden (Sujata B. Iyer 1997). Da die Plasmid-DNA der Komplexe nicht mit PE sondern mit Cy3 gefärbt ist, werden zunächst die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe am Fluorimeter miteinander korreliert.

3.8.1 Erstellung der Kalibriergeraden für R-PE und Cy3-CTP am Fluorimeter

Die Fluorimetermessungen wurden von Frau Alexandra Walter (Pharmazeutische Chemie, Universität Freiburg) durchgeführt.

Zunächst werden von den Fluoreszenzfarbstoffen R-PE (R-Phycoerythrin) und Cy3-CTP Verdünnungsreihen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) hergestellt und die Lösungen am Fluorimeter gegen PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) als Leerwert vermessen. Für R-PE werden 7 Verdünnungen über einen Konzentrationsbereich von $8,50 \cdot 10^{-13}$ bis $1,28 \cdot 10^{-11}$ mol/2 ml und für Cy3-CTP 9 Verdünnungen über einen Konzentrationsbereich von $1,00 \cdot 10^{-12}$ bis $1,00 \cdot 10^{-10}$ mol/2 ml hergestellt. Von jeder Konzentration dieser Verdünnungsreihen wird jeweils eine Dreifachbestimmung der Fluoreszenzintensität durchgeführt. Da für die spätere Korrelation der Fluorimeter- mit den FACS-Daten die eingesetzten Stoffmengen benötigt werden, wird für die Erstellung der Kalibriergeraden jeweils die Fluoreszenzintensität gegen die Stoffmenge Farbstoff pro Küvette aufgetragen (siehe Abbildung 3-1D).

3.8.2 Zellversuche

Für die quantitative Bestimmung der zellulären Aufnahme von Cy3-Plasmidkopien werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen wie unter 3.7.1 beschrieben mit einer Zelldichte von 20 000/Well in einer 48-Well-Platte ausplattiert und mit +/– US Cy3-DNA Komplexen 5 h inkubiert. Das Verhältnis von Cy3/DNA wurde zuvor nach den Angaben des Herstellers bestimmt (s. 3.2.5). Um die Kinetik der Komplexaufnahme zu erfassen, wird die zelluläre Aufnahme der Komplexe nach 1, 2, 3 und 5 h bestimmt.

3.8.3 Auswertung

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Analyse der Zellen werden die QuantiBRITETM PE Beads mit den Einstellungen des Zellversuchs über das *Quantitation Aquisition* Modul der CellQuestPro-Software vermessen. Die vier Färbegrade der Beads spiegeln sich in vier Peaks mit entsprechender Verschiebung im Kanal FL-2 wieder (*low - med-low - med-high - high*). Durch logarithmisches Auftragen der geometrischen Mittel der einzelnen Peaks gegen den Logarithmus der chargenspezifischen PE/Bead-Werte erhält man eine Kalibriergerade. Anhand dieser kann nun über die FL-2-Verschiebung der Zellpopulation auf die Äquivalentmenge PE-Molekülen \mathbf{x}_{PE} pro positiver Zelle rückgerechnet werden. Da kein Quantifizierungskit mit dem im Zellversuch verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 erhältlich ist, ist eine Korrelation der Fluoreszenzintensitäten von Cy3 und PE nötig. Mit Hilfe der Kalibriergeraden am Fluorimeter (vgl. 3.8.1) wird die Fluoreszenzintensität der PE-Moleküle \mathbf{x}_{PE} ermittelt und auf die Anzahl Cy3-Moleüle \mathbf{x}_{Cy3} , denen diese Intensität entspricht, korreliert. Da zuvor die Anzahl Cy3-Moleküle pro Plasmid bestimmt wurde, lässt sich nun die Plasmidmenge pro Zelle berechnen.



Abbildung 3-1: Quantifizierung der intrazellulären Plasmidmenge

Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Vermessung von QuantiBRITETM PE Beads (A) sowie Cy3-DNA-Komplex-inkubierter Zellen (B). QuantiBRITETM PE Beads-Kalibriergerade: Korrelation des geometrischen Mittels der FL2-Verschiebung der Beads mit dem chargenspezifischen Färbegrad PE/Bead (C). Kalibriergeraden der Fluoreszenzfarbstoffe R-PE sowie Cy3-CTP am Fluorimeter (D).

3.9 Fluoreszenzmikroskopie

3.9.1 Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA

Einen Tag vor dem Versuch werden Ø-12 mm-Deckgläschen hitzesterilisiert und in einer passenden Multiwellplatte (24-Well-Platte) mit 1 ml autoklavierter Gelatinelösung (0,2 % in PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)) für 10 Minuten bei 37 °C beschichtet und anschließend 2-mal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen.

Für die Bestimmung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen auf diese beschichteten Deckgläschen mit einer Zelldichte von 20 000/Well ausplattiert. Am Versuchstag erfolgt ein Medienwechsel und anschließende Inkubation von nach 3.3 hergestellten +/– US DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen. Nach 5 h werden die Komplexe durch einen Medienwechsel entfernt und die Zellen für weitere 25 h inkubiert. Um die Kinetik der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA zu bestimmen wird nach 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h für die Analyse aufgearbeitet. Für weitere Experimente wird lediglich das Kernintensitätsmaximum analysiert (5 h in A-10 SMC und 8 h in MDCK II).

Zu den jeweiligen Zeitpunkten werden die Zellen mit PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen. Eventuell noch extrazellulär vorhandene Komplexe werden durch einen Waschschritt mit CellScrub Buffer (10 min; RT) und weiteres 2-maliges Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) entfernt. Die Zellen werden mit 4% iger (m/V) Paraformaldehydlösung für 20 Minuten bei 37 °C fixiert und anschließend erneut 2-mal mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen. Für die Zellkernfärbung werden die Zellen mit Triton-X-100 (0,1 % in Millipore-Wasser) für 5 Minuten bei RT permeabilisiert, unspezifische Bindungsstellen mit frisch hergestellter BSA-Lösung (1 % in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}); 20 min; RT) blockiert und die Kerne anschließend mit SYTOX[®] Green Nucleic Acid Stain (100 nM in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}); 15 min, RT) gefärbt. Nach 3-maligem Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) auf dem Schüttler (150 rpm) werden die Deckgläschen aus der Mikrotiterplatte entnommen, getrocknet und mit dem *antifading* Reagenz MobiGLOW[®] eingebettet.

Von den so hergestellten Proben werden am konfokalen Mikroskop LSM 510 Meta mit einem 20 x/1,4 NA Objektiv 15 – 20 Bilder pro Probe aufgenommen und mit der Zen2009 Software bearbeitet. Im Anschluss werden die Bilder mit der CellProfilerTM-Software analysiert.

3.9.2 CellProfilerTM-Analysen

Die aufgenommenen Mikroskopbilder werden manuell mit Hilfe der Zen 2009 Software in die Einzelkanäle grün (SYTOX[®] Green-Färbung: Zellkerne) und rot (Cy3-Färbung: Plasmid-DNA) zerlegt und anschließend in die CellProfilerTM Software geladen. Zunächst werden die Einzelkanalbilder innerhalb der Software zur Vorbereitung der Analyse prozessiert: Die Bilder werden in Graustufenbilder umgewandelt und anschließend der Hintergrund der Zellkernbilder über das Modul *EnhanceOrSupressFeatures* minimiert. Als nächstes werden die Zellkerne automatisch erkannt und segmentiert (*IdentifyPrimaryAutomatic*). Von jedem Zellkern wird ein Sicherheitsabstand von 1 – 2 Pixeln abgezogen (*ExpandOrShrinkObjects*) um perinukleär lokalisierte Cy3-DNA von intranukleärer pDNA abzugrenzen. Anschließend werden die Zellkernumrisse auf das Cy3-DNA-Bild übertragen und die Cy3-Intensität in den Kernen gemessen (*MeasureObjectIntensity*). Des Weiteren werden in den Cy3-Bildern Cy3-DNA-Partikel (Ø 1 – 15 bzw. 5 – 15 Pixel) definiert (*IdentifyPrimaryAutomatic*) und die Anzahl der Partikel pro Zelle sowie pro Zellkern (*RelateObjects*) gezählt.



В



Abbildung 3-2: CellProfiler[™]-Analyse

(A) Prinzip der CellProfiler[™]-Bildanalysen: Zellkerne sowie Cy3-DNA-Partikel werden automatisch identifiziert. Obere Reihe: Messung der Cy3-Intensität pro segmentiertem Zellkern. Untere Reihe: Bestimmung der Anzahl an Cy3-DNA-Partikeln pro Zellkern. (B) CellProfiler[™]-Pipeline zur Prozessierung und Analyse der Mikroskopbilder.
3.9.3 Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA nach Inkubation mit endozytoseaktiven Substanzen

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung des Einflusses von endozytoseaktiven Substanzen auf die nukleäre Aufnahme von Cy3-DNA entspricht 3.9.1. Die Endozytoseinhibitoren und -enhancer werden nach Tabelle 3-2 und Tabelle 3-3 eingesetzt und nach der entsprechenden Präinkubationszeit mit den Komplexen für 5 h koinkubiert. Die weitere Aufarbeitung entspricht 3.9.1.

3.9.4 Konfokale Kolokalisationsstudien zur Bestimmung der intrazellulären Prozessierung von Cy3-DNA-Komplexen

Für die Kolokalisationsstudien von Cy3-DNA-Komplexen mit dem spätendosomalen/lysosomalen Markerprotein LAMP1 als Clathrin-Marker sowie Caveolin-1 Caveolae-Marker werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen nach 3.9 als auf gelatinebeschichteten Deckgläschen ausplattiert und mit nach 3.3 hergestellten +/- US Cy3-DNA-Komplexen für 5 h inkubiert. Die Kolokalisation von Cy3-DNA und LAMP1 wird nach 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h, die Kolokalisation mit Caveolin-1 nach 5 (A-10 SMC) bzw. 8 (MDCK II) sowie 24 h bestimmt. Die Fixierung der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten entspricht 3.9. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt mit Saponin-Lösung (1 mg/ml in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}); 10 min; RT) oder mit Triton-X-100 (0,1 % in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}); 5 min; 4 °C). Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit blocking solution (10 % FCS in PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺)) für 30 Minuten bei RT blockiert. Zwischenzeitlich werden die Primär- und Sekundärantikörper auf die Zielkonzentration (vergleiche Tabelle 3-4 und Tabelle 2-1) verdünnt. Zunächst werden von der Verdünnung der Primärantikörper je 100 µl auf Parafilm gegeben und die Deckgläschen invers darauf gegeben. Auf Grund des besseren Spreitens der Lösung auf dem Parafilm kann die benötigte Antikörpermenge auf das angegebene Volumen reduziert werden. Die Deckgläschen werden nun 30 bzw. 60 Minuten bei RT unter Lichtschutz inkubiert und anschließend 3-mal mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Analog zum Primärantikörper wird im Anschluss der Sekundärantikörper für 60 Minuten bei RT inkubiert und wiederum 3-mal mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Die Deckgläschen werden auf einem Papiertuch getrocknet und anschließend mit dem antifading Reagenz MobiGLOW[®] eingebettet. Von den Proben werden am konfokalen Mikroskop Bilder mit einem 63 x/1,4 NA bzw. einem 100 x/1,3 NA objektiv aufgenommen und die Kolokalisation von Cy3-DNA und LAMP1 bzw. Caveolin-1 mittels der Software ImageJ 1.42 analysiert.

Tabelle 3-4: Primäre Antikörper

Name	Zielkonzentration [µg/ml]	Inkubationszeit [min]
Mouse-anti Caveolin-1 IgM	10	30
Rabbit anti-LAMP1	50	60

Tabelle 3-5: Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Zielkonzentration [µg/ml]]	Inkubationszeit [min]
Goat anti-mouse IgG (H+L) Chromeo [™] 642	20	60
Goat anti-mouse IgG (H+L) MFP 488	20	60
Goat anti-rabbit IgG (H+L) Chromeo [™] 546	20	60
Goat anti-rabbit IgG (H+L) MFP 488	40	60

3.10 Bestimmung der Zellviabilität und -toxizität

3.10.1 Zellviabilität

Um den Einfluss der im Zellversuch inkubierten Substanzen auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu bestimmen wird diese in A-10 SMC und MDCK II-Zellen während der verschiedenen Versuche mittels des CellTiterGloTM-Assays erfasst. Die Viabilität der Zellen wird über die Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts bestimmt und spiegelt somit die metabolische Aktivität der Zellen wider. Der CellTiterGloTM-Assay bietet ein simples Ein-Schritt "*add-mix-measure*" Design: Durch Zugabe des CellTiterGloTM-Reagenzes zu den Zellen werden diese zunächst lysiert und intrazelluläres ATP freigesetzt. Im Folgenden wird

das Substrat Luciferin unter ATP-Verbrauch mittels des im Reagenz enthaltenen Enzyms Luciferase zu Oxiluciferin umgesetzt. Bei dieser Reaktion wird chemische Energie in Form von Lumineszenz frei, die mit einem Luminometer quantifiziert wird. Das Lumineszenzsignal ist direkt proportional zur vorhandenen ATP-Menge und entspricht damit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen (Crouch et al. 1993). Die Durchführung des Assays erfolgt nach Angaben des Herstellers: Das lyophilisierte CellTiterGloTM-Reagenz wird mit dem im Kit enthaltenen Puffer rekonstituiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für den Versuch wird ein Aliquot des CellTiterGloTM-Reagenzes maximal 30 Minuten bei RT unter Lichtschutz aufgetaut. Die Multititerplatte mit den Zellen wird aus dem Inkubator entnommen und ebenfalls auf RT gebracht. Nun wird zu jedem Well das exakt gleiche Volumen an CellTiterGloTM-Reagenz pipettiert und die Platte zur Beschleunigung der Zelllyse für 2 Minuten bei 300 rpm auf der Schüttelplatte inkubiert. Nach weiterer 10-minütiger Inkubation bei RT werden aus jedem Well 3 Proben à 200 µl in die Vertiefungen einer Luminometerplatte (96-Well) pipettiert und diese unmittelbar danach im Luminometer vermessen. Aus den 3 Viabilitätsproben wird der Mittelwert berechnet und die Viabilität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (entsprechend 100 % Viabilität) angegeben.

3.10.2 Zelltoxizität

Zusätzlich zur Bestimmung der Zellviabilität wird die Zelltoxizität der eingesetzten Substanzen überprüft.

Zum einen werden lebende Zellen am Durchflusszytometer durch Analyse des Vorwärts-(FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) detektiert und die Zellwolke entsprechend gegatet um die Analyse auf lebende Zellen zu beschränken.

Des Weiteren können tote Zellen mit Hilfe des Avitalfarbstoffs 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) kenntlich gemacht werden. Während der Apoptose bzw. Nekrose von Zellen kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (Alberts *et al.* 2008). Da 7-AAD nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann, können mit diesem Fluoreszenzfarbstoff spätapoptotische sowie nekrotische Zellen angefärbt werden. Durch die Interkalation von 7-AAD in die DNA verändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs (Exc 488 nm; Em_{max} 647 nm). 7-AAD wird unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse zu den Zellen gegeben (0,25 µg/Probe) und für 20 Minuten bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend werden die Zellen am Durchflusszytometer vermessen. Nicht-vitale Zellen

zeigen also eine zusätzliche Fluoreszenz im Kanal FL-3. Bei der Auswertung wird die Zellwolke entsprechend soweit eingegrenzt, dass die Fluoreszenzintensität von 7-AAD in FL-3 unter 1 % liegt.

3.11 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mittels der Software GraphPad Prism 5 durchgeführt. Ein p-Wert < 0,1 wird als signifikant (*), < 0,05 bzw. < 0,005 als hoch signifikant (** bzw. ***) betrachtet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen

Die Herstellung von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen erfolgt nach den Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider (Schneider 2010). +/– US Ausgangsliposomen für die spätere Komplexierung von Plasmid DNA werden nach 3.1.3 hergestellt und nach 3.3 mit pEGFP zu Lipid/DNA-Komplexen in einem Verhältnis Lipid/DNA von 8/1 (m/m) umgesetzt. Größe und Form der DC 30[®] Ausgangsliposomen sowie der resultierenden Komplexe werden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert. Weiterhin wird der Einfluss der Lagertemperatur und des pH-Werts auf die Partikelgrößenentwicklung der Komplexe untersucht.



4.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)



Die DC 30[®] Ausgangsliposomen sowie die resultierenden Lipid/DNA-Komplexe zeigen eine heterogene Partikelgrößenverteilung, die sich in den Polydispersitätindices von 0,22 – 0,33 widerspiegelt. In allen Proben finden sich stets 2 – 3 Partikelgrößenfraktionen (1. Fraktion: < 200 nm; 2. Fraktion: 400 – 500 nm; 3. Fraktion: > 1000 nm). Die Partikelgrößenfraktionen der ultraschallbehandelten Ausgangsliposomen sind dabei stets kleiner als die der unbehandelten Liposomen. Vergleichbares gilt für die resultierenden +/– US Lipid/DNA-Komplexe: die + US-Präparation enthält im Vergleich zu – US tendenziell kleinere Partikel bzw. einen kleineren Anteil der Fraktionen mit einer Größe > 1 µm. Die Behandlung der Ausgangsliposomen mit der Ultraschallspitze führt demnach zur Bildung von Lipid/DNA-Komplexen mit einer geringeren Teilchengröße.

4.1.1.1 Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen

Die Partikelgrößenentwicklung von +/– US Lipid/DNA-Komplexen bei verschiedenen Lagertemperaturen wird ebenfalls mittels PCS-Messung bestimmt. +/– US Ausgangsliposomen sowie DC 30[®]/DNA-Komplexe werden nach 3.1.3 bzw. 3.3 hergestellt und die Ausgangspartikelgrößen nach 20 Minuten gemessen. Anschließend werden die Komplexe jeweils bei 4 °C im Kühlschrank und 37 °C im Trockenschrank gelagert und die Partikelgrößenentwicklung über 30 h verfolgt.

Die Partikelgrößen der + US-Komplexe ändern sich bei den untersuchten Lagerbedingungen nur geringfügig. Die beobachteten Partikelgrößenfluktuationen bei den unbehandelten Komplexen lassen sich mit der Heterogenität der Probe und der dynamischen Natur der Komplexe erklären. Verschiedene Komplexstrukturen stehen miteinander im Gleichgewicht, je nach Lage und momentanen Zustand des Systems werden dementsprechende Messergebnisse erhalten. Die temperaturabhängige Größenzunahme von Lipid/DNA-Komplexen wurde bereits in den Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider beschrieben (Schneider 2010).



Abbildung 4-2: Einfluss der Lagertemperatur auf die Partikelgrößenentwicklung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexe wurden nach 3.3 hergestellt, bei 4 bzw. 37 °C eingelagert und die hydrodynamischen Durchmesser über 30 h mittels PCS bestimmt (n = 3, +/- SEM).

4.1.1.2 Einfluss des pH-Werts auf die Größenentwicklung von Lipid/DNA-Komplexen

Bei der Inkubation von Cy3-gefärbten +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen im Zellversuch (vergleiche 4.2.2, 4.2.5 sowie 4.2.10) zeigen diese zelllinienspezifisch ein unterschiedliches intrazelluläres Erscheinungsbild. Dies ist insbesondere für die unbehandelte Komplexpräparation in der Zelllinie A-10 SMC der Fall (siehe Abbildung 4-3). Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Größenverhältnisse wurden in Abbildung 4-3 Cy3-gefärbte Strukturen mittels der ImageJ Software ausgemessen. Zu berücksichtigen bleibt, dass hier keine einzelnen Lipid/DNA-Komplexe vermessen werden können. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche intrazelluläre Erscheinungsbild der +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexe könnte die Veränderung der Komplexstruktur auf Grund der Acidifizierung der endosomalen Kompartimente im Laufe der intrazellulären Prozessierung sein. Da – US Komplexe eine geringere Packungsdichte als + US Komplexe aufweisen, könnten diese für pH-abhängige Strukturveränderungen anfälliger sein. Um den Einfluss der pH-Wert-Änderung auf die Komplexgrößenentwicklung zu untersuchen, werden +/- US Lipid/DNA-Komplexe nach 3.3 hergestellt und die Partikelgrößenveränderung in Abhängigkeit vom pH-Wert mittels PCS analysiert. Als pH-Werte werden pH 7,4 (physiologischer Wert) und zur Simulation der endosomalen Verhältnisse pH 5,5 (früh endosomal) und 4,5 (spät endosomal) gewählt.



Abbildung 4-3: Intrazelluläres Erscheinungsbild von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen in A-10 SMC bzw. MDCK II-Zellen

A-10 SMC bzw. MDCK II-Zellen wurden für 5 h mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen (rot) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit SYTOX[®] Green (grün) gefärbt. Konfokale Mikroskopie, Größenmaßstab 10 µm.



Abbildung 4-4: Einfluss des pH-Werts auf die Partikelgrößenentwicklung von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen +/- US Lipid/DNA-Komplexe wurden nach 3.3 in sterilfiltriertem Transfektionsmedium (pH 7,4) hergestellt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,5 bzw. 4,5 eingestellt und die hydrodynamischen Partikeldurchmesser mittels PCS bestimmt (n = 3, +/- SEM).

Aus den PCS-Messungen geht hervor, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Partikelgrößen der ultraschallbehandelten Komplexe hat, die mittleren Partikeldurchmesser bewegen sich hier im Bereich von 427.1 + -64.3 nm (PDI > 0.2) wohingegen sich die Partikelgrößen bei den unbehandelten Komplexen deutlich vergrößern (573,4 +/- 19,2 nm bei pH 7,4; 900,5 +/- 36,6 nm bei pH 4,5; PDI > 0,3). Die pH-abhängige Größenzunahme der unbe-handelten Komplexe erklärt zum Teil das Auftreten der großen Cy3-gefärbten Strukturen im Zellversuch. Die Inkubation von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen in der Zelllinie A-10 SMC führt stets zu intrazellulären Cy3-gefärbten Strukturen dieses unterschiedlichen Erscheinungsbildes, in MDCK II-Zellen kann dieses Phänomen allerdings nicht beobachtet werden. Die intrazelluläre pH-Wert-Änderung kann daher nicht als einzige relevante Ursache für den massiven Größenzuwachs der Cy3-gefärbten Strukturen in A-10 SMC angesehen werden. Vergleichbare intrazelluläre Größenzunahme von Lipid/DNA-Komplexen wird von Kamiya et al. beschrieben (Kamiya et al. 2002). Als Ursache wird hierfür die Komplexierung der Plasmid-DNA mit zytosolischen DNA-bindenden Makromolekülen verantwortlich gemacht. Die Dissoziation von Plasmid-DNA und kationischem Lipid in beiden Zellmodellen wurde in Vorgängerarbeiten gezeigt (A-10: 75 % MDCK II: 50 %) (Schneider 2010). Die geringere Packungsdichte vs. der - US-Komplexstruktur sowie die effizientere Freisetzung von Plasmid-DNA in der Zelllinie A-10 SMC könnte eine solche Bindung begünstigen und somit die beobachtete Größenzunahme der Komplexstrukturen erklären.

4.1.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Zusätzlich den **PCS-Messungen** werden Charakterisierung zu zur von +/-USAusgangsliposomen sowie resultierenden Lipid/DNA-Komplexen elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Die für die Zellversuche eingesetzten Lipidund DNA-Konzentrationen sind gering ($c_{\text{Lipid}} = 0.08 \,\mu g/\mu l \text{ bzw. } c_{\text{DNA}} = 0.01 \,\mu g/\mu l$), wodurch die Probenfindung im Cryo-TEM erschwert wird. Um mehr elektronenmikroskopisch detektierbare Strukturen zu erhalten werden die +/- US Ausgangsliposomen mit einem höheren Lipidgehalt (5 mM) hergestellt. Die Endkonzentration der Komplexproben wird nach 3.3 konstant gehalten, da die Komplexbildung neben der Temperatur und der eingesetzten Volumina auch von der Lipid- und DNA-Konzentration abhängig ist (Schneider 2010).

Cryo-TEM-Aufnahmen bestätigen die PCS-Daten: Ausgangsliposomen sowie Die Lipid/DNA-Komplexe zeigen heterogene Partikelgrößenverteilungen, wobei die + US-Populationen jeweils kleinere Partikelgrößen aufweisen. Strukturen > 1 μ m, die für alle Proben in den PCS-Messungen detektiert wurden, können im Cryo-TEM nicht dargestellt werden, da diese die Porengröße des Kupfergrids übersteigen. Die Strukturen der +/-USAusgangsliposomen unterscheiden sich deutlich. dennoch weisen die +/- US Lipid/DNA-Komplexe ähnliche Strukturen auf, die sich lediglich in ihrer Größe unterscheiden.

Lipid/DNA-Komplexe sind in den Bildern als dunkle wolkenartige Strukturen erkennbar, ebenfalls finden sich kleine elektronendichte Strukturen, die freie Plasmid-DNA darstellen könnten (Zabner *et al.* 1995). Klassische *"fingerprint"*-Strukturen, wie in der Literatur oft beschrieben (Häfele 2007) können in diesen Proben nicht gefunden werden. Die wolkenartigen Komplexstrukturen zeigen Ähnlichkeit zu Cryo-TEM-Aufnahmen von Alekseeva et al. von Typ B-Chol-PB/DOPE/DNA-Komplexen. Erfolgreiche Zelltransfektion war in diesen Arbeiten auf diesen Komplextyp beschränkt (Alekseeva *et al.* 2011).



Abbildung 4-5: Cryo-TEM-Aufnahmen von +/- US DC 30[®] Ausgangsliposomen und +/- US Lipid/DNA-Komplexen Repräsentative Cryo-TEM-Bilder von unbehandelten (A) und US-behandelten DC 30[®] Ausgangsliposomen (C) sowie – US (B) und + US Lipid/DNA-Komplexen (D).

4.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Herstellung (+/– US) und Charakterisierung von DC 30[®] Ausgangsliposomen sowie resultierender Lipid/DNA-Komplexe beschrieben. Wie bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, wird die Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst (verwendetes Lipid, Temperatur, eingesetzte Volumina an Lipid- bzw. DNA-Lösung, Pipettiergeschwindigkeit, etc.) (Clement *et al.* 2005, Schneider 2010, Simberg *et al.* 2001, Zuidam *et al.* 1999). Der Einsatz der Ultraschallspitze zur Zerkleinerung der Ausgangsliposomen führt generell zur Entstehung kleinerer Komplexfraktionen. Es ist somit möglich, die relative Lipoplexgröße bedingt einzustellen. Nichtsdestotrotz stellt die Herstellung einheitlicher Lipid/DNA-Komplexe eine große Herausforderung dar. Der Einfluss des Herstellungsprotokolls (+/– US) auf die Größenverteilung von +/– US Ausgangs-liposomen sowie der resultierenden Lipid/DNA-Komplexe wird daher in dieser Arbeit mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert.

Die Bewertung der PCS-Ergebnisse für DC 30[®] Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Komplexe gestaltet sich schwierig. Die hohen Polydispersitätsindices deuten auf eine große Heterogenität der Proben hin. Auf Grund dieser Inhomogenität, die zum einen durch die unterschiedlichen Partikelgrößen, zum anderen durch die Partikelform bedingt ist, treten Streulichtphänomene auf, die die weitere Analyse erschweren (Ostrowsky 1993). So zeigen kleine Partikel ein anderes Streulichtverhalten als große (Rayleigh- bzw. Mie-Streuung), so dass es hier zu Streulichtüberlagerungseffekten kommt. Weiterhin stellt die dynamische Natur der Lipid/DNA-Komplexe ein großes Problem dar. Die Komplexe sind nicht kugelförmig, so dass sich die Streuungseigenschaften diffusions- und rotationsbedingt kontinuierlich verändern. Die Durchführung einer Kumulantenanalyse zur Ermittlung des Z-Average ist nur bei monomodalen Proben zulässig. Da diese nicht zwischen einer breit verteilten monomodalen und einer multimodalen Probe unterscheiden kann, wird zur Vermessung der Liposomen- und der Lipid/DNA-Komplexproben der NNLS-Algorithmus (Non-Negatively constrained Least *Squares*) (Lawson & Hanson 1974) zu Grunde gelegt. Umrechnungsalgorithmen bieten zwar eine gute Näherung, die jedoch nicht die tatsächlichen Gegebenheiten der Probe widerspiegelt. Die Größenmessungen der Liposomen und Komplexe sind daher mit Ungenauigkeiten behaftet, so dass die Aussagekraft zu hinterfragen ist.

Neben der Bestimmung der Partikelgrößen von DC 30[®] Ausgangsliposomen und Komplexen mittels PCS werden weiterhin elektronenmikroskopische Aufnahmen (Cryo-TEM) der Proben gemacht. Die Heterogenität der Proben zeigt sich durch die Präsenz mehrerer Partikelgrößenfraktionen. Strukturen > 1 μ m, wie sie in den PCS-Messungen detektiert wurden, sind in den Aufnahmen nicht darstellbar. Die Ausbeute elektronendichter Strukturen ist vor allem bei den Lipid/DNA-Komplexen so gering, dass die Cryo-TEM-Aufnahmen lediglich ein repräsentatives Bild der untersuchten Proben wiedergeben. Die aus den PCS-Daten erhaltenen Hinweise auf die relative Größenverteilung von +/– US Liposomen bzw. Komplexen werden durch die Cryo-TEM-Bilder bestätigt. Die in den Proben enthaltenen Partikelfraktionen können zwar hinsichtlich ihrer Größen nicht exakt definiert werden, die ultraschallbehandelten Proben sind jedoch eindeutig kleiner.

Nachdem die Charakterisierung der +/– US Komplexe unterschiedliche Eigenschaften für ultraschallbehandelte und unbehandelte Proben ergeben hat, soll nun in weiteren Versuchen untersucht werden, ob sich dies auch in ihrer intrazellulären Effizienz widerspiegelt.

4.2 Zelluläre Barrieren von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen

Der therapeutische Einsatz von Lipid/DNA-Komplexen als Gentransfersystem wird unter anderem durch die ungenügende intrazelluläre Effektivität limitiert. Entscheidend für die Effizienz eines Gentransfersystems ist die Fähigkeit, zelluläre Transfektionsbarrieren zu überwinden (Rao & Gopal 2006, Zuhorn *et al.* 2007). Als zelluläre Barrieren sind unter anderem anzusehen:

- zelluläre Aufnahme der Komplexe
- intrazelluläre Prozessierung
- Dekomplexierung und Freisetzung der Plasmid-DNA
- Aufnahme der Plasmid-DNA in den Zellkern
- Proteinexpression

In Vorgängerarbeiten wurden bereits die zelluläre Aufnahme, die intrazelluläre Prozessierung sowie die Dissoziation von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen als potentielle Transfektionsbarrieren untersucht (Schneider 2010). Die Effizienz der eingesetzten Lipid/DNA-Komplexe wurde dabei anhand der erreichten zellulären Transfektionsrate (% transfizierter Zellen) bewertet. Als erste wichtige Barriere konnte dabei die zelluläre Komplexaufnahme identifiziert werden.

Ebenso wurde versucht, die Effizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen durch Variation des Herstellungsprotokolls zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit werden daher zwei Protokolle (+/– US) für die Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen herangezogen und das intrazelluläre Verhalten miteinander verglichen.

Außerdem sollen weitere intrazelluläre Transfektionsbarrieren identifiziert und bewertet werden. In dieser Arbeit werden die intrazelluläre Prozessierung, die nukleäre Aufnahme der Plasmid-DNA, die Transgenexpression sowie der Einfluss der Zellteilung auf die Effizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen genauer untersucht. Ob es sich bei den verschiedenen Prozessen tatsächlich um zelluläre Transfektionsbarrieren für +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexe handelt, wird anhand der erreichten zellulären Transfektionsrate bewertet. Alle zellulären Untersuchungen werden mit Hilfe zweier Zellmodelle untersucht.

4.2.1 Zellmodelle

Als zelluläre Modelle zur Bewertung der Effizienz von +/– US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen verwendet. Die Transfektionseigenschaften und das Endozytoseprofil der beiden Zelllinien wurden bereits in Vorgängerarbeiten charakterisiert und die zelluläre Aufnahme sowie die Dissoziation von DC 30[®]/DNA-Komplexen in diesen Modellen untersucht (Schneider 2010). Bei A-10 SMC handelt es sich um das zelluläre "Positivmodell" mit guten Transfektionseigenschaften für DC 30[®]/DNA-Komplexe. Als "Negativmodell" dienen MDCK II-Zellen, die äußerst geringe Transfektionslevel nach Lipofektion mit DC 30[®]/DNA-Komplexen aufweisen.



Abbildung 4-6: Zelluläre Aufnahme und Transfektion von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in A-10 SMC und MDCK II-Zellen A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden mit (Cy3-) DC 30[®]/pEGFP-Komplexen 5 h inkubiert. Die zelluläre Aufnahme (A) wurde nach 5 h und die Transfektion (B) nach 24 h (MDCK II) bzw. 48 h (A-10) durchflusszytometrisch bestimmt (n > 3; + SEM).

Auf Grundlage der Aufnahme- und Transfektionsdaten von DC $30^{\text{@}}$ /pEGFP-Komplexen wird für beide Zelllinien die relative Transfektionseffizienz (TE_{rel}) berechnet:

$$TE_{rel} = \frac{TR}{AR} \cdot 100 \%$$

TE_{rel} relative Transfektionseffizienz (%)

- TR Zelluläre Transfektionsrate (in % fluoreszierender Zellen)
- AR Zelluläre Aufnahmerate (in % fluoreszierender Zellen)

Für das Positivmodell A-10 SMC ergibt sich eine relative Transfektionseffizienz von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen von 42,0 %. Im Gegensatz dazu liegt diese in MDCK II-Zellen lediglich bei 10,6 %. Aus der Diskrepanz zwischen Aufnahme- und Transfektionsraten lässt sich eindeutig schließen, dass im Zellmodell MDCK II neben der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen weitere intrazelluläre Transfektionsbarrieren vorhanden sein müssen.

Im Zuge der Charakterisierung der beiden Zelllinien A-10 SMC und MDCK II wird unter anderem deren Endozytoseprofil mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Endozytosemarkern durchflusszytometrisch ermittelt. Hierfür wird Transferrin als Clathrin-Marker (Karin & Mintz 1981, Maxfield & McGraw 2004) sowie Lactosylceramid als Caveolae-Marker (Puri *et al.* 2001, Singh *et al.* 2003) verwendet.



Abbildung 4-7: Zelluläre Aufnahme von Endozytosemarkern in A-10 SMC und MDCK II-Zellen A-10 SMC und **MDCK II-Zellen** wurden mit fluoreszenzmarkierten Endozytosemarkern (Clathrin-Marker: Transferrin: Caveolae-Marker: Tf; Lactosylceramid: Aufnahme Lac) 5 h inkubiert und die zelluläre durchflusszytometrisch bestimmt (n > 3; + SEM).

A-10 SMC und MDCK II-Zellen weisen ein spiegelbildliches Endozytoseverhalten auf. Während A-10 SMC überwiegend Clathrin-abhängige Endozytose betreiben und der Caveolae-Weg nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, zeigt sich in MDCK II-Zellen Caveolae-Dominanz mit geringer Beteiligung der Clathrin-abhängigen Endozytose.

4.2.2 Zelluläre Aufnahme von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen

Die zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen in A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurde in den Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider bereits genauer untersucht (Schneider 2010). Die Komplexe werden in beiden Zelllinien durch Clathrin- und Caveolaeabhängige Endozytose aufgenommen. Des Weiteren konnte in diesen Arbeiten die zelluläre Aufnahme als erste wichtige Transfektionsbarriere von DC 30[®]/DNA-Komplexen identifiziert werden, da diese unmittelbar die für die weitere Prozessierung zur Verfügung stehende intrazelluläre Komplexennege beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Herstellungsprotokolls (+/– US) für Lipid/DNA-Komplexe auf das Aufnahmeverhalten der beiden Zellmodelle miteinander verglichen werden. Hierfür werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen nach 3.7.1 mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch analysiert.



Abbildung 4-8: Zelluläre Aufnahme von +/– US Cy3 DC 30[®]/DNA-Komplexen in A-10 SMC und MDCK II-Zellen A-10 SMC (weiße Balken) und MDCK II-Zellen (schwarze Balken) wurden 5 h mit Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch bestimmt (n > 3; + SEM).

In 4.1 konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Ausgangsliposomen mit der Ultraschallspitze zu kleineren Ausgangsliposomen wie auch resultierenden Lipid/DNA-Komplexen führt. Durch die Verkleinerung der Partikelgrößen kann die zelluläre Aufnahme im Clathrin-dominanten Modell A-10 SMC deutlich, in MDCK II allerdings nur geringfügig verbessert werden (relative Zunahme um 8,6 % vs. 2,5 % in MDCK II).

4.2.2.1 Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen

Nachdem in vorhergehenden Arbeiten beschrieben wurde, dass die zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen Clathrin- und Caveolae-abhängig erfolgt, konzentrieren sich die weitergehenden Untersuchungen auf eben diese Endozytosewege (Schneider 2010).

Um die Beteiligung der beschriebenen Endozytosewege an der zellulären Aufnahme und folglich der intrazellulären Prozessierung der Komplexe genauer zu untersuchen, werden zunächst Versuche mit Endozytoseinhibitoren durchgeführt. Eingesetzt werden hier Chlorpromazin als Inhibitor der Clathrin-Endozytose, Genistein als Caveolae-Inhibitor sowie Methyl-β-Cyclodextrin als Inhibitor beider Endozytosewege.

Chlorpromazin führt durch Interaktion mit Clathrin zum Entzug der "*coated pits*" von der Zelloberfläche und beeinflusst somit direkt die Clathrin-abhängige Prozessierung (Wang *et al.* 1993). Der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein interferiert mit der Caveolae-abhängigen Endozytose durch Inhibition von Phosphorylierungsreaktionen, die für das Abschnüren und Prozessieren von Caveolae-Vesikeln eine wichtige Rolle spielen (Nichols 2003, Parton *et al.* 1994, Puri *et al.* 2001, Sharma *et al.* 2003, Thomsen *et al.* 2002). Methyl-β-Cyclodextrin bildet eine Einschlussverbindung mit Cholesterol und entzieht dieses somit aus der Plasmamembran. Da die Cholesterolmikrodomänen für die Clathrin- wie auch die Caveolae-abhängige Endozytose benötigt werden, führt dies konsequenterweise zur Hemmung beider Endozytosewege (Rodal *et al.* 1999, Subtil *et al.* 1999, Thomsen *et al.* 2002). Die Endozytoseinhibitoren wurden in Vorgängerarbeiten bereits hinsichtlich der einzusetzenden Konzentrationen charakterisiert (siehe Tabelle 2-1) (Schneider 2010).

A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden nach 3.7.1 vorbereitet und nach 3.7.7 neben den Lipid/DNA-Komplexen mit den Endozytoseinhibitoren prä- und anschließend koinkubiert. Der Einfluss der inkubierten Substanzen auf die Zellviabilität wird mittels des CellTiterGloTM-Assays bestimmt und die relative Viabilität der Zellen in Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen (entsprechend 100 % Viabilität) angegeben.



Abbildung 4-9: Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Viabilität von A-10 SMC und MDCK II-Zellen

A-10 SMC (weiße Balken) und MDCK II-Zellen (schwarze Balken) wurden mit den Endozytoseinhibitoren (Chlorpromazin: clz; Genistein: gen; Methyl- β -Cyclodextrin: mbcd) nach Tabelle 3-2 präinkubiert und anschließend 5 h mit DC 30[®]/DNA-Komplexen koinkubiert. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels des CellTiterGloTM-Assays bestimmt. Relative Viabilität bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die Viabilitätswerte für Genistein liegen je nach Zelllinie zwischen 65 - 80 %, für alle anderen Inhibitoren > 90 %. Reduktion der inkubierten Genisteinmenge verbessert zwar die Viabilitätsdaten der Zellen, allerdings kann dann kein ausreichend inhibitorischer Effekt auf die zelluläre Aufnahme der Caveolae-Markersubstanz Lactosylceramid nachgewiesen werden. 60

40

20-

0

+us

clz

gen

mbcd

+us

clz





mbcd

gen

Die zelluläre Aufnahme von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen wird in beiden Zelllinien durch die eingesetzten Inhibitoren beeinflusst. Dabei ist die Aufnahmehemmung jeweils am bevorzugten Aufnahmeweg (A-10 SMC: Ct; MDCK II: Cav) am stärksten ausgeprägt. Die Komplexaufnahme kann durch Blockade des Clathrin-Weges in der Clathrin-dominanten Zelllinie A-10 SMC entsprechend stärker beeinflusst werden als durch Inhibition des Caveolae-Weges. In der Caveolae-dominanten Zelllinie MDCK II verhält es sich umgekehrt, hier überwiegt der Effekt des Caveolae-Inhibitors. Die Inkubation der Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin als Inhibitor der Clathrin- wie auch der Caveolae-abhängigen Endozytose zeigt in beiden Zelllinien den zu erwartenden additiven inhibitorischen Effekt auf die Komplexaufnahme.

Das Aufnahmeverhalten der Zellen bezüglich der unterschiedlichen Komplexpräparationen (+/– US) wird durch die Endozytoseinhibitoren ebenfalls beeinflusst. So wird die Aufnahme der + US-Präparation in beiden Zelllinien durch den Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin stärker beeinflusst als bei Inkubation der unbehandelten Präparation.

4.2.2.2 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die zelluläre Aufnahme von unterschiedlich hergestellten Lipid/DNA-Komplexen (+/– US) in zwei Zellmodellen untersucht. Das unterschiedliche Endozytoseprofil der Zellen erlaubt dabei Rückschlüsse auf die Beteiligung bestimmter Endozytosewege an der Komplexaufnahme, welche weiterhin durch den Einsatz von Endozytoseinhibitoren genauer bewertet werden.

In A-10 SMC und MDCK II-Zellen konnten die Clathrin- wie auch die Caveolae-abhängige Endozytose als wichtigste Aufnahmewege für DC 30[®]/DNA-Komplexe identifiziert werden (Schneider 2010). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Inhibitorstudien zeigen, dass der Aufnahmeweg der Komplexe durch die unterschiedliche Herstellung (+/- US) beeinflusst wird. Der Hauptunterschied zwischen den hergestellten Lipid/DNA-Komplexen ist die Größe enthaltenen Partikelfraktionen (vergleiche 4.1). Die Größenabhängigkeit der der verschiedenen Endozytosewege ist in der Literatur beschrieben (Rejman et al. 2006, Rejman et al. 2004, Zuhorn et al. 2002). Partikel in der Größenordnung von < 200 nm werden dabei vornehmlich via Clathrin-abhängiger Endozytose aufgenommen, Partikel im Größenbereich von ~ 200 – 500 nm vermehrt über Caveolae-Strukturen. In den unterschiedlich hergestellten Komplexpräparationen (+/- US) können jeweils Partikelfraktionen im entsprechenden Größenbereich detektiert werden. Auf Grund der stärkeren Gewichtung kleinerer Komplexfraktionen bei der ultraschallbehandelten Präparation ist hier von einer vermehrten Prozessierung über Clathrin-Strukturen auszugehen. Dies wird durch die Inhibitordaten bestätigt. Die Verkleinerung der Komplexfraktionen durch die Ultraschallspitzenbehandlung führt zu einem Shift der Aufnahmeroute für Lipid/DNA-Komplexe von Caveolae- zu Clathrin-abhängiger Endozytose.

Eine große Schwierigkeit in der Bewertung von Inhibitorstudien ist die zelllinienabhängige Inhibitor-Aktivität sowie die von den eingesetzten Substanzen ausgehende Zelltoxizität. Die einzusetzenden Konzentrationen müssen entsprechend gewählt werden. dass Endozytoseinhibition bei akzeptabler Zellviabilität möglich ist (Vercauteren et al. 2010). Ein weiteres Problem ist die Selektivität der eingesetzten Substanzen. So können neben der Beeinflussung der endozytotischen Aktivität andere zelluläre Effekte nicht ausgeschlossen werden (Huth et al. 2006, Ivanov 2008). Eine vollständige Blockade eines Endozytoseweges wird oft nicht erreicht, so dass immer mit einer gewissen Restaktivität und somit parallel ablaufenden Aufnahmeprozessen gerechnet werden muss. Ein weiteres Problem stellt aber auch die potentielle kompensatorische Hochregulierung eines Endozytoseweges durch die Inhibition eines anderes Weges dar (Hoekstra et al. 2007). Deshalb bedingt der Einsatz von Endozytoseinhibitoren eine fundierte Charakterisierung der eingesetzten Substanzen hinsichtlich endozytotischer Hemmaktivität und Zelltoxizität.

Inhibitorstudien sind demnach immer mit Vorsicht zu bewerten und können nur Anhaltspunkte für eine zelluläre Aufnahmeroute liefern, diese aber nicht absolut beweisen. Ein kombinierter Einsatz von Endozytoseinhibitoren und Kolokalisationsstudien mit spezifischen endozytotischen Markern ist für die Bewertung der zellulären Aufnahme und Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen daher unumgänglich.

4.2.3 Transfektion von +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen

Im klassischen Sinne wird unter dem Begriff "Transfektion" das Einbringen fremder DNA in eine Zielzelle verstanden. In dieser Arbeit wird die Expression des transfizierten Gens als Indikator für eine erfolgreiche Transfektion definiert und zur Bewertung der Transfektionseffizienz von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in den beiden Zellmodellen A-10 SMC und MDCK II herangezogen. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen ermöglicht zum einen eine quantitative Aussage über den Anteil an erfolgreich transfizierten Zellen, daneben ist zum anderen die Bewertung der Transgen-Expressionsstärke möglich (siehe 4.2.7). Die Transfektionsversuche sollen weiterhin zeigen, ob das

Herstellungsprotokoll (+/- US) der Lipid/DNA-Komplexe einen Einfluss auf deren Transfektionseffizienz hat.

Für die Versuche werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen mit +/– US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen nach 3.7.3 inkubiert und der Anteil der fluoreszierenden Zellen über 96 h durchflusszytometrisch bestimmt.



Abbildung 4-11: Transfektion von +/– US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in A-10 SMC und MDCK II-Zellen

A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden nach 3.7.3 mit + US (weiße Symbole) und – US (schwarze Symbole) DC $30^{(8)}$ /pEGFP-Komplexen für 5 h inkubiert und der Anteil an fluoreszierenden Zellen nach 12, 24, 36, 48, 72 und 96 h durchflusszytometrisch bestimmt (A). Maximale Transfektion für A-10 SMC (weiße Balken) und MDCK II-Zellen (schwarze Balken) für +/– US Komplexe nach 48 h bzw. 24 h (B) (n = 3; +/– SEM).

Die Transfektionseffizienz von DC $30^{\text{@}}$ /pEGFP-Komplexen ist in der Zelllinie A-10 SMC bei Weitem größer als in MDCK II-Zellen. Dabei werden durch die + US-Präparation bis zum Zeitpunkt t = 72 h mehr Zellen transfiziert als durch die unbehandelte Präparation. Im Gegensatz dazu sind die Transfektionsraten in MDCK II-Zellen für beide Präparationen äußerst gering, so liegt der Anteil an transfizierten Zellen für die + US-Präparation stets < 1 %, bei der unbehandelten Präparation bei maximal 5 % nach 24 h. Maximale Transfektionsraten werden in A-10 SMC nach 48 h und in MDCK II-Zellen nach 24 h erreicht. Für die Folgeversuche wird zur Bewertung der Transfektionseffizienz der Komplexe daher für beide Zelllinien jeweils der Zeitpunkt des Transfektionsmaximums gewählt.

4.2.4 Quantifizierung der intrazellulären Plasmidmenge

4.2.4.1 Intrazelluläre Quantifizierung von Cy3-DNA-Plasmidkopien mittels QuantiBRITETM PE-Beads

Für die Bewertung der zellulären Aufnahme von DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen ist nicht nur der Anteil der komplexaufnehmenden Zellen von Interesse sondern auch die Anzahl der pro Zelle aufgenommenen Plasmidkopien. Mit Hilfe des BD QuantiBRITETM PE *Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kits* wird die intrazelluläre Äquivalentmenge an Phycoerythrin-Molekülen bestimmt (siehe 3.8). Über Kalibriergeraden der Fluoreszenzfarbstoffe R-PE und Cy3 am Fluorimeter kann nun die R-PE-Äquivalentmenge in Cy3-Moleküle umgerechnet werden. Da das Verhältnis von Cy3/DNA zuvor bestimmt wird, kann die intrazelluläre Plasmidmenge pro Cy3-positiver Zelle berechnet werden.

Zunächst werden für die Fluoreszenzfarbstoffe R-PE und Cy3-CTP Kalibriergeraden am Fluorimeter erstellt.





Von den Fluoreszenzfarbstoffen R-PE (A) und Cy3-CTP (B) wurden Verdünnungsreihen hergestellt und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten am Fluorimeter vermessen (n = 3; + SD).

Für den Versuch wird die Plasmid-DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 nach den Angaben des Herstellers gelabelt und das Verhältnis Cy3/DNA photometrisch bestimmt (siehe 3.2.5). A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden nach 3.8.2 mit nach 3.3 hergestellten +/– US Cy3-DNA-Komplexen inkubiert, nach 1, 2, 3 und 5 h durchflusszytometrisch vermessen und die intrazelluläre Anzahl an Plasmidkopien nach 3.8.3 bestimmt.





A-10 SMC (A, B) und MDCK II-Zellen (C, D) wurden mit + US (weiße Symbole) und – US (schwarze Symbole) Cy3-DNA-Komplexen 5 h inkubiert. Die zelluläre Aufnahme (in % fluoreszierender Zellen (A, C)) sowie die intrazelluläre Plasmidmenge der Cy3-DNA-positiven Zellen (B, D) wurde nach 1, 2, 3 und 5 h nach 3.8 bestimmt (n = 3; + SEM).

In A-10 SMC nimmt der Anteil an fluoreszierenden Zellen während der Inkubation mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen stetig zu und nähert sich gegen Ende der Inkubationszeit nach 5 h einem Plateau an. Dabei wird die + US-Präparation zu frühen Zeitpunkten von mehr Zellen aufgenommen als die unbehandelte. Die vergleichbaren Kurvenverläufe für beide Präparationen deuten auf gleiche Aufnahmekinetiken hin. Die Berechnung der Anzahl an intrazellulären Plasmidkopien ergibt nach 5 h für beide Komplexpräparationen vergleichbare Mengen an Plasmid-DNA pro Cy3-DNA-positiver Zelle.

In MDCK II nimmt der Anteil der fluoreszierenden Zellen über die 5stündige Inkubationszeit mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen für beide Präparationen vergleichbar zu. Die beiden Präparationen werden also von gleich vielen Zellen aufgenommen. Im Hinblick auf die internalisierte Plasmidmenge ergeben sich nach 5 h ebenfalls vergleichbare Aufnahmeraten für +/– US Komplexe.

Zusammenfassend erzielen beide Komplexpräparationen (+/-US) in A-10 SMC bzw. vergleichbares Ergebnis MDCK II jeweils ein hinsichtlich der Anzahl an komplexaufnehmenden Zellen wie auch der pro Zelle aufgenommenen Plasmidmenge. Der Vergleich der beiden Zelllinien zeigt, dass A-10 SMC deutlich aktiver Lipid/DNA Komplexe aufnehmen als MDCK II-Zellen, so haben nach 5 h 3,2mal mehr A-10 SMC Komplexe internalisiert und auch die internalisierte Plasmidmenge pro Zelle ist um Faktor 10 größer als in MDCK II. Die deutlich bessere zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen in A-10 SMC resultiert folglich in höheren Transfektionsraten im Vergleich zu MDCK II. Die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen von +/- US Komplexen (vergleiche Abbildung 4-11) bei vergleichbaren intrazellulärer Plasmidmengen in A-10 SMC erscheinen zunächst nicht plausibel, lassen sich aber durch die unterschiedliche intrazelluläre Prozessierung erklären (vergleiche 4.2.5.4 bzw. 4.2.10).

4.2.4.2 Intrazelluläre Quantifizierung von Cy3-DNA-Plasmidpartikeln mittels CellProfilerTM

Neben der Ouantifizierung der intrazellulären Plasmidkopien mit Hilfe des BD QuantiBRITETM PE Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kits soll die Anzahl an internalisierten Lipid/DNA-Komplexen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden. Da die Auflösung einzelner Lipid/DNA-Komplexe hier nicht möglich ist, wird eine bildbasierte quantitative Analyse mittels "Quantitative Imaging" durchgeführt. Diese Methode kombiniert konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit computergestützter bildbasierter Analyse über die CellProfilerTM Software. "Quantitative Imaging" wurde in Vorgängerarbeiten als neue Methode in die Arbeitsgruppe eingeführt (Schneider 2010) und wird in dieser Arbeit weiterentwickelt.

A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden nach 3.9 mit +/– US DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen für 5 h inkubiert, fixiert und anschließend für die Mikroskopaufnahmen vorbereitet. Die Analyse der konfokalen Bildreihen wird wie in 3.9.2 beschrieben durchgeführt. Mittels der CellProfilerTM Software werden in den Cy3-DNA-Bildern "*Cy3-DNA-Partikel*" definiert und anschließend die Anzahl der Partikel pro Zelle über die Zeit gezählt.



Abbildung 4-14: Quantifizierung der intrazellulären +/– US Cy3-DNA-Partikelmenge - Zeitreihe A-10 SMC (A) und MDCK II-Zellen (B) wurden mit + US (weiße Symbole) und – US (schwarze Symbole) Cy3-DNA-Komplexen 5 h inkubiert. Die intrazelluläre Cy3-DNA-Partikelmenge wurde nach 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h mittels *"Quantitative Imaging"* bestimmt. Repräsentativer Versuch (n = 3; mean +/– SD).

Die intrazelluläre Menge an Cy3-DNA-Partikeln nimmt in beiden Zelllinien bis 8 h zu. Die Komplexpräparationen werden nach 5 h aus dem Überstand der Zellen durch einen Medienwechsel entfernt. Da an dieser Stelle kein Waschschritt erfolgt erklärt sich der weitere Anstieg der intrazellulären Partikelmenge durch die an die Zellwand assoziierten Komplexe, die nach dem Medienwechsel noch aufgenommen werden können. In beiden Zelllinien können zu jedem Zeitpunkt mehr Cy3-DNA-Partikel der + US-Komplexpräparation detektiert werden. Zu berücksichtigen bleibt dabei die unterschiedliche Partikelgröße von +/– US Cy3-DNA-Komplexen. – US-Komplexe sind deutlich größer, daher werden hier folglicherweise weniger Partikel gezählt. Allerdings ist davon auszugehen, dass größere Partikel auch mehr Plasmid-DNA enthalten. Aus einer geringeren Anzahl an intrazellulären – US-Partikeln im Vergleich zu + US-Partikeln kann demnach nicht auf eine geringere Anzahl an intrazellulären Plasmid-DNA-Kopien geschlossen werden. Die Cy3-DNA-Partikeldaten zeigen allerdings die deutlich reduzierten zellulären Aufnahmeraten in MDCK II-Zellen im Vergleich zu A-10 SMC (+ US Cy3-DNA-Partikel: MDCK II: 2,0 vs. A-10 SMC: 10,4).

Die beiden untersuchten Komplexpräparationen +/– US haben insbesondere in der Zelllinie A-10 SMC ein deutlich unterschiedliches intrazelluläres Erscheinungsbild (vgl. 4.1.1.2). Um dies für die Auswertung der Cy3-DNA-Partikeldaten zu berücksichtigen, werden die Partikel hinsichtlich ihrer Größe klassifiziert. Bei der CellProfilerTM-Analyse wird zunächst die Gesamtanzahl an Cy3-DNA-Partikeln (Ø 1 - 15 Pixel) und anschließend die Anzahl der großen Partikel (Ø 5 - 15 Pixel) bestimmt. Im Folgenden wird dann der intrazelluläre Anteil an großen Partikeln berechnet. Diese Auswertung erfolgt in Anlehnung an die Versuche zur Bestimmung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA (vgl. Abschnitt 4.2.5) zum Zeitpunkt t = 5 h für A-10 SMC und t = 8 h für MDCK II.



Abbildung 4-15: Quantifizierung der intrazellulären +/- US Cy3-DNA-Partikelmenge A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden mit +/- US Cy3-DNA-Komplexen 5 h inkubiert. Die intrazelluläre Gesamt-Cy3-DNA-Partikelmenge (Ø 1 - 15 Pixel) wurde nach 5 (A-10) bzw. 8 h (MDCK II) mittels "Quantitative Imaging" bestimmt (A). Anschließend wurde der Anteil an großen Cy3-DNA-Partikeln (Ø 5 - 15 Pixel) berechnet (B) (n = 3; + SEM).

Wie aus Abbildung 4-14 bereits ersichtlich, werden in A-10 SMC insgesamt mehr intrazelluläre Cy3-DNA-Partikel gezählt als in MDCK II-Zellen. Weiterhin ist jeweils die Gesamtanzahl an Partikeln für – US geringer als für + US. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Partikelgrößen zeigt deutlich, dass für beide Komplexpräparationen (+/- US) in A-10 SMC mehr Cy3-DNA-Partikel im Größenbereich von 5 - 15 Pixeln gefunden werden. Der Anteil an großen Partikeln ist insbesondere für die – US-Präparation hoch (34,6 % vs. 20,0 % in MDCK II).

Zusammenfassend enthalten A-10 SMC zum einen insgesamt mehr intrazelluläre Cy3-DNA-Partikel, zum anderen sind diese Partikel deutlich größer als in MDCK II-Zellen. A-10 SMC weisen demnach mehr intrazelluläre Cy3-DNA auf als MDCK II-Zellen. Ob die beiden Quantifizierungsmethoden für intrazelluläre Plasmid-DNA (Durchflusszytometrie/CellProfilerTM) vergleichbare Ergebnisse liefern, wird im Folgenden durch Korrelation geprüft. Voraussetzung für das Poolen der Datensätze ist die Homogenität der zu korrelierenden Partikeldaten, d.h. dass die intrazellulären Cy3-DNA-Partikelgrößen vergleichbar sind. Dies wird nur durch die +/- US Cy3-DNA-Partikel in MDCK II und + US in A-10 SMC erfüllt (vergleiche Abbildung 4-3). Die Datensätze dieser drei Präparationen werden für die erste Korrelation verwendet (siehe Abbildung 4-16A). Zu Beginn dieses Abschnitts wurde die Hypothese aufgestellt, dass große Cy3-DNA-Partikel mehr Plasmidkopien enthalten als kleine. Um die Linearität zwischen Partikelgröße und Plasmidanzahl zu zeigen, werden die – US-Datensätze aus der Zelllinie A-10 SMC ebenfalls korreliert (siehe Abbildung 4-16B).



Abbildung 4-16: Korrelation der durchflusszytometrischen QuantiBRITE[™] PE-Beads (Anzahl der Plasmidkopien) - und der CellProfiler[™] Cy3-DNA-Partikel-Daten Die QuantiBRITE[™] PE Beads- und die CellProfiler[™] Cy3-DNA-Partikel-Daten wurden für MDCK II +/- US und A-10 SMC + US (A) und A-10 SMC - US (B) korreliert.

Die durchflusszytometrischen QuantiBRITETM PE-Beads- und die CellProfilerTM Cy3-DNA-Partikel-Daten können, in Abhängigkeit von der jeweiligen Partikelgröße, miteinander korreliert werden ($r^2 = 0,9983$ bzw. 0,9963). Es ist somit möglich, aus der Anzahl der intrazellulären Cy3-DNA-Partikel auf die intrazelluläre Plasmidmenge rückzuschließen. Des Weiteren wird die Annahme, dass große Cy3-DNA-Partikel auch tatsächlich mehr Plasmidkopien enthalten, bestätigt.

4.2.4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen wird in diesem Kapitel mittels zweier Methoden quantifiziert. Die aufgenommene Plasmidmenge wird zum einen durchflusszytometrisch mit Hilfe von standardisierten PE-Beads, zum anderen durch eine computergestützte bildbasierte Analyse quantitativ ausgewertet.

Die heterogene Größenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe birgt dabei Ungenauigkeiten bei der Definition und Erkennung der Cy3-DNA-Partikel. Auch wird durch die alleinige Betrachtung der Partikelzahlen die tatsächliche Plasmidmenge pro Partikel nicht berücksichtigt. Die CellProfilerTM Partikelanalyse ist demnach insbesondere für die – US-Komplexpräparation in A-10 SMC fehlerbehaftet und stößt an ihre Grenzen. Eine Bewertung dieser Ergebnisse ist nur im Kontext mit den durchflusszytometrischen Daten der QuantiBRITETM PE-Beads zulässig.

Die Durchflusszytometrie ist die Methode der Wahl zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Präparationen. Die hohe Stichprobenzahl (10 000 Zellen) ermöglicht eine statistisch fundierte Auswertung der Ergebnisse (Mandy *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu ist die statistische Aussagekraft fluoreszenzmikroskopischer Analysen durch die deutlich geringere Stichprobenmenge begrenzt. Im vorliegenden Fall werden pro Analyse konfokale Bildreihen à 15 - 20 Bilder ausgewertet, so dass die Stichprobenmenge auf 500 - 2000 Zellen vergrößert wird. Eine statistische Bewertung der Daten wird somit möglich. Weiterhin können die Ergebnisse der beiden Quantifizierungsmethoden in Abhängigkeit von der Partikelgröße gut miteinander korreliert werden, so dass die jeweilige Aussagekraft gestärkt wird.

Die Aufnahmeraten der beiden Zellmodelle A-10 SMC und MDCK II für DC 30[®]/DNA-Komplexe bzw. Plasmid-DNA unterscheiden sich massiv (A-10 SMC >> MDCK II). Eine höhere intrazelluläre Plasmidmenge begünstigt direkt die Effizienz der Lipid/DNA-Komplexe, da für die intrazellulären Prozessierungsschritte mehr Plasmid-DNA zur Verfügung steht. Reduzierte Aufnahmeraten lassen auf das Gegenteil im Negativmodell MDCK II schließen. Die zelluläre Aufnahme von Plasmid-DNA kann durch diese Studien eindeutig als wichtigste zelluläre Barriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe bestätigt werden. Ein Einfluss des Herstellprotokolls der Lipid/DNA-Komplexe (+/– US) auf die maximal aufgenommene Plasmidmenge kann in diesen Studien nicht gefunden werden.

4.2.5 Nukleäre Aufnahme von pDNA

Nach der Aufnahme von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen in die Zelle werden diese entlang der jeweiligen Aufnahmeroute (Clathrin- bzw. Caveolae-abhängige Endozytosewege) intrazellulär prozessiert. Untersuchungen zur Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen wurden bereits in den Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider begonnen und werden in dieser Arbeit fortgeführt. Die intrazelluläre Dissoziation der Komplexe und somit die Freisetzung der Plasmid-DNA aus dem Komplex mit dem kationischen Lipid ins Zytoplasma wurde von Schneider mittels eines FRET-Assays quantifiziert (Schneider *et al.* 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Lipid/DNA-Komplexe in A-10 SMC effizienter dissoziieren als im MDCK II-Zellmodell (70 vs. 50 %). Für den Fall, dass nach der Dekomplexierung keine weitere zelluläre Transfektionshürde mehr vorhanden ist, sollte die intrazellulär freigesetzte Plasmidmenge für eine effiziente Transfektion in MDCK II-Zellen eigentlich ausreichend sein.

Nach der Freisetzung der Plasmid-DNA ins Zytoplasma der Zelle stellen der Transport zum Zellkern und die nukleäre Aufnahme die nächsten folgenden Schritte dar. Für die quantitative Untersuchung der nukleären Aufnahme von Komplex-freigesetzter Plasmid-DNA wird die *"Quantitative Imaging"*-Methode herangezogen, die konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit computergestützter bildbasierter Analyse über die CellProfilerTM Software kombiniert (vergleiche 1.4.2).

Um die Komplex-DNA intrazellulär verfolgen zu können wird diese nach 3.2.5 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 kovalent markiert. Der Einfluss des Cy3-Labels auf die Integrität der Plasmid-DNA wird zunächst in einem Kontrollexperiment in der Zelllinie A-10 SMC geprüft.



Abbildung 4-17: Einfluss des Cy3-Labels auf die Integrität der Plasmid-DNA A-10 SMC wurden 5 h mit Cy3-gefärbten und ungefärbten DC 30[®]/DNA-Komplexen inkubiert. Die Transfektion der Zellen wurde nach 48 h durchflusszytometrisch bestimmt. Relative Transfektion bezogen auf die ungefärbte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die kovalente Markierung der Plasmid-DNA beeinflusst zwar deren Bioaktivität, jedoch bleibt eine Restaktivität von 75 % erhalten. Von einer vergleichbaren intrazellulären Prozessierung von gefärbter wie ungefärbter Plasmid-DNA kann demnach ausgegangen werden.

Für die Studien zur nukleären Aufnahme von Cy3-DNA werden A-10 SMC und MDCK II-Zellen nach 3.9 mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen inkubiert, nach 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h fixiert und die Zellkerne mit SYTOX[®] Green gefärbt. Anschließend werden pro Zeitpunkt und Probe 15 - 20 konfokale Bilder aufgenommen und diese nach 3.9.2 mittels der CellProfilerTM Software quantitativ ausgewertet.

4.2.5.1 CellProfilerTM-Analyse 1: Messung der Kernintensität

Die nukleär aufgenommene Plasmidmenge wird durch die Messung der Cy3-Intensität im Zellkern quantifiziert. Das Prinzip der Bildanalyse ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt. Nach Identifizierung und Prozessierung der Zellkerne wird die Intensität der Cy3-Plasmid-DNA intranukleär in Relation zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Für die Auswertung werden nur Kerne berücksichtigt, deren Intensität oberhalb des Schwellenwerts der unbehandelten Kontrollkerne + 2*SD liegt und somit als Komplex-DNA-positiv zu bewerten sind. Zunächst wird die Aufnahme der Cy3-DNA in die Zellkerne über die Zeit verfolgt, um den Zeitpunkt der maximalen Kernaufnahme zu bestimmen. In den Folgeversuchen wird die Kernintensität dann jeweils zum entsprechenden Zeitpunkt t_{max} analysiert.

In Abbildung 4-18A und B sind die Ergebnisse eines repräsentativen Kinetikversuchs gezeigt. Nach Inkubation der beiden Komplexpräparationen (+/– US) nimmt die Kernintensität in beiden Zelllinien bis zum Zeitpunkt t_{max} zu. Dabei wird dieses Intensitätsmaximum in A-10 SMC bereits nach 5 h erreicht, in MDCK II erst nach 8 h. In Abbildung 4-18C ist der Zeitpunkt des Kernintensitätsmaximums für A-10 SMC (5 h) und MDCK II (8 h) aufgeschlüsselt. Die maximalen Kernintensitäten sind dabei für beide Komplexpräparationen (+/– US) jeweils vergleichbar. Die unterschiedliche Herstellung der Lipid/DNA-Komplexe hat demnach keinen Einfluss auf die maximal aufgenommene Plasmidmenge pro Komplex-DNA-positivem Zellkern. Die maximal nukleär aufgenommene Plasmidmenge ist dabei in A-10 SMC höher als in MDCK II-Zellen, es befindet sich also mehr Plasmid-DNA pro Cy3-DNA-positiven Zellkern. In Abbildung 4-18C ist weiterhin der relative Anteil der Cy3-DNA-positiven Zellkerne angegeben. Auch hier sind die A-10 SMC den MDCK II-Zellen deutlich überlegen, so ist komplexfreigesetzte Plasmid-DNA in 50 % der A-10 SMC-Kerne, aber lediglich in 10 % der MDCK II-Kerne nachweisbar.


Abbildung 4-18: Quantifizierung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA mittels Quantitative Imaging - Kernintensitätsmessung

A-10 SMC (A) und MDCK II-Zellen (B) wurden nach 3.9 mit + US (Kreise) und – US (Dreiecke) Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die nukleäre Cy3-Intensität der Cy3-positiven Kerne (Kontrolle + 2*SD) nach 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h bestimmt. Repräsentativer Versuch (+/– SD). Nukleäre Cy3-Intensität zum Zeitpunkt t_{max} für A-10 SMC (5 h) und MDCK II (8 h) (n > 5; + SEM). Relativer Anteil (in %) der Cy3-positiven Kerne im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist angegeben.

4.2.5.2 CellProfilerTM-Analyse 2: Bestimmung der Anzahl an nukleären Cy3-DNA-Partikeln

Neben der Quantifizierung der nukleären Aufnahme von komplexfreigesetzter Plasmid-DNA mittels der CellProfilerTM-Kernintensitätsmessung wird ein zweiter Ansatz verfolgt. Die CellProfilerTM-Pipeline wird so programmiert, dass "*Cy3-DNA-Partikel"* in den konfokalen Bildern definiert und die Anzahl an kernassoziierten Cy3-DNA-Partikeln gezählt werden (vgl. Abbildung 3.2).



Abbildung 4-19: Quantifizierung der nukleären Aufnahme von Cy3-DNA-Partikeln mittels *Quantitative Imaging* - Partikelzählung

A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden nach 3.9 mit +/– US Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die Anzahl der zellkernassoziierten Cy3-DNA-Partikel (Ø 1 - 15 Pixel) zum Zeitpunkt t_{max} für A-10 SMC (5 h) und MDCK II (8 h) bestimmt (n = 5; + SEM).

Die Anzahl zellkernassoziierter Cy3-DNA-Partikel ist zwar in A-10 SMC größer als in MDCK II, bei der Auswertung der Datensätze fällt allerdings auf, dass die mittlere Cy3-DNA-Partikelmenge im Zellkern im Vergleich zur intrazellulären Gesamtpartikelmenge äußerst gering ist:



Abbildung 4-20: Quantifizierung der zellulären und nukleären Aufnahme von Cy3-DNA-Partikeln mittels *Quantitative Imaging* - Partikelzählung A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden nach 3.9 mit +/- US Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die Anzahl der intrazellulären sowie zellkernassoziierten Cy3-DNA-Partikel (Ø 1 - 15 Pixel) zum Zeitpunkt t_{max} für A-10 SMC (5 h) und MDCK II (8 h) bestimmt (n = 5; + SEM).

Die Kernintensitätsdaten zeigen, dass Cy3-DNA in den Zellkern aufgenommen wird (vergleiche Abbildung 4-18). Die Partikeldaten spiegeln dies allerdings nicht wieder. Definition von Cy3-DNA-Partikeln über die CellProfilerTM Software ist nur für Cy3-DNA-Komplexe, die in vesikulären Strukturen, sprich Endosomen, lokalisiert ist, möglich. Im Zuge der Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen (*endosomal escape*) und der simultan ablaufenden Dissoziation der Plasmid-DNA vom Lipidträger, wird die "partikelartige" Struktur aufgehoben und kann folglich nicht mehr als solche aufgelöst werden. Die Partikeldaten deuten somit darauf hin, dass hauptsächlich freie und nicht komplexgebundene Cy3-DNA in den Zellkern aufgenommen wird.

4.2.5.3 Bewertung der nukleären Aufnahmeeffizienz

Um die Effizienz der nukleären Aufnahme in A-10 SMC und MDCK II-Zellen bewerten zu können, werden Kolokalisationsstudien von Cy3-DNA und dem Zellkern zum Zeitpunkt der maximalen Kernaufnahme (A-10 SMC: 5 h; MDCK II: 8 h) durchgeführt und mittels der ImageJ Software 1.42 der Manders Kolokalisationskoeffizient (M_{nuc}) bestimmt.



Abbildung 4-21: Bestimmung des Manders Kolokalisationskoeffizienten M_{nuc} für Cy3-DNA-Komplexe/Zellkern in A-10 SMC und MDCK II-Zellen

A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden nach 3.9 mit Cy3-DNA-Komplexen inkubiert und die Zellkerne mit SYTOX[®] Green gefärbt. Der Manders Kolokalisationskoeffizient M_{nuc} für Cy3-DNA/Zellkern wurde mittels der ImageJ Software 1.42 bestimmt. (n = 3; + SEM).

Zum Zeitpunkt der maximalen nukleären Aufnahme von Cy3-DNA kolokalisiert in A-10 SMC mehr Plasmid-DNA mit dem Zellkern als in MDCK II ($M_{nuc, A-10} = 37,0 +/-2,8 \%$ vs. $M_{nuc, MDCK II} = 25,7 +/-3,4 \%$). Die Aufnahme von komplexfreigesetzter Plasmid-DNA verläuft also im Positivmodell A-10 SMC effizienter als im Negativmodell MDCK II und stellt demnach einen weiteren limitierenden Faktor für die Transfektion von DC 30[®]/DNA-Komplexen dar.

4.2.5.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die nukleäre Aufnahme von dekomplexierter Plasmid-DNA wird in diesem Kapitel quantifiziert und ihre Rolle als potentielle Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe diskutiert.

Für die Quantifizierung der nukleären Aufnahme von Plasmid-DNA wird in dieser Arbeit die computergestützte bildbasierte "*Quantitative Imaging*"-Methode verwendet. Eine ähnliche bildbasierte Quantifizierungsmethode wurde von Akita et al. angewendet. Sie entwickelten eine Methode namens CIDIG (*confocal image-assisted three-dimensionally integrated quantification method*), bei der jeweils 30 Zellkerne in Form von z-stacks dreidimensional nach Plasmid-DNA gescreent wurden (Akita *et al.* 2004). Unsere Bildanalyse beschränkt sich lediglich auf eine Bildebene des Zellkerns, allerdings wird deshalb die Stichprobenmenge auf 500 – 2000 Zellkerne pro Analyse erhöht, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern.

Elegant ist der direkte Nachweis nukleärer Plasmid-DNA mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) (Cohen *et al.* 2009, Ruponen *et al.* 2009). Eine kovalente Markierung der Plasmid-DNA, die immer eine Beeinflussung der Bioaktivität der DNA hinsichtlich intrazellulärer Prozessierung wie auch Transkription mit sich bringt, wäre dann hinfällig (Gasiorowski & Dean 2005, Slattum *et al.* 2003, Zelphati *et al.* 1999). Die qRT-PCR gehört molekularbiologisch zwar zu den Standardmethoden, ist in unserer Arbeitsgruppe allerdings nicht etabliert. Da neben der nukleären Aufnahme auch die intrazelluläre Prozessierung der Plasmid-DNA anhand von Kolokalisationsstudien mit entsprechend gefärbten zellulären Kompartimenten genauer untersucht werden soll, ist die direkte Markierung der Plasmid-DNA unumgänglich (Schneider & Süss 2010). Neben der kovalenten Plasmidmodifizierung gewinnen in-situ Hybridisationstechniken zur intrazellulären Darstellung von Plasmid-DNA immer mehr an Bedeutung, da die Plasmid-DNA hier erst nach dem Hybridisierungsschritt in ihrer Aktivität beeinträchtigt wird (Dean 1997, Gasiorowski & Dean 2005).

Die nukleäre Aufnahme von Cy3-gefärbter Plasmid-DNA wird in der vorliegenden Arbeit über eine Kernintensitätsmessung verfolgt. Von einer vergleichbaren intrazellulären Prozessierung von gefärbter wie ungefärbter DNA wird ausgegangen (vergleiche Abbildung 4-17). Über die Zunahme der Cy3-Kernintensität kann somit unmittelbar die nukleäre Aufnahme der Cy3-DNA verfolgt und bewertet werden (vergleiche Abbildung 4-18A).

Die Intensitäts-Zeit-Verläufe der +/- US-Komplexpräparationen in beiden Zelllinien verhalten sich spiegelbildlich: so ähnelt die + US-Kurve in A-10 SMC der – US-Kurve in

MDCK II und umgekehrt. Diese Kurvenverläufe lassen sich mit den Partikelgrößen der eingesetzten Lipid/DNA-Komplexe sowie dem Endozytoseverhalten der beiden Zellmodelle erklären. Wie bereits in Abschnitt 4.1 gezeigt, bewirkt die Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen eine Verkleinerung der nach der Komplexierung mit Plasmid-DNA entstehenden Lipid/DNA-Komplexe. Die Clathrin-abhängige Endozytose wird im Vergleich zur Caveolae-Prozessierung in der Literatur als schneller Prozess beschrieben (Rejman et al. 2005, Rejman et al. 2004). Die eingesetzten +/- US Lipid/DNA-Komplexe liegen mit ihren Partikelgrößen im Bereich der Clathrin- und Caveolae-Prozessierung. Dabei werden durch die Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen mehr Komplexe in den Größenbereich der Clathrin-abhängigen Endozytose verschoben. Diese werden in der Clathrin-dominanten Zelllinie A-10 SMC folglich besser aufgenommen und prozessiert als größere Komplexe der – US-Präparation (vergleiche 4.2.2). Die schnelle Prozessierung der kleineren Komplexfraktionen bedingt den schnelleren Anstieg der Kernintensitätskurve und das scharfe Intensitätsmaximum nach bereits 5 h. Im Vergleich dazu liefert die unbehandelte Präparation durch höhere Caveolae-Beteiligung einen breiteren Kurvenverlauf. In MDCK II-Zellen trifft das Gegenteil zu: hier werden größere Komplexe, die vor allem in der - US-Präparation zu finden sind, durch die Caveolae-Dominanz in MDCK II bevorzugt aufgenommen und prozessiert. Das Kernintensitätsmaximum ist entsprechend der langsameren Prozessierung via Caveolae daher erst nach 8 h erreicht. Inkubation der ultraschallbehandelten Präparation bedingt in MDCK II die Verbreiterung der Kernintensitätskurve durch die zusätzliche Beteiligung der Clathrin-Prozessierung. Da in A-10 SMC die Clathrin- über die Caveolae-Prozessierung dominiert, findet sich das Kernintensitätsmaximum für beide Präparationen (+/- US) nach 5 h. Im Umkehrschluss zeigt das Intensitätsmaximum nach 8 h die Caveolae-Dominanz in MDCK II.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, die nukleäre Plasmid-Aufnahme über die Cy3-DNA-Partikelzählung zu verfolgen. Diese Strategie erweist sich hierfür als nicht brauchbar, da Cy3-DNA-Partikel in dem Sinne nicht im Zellkern detektiert werden können. Trägergebundene Plasmid-DNA ist intrazellulär als partikelförmige Struktur in vesikulären Kompartimenten erkennbar (vergleiche Abbildung 4-3). Nach Dissoziation der Plasmid-DNA aus dem Komplex mit dem kationischen Lipid ist diese strukturell nicht mehr greifbar und somit mittels der CellProfiler[™] Software auch nicht mehr auflösbar. Von der nukleären Aufnahme trägergebundender Plasmid-DNA ist laut Literatur nicht auszugehen (Elouahabi & Ruysschaert 2005). Die wenigen dennoch im Zellkern detektierten Cy3-DNA-Partikel könnten Artefakte aus der CellProfiler[™]-Analyse darstellen, Berührung von Cy3-DNA- Partikel und Zellkern in nur einem Bildpunkt ist für die positive Bewertung der Zellkernassoziation ausreichend, so dass hier Partikel in unmittelbarer Zellkernnähe fälschlicherweise miteingeschlossen worden sein könnten.

Die Studien zur nukleären Aufnahme von komplexfreigesetzter Plasmid-DNA zeigen weitere wichtige Unterschiede der beiden Zellmodelle A-10 SMC und MDCK II: die nukleäre Aufnahme unterscheidet sich zunächst einmal in der Quantität, also der pro Kern aufgenommenen Plasmidmenge, zum anderen in der Effizienz, also dem prozentualen Anteil der nukleären Plasmid-DNA bezogen auf die intrazelluläre Gesamtmenge.

Im Negativmodell MDCK II ist nicht nur die zelluläre, sondern auch die nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA reduziert und stellt somit eine weitere zelluläre Barriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe dar.

4.2.6 Einfluss der Zellteilung auf die Transfektion von DC 30[®]/DNA-Komplexen

Die Aufnahme der Plasmid-DNA in den Zellkern stellt eine weitere wichtige Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe dar. Für die nukleäre Aufnahme werden verschiedene Mechanismen diskutiert (vgl. 1.3.4). Der Zellteilung wird dabei eine große Rolle zugeschrieben: in der Mitosephase des Zellzyklus wird die Zellkernmembran abgebaut und somit passive Diffusion von Plasmid-DNA in den "Zellkern" erleichtert (Brunner *et al.* 2000).

Der Einfluss der Zellteilung auf die Transfektionseffizienz von DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen wird im Folgenden in der Zelllinie A-10 SMC untersucht. Die Teilung der Zellen wird durch FCS-Verarmung unterdrückt und diese somit in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Durch Reduktion der Serummenge im Medium von 20 % auf 0,75 % kann die Zellteilung in A-10 SMC bei akzeptabler Zellviabilität erfolgreich unterbunden werden. Nach 36stündiger FCS-Verarmung werden die Zellen mit DC $30^{\text{®}}$ /pEGFP-Komplexen 5 h inkubiert und die Transfektion der Zellen nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt (vgl. 3.7.6).



Abbildung 4-22: Einfluss der Zellteilung auf die Transfektion von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in A-10 SMC

Wachstumskurve von A-10 SMC unter FCS-Verarmung (A). Die Zellteilung von A-10 SMC wurde durch FCS-Entzug (Endkonzentration 0,75 %) über 36 h unterdrückt. Anschließend wurden die Zellen 5 h mit DC $30^{\text{®}}$ /pEGFP-Komplexen inkubiert und die zelluläre Transfektion nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt (B). Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die Transfizierbarkeit von A-10 SMC wird durch die Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase nicht negativ beeinflusst. Die beobachtete Zunahme der Anzahl transfizierter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erklärt sich durch die weiterhin stattfindende Zellteilung im Kontrollwell im Gegensatz zur konstanten Zellzahl im FCS-verarmten Well. Die nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA ist somit nicht von der Zellteilung abhängig. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die eingesetzte Plasmid-DNA aktiv in den Zellkern aufgenommen wird.

erfolgt (energieabhängig) Nukleäre Aufnahme entweder aktiv oder passiv (energieunabhängig) über den Kernporenkomplex (NPC). Freie Diffusion durch die Kernmembranporen ist dabei nur für Moleküle < 10 nm (entsprechend 40 - 60 kDa) möglich, alle anderen benötigen einen aktiven Transportmechanismus (van der Aa et al. 2006). Mit einer Vektorgröße von 4,7 kb (entsprechend 310 kDa) des pEGFP-C1-Konstrukts kann passive Diffusion durch die Kernmembranporen als Aufnahmemechansimus ausgeschlossen werden. In den Arbeiten von Dean et al. konnte gezeigt werden, dass für die nukleäre SV 40-Plasmid-DNA eine 72 bp-Sequenz Aufnahme von der Enhancer-Region hauptverantwortlich ist. Diese besitzt mehrere Bindestellen für NLS-Proteine wie Importin- α (Dean et al. 1999). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte pEGFP-C1-Vektor enthält unter anderem den SV 40-Replikationsursprung, der die für die aktive nukleäre Aufnahme erforderliche 72 bp-Sequenz in der Enhancer-Region trägt (siehe Abbildung 1-2). Daher kann der Schluss gezogen werden, dass der pEGFP-Vektor aktiv in den Zellkern aufgenommen wird.

4.2.7 Transgenexpression nach +/- US DC 30[®]/pEGFP-Transfektion

Für eine erfolgreiche Genexpression ist neben der Aufnahme der Plasmid-DNA in den Zellkern eine effiziente Transkription in die mRNA mit anschließender ribosomaler Translation in das codierte Protein erforderlich. Um die Effizienz der Expressionsmaschinerien der beiden Zellmodelle A-10 SMC und MDCK II miteinander zu vergleichen. wird die **EGFP-Expression** nach Transfektion der Zellen mit +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen als potentielle nächste intrazelluläre Barriere untersucht.

A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden nach 3.7.3 mit +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen inkubiert und die EGFP-Expression über 96 h analog zum Kinetikversuch bestimmt. Um die Proteinexpressionslevel der transfizierten Zellen unabhängig von den Transfektionsraten zu analysieren, werden zu den verschiedenen Zeitpunkten zunächst die erfolgreich transfizierten Zellpopulationen gegatet und die jeweiligen Expressionslevel anhand des Geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensitätspeaks ausgewertet.







Abbildung 4-23: Bestimmung der **EGFP-Expressionslevel** nach Transfektion von +/- US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in A-10 SMC und MDCK II-Zellen A-10 SMC (weiße Balken) und MDCK II-Zellen (schwarze Balken) wurden 5 h mit + US (A) bzw. - US (B) DC 30[®]/DNA-Komplexen inkubiert. Die EGFP-Expressionsstärke der Zellen wurde nach 12, 24, 48, und 96 h 72 durchflusszytometrisch anhand des Mittels EGFP-Geometrischen der exprimierenden Zellpopulation bestimmt (n = 3; + SEM).

Die EGFP-Expressionslevel sind in der Zelllinie A-10 SMC für beide Komplexpräparationen vergleichbar (+ US: 19,0 vs. – US: 20,5), maximale Proteinexpression ist nach 48 h erreicht. Im Gegensatz dazu erzielt die unbehandelte Präparation in MDCK II-Zellen nach 48 h bereits höhere Expressionsraten als die ultraschallbehandelte Präparation (17,9 vs. 9,7) und übersteigt zum Zeitpunkt t = 72 h sogar die Raten in A-10 SMC. Zu berücksichtigen bleibt, dass zu diesem Zeitpunkt weniger als 1 % erfolgreich transfizierte MDCK II-Zellen vorliegen

(vergleiche Abbildung 4-11A). Sofern Lipid/DNA-Komplexe alle vorgeschalteten Transfektionsbarrieren in MDCK II überwinden und die Plasmid-DNA erfolgreich in den Zellkern aufgenommen wird, kann diese auch effizient abgeschrieben und das Transgen exprimiert werden.

Die EGFP-Expression ist im Positivmodell A-10 SMC bereits zu früheren Zeitpunkten (t = 12 h) detektierbar und zu diesen signifikant stärker als im Negativmodell MDCK II. Wie bereits in Abschnitt 4.2.5.4 diskutiert resultiert die schnellere und gleichzeitig effizientere intrazelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen bzw. der freigesetzten Plasmid-DNA letztendlich in früherer und stärkerer Transgenexpression in A-10 SMC.

4.2.8 Steigerung der zellulären Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen im Zellmodell MDCK II

Die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen wurde bereits als wichtigste zelluläre Transfektionsbarriere identifiziert (vgl. 4.2.2). Die Steigerung dieser sollte demnach die Transfektionseffizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen im Negativmodell MDCK II günstig beeinflussen.

Es werden 2 Ansätze verfolgt:

- Unspezifische Steigerung der zellulären Aufnahme durch Modifikation von Lipid/DNA-Komplexen mit dem zellpenetrierenden Peptid TATp
- Spezifische Stimulation der Clathrin- bzw. Caveolae-abhängigen Endozytose durch Einsatz von Endozytoseenhancern (Saponinum album (Ct) und Lactosylceramid (Cav))

Die Versuche zur Steigerung der zellulären Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen beschränken sich dabei auf das Negativmodell MDCK II, da unter Standardbedingungen bereits fast 100 % aller A-10 SMC (Positivmodell) Lipid/DNA-Komplexe aufnehmen.

4.2.8.1 Modifizierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen mit TATp

Das TAT-Protein (TATp) vermittelt unspezifisch die Transduktion von gebundenen Molekülen in die Zelle. Die erfolgreiche Modifizierung von Lipid/DNA-Komplexen (PC/Chol/DOTAP/pNP-PEG-PE 7:3:1:0,05 (mol/mol) komplexiert mit pEGFP-N1 (10:1 (m/m)) mit dem TATp wurde in den Arbeiten von Torchilin et al. beschrieben und effiziente Transfektion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Torchilin *et al.* 2003). In Anlehnung an die Arbeiten von Doris Zimmer aus der eigenen Arbeitsgruppe wird die Modifizierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen mit dem zellpenetrierenden Peptid TATp nach der modifizierten SPIT-Methode nach 3.7.8 durchgeführt. Die zelluläre Aufnahme sowie die Transfektion der modifizierten Komplexe wird im Negativmodell MDCK II nach 3.7.1 bzw. 3.7.3 bestimmt.



Abbildung 4-24: Einfluss der TATp-Modifizierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen auf die zelluläre Aufnahme und Transfektion von MDCK II-Zellen

DC $30^{\text{e}/(\text{Cy3-})}$ DNA-Komplexe wurden nach 2 Protokollen mittels der modifizierten SPIT-Methode (*sterol-based post insertion technique*) mit 5 – 20 mol% TATp - Mal-PEG-Chol-Anker-Konjugat bezogen auf das Gesamtlipid modifiziert: (DC 30^{e} + DNA) + TATp bzw. (DC 30^{e} + TATp) + DNA. MDCK II-Zellen wurden für 5 h mit den entsprechenden Komplexen inkubiert. Die zelluläre Aufnahme (A) wurde nach 5 h und die Transfektion (B) nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Relative zelluläre Aufnahme bzw. Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 2; + SEM).

Die Oberflächenmodifizierung von Lipid/DNA-Komplexen mit dem Protein TATp führt zu keiner Steigerung der zellulären Komplexaufnahme. Wie aus den Aufnahmeversuchen anzunehmen, hat die TATp-Modifizierung ebenfalls keinen positiven Einfluss auf die Transfektionsraten von DC 30[®]/DNA-Komplexen im Zellmodell MDCK II. Selbst eine

Erhöhung der eingesetzten Anker-TATp-Konjugat-Menge von 5 auf 20 mol% bezogen auf das Gesamtlipid erbringt keine Verbesserung der zellulären Aufnahme (Daten nicht gezeigt).

4.2.8.2 Einsatz von Endozytoseenhancern

Als Endozytoseenhancer werden als Clathrin-Enhancer ein Saponingemisch aus *Gypsophila paniculata L.* (Saponinum album) aus der Forschungsgruppe von Herrn Matthias F. Melzig (Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin) sowie Lactosylceramid als Caveolae-Enhancer eingesetzt.

Saponinum album wird selbst über Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert (Weng *et al.* 2009). Die Steigerung des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges beruht dabei weniger auf einer direkten Zunahme der Clathrin-vermittelten Aufnahme sondern auf einer verbesserten intrazellulären Freisetzung aus dem endosomalen System. Saponinum album reichert sich auf Grund des amphiphilen Charakters in der endosomalen Membran an und begünstigt somit die intrazelluläre Freisetzung von kointernalisierten Molekülen (Bachran *et al.* 2011).

Das Glycosphingolipid Lactosylceramid dient zum einen fluoreszenzmarkiert als Endozytosemarker, da es über Caveolae-abhängige Endozytose aufgenommen wird, triggert aber gleichzeitig auch die zelluläre Caveolae-Aufnahmeroute (Puri *et al.* 2001, Singh *et al.* 2003). Als Mechanismus wird eine durch Lactosylceramid bedingte Reorganisation (Clustern) der Lipide und Signalproteine in der Plasmamembran diskutiert, wodurch membranständige Kinasen wie Src oder PKC aktiviert und Caveolae-abhängige Endozytosewege ausgelöst werden können (Sharma *et al.* 2004).

Die verwendeten Endozytoseenhancer wurden in Vorgängerarbeiten bereits hinsichtlich der einzusetzenden Konzentrationen charakterisiert (Schneider *et al.* 2010). Bei den Enhancer-Versuchen liegt die Zellviabilität stets > 95 %.



Abbildung 4-25: Einfluss von Endozytoseenhancern auf die Viabilität von MDCK II-Zellen MDCK II-Zellen wurden mit den Endozytoseenhancern Saponinum album (ce) und Lactosylceramid (laccer) nach Tabelle 3-3 präinkubiert und anschließend 5 h mit DC 30[®]/DNA-Komplexen koinkubiert. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels des CellTiterGloTM-Assays bestimmt. Relative Viabilität bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Der Einfluss der Endozytoseenhancer Ce und Laccer auf die zelluläre Aufnahme wird nach 3.7.7 bestimmt. MDCK II-Zellen werden mit – US DC 30[®]/DNA-Komplexen und den Endozytoseenhancern nach Tabelle 3-3 koinkubiert und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch bestimmt.



Abbildung 4-26: Einfluss von Endozytoseenhancern auf die zelluläre Aufnahme von Cy3-DC 30[®]/DNA-Komplexen in MDCK II-Zellen

MDCK II-Zellen wurden mit den Endozytoseenhancern Saponinum album (ce) oder Lactosylceramid (laccer) und – US Cy3-DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen 5 h koinkubiert. Die zelluläre Aufnahme wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Relative zelluläre Aufnahme bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Durch Koinkubation von DC 30[®]/DNA-Komplexen mit den Endozytoseenhancern Ce und Laccer kann die zelluläre Komplexaufnahme in MDCK II-Zellen signifikant gesteigert werden. Dabei wird erwartungsgemäß die Komplexaufnahme über den bevorzugt betriebenen Caveolae-Endozytoseweg stärker beeinflusst (Faktor 2,1 vs. 1,3).

Neben den Untersuchungen zum Einfluss der Endozytoseenhancer auf die zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen in MDCK II-Zellen wird parallel dazu der Einfluss auf die nukleäre Aufnahme der Plasmid-DNA betrachtet. Dafür werden MDCK II-Zellen nach 3.7.7 mit den Endozytoseenhancern Saponinum album (ce) und Lactosylceramid (laccer) sowie DC 30[®]/(Cy3-) DNA-Komplexen inkubiert und nach 3.7.7 bzw. 3.9.2 analysiert.



Abbildung 4-27: Einfluss von Endozytoseenhancern auf die nukleäre Aufnahme von Cy3-DNA MDCK II-Zellen wurden nach 3.7.7 mit den Endozytoseenhancern Saponinum album (ce) und Lactosylceramid (laccer) und – US Cy3-DC 30[®]/DNA-Komplexen 5 h koinkubiert. Die nukleäre Aufnahme von Cy3-DNA wurde nach 8 h mittels "*Quantitative Imaging*" bestimmt. Bestimmung der mittleren Cy3-Kernintensität (A) sowie der Anzahl Cy3-positiver Kerne (B). Relative Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Nach Koinkubation von DC 30[®]/DNA-Komplexen mit den Endozytoseenhancern sind im Vergleich zur unbehandelten Komplexkontrolle jeweils höhere Cy3-Kernintensitäten messbar, es befindet sich demnach mehr Plasmid-DNA pro Cy3-positivem Zellkern. Der Anteil plasmidpositiver Kerne kann zwar durch beide Enhancer gesteigert werden, allerdings zeigt der Clathrin-Enhancer hier überraschenderweise einen deutlich stärkeren Effekt (Faktor 1,8 vs. 1,4).

Abschließend wird der Einfluss der Endozytoseenhancer Saponinum album (ce) und Lactosylceramid (laccer) auf die Transfektion von MDCK II-Zellen untersucht.





Lactosylceramid (laccer) und – US Cy3-DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen 5 h koinkubiert. Die Transfektion der Zellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die Transfektion von MDCK II-Zellen kann durch den Einsatz beider Endozytoseenhancer im Vergleich zur unbehandelten Komplexkontrolle gesteigert werden. Die Zunahme der Transfektionsrate (Faktor 1,4 (laccer) bzw. 1,8 (ce)) korreliert dabei nicht mit der Steigerung der zellulären Aufnahme (Faktor 2,1 vs. 1,3), aber mit der Erhöhung der nukleären Aufnahme (Faktor 1,4 (laccer) bzw. 1,8 (ce)). Die Zunahme der Transfektionsrate in MDCK II-Zellen lässt sich demnach weniger durch die Steigerung der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen erklären, vielmehr scheint dies ausschließlich auf die Steigerung der nukleären Aufnahme der Plasmid-DNA zurückzuführen zu sein.

4.2.8.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die zelluläre Aufnahme als wichtigste Transfektionsbarriere von DC 30[®]/DNA-Komplexen soll in diesem Kapitel mit Hilfe zweier Strategien im Negativmodell MDCK II gesteigert werden: Oberflächenmodifizierung der Komplexe mit dem zellpenetrierenden Peptid TATp sowie Steigerung der zellulären Komplexaufnahme durch Stimulation der beteiligten Endozytosewege.

Durch die TATp-Modifizierung der Komplexe kann kein positiver Effekt auf die zelluläre Komplexaufnahme und folglicherweise auch nicht auf die Transfektionseffizienz nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu kann die zelluläre Komplexaufnahme und in Konsequenz die nukleäre Aufnahme der Plasmid-DNA sowie die Transfektion von MDCK II-Zellen nach Einsatz der Endozytoseenhancer Saponin und Lactosylceramid gesteigert werden. Die zelluläre Komplexaufnahme wird im Caveolae-dominanten Zellmodell MDCK II durch den Caveolae-Enhancer Lactosylceramid deutlich stärker beeinflusst als durch den Clathrin-Enhancer Saponin. Der Einfluss der Endozytoseenhancer auf die nukleäre Aufnahme von komplexfreigesetzter Plasmid-DNA ist zunächst durch die gesteigerte zelluläre Komplexaufnahme bedingt, durch die größere intrazelluläre Plasmidmenge kann folglicherweise auch mehr in den Zellkern prozessiert werden. Erstaunlicherweise entspricht die Steigerung der nukleären Aufnahme bzw. der Transfektionsraten nicht der Zunahme der zellulären Komplexaufnahme. Um die Effizienz der intrazellulären Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen entlang der Clathrin- bzw. Caveolae-Route hinsichtlich erfolgreicher Transfektion zu charakterisieren, werden die relativen Transfektionseffizienzen TE_{rel, ct} bzw. TE_{rel, cav} (TE_{rel} = Transfektionsrate/zelluläre Aufnahmerate [%]) für die beiden Enhancer berechnet. So zeigt sich dass die durch Lactosylceramid stimulierte Caveolae-Prozessierung trotz des starken Effekts auf die Komplexaufnahme der Clathrin-Prozessierung in ihrer Effizienz unterlegen ist (TE_{rel, cav} = 10,3 % bzw. TE_{rel, ct} = 20,9 %). Für eine erfolgreiche Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen ist demnach nicht nur die zelluläre Aufnahme an sich sondern auch die Aufnahmeroute (Clathrin- bzw. Caveolae-abhängige Endozytose) entscheidend.

Obwohl die Transfektion von MDCK II-Zellen durch den Einsatz der Endozytoseenhancer gesteigert werden konnte, liegen die erreichten Transfektionsraten dennoch unter 10 % (Daten nicht gezeigt).

4.2.9 Bewertung der Clathrin-Prozessierung

Um die Relevanz der Clathrin-Prozessierung hinsichtlich effizienter zellulärer Transfektion von DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen zu prüfen, werden im Clathrin-dominanten Positivmodell A-10 SMC Endozytoseinhibitorversuche durchgeführt. Eingesetzt werden hier wieder Chlorpromazin als Clathrin-Inhibitor, Genistein als Caveolae-Inhibitor sowie Methyl- β -Cyclodextrin als Inhibitor beider Endozytosewege.

A-10 SMC werden nach 3.7.1 vorbereitet und nach 3.7.7 neben den Lipid/DNA-Komplexen mit den Endozytoseinhibitoren nach Tabelle 3-2 inkubiert. Der Einfluss der Endozytoseinhibitoren auf die zelluläre Aufnahme von DC 30[®]/DNA-Komplexen wurde bereits in Abschnitt 4.2.2 dargestellt. Weiterhin wird parallel dazu die nukleäre Aufnahme der Plasmid-DNA nach 3.8.2 sowie die Transfektion der Zellen nach 3.7.3 analysiert.



Abbildung 4-29: Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die nukleäre Aufnahme von Cy3-DNA A-10 SMC wurden nach 3.7.7 mit den Endozytoseinhibitoren Chlorpromazin (clz), Genistein (gen) und Methyl-β-Cyclodextrin (mbcd) nach Tabelle 3-2 präinkubiert und anschließend mit + US (weiße Balken) und – US (schwarze Balken) Cy3 DC 30[®]/DNA-Komplexen 5 h koinkubiert. Die nukleäre Aufnahme von Cy3-DNA wurde nach 5 h mittels "*Quantitative Imaging*" bestimmt. Kernintensitätsmessungen: Bestimmung der mittleren Cy3-Kernintensität (A, C) sowie der Anzahl Cy3-positiver Kerne (B, D). Relative Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die mittlere Cy3-Kernintensität und somit die maximal nukleär aufgenommene Plasmidmenge in den Cy3-positiven Zellkernen wird für beide Komplexpräparationen lediglich durch den Caveolae-Inhibitor Genistein beeinflusst. Allerdings wird der Anteil an Kernen, die Cy3-DNA enthalten, durch die eingesetzten Inhibitoren signifikant reduziert. Der Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin zeigt dabei gemäß der Clathrin-Dominanz des Zellmodells A-10 SMC einen stärkeren Effekt als der Caveolae-Inhibitor Genistein (57,6 +/– 7,5 % bzw. 76,0 +/– 7,8 %). Der direkte Vergleich der % positiven Zellkerne zeigt, dass die Prozessierung der + US-Komplexe tendenziell durch den Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin stärker beeinflusst wird als die der – US-Komplexe ($52,3 \pm - 0,9 \text{ vs. } 62,8 \pm - 3,9 \%$). Im Umkehrschluss ist der Einfluss des Caveolae-Inhibitors Genistein bei Inkubation der – US-Komplexpräparation größer ($70,5 \pm - 3,9 \text{ vs. } 81,5 \pm - 3,9 \%$). Als Erklärung hierfür kann wieder die größenabhängige Aufnahme und Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen herangezogen werden (Rejman *et al.* 2004): die + US-Präparation enthält einen größeren Anteil kleinerer Komplexfraktionen (< 200 nm), die vermehrt über Clathrin-Strukturen prozessiert werden, wohingegen die – US-Präparation mehr Komplexe im Größenbereich von > 200 nm enthält, die präferentiell in die Caveolae-Route passen (vergleiche 4.2.5.4).

Die Kerndaten zeigen, dass prinzipiell beide Aufnahmerouten für Lipid/DNA-Komplexe (Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose) zum Zellkern prozessieren. Nichtsdestotrotz scheint die Prozessierung via Clathrin für einen effizienten Kerntransport relevanter zu sein.

Weiterhin wird der Einfluss der Inhibitoren bzw. der endozytotischen Prozessierung auf die Transfektionsraten von +/- US DC $30^{(B)}/$ DNA-Komplexen betrachtet.



Abbildung 4-30: Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Transfektion von +/– US DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in A-10 SMC

A-10 SMC wurden mit den Endozytoseinhibitoren Chlorpromazin (clz), Genistein (gen) und Methyl- β -Cyclodextrin (mbcd) präinkubiert und anschließend mit + US (weiße Balken) und – US (schwarze Balken) DC 30[®]/DNA-Komplexen 5 h koinkubiert. Die Transfektion der Zellen wurde nach 48 h durchflusszytometrisch bestimmt. Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SEM).

Die Transfektion von A-10 SMC durch +/- US DC 30[®]/pEGFP-Komplexe wird durch die eingesetzten Endozytoseinhibitoren Chlorpromazin und Genistein reduziert. Eine erfolgreiche Transfektion von A-10 SMC scheint demnach prinzipiell über beide Endozytosewege möglich zu sein. Analog zu den Kerndaten hat der Clathrin-Inhibitor einen stärkeren Effekt auf die Transfektion der ultraschallbehandelten Präparation (54,1 vs. 86,6 %), der Caveolae-Inhibitor hingegen auf die der unbehandelten Präparation (68,6 vs. 75,1 %). Der additive und Caveolae-Inhibitors Einfluss des Clathrin-Methly-β-Cyclodextrin auf die Transfektionshemmung ist analog zum Aufnahmeversuch nachweisbar. In logischer Konsequenz reduziert die vorausgehende Hemmung der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen die intrazellulär zur Verfügung stehende Plasmid-DNA-Menge und beeinflusst somit unmittelbar die zu erreichenden Transfektionsraten der Zellen.

4.2.9.1 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Bedeutung der Endozytosewege Clathrin bzw. Caveolae bezüglich effizienter Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen im Zellmodell A-10 SMC untersucht. Durch den Einsatz von Endozytoseinhibitoren wird die zelluläre Aufnahme der Komplexe gehemmt und die Auswirkungen auf den Kerntransport sowie die erreichten Transfektionsraten im Vergleich zur unbehandelten Komplexkontrolle bewertet. Generell hat die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose im Gegensatz zur Caveolae-Inhibition einen größeren Einfluss auf die erreichten Transfektionsraten in A-10 SMC. In einer Clathrin-dominanten Zelllinie ist dies zu erwarten, nichtsdestotrotz unterstreichen die Ergebnisse die Rolle der Clathrin-Prozessierung hinsichtlich erfolgreicher zellulärer Transfektion. Die guten Transfektionsergebnisse von DC 30[®]/DNA-Komplexen in A-10 SMC sind augenscheinlich auf die Clathrin-Dominanz dieser Zelllinie zurückzuführen.

Ähnliche Ergebnisse wurden für Lipid/DNA-Komplexe vergleichbarer Struktur (kationisches Lipid/neutrales Helferlipid) erzielt: So konnte u.a. in den Arbeiten von Zuhorn et al. gezeigt werden, dass für die Transfektionseffizienz von SAINT/DOPE-Komplexen die Clathrinabhängige Prozessierung essentiell ist (Zuhorn *et al.* 2002). Mit der Relevanz der Clathrin-Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen befasst sich die Literatur intensiv (Elouahabi & Ruysschaert 2005, Friend *et al.* 1996, Rejman *et al.* 2005). Für DC 30[®]/DNA-Komplexe wird eine Prozessierung über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose beschrieben (Schneider 2010) und soll im Folgenden detaillierter untersucht werden.

4.2.10 Intrazelluläre Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen

4.2.10.1 Konfokale Kolokalisationsstudien zur Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytosewege

DC 30[®]/pEGFP-Komplexe werden über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose in die Zellen aufgenommen und entlang dieser Endozytoserouten intrazellulär prozessiert. In Vorgängerarbeiten wurden diese bereits grundlegend charakterisiert (Schneider 2010).

Die Beteiligung der Clathrin- bzw. Caveolae-abhängigen Endozytosewege an der Prozessierung von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen wird in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von konfokalen Kolokalisationsstudien für die Zellmodelle A-10 SMC und MDCK II detaillierter bewertet und über die Manders Kolokalisationskoeffizienten quantifiziert. Als intrazelluläre Marker für die untersuchten Endozytosewege werden in der Literatur LAMP1 (*lysosomal membrane associated protein-1*) für die Clathrin-Prozessierung und Caveolin-1 (*Cav-1*) für die Caveolae-Route beschrieben (Andrejewski *et al.* 1999, Cai *et al.* 2008, Eskelinen *et al.* 2003, Karlsson & Carlsson 1998, Parton & Howes 2010, Swetha *et al.*). Die durchgeführten Studien sollen weiterhin zeigen, ob die Transfektionseffizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen von der eingeschlagenen Endozytoseroute (Ct bzw. Cav) abhängig ist. Dafür wird zusätzlich die Kolokalisation von Cy3-DNA mit dem Zellkern untersucht.

A-10 SMC und MDCK II-Zellen werden nach 3.9.4 mit nach 3.3 hergestellten +/- US DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen inkubiert. LAMP1 und Caveolin-1 werden immunhistochemisch gelabelt (siehe Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5), die Zellkerne mit SYTOX[®] Green gefärbt und konfokale Bilder der Proben am Mikroskop aufgenommen. Die Kolokalisation von Cy3-DNA mit den jeweiligen Endozytosemarkern sowie dem Zellkern wird mittels der ImageJ Software 1.42 analysiert und anhand der Manders Kolokalisationskoeffizienten M_{LAMP1}, M_{Cav-1} und M_{nuc} ausgewertet.



Abbildung 4-31: Kolokalisation von +/– US DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen mit LAMP1 A-10 SMC und MDCK II-Zellen wurden mit +/– US DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen (rot) inkubiert. LAMP1 wurde immunhistochemisch mit einem MFP 488-konjugierten Antikörper gefärbt (grün). Repräsentative konfokale Bilder nach 24 h. Größenmaßstab 10 μm.

Kolokalisation von Cy3-DNA und dem Clathrin-Marker LAMP1 ist in den Bildern in der Überlagerung der Einzelfärbungen als gelbe Bildpunkte erkennbar (siehe Pfeile). Diese Überlagerung ist allerdings nur bei Inkubation der + US-Komplexpräparation eindeutig zu finden. Das durch die jeweilige Größe bedingte stark unterschiedliche intrazelluläre Erscheinungsbild Lipid/DNA-Komplexe für die der stellt Bewertung der - US-Komplexe/LAMP1-Kolokalisation ein Problem dar. - US-Komplexe sind in großen "aufgeblähten" Vesikeln lokalisiert, deren Membran mit LAMP1 ausgekleidet ist. Durch die fehlende räumliche Überlappung der Vesikelmembran mit den Komplexen ist eine Bewertung der Kolokalisation über den Manders Kolokalisationskoeffizienten für die - US Präparation nicht möglich. Die Kolokalisationsanalyse von Cy3-DNA und LAMP1 beschränkt sich daher auf die + US-Komplexpräparation.

In beiden Zelllinien werden Lipid/DNA-Komplexe über LAMP1-positive Kompartimente prozessiert, dabei findet sich maximale Kolokalisation von Cy3-DNA und LAMP1 jeweils nach etwa 2 h ($M_{LAMP1} = 20,6 +/-2,7 \%$ (A-10) bzw. 15,7 +/- 2,1 % (MDCK II)). Die anschließende Abnahme von M_{LAMP1} spiegelt den lysosomalen Abbau eines Teils der Komplexe aber auch die Freisetzung der Komplexe aus den LAMP1-positiven Kompartimenten wider. Nach etwa 5 h erreicht M_{LAMP1} in beiden Zelllinien ein konstantes Niveau ($M_{LAMP1} = 9,4 +/-1,7 \%$ (A-10) bzw. 6,2 +/-1,2 % (MDCK II)), ein Teil der Cy3-DNA-Komplexe persistiert demnach bis zum Versuchsende (t = 30 h) im Clathrin-Weg.

Parallel zur Kolokalisation von Cy3-DNA und LAMP1 wird die Kolokalisation mit dem Zellkern (M_{nuc}) verfolgt. Zeitgleich mit der Abnahme von M_{LAMP1} kann in beiden Zelllinien eine Zunahme von M_{nuc} beobachtet werden. Cy3-DNA-Komplexe werden folglicherweise über spätendosomale Kompartimente zum Zellkern prozessiert. Aus Vorgängerarbeiten ist bereits bekannt, dass ein Teil der Komplexe in spätendosomalen LAMP1-positiven Kompartimenten persistiert (Schneider 2010). Eine vollständige endosomale Freisetzung ist auch in der vorliegenden Arbeit nicht zu verzeichnen. Da die M_{LAMP1} -Koeffizienten für A-10 SMC und MDCK II-Zellen nach 24 h vergleichbar sind, ist der intrazelluläre Verlust von Lipid/DNA-Komplexen im Clathrin-Endozytoseweg ebenfalls als vergleichbar anzusehen.



Abbildung 4-32: Kolokalisationsstudien von + US DC 30[®]/Cy3-DNA und LAMP1, Zellkern bzw. Caveolin-1 in A-10 SMC und MDCK II-Zellen

A-10 SMC (weiße Symbole) und MDCK II-Zellen (schwarze Symbole) wurden 5 h mit +/- US DC 30[®]/DNA-Komplexen inkubiert. LAMP1 sowie Caveolin-1 wurden jeweils immunhistochemisch mit einem MFP 488-konjugierten sekundären Antikörper und die Zellkerne mit SYTOX[®] Green gefärbt. Die Kolokalisation von Cy3-DNA und LAMP1 (Rauten) bzw. den Zellkernen (Kreise) wurde in A-10 SMC (A) und MDCK II-Zellen (B) nach 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24 und 30 h mittels des Manders Kolokalisationskoeffizienten bestimmt (n = 3; + SEM). Kolokalisation von Cy3-DNA und Cav-1 wurde in A-10 SMC nach 5 und 24 h und in MDCK II nach 8 und 24 h analysiert (C) (n = 3;+ SEM). Anschließend wurden die Manders Kolokalisationskoeffizienten für LAMP1 bzw. Cav-1 nach 24 h in beiden Zelllinien miteinander verglichen (D) (n = 3; + SEM).

Neben der Prozessierung der Lipid/DNA-Komplexe über den Clathrin-Weg wird ebenfalls die Beteiligung des Caveolae-Weges untersucht (siehe Abbildung 4-32C). Für die Kolokalisationsstudien von Cy3-DNA und Caveolin-1 werden als Zeitpunkte jeweils die t_{max}– Werte der Kernversuche (vgl. 4.2.5) sowie t = 24 h als Endzeitpunkt gewählt. Die Komplexprozessierung über Caveolae-Strukturen spielt in der Zelllinie A-10 SMC im Gegensatz zu MDCK II-Zellen eine untergeordnete Rolle ($M_{Cav-1, max} = 7,0 +/-2,1 \%$ vs. 25,1 +/- 2,3 %). In MDCK II-Zellen finden sich nach 24 h noch 15,4 +/- 1,9 % der Cy3-DNA-Komplexe mit Caveolin-1-positiven Kompartimenten assoziiert. Lipid/DNA-Komplexe persistieren in MDCK II-Zellen demnach nicht nur im Clathrin- sondern auch im Caveolae-Endozytoseweg (siehe Abbildung 4-32D).

4.2.10.2 Zusammenfassung und Diskussion

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der detaillierteren Untersuchung der intrazellulären Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen entlang der Clathrin- bzw. Caveolae-Route in A-10 SMC und MDCK II-Zellen. Mittels konfokaler Kolokalisationsstudien von Cy3-DNA-Komplexen mit den Endozytosemarkern LAMP1 (Ct) und Caveolin-1 (Cav) sowie dem Zellkern wird das intrazelluläre Schicksal der internalisierten Komplexe verfolgt.

In beiden Zellmodellen werden Lipid/DNA-Komplexe entsprechend dem Endozytoseprofil der Zellen präferentiell über den jeweils bevorzugten Endozytoseweg aufgenommen und prozessiert (A-10 SMC: Ct; MDCK II: Cav). Die Komplexprozessierung über Caveolae-Strukturen spielt dabei im Positivmodell A-10 SMC eine untergeordnete Rolle. Der Großteil der Komplexe wird aus den endosomalen Strukturen freigesetzt und zum Zellkern transportiert. Allerdings persistiert in beiden Zellmodellen auch ein Teil der Lipid/DNA-Komplexe in spätendosomalen perinukleären Kompartimenten im Clathrin-Weg und im Negativmodell MDCK II zusätzlich im Caveolae-Weg.

Wie in Abschnitt 1.3.3 einleitend erklärt ist der genaue Mechanismus der endosomalen Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen nicht bekannt. Diskutiert wird u.a. die Fusion der Komplexe mit der endosomalen Membran woraufhin die Komplexe bzw. die Plasmid-DNA in das Zytosol freigesetzt werden (Elouahabi & Ruysschaert 2005). Untermauert wird diese Hypothese durch die Notwendigkeit der Präsenz des fusogenen Helferlipids DOPE als Komplexkomponente (Fasbender *et al.* 1997). Im Zuge der endosomalen Acidifizierung durchläuft DOPE eine Phasenumkehr von Bilayer- zu invers hexagonaler Phase, wodurch der Fusionsprozess katalysiert wird (Farhood *et al.* 1995, Koltover *et al.* 1998).

Das Positivmodell A-10 SMC zeichnet sich durch seine Clathrin-Dominanz und die gute Transfizierbarkeit durch Lipid/DNA-Komplexe aus. Die endosomale Freisetzung sollte hier demnach keine intrazelluläre Barriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe darstellen und scheint auf der Phasenumkehr des Helferlipids DOPE unter sauren Bedingungen zu beruhen.

Im Negativmodell MDCK II werden Lipid/DNA-Komplexe vor allem über Caveolae- und bedingt auch über Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen. Die intrazelluläre Prozessierung entlang der beiden Routen ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Zelluläre Aufnahme via Caveolae führt zunächst zur Bildung eines endozytotischen Vesikels (endocytic vesicular carrier). Dieses kann nun entweder durch Fusion mit frühen Endosomen in den Clathrin-Weg einmünden oder mit dem Caveosom verschmelzen (Sharma et al. 2003). Im Zuge der weiteren Prozessierung entlang des Clathrin-Weges wird der endosomale pH abgesenkt und somit die Komplexfreisetzung induziert. Das Caveosom hingegen zeichnet sich durch einen neutralen pH-Wert von 7,4 aus und dient der Zelle als "Sortierstation" (Parton & Simons 2007). Der vorliegende neutrale pH-Wert könnte die Komplexfreisetzung entscheidend beeinflussen. Es ist davon auszugehen, dass die Phasenumkehr des Helferlipids DOPE auf Grund der nicht-optimalen pH-Verhältnisse in MDCK II-Zellen nur in ungenügendem Maße vonstatten geht und die Komplexe somit nicht effizient freigesetzt werden können, was folglich zur Persistenz in der Caveolae-Route führt. Die intrazelluläre Freisetzung der Lipid/DNA-Komplexen würde sich somit als weitere Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe entpuppen.

4.2.10.3 Endosomale Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen

Die endosomale Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen wird durch die Ergebnisse der Kolokalisationsstudien (vergleiche 4.2.10) als weitere zelluläre Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe angenommen. Entscheidend hierfür scheint dabei die Phasenumkehr des Helferlipids DOPE zu sein. Um die endosomale Freisetzung als Transfektionsbarriere von Lipid/DNA-Komplexen zu bestätigen, werden in der Zelllinie A-10 SMC Inhibitorversuche mit dem Makrolidantibiotikum Bafilomycin A₁ (Baf) durchgeführt. Bafilomycin A₁ ist ein spezifischer Inhibitor der vesikulären Protonenpumpe (V-ATPase) und verhindert somit die Acidifizierung der Endosomen (Werner *et al.* 1984, Yoshimori *et al.* 1991). Wenn die endosomale Freisetzung von DC 30[®]/DNA-Komplexen vom pH-Wert abhängig ist, sollte die Transfektionsrate der Zellen unter Bafilomycin A₁-Behandlung deutlich gesenkt werden.

A-10 SMC werden nach 3.7.9 mit Bafilomycin A_1 präinkubiert und anschließend mit DC 30[®]/(Cy3-) DNA-Komplexen 5 h inkubiert. Die Transfektion der Zellen wird nach 48 h durchflusszytometrisch analysiert. Um einen Einfluss von Bafilomycin A_1 auf die zelluläre Aufnahme auszuschließen, wird parallel zum Transfektions- ein Aufnahmeversuch durchgeführt.



Abbildung 4-33: Einfluss von Bafilomycin A_1 auf die zelluläre Aufnahme und Transfektion von DC 30[®]/(Cy3-) pEGFP-Komplexen in A-10 SMC

A-10 SMC wurden mit Bafilomycin A₁ (baf1) präinkubiert und anschließend mit DC $30^{\text{®}}$ /DNA-Komplexen 5 h inkubiert. Die zelluläre Aufnahme der Komplexe wurde nach 5 h (A), die Transfektion nach 48 h durchflusszytometrisch bestimmt (B). Relative Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n > 3; + SEM).

Die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen wird durch den Einsatz von Bafilomycin A_1 nicht beeinflusst. Die Transfektion von A-10 SMC wird unter Bafilomycin A_1 -Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 50 % reduziert. Parallel zum Versuch wurden konfokale Mikroskopbilder aufgenommen.



Abbildung 4-34: Einfluss von Bafilomycin A₁ auf die intrazelluläre Prozessierung von DC 30[®]/Cy3-DNA-Komplexen in A-10 SMC
A-10 SMC wurden mit Bafilomycin A₁ präinkubiert und mit DC 30[®]/DNA-Komplexen (rot) 5 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit SYTOX[®] Green gefärbt (grün). Repräsentative konfokale Bilder von unbehandelten Kontrollzellen (A) und Bafilomycin A₁-behandelten Zellen (B) nach 24 h. Größenmaßstab 10 μm.

Cy3-DNA-Komplexe sind in den Bafilomycin A₁-behandelten Zellen in der Zellperipherie lokalisiert, wohingegen sie in unbehandelten Kontrollzellen in Zellkernnähe zu finden sind. Bafilomycin A₁ interagiert somit direkt mit der intrazellulären Prozessierung der Komplexe.

4.2.10.4 Zusammenfassung und Diskussion

Für eine erfolgreiche Transfektion von DC 30[®]/DNA-Komplexen ist eine effiziente intrazelluläre Komplexfreisetzung nötig, die nur dann effizient verläuft, wenn in der Komplexumgebung eine ausreichende pH-Wert-Absenkung erfolgt. Dies ist lediglich entlang der Clathrin-Route der Fall und bestätigt damit die Relevanz der Clathrin-abhängigen Endozytose als effizienter Prozessierungsweg. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 bzw. 1.3.3 gezeigt, ist bei der Prozessierung über Caveolae-Strukturen ein Einmünden in den Clathrin-Weg über die Fusion des Caveolae-Carriers mit den frühen Endosomen möglich (Sharma *et al.* 2003). Die Freisetzung der Komplexe aus den Caveosomen scheint hingegen durch den neutralen pH-Wert erschwert zu sein. Die Persistenz von DC 30[®]/DNA-Komplexen im

Caveolae-Weg kann für das Caveolae-dominante Negativmodell MDCK II gezeigt werden (vgl. 4.2.10.1). Demzufolge kann die intrazelluläre Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen als weitere Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe bestätigt werden.

4.2.11 Transfektion des Negativmodells MDCK II mit Lipid/Protamin/DNA-Komplexen (LPD)

Die Versuche zur Transfektion von MDCK II-Zellen mit LPD-Komplexen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Maximilian Wittmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie (Universität Freiburg) durchgeführt.

Mit dem bestehenden Lipid/DNA-Komplexsystem (DC 30[®]/pEGFP, – US) können im Negativmodell MDCK II lediglich Transfektionsraten von maximal 5 % erreicht werden. Im Folgenden soll geprüft werden, ob mit einem anderen Vektorsystem bessere Resultate erzielt werden können. Dafür werden Lipid/Protamin/DNA-Komplexe (LPD), bestehend aus dem kationischen Lipid DOTAP, Protaminsulfat und pEGFP als DNA-Komponente nach 3.5 hergestellt und die Zellen nach 3.7.10 mit diesen inkubiert. Die Transfektion der Zellen durch das Nanopartikel-basierte System wird im Vergleich zum Lipid/DNA-Komplexsystem (DC 30[®]/pEGFP) durchflusszytometrisch bestimmt.



Abbildung 4-35: Transfektion von MDCK II-Zellen mit LPD-Komplexen

MDCK II-Zellen wurden mit DC $30^{\ensuremath{\mathbb{S}}}/\text{DNA-Komplexen}$ (lipo) und DOTAP/Protamin/DNA-Komplexen (Verhältnis Lipid/DNA 12, 14, 16 (n/m)) 5 h inkubiert. Die Transfektion der Zellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (n = 3; + SD).

Durch den Wechsel des Trägersystems von Lipid/DNA-Komplex zu Nanopartikel-basiert können die Transfektionsraten im Negativmodell MDCK II durch alle LPD-Komplexpräparationen signifikant gesteigert werden. Das beste Ergebnis erzielt dabei die Präparation LPD 14, durch die die Transfektion im Vergleich zum Lipid/DNA-Komplex um den Faktor 8 gesteigert werden kann.

Die ersten Ergebnisse sind viel versprechend, nichtsdestotrotz bleibt zu klären, worauf die Steigerung der Transfektionsraten zurückzuführen ist. Weitere Studien zur zellulären Aufnahme und Transfektion von LPD-Komplexen in MDCK II wie auch in A-10 SMC sind ebenfalls Gegenstand der Diplomarbeit von Maximilian Wittmann.

120 Ergebnisse und Diskussion

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden DC 30[®]/pEGFP-Komplexe als Vertreter der Lipid/DNA-Komplexe als nicht-virales Gentransfersystem hinsichtlich ihrer Herstellung und zellulären durchgeführten Arbeiten charakterisiert. Die knüpfen dabei an die Effizienz Vorgängerarbeiten von Sebastian Schneider an, in denen unter anderem die Herstellung, die zelluläre Aufnahme, intrazelluläre Prozessierung und Dissoziation von DC 30®/DNA-Komplexen untersucht wurde (Schneider 2010). Durch den Einsatz der Ultraschallspitze (+ US) zur Zerkleinerung der Ausgangsliposomen konnte die resultierende Komplexgröße bedingt eingestellt werden. Ob sich das Herstellungsprotokoll (+/- US) für Lipid/DNA-Komplexe auf die zelluläre Effizienz des Systems auswirkt, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Gentransfereffizienz wird dabei mittels der Expression des transfizierten Plasmids (pEGFP) in zwei Zellmodellen mit unterschiedlichem Endozytoseprofil und Transfektionseigenschaften für Lipid/DNA-Komplexe bewertet. Als Positivmodell dient dabei die Clathrin-dominante Zelllinie A-10 SMC (Transfektionsraten > 50 %), als Negativmodell die Caveolae-dominante Zelllinie MDCK II (Transfektionsraten < 5 %). Neben der Komplex-Charakterisierung sollen weiterhin intrazelluläre Transfektionsbarrieren für DC 30[®]/DNA-Komplexe identifiziert und bewertet werden. Die zelluläre Assoziation und Aufnahme der Komplexe wurde bereits in Vorgängerarbeiten als solche identifiziert. Die Dissoziationsraten der Komplexe sind im Negativmodell MDCK II im Vergleich zu A-10 SMC reduziert (70 % vs. 50 %), sollten bei ansonsten effizienter Prozessierung allerdings für eine erfolgreiche Transfektion ausreichend sein (Schneider 2010). Da die Transfektionsraten im Negativmodell MDCK II trotzdem unter 5 % liegen, ist vom Vorhandensein weiterer Barrieren auszugehen.

Herstellung von +/- US Lipid/DNA-Komplexen

Das Herstellungsprotokoll (+/– US) für Lipid/DNA-Komplexe wird von Sebastian Schneider übernommen (Schneider 2010). Die Größe der Ausgangsliposomen und resultierender Komplexe wird mittels Photonenkorrelationsspekroskopie und Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie bestimmt. Durch die Behandlung der Ausgangsliposomen mit der Ultraschallspitze können die Partikelgrößen der Liposomenfraktionen im Vergleich zu unbehandelten Liposomen verkleinert werden. Nach Komplexierung der +/– US Ausgangsliposomen mit der Plasmid-DNA führt dies zu +/– US Lipid/DNA- Komplexen vergleichbarer Struktur aber unterschiedlicher Größe. Generell zeichnen sich die Proben durch eine große Inhomogenität mit drei Hauptpartikelfraktionen (< 200 nm, 400 – 500 nm, > 1 μ m) aus. Die + US-Präparation enthält jeweils im Vergleich zu – US entweder kleinere Partikelgrößen oder zumindest mehr Partikel in der kleineren Fraktion.

Obwohl durch die Ultraschallspitzenbehandlung eine Verkleinerung der resultierenden Lipid/DNA-Komplexe erzielt werden konnte, bleibt die Komplexherstellung an sich schwer kontrollierbar. Der Prozess wird von vielen Parametern beeinflusst (eingesetztes Lipid, Temperatur, Lipid- bzw. DNA-Konzentration, Pipettiergeschwindigkeit, eingesetzte Volumina, etc.), so dass die standardisierte und reproduzierbare Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen eine große Herausforderung darstellt. Eine standardisierte Herstellung von DAC-30[®]/DNA-Komplexen wurde in den Arbeiten von Clement 2005 durch definiertes Zusammenpumpen der Komplexkomponenten über ein Y-Stück erreicht. Die so hergestellten Komplexe zeigten vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich Komplexgröße, Morphologie sowie Transfektionseffizienz im Vergleich zur Komplexherstellung im Labormaßstab durch Zusammenpipettieren. Ebenfalls war es möglich, durch Lyophilisation der Komplexe Lagerstabilität über 18 Monate bei vergleichbarer Transfektionseffizienz zu erreichen. Eine verbesserte Größenstabilität konnte durch Extrusion der Ausgangsliposomen erreicht werden (Clement et al. 2005).

von Arbeiten Sebastian Schneider wurde In den versucht, dieses Upscale-Herstellungsprotokoll auf DC 30[®]/DNA-Komplexe zu übertragen. Die Proben zeichneten sich durch eine große Inhomogenität aus, zeigten sich allerdings hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz als vergleichbar. Die Lyophilisation der Komplexe resultierte jedoch in einer deutlichen Reduktion der Transfektionseffizienz (bis 50 %). Extrusion der Ausgangsliposomen resultierte in einem Lipidverlust von bis zu 50 % und damit einhergehend mit Strukturveränderungen sowie Transfektionsverlust der resultierenden Lipid/DNA-Komplexe (Schneider 2010). Die standardisierte industrielle Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen im Großmaßstab (upscaling) gestaltet sich demnach schwierig und muss für jedes Lipid/DNA-System etabliert und optimiert werden.

Zelluläre Aufnahme von +/- US Lipid/DNA-Komplexen

Die zelluläre Aufnahme von +/– US DC 30[®]/DNA-Komplexen erfolgt in den eingesetzten Zellmodellen A-10 SMC und MDCK II mittels Clathrin- und Caveolae-abhängiger Endozytose (Schneider 2010). Die Komplexaufnahmeraten im Negativmodell MDCK II sind im Vergleich zum Positivmodell A-10 SMC deutlich reduziert, wodurch die intrazellulär zur Verfügung stehende Komplexmenge massiv limitiert und die Transfektionsraten unmittelbar beeinflusst werden. Durch den Einsatz von Endozytoseenhancern kann die zelluläre Aufnahme in MDCK II-Zellen gesteigert und eine Zunahme der Transfektionsrate beobachtet werden. Folglich ist die effiziente Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen für eine erfolgreiche Transfektion essentiell und kann somit als wichtigste zelluläre Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe identifiziert werden.

Nukleäre Aufnahme von fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA

Die nukleäre Aufnahme von komplexfreigesetzter Cy3-Plasmid-DNA wird mittels konfokaler Bildreihen und computer-gestützter Analyse (*Quantitative Imaging*) untersucht. Beide Komplexpräparationen (+/– US) erweisen sich hinsichtlich ihrer Kerntransporteffizienz für Plasmid-DNA als vergleichbar. Die nukleäre Plasmid-Aufnahme im Negativmodell MDCK II ist allerdings wiederum dem Positivmodell A-10 SMC unterlegen. Da nur nukleär lokalisierte Plasmid-DNA transkribiert und letztlich exprimiert werden kann, stellt die nukleäre Aufnahme von komplexfreigesetzter Plasmid-DNA eine weitere Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe dar.

Intrazelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen

Die intrazelluläre Prozessierung von DC 30[®]/DNA-Komplexen entlang der Clathrin- und Caveolae-Route wird in dieser Arbeit mit Hilfe von konfokalen Kolokalisationsstudien detaillierter untersucht. In beiden Zellmodellen kann Persistenz und somit Verlust eines Teils der Komplexe im Clathrin-Endozytoseweg festgestellt werden. Effiziente Freisetzung der DC 30[®]/DNA-Komplexe aus dem endosomalen System ist für eine erfolgreiche Transfektion unerlässlich und beruht auf der pH-abhängigen Phasenumkehr des Helferlipids DOPE (Farhood *et al.* 1995, Koltover *et al.* 1998). Zusätzlich zur Persistenz in endosomalen Strukturen verbleibt im Negativmodell MDCK II ein nicht unerheblicher Teil der Komplexe ebenfalls im Caveolae-Weg. Die Freisetzung der Komplexe aus den Caveosomen scheint durch den dort vorliegenden neutralen pH-Wert erschwert. Intrazellulärer Verlust von

Lipid/DNA-Komplexen durch ineffiziente Prozessierung und Freisetzung kann somit als nächste Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe identifiziert werden.

Weitere potentielle Transfektionsbarrieren

Als weitere potentielle zelluläre Barrieren werden die Transgenexpression sowie der Einfluss der Zellteilung auf die Transfektionseffizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen untersucht.

Die Expression von EGFP verläuft im Negativmodell MDCK II im Vergleich zu A-10 SMC deutlich langsamer, auch sind die Expressionsraten zu frühen Beobachtungszeitpunkten niedriger. Dieser Effekt erklärt sich durch die schnellere und gleichzeitig effizientere intrazelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen bzw. der freigesetzten Plasmid-DNA in A-10 SMC und ist nicht auf eine reduzierte Aktivität der Expressionsmaschinerie in MDCK II-Zellen zurückzuführen. Die Transgenexpression an sich stellt folglich keine Transfektionsbarriere für DC 30[®]/DNA-Komplexe dar.

Die Transfektionsraten von DC 30[®]/pEGFP-Komplexen in nicht-teilenden wie teilenden Zellen sind vergleichbar. So ist die Mitosephase mit dem dazugehörenden Ab- und Wiederaufbau der Kernmembran für die nukleäre Aufnahme der Plasmid-DNA nicht erforderlich. Vielmehr scheint der pEGFP-C1-Vektor aktiv in den Zellkern aufgenommen zu werden. Die Effizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen ist nicht von der Zellproliferation abhängig, so dass diese folglich als Transfektionsbarriere ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassung

Für das Herstellungsprotokoll (+/– US) für Lipid/DNA-Komplexe ergibt sich folgendes: Die unterschiedliche Behandlung der Ausgangsliposomen führt zu Komplexpräparationen, die sich primär in ihren Partikelgrößen unterscheiden. Die zelluläre Aufnahme der Komplexe konnte durch die Ultraschallbehandlung leicht verbessert werden. Das intrazelluläre Erscheinungsbild der +/– US-Komplexe ist völlig unterschiedlich, nichtsdestotrotz verläuft die intrazelluläre Prozessierung vergleichbar. Zelllinienabhängig kann die Transfektionseffizienz der Komplexe durch Einsatz der Ultraschallspitze in A-10 SMC gesteigert werden. Ein positiver Effekt auf das Negativmodell MDCK II konnte allerdings nicht verzeichnet werden.

Die Transfektionseffizienz von Lipid/DNA-Komplexen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So spielt für ein Gentransfersystem neben der Partikelgröße und –ladung auch die Eigenschaft, zelluläre Barrieren zu überwinden, eine entscheidende Rolle. Erfolgreiche
zelluläre Transfektion beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Prozesse von zellulärer Aufnahme bis zur Genexpression wobei jeder dieser Schritte als mitverantwortlich für die Effizienz des Systems angesehen werden muss. Als wichtige zelluläre Barrieren werden in dieser Arbeit neben der zellulären Aufnahme die intrazelluläre Prozessierung und die nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA identifiziert.

90 % der Zellen des Positivmodells A-10 SMC nehmen DC 30[®]/DNA-Komplexe auf und mehr als die Hälfte davon transportiert die Plasmid-DNA effizient in den Zellkern. In durchschnittlich 85 % dieser Zellen kann letztendlich erfolgreiche Transgenexpression detektiert werden, was einer relativen Transfektionseffizienz von 45 % entspricht. Im Gegensatz dazu liegen die zellulären Aufnahmeraten im Negativmodell MDCK II lediglich bei 30 %, in weniger als einem Drittel dieser Zellen kann Plasmid-DNA im Zellkern detektiert werden und führt somit zu einem tatsächlichen Anteil an erfolgreich transfizierten Zellen von weniger als 5 % (Relative Transfektionseffizienz: 10 %).

Ausblick

Die Frage bleibt, wie die Effizienz von DC 30[®]/DNA-Komplexen als nicht-virales Gentransfersystem verbessert werden kann. Die Entwicklung eines geeigneten Trägersystems muss sich an den Eigenschaften der Zielzellen orientieren und diesen angepasst werden.

Weiterführende Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit der Modifikation der Komplexzusammensetzung (Diplomarbeit Maximilian Wittmann). So soll das Trägersystem von Lipid/DNA-Komplex zu einem Nanopartikel-basierten System umgestellt werden. In Anlehnung an die Arbeiten von Delgado et al. werden Protaminsulfat/DNA-Partikel hergestellt und anschließend mit kationischem Lipid (DOTAP) gecoatet (LPD: Lipid/Protamin/DNA) (Delgado et al. 2012). Die Überlegenheit des LPD- über das Lipoplex-System wurde für DOTAP/Protamin/DNA-Partikel und DOTAP/DNA-Komplexe gezeigt (Caracciolo et al. 2011). Die Arbeiten von Maximilian Wittmann liefern erste viel versprechende Ergebnisse zur Transfektion des Negativmodells MDCK II mit LPD-Komplexen, so konnte diese durch den Einsatz von DOTAP/Protamin/DNA-Komplexen im Vergleich zum Lipid/DNA-Komplexsystem (DC 30[®]/DNA) signifikant verbessert werden (vergleiche 4.2.11). Weiterhin ermöglicht die Lipidhülle der Partikel eine Oberflächenfunktionalisierung des Trägers mit spezifischen Liganden und somit eine verbesserte zelluläre Assoziation an bestimmte Zielstrukturen (aktives Targeting) (Lewrick 2008). Die Oberflächenmodifikation der LPD-Komplexe ist ebenfalls Gegenstand der Diplomarbeit von Maximilian Wittmann.

Der Einsatz von Protaminsulfat als Komplexkomponente bietet weitere Vorteile: so beinhaltet dieses stark basische Peptid mit sechs benachbarten Arginin-Resten eine Kernlokalisierungssequenz und fungiert somit als NLS–Peptid (Masuda *et al.* 2005). Weiterhin wurde für LPD-Partikel eine bevorzugte zelluläre Aufnahme via Clathrin-abhängiger Endozytose sowie eine verbesserte endosomale Freisetzung beschrieben (Delgado *et al.* 2011). Die Relevanz der Clathrin-Prozessierung hinsichtlich erfolgreicher zellulärer Transfektion wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

Die vorliegende Arbeit identifiziert die zelluläre Aufnahme, die intrazelluläre Prozessierung und die nukleäre Aufnahme von Plasmid-DNA als limitierende Faktoren der lipid-basierten Transfektion zellulärer Systeme. Die von Sebastian Schneider 2010 in den Lehrstuhl eingeführte CellProfilerTM-Analyse fluoreszenzmarkierter DNA wurde in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt. Im Gegensatz zur manuellen Segmentierung und quantitativer Auswertung einzelner Bilddateien (Schneider 2010) wurde die automatische Prozessierung und Analyse größerer Bildreihen etabliert (*upscaling*), und so die Quantifizierung der nukleären Aufnahme von fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA ermöglicht. Zur Bewertung der intrazellulären Prozessierung wurden die konfokalen Kolokalisationsstudien auf fluoreszenzgefärbte Endozytosekompartimente (Endosomen, Caveosomen) übertragen und somit ebenfalls einer quantitativen Analyse zugänglich gemacht.

Die Modifikation des Trägersystems für Plasmid-DNA von Lipoplex- zu LPD-Struktur könnte einen viel versprechenden Ansatz zur Überwindung der identifizierten Transfektionsbarrieren und somit zur möglichen Effizienzsteigerung von nicht-viralen Gentransfersystemen darstellen. Die erforderlichen Methoden und Arbeitstechniken zur Erfassung und Bewertung des Verhaltens von Trägersystemen auf verschiedenen zellulären Ebenen (konfokale Kolokalisationsstudien, *Quantitative Imaging*, etc.) wurden in dieser Arbeit weiterentwickelt und im Arbeitskreis etabliert. Die Übertragung dieser auf das neue Trägersystem bietet somit mögliche Anknüpfungspunkte für weiterführende Arbeiten.

6 Literaturverzeichnis

Aderem A., Underhill D.M. (1999); *Mechanisms of phagocytosis in macrophages;* Annu Rev Immunol; 17 593-623.

Akita H., Ito R., Khalil I.A., Futaki S., Harashima H. (2004); *Quantitative three-dimensional* analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy; Mol Ther; 9 (3): 443-51.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008); *Molecular Biology of the cell;* Garland Science; New York.

Alekseeva A.S., Maslov M.A., Antipova N.V., Boldyrev I.A. (2011); *Comparison of two lipid/DNA complexes of equal composition and different morphology;* Colloids Surf B Biointerfaces; 88 (1): 512-16.

Andrejewski N., Punnonen E.L., Guhde G., Tanaka Y., Lullmann-Rauch R., Hartmann D., von Figura K., Saftig P. (1999); *Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice;* J Biol Chem; 274 (18): 12692-701.

Bachran D., Schneider S., Bachran C., Weng A., Melzig M.F., Fuchs H. (2011); *The* endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins; Mol Pharm; 8 (6): 2262-72.

Bartlett G.R. (1959); *Phosphorus assay in column chromatography;* J Biol Chem; 234 (3): 466-8.

Baum C., Dullmann J., Li Z., Fehse B., Meyer J., Williams D.A., von Kalle C. (2003); *Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells;* Blood; 101 (6): 2099-114.

Belting M. (2003); *Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier;* Trends Biochem Sci; 28 (3): 145-51.

Bolte S., Cordelieres F.P. (2006); A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy; J Microsc; 224 (Pt 3): 213-32.

Bowman E.J., Siebers A., Altendorf K. (1988); *Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells;* Proc Natl Acad Sci U S A; 85 (21): 7972-6.

Brigham K.L., Meyrick B., Christman B., Magnuson M., King G., Berry L.C., Jr. (1989); *In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle;* Am J Med Sci; 298 (4): 278-81.

Brunner S., Sauer T., Carotta S., Cotten M., Saltik M., Wagner E. (2000); *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus;* Gene Ther; 7 (5): 401-7.

Bush W.S., Ihrke G., Robinson J.M., Kenworthy A.K. (2006); *Antibody-specific detection of caveolin-1 in subapical compartments of MDCK cells;* Histochem Cell Biol; 126 (1): 27-34.

Cai T., Wang H., Chen Y., Liu L., Gunning W.T., Quintas L.E., Xie Z.J. (2008); *Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase;* J Cell Biol; 182 (6): 1153-69.

Caracciolo G., Pozzi D., Capriotti A.L., Marianecci C., Carafa M., Marchini C., Montani M., Amici A., Amenitsch H., Digman M.A., Gratton E., Sanchez S.S., Lagana A. (2011); *Factors determining the superior performance of lipid/DNA/protammine nanoparticles over lipoplexes;* J Med Chem; 54 (12): 4160-71.

Carpenter A.E., Jones T.R., Lamprecht M.R., Clarke C., Kang I.H., Friman O., Guertin D.A., Chang J.H., Lindquist R.A., Moffat J., Golland P., Sabatini D.M. (2006); *CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes;* Genome Biol; 7 (10): R100.

Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. (1989); One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution; Proc Natl Acad Sci U S A; 86 (7): 2172-5.

Clement J., Kiefer K., Kimpfler A., Garidel P., Peschka-Süss R. (2005); *Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life;* Eur J Pharm Biopharm; 59 (1): 35-43.

Cohen R.N., van der Aa M.A., Macaraeg N., Lee A.P., Szoka F.C., Jr. (2009); *Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection;* J Control Release; 135 (2): 166-74.

Corle K. (1996); *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems;* Academic Press; Waltham, Massachusetts.

Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J. (1993); *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity;* J Immunol Methods; 160 (1): 81-8.

Dean D.A. (1997); Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific; Exp Cell Res; 230 (2): 293-302.

Dean D.A., Dean B.S., Muller S., Smith L.C. (1999); Sequence requirements for plasmid nuclear import; Exp Cell Res; 253 (2): 713-22.

Delgado D., del Pozo-Rodriguez A., Solinis M.A., Rodriguez-Gascon A. (2011); *Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: the importance of the entry pathway;* Eur J Pharm Biopharm; 79 (3): 495-502.

Delgado D., Gascon A.R., Del Pozo-Rodriguez A., Echevarria E., Ruiz de Garibay A.P., Rodriguez J.M., Solinis M.A. (2012); *Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice;* Int J Pharm; 425 (1-2): 35-43.

Dharmawardhane S., Schurmann A., Sells M.A., Chernoff J., Schmid S.L., Bokoch G.M. (2000); *Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1;* Mol Biol Cell; 11 (10): 3341-52.

Doherty G.J., McMahon H.T. (2009); *Mechanisms of endocytosis;* Annu Rev Biochem; 78 857-902.

Drab M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., Menne J., Lindschau C., Mende F., Luft F.C., Schedl A., Haller H., Kurzchalia T.V. (2001); *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice;* Science; 293 (5539): 2449-52.

Drose S., Altendorf K. (1997); *Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases;* J Exp Biol; 200 (Pt 1): 1-8.

Duan Y., Zhang S., Wang B., Yang B., Zhi D. (2009); *The biological routes of gene delivery mediated by lipid-based non-viral vectors;* Expert Opin Drug Deliv; 6 (12): 1351-61.

Elouahabi A., Ruysschaert J.M. (2005); *Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes;* Mol Ther; 11 (3): 336-47.

Eskelinen E.L., Tanaka Y., Saftig P. (2003); At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins; Trends Cell Biol; 13 (3): 137-45.

Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995); *The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer;* Biochim Biophys Acta; 1235 (2): 289-95.

Fasbender A., Zabner J., Chillon M., Moninger T.O., Puga A.P., Davidson B.L., Welsh M.J. (1997); *Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer in vitro and in vivo;* J Biol Chem; 272 (10): 6479-89.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. (1987); *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure;* Proc Natl Acad Sci U S A; 84 (21): 7413-17.

Ferber D. (2001); Gene therapy. Safer and virus-free?; Science; 294 (5547): 1638-42.

Frick M., Bright N.A., Riento K., Bray A., Merrified C., Nichols B.J. (2007); *Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding;* Curr Biol; 17 (13): 1151-56.

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

Galbiati F., Engelman J.A., Volonte D., Zhang X.L., Minetti C., Li M., Hou H., Jr., Kneitz B., Edelmann W., Lisanti M.P. (2001); *Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities;* J Biol Chem; 276 (24): 21425-33.

Gao X., Huang L. (1991); A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells; Biochem Biophys Res Commun; 179 (1): 280-5.

Gasiorowski J.Z., Dean D.A. (2005); *Postmitotic nuclear retention of episomal plasmids is altered by DNA labeling and detection methods;* Mol Ther; 12 (3): 460-7.

Germain R.N. (2004); An innately interesting decade of research in immunology; Nat Med; 10 (12): 1307-20.

Glebov O.O., Bright N.A., Nichols B.J. (2006); *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells;* Nat Cell Biol; 8 (1): 46-54.

Gorlich D., Henklein P., Laskey R.A., Hartmann E. (1996); A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus; Embo J; 15 (8): 1810-7.

Häfele S.Y. (2007); DNA-Aufnahme und intrazelluläres Trafficking an Primärzellen mittels lipid- und polymer basierten, nicht-viralen Transfersystemen; Dissertation; Universität Freiburg.

Hafez I.M., Maurer N., Cullis P.R. (2001); On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids; Gene Ther; 8 (15): 1188-96.

Hoekstra D., Rejman J., Wasungu L., Shi F., Zuhorn I. (2007); *Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome;* Biochem Soc Trans; 35 (Pt 1): 68-71.

Huth U.S., Schubert R., Peschka-Suss R. (2006); *Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging;* J Control Release; 110 (3): 490-504.

Ivanov A.I. (2008); *Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?;* Methods Mol Biol; 440 15-33.

James M.B., Giorgio T.D. (2000); Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells; Mol Ther; 1 (4): 339-46.

Kamiya H., Fujimura Y., Matsuoka I., Harashima H. (2002); Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes; Biochem Biophys Res Commun; 298 (4): 591-7.

Karin M., Mintz B. (1981); *Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells;* J Biol Chem; 256 (7): 3245-52.

Karlsson K., Carlsson S.R. (1998); Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network; J Biol Chem; 273 (30): 18966-73.

Karmali P.P., Chaudhuri A. (2007); *Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises;* Med Res Rev; 27 (5): 696-722.

Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. (2001); Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics; Nat Med; 7 (1): 33-40.

Khalil I.A., Kogure K., Akita H., Harashima H. (2006); Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery; Pharmacol Rev; 58 (1): 32-45.

Kiefer K., Clement J., Garidel P., Peschka-Süss R. (2004); *Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells;* Pharm Res; 21 (6): 1009-17.

Kirkham M., Parton R.G. (2005); *Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers;* Biochim Biophys Acta; 1746 (3): 349-63.

Koltover I., Salditt T., Radler J.O., Safinya C.R. (1998); An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery; Science; 281 (5373): 78-81.

Kopatz I., Remy J.S., Behr J.P. (2004); A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin; J Gene Med; 6 (7): 769-76.

Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C.G., Benmerah A., Dautry-Varsat A. (2001); *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway;* Mol Cell; 7 (3): 661-71.

Lawson C.L., Hanson R.J. (1974); *Solving Least Squares Problems;* Prentice Halls, Englewood Cliffs; New Jersey.

Le Bihan O., Chevre R., Mornet S., Garnier B., Pitard B., Lambert O. (2011); *Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale;* Nucleic Acids Res; 39 (4): 1595–609.

Lewrick F. (2008); *Aktives liposomales Targeting endokriner Tumore;* Dissertation; Universität Freiburg.

Li W., Szoka F.C., Jr. (2007); *Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery;* Pharm Res; 24 (3): 438-49.

Liberali P., Kakkonen E., Turacchio G., Valente C., Spaar A., Perinetti G., Bockmann R.A., Corda D., Colanzi A., Marjomaki V., Luini A. (2008); *The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS;* Embo J; 27 (7): 970-81.

Luby-Phelps K. (2000); Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area; Int Rev Cytol; 192 189-221.

Lundmark R., Doherty G.J., Howes M.T., Cortese K., Vallis Y., Parton R.G., McMahon H.T. (2008); *The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway;* Curr Biol; 18 (22): 1802-8.

Luzio J.P., Pryor P.R., Bright N.A. (2007); *Lysosomes: fusion and function;* Nat Rev Mol Cell Biol; 8 (8): 622-32.

Lv H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J. (2006); *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery;* J Control Release; 114 (1): 100-9.

Mandy F.F., Bergeron M., Minkus T. (1995); *Principles of flow cytometry;* Transfus Sci; 16 (4): 303-14.

Masuda T., Akita H., Harashima H. (2005); *Evaluation of nuclear transfer and transcription of plasmid DNA condensed with protamine by microinjection: the use of a nuclear transfer score;* FEBS Lett; 579 (10): 2143-8.

Mattaj I.W., Englmeier L. (1998); *Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase;* Annu Rev Biochem; 67 265-306.

Maxfield F.R., McGraw T.E. (2004); *Endocytic recycling;* Nat Rev Mol Cell Biol; 5 (2): 121-32.

Mayor S., Pagano R.E. (2007); *Pathways of clathrin-independent endocytosis;* Nat Rev Mol Cell Biol; 8 (8): 603-12.

Mercer J., Helenius A. (2009); Virus entry by macropinocytosis; Nat Cell Biol; 11 (5): 510-20.

Minsky M. (1957); Microscopy Apparatus; US-Patent; 3013467; USA.

Minsky M. (1988); *Memoir on inventing the confocal scanning microscope;* Scanning; 10 128–38.

Mislick K.A., Baldeschwieler J.D. (1996); *Evidence for the role of proteoglycans in cationmediated gene transfer;* Proc Natl Acad Sci U S A; 93 (22): 12349-54.

Mounkes L.C., Zhong W., Cipres-Palacin G., Heath T.D., Debs R.J. (1998); *Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo;* J Biol Chem; 273 (40): 26164-70.

Mülhardt C. (2003); *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics;* Spektrum Akademischer Verlag;

Nabel G.J., Nabel E.G., Yang Z.Y., Fox B.A., Plautz G.E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D., Chang A.E. (1993); *Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans;* Proc Natl Acad Sci U S A; 90 (23): 11307-11.

Nichols B. (2003); *Caveosomes and endocytosis of lipid rafts;* J Cell Sci; 116 (Pt 23): 4707-14.

Opalinska J.B., Gewirtz A.M. (2002); *Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications;* Nat Rev Drug Discov; 1 (7): 503-14.

Ostrowsky N. (1993); *Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy;* Chemistry and physics of lipids; 64 45-56.

Paddock S.W. (1999); *Confocal laser scanning microscopy*; Biotechniques; 27 (5): 992-6, 98-1002, 04.

Parton R.G., Howes M.T. (2010); *Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome;* J Cell Biol; 191 (3): 439-41.

Parton R.G., Joggerst B., Simons K. (1994); *Regulated internalization of caveolae;* J Cell Biol; 127 (5): 1199-215.

Parton R.G., Simons K. (2007); *The multiple faces of caveolae;* Nat Rev Mol Cell Biol; 8 (3): 185-94.

Paschal B.M. (2002); *Translocation through the nuclear pore complex;* Trends Biochem Sci; 27 (12): 593-6.

Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A. (2001); *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER;* Nat Cell Biol; 3 (5): 473-83.

Pouton C.W., Seymour L.W. (2001); *Key issues in non-viral gene delivery;* Adv Drug Deliv Rev; 46 (1-3): 187-203.

Pucadyil T.J., Schmid S.L. (2009); Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation; Science; 325 (5945): 1217-20.

Puri V., Watanabe R., Singh R.D., Dominguez M., Brown J.C., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E. (2001); *Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways;* J Cell Biol; 154 (3): 535-47.

Rao N.M., Gopal V. (2006); *Cell biological and biophysical aspects of lipid-mediated gene delivery;* Biosci Rep; 26 (4): 301-24.

Rappoport J.Z. (2008); *Focusing on clathrin-mediated endocytosis;* Biochem J; 412 (3): 415-23.

Rejman J., Bragonzi A., Conese M. (2005); *Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes;* Mol Ther; 12 (3): 468-74.

Rejman J., Conese M., Hoekstra D. (2006); *Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis;* J Liposome Res; 16 (3): 237-47.

Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. (2004); *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis;* Biochem J; 377 (Pt 1): 159-69.

Rodal S.K., Skretting G., Garred O., Vilhardt F., van Deurs B., Sandvig K. (1999); *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles;* Mol Biol Cell; 10 (4): 961-74.

Ruponen M., Arkko S., Urtti A., Reinisalo M., Ranta V.P. (2009); *Intracellular DNA release* and elimination correlate poorly with transgene expression after non-viral transfection; J Control Release; 136 (3): 226-31.

Sabharanjak S., Sharma P., Parton R.G., Mayor S. (2002); *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway*; Dev Cell; 2 (4): 411-23.

Sahay G., Alakhova D.Y., Kabanov A.V. (2010); *Endocytosis of nanomedicines;* J Control Release; 145 (3): 182-95.

Sakurai F., Inoue R., Nishino Y., Okuda A., Matsumoto O., Taga T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M. (2000); *Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression;* J Control Release; 66 (2-3): 255-69.

Schneider S. (2010); Herstellung, zelluläre Prozessierung und Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme; Dissertation; Universität Freiburg.

Schneider S., Lenz D., Holzer M., Palme K., Suss R. (2010); *Intracellular FRET analysis of lipid/DNA complexes using flow cytometry and fluorescence imaging techniques;* J Control Release; 145 (3): 289-96.

Schneider S., Süss R. (2010); *Spectral bio-imaging and confocal imaging of the intracellular distribution of lipoplexes;* Methods Mol Biol; 606 457-67.

Schnitzer J.E., Oh P., Pinney E., Allard J. (1994); *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules;* J Cell Biol; 127 (5): 1217-32.

Sharma D.K., Brown J.C., Choudhury A., Peterson T.E., Holicky E., Marks D.L., Simari R., Parton R.G., Pagano R.E. (2004); *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol;* Mol Biol Cell; 15 (7): 3114-22.

Sharma D.K., Choudhury A., Singh R.D., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E. (2003); *Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling;* J Biol Chem; 278 (9): 7564-72.

Shimomura O. (2005); *The discovery of aequorin and green fluorescent protein;* J Microsc; 217 (Pt 1): 1-15.

Simberg D., Danino D., Talmon Y., Minsky A., Ferrari M.E., Wheeler C.J., Barenholz Y. (2001); *Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. Relevance to optimal transfection activity;* J Biol Chem; 276 (50): 47453-9.

Simoes S., Slepushkin V., Pires P., Gaspar R., de Lima M.P., Duzgunes N. (1999); *Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides;* Gene Ther; 6 (11): 1798-807.

Simon R.H., Engelhardt J.F., Yang Y., Zepeda M., Weber-Pendleton S., Grossman M., Wilson J.M. (1993); *Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study;* Hum Gene Ther; 4 (6): 771-80.

Singh R.D., Puri V., Valiyaveettil J.T., Marks D.L., Bittman R., Pagano R.E. (2003); *Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids;* Mol Biol Cell; 14 (8): 3254-65.

Slattum P.S., Loomis A.G., Machnik K.J., Watt M.A., Duzeski J.L., Budker V.G., Wolff J.A., Hagstrom J.E. (2003); *Efficient in vitro and in vivo expression of covalently modified plasmid DNA;* Mol Ther; 8 (2): 255-63.

Stelzer E.H.K., Merdes, A. and De Mey, J. (1991); *Konfokale Fluoreszenzmikroskopie in der Zellbiologie;* Biologie in unserer Zeit; 21 19–25.

Subtil A., Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M.A., Keen J.H., McGraw T.E. (1999); *Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding;* Proc Natl Acad Sci U S A; 96 (12): 6775-80.

Sujata B. Iyer J.E.B., Barnaby Abrams, Vernon C. Maino, Anthony J. Ward, Todd P. Christian, Kenneth A. Davis (1997); *QuantiBRITE - A New Standard for Fluorescence Quantitation;* BD Biosciences, Vol. Part No. 23-3496-00;

Swanson J.A. (2008); *Shaping cups into phagosomes and macropinosomes;* Nat Rev Mol Cell Biol; 9 (8): 639-49.

Swetha M.G., Sriram V., Krishnan K.S., Oorschot V.M., Ten Brink C., Klumperman J., Mayor S. (2011); *Lysosomal membrane protein composition, acidic pH and sterol content are regulated via a Light-dependent pathway in metazoan cells;* Traffic; 12 (8): 1037-55.

Symens N., Soenen S.J., Rejman J., Braeckmans K., De Smedt S.C., Remaut K. (2012); *Intracellular partitioning of cell organelles and extraneous nanoparticles during mitosis;* Adv Drug Deliv Rev; 64 (1): 78-94.

Thomsen P., Roepstorff K., Stahlhut M., van Deurs B. (2002); *Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking;* Mol Biol Cell; 13 (1): 238-50.

Torchilin V.P., Levchenko T.S., Rammohan R., Volodina N., Papahadjopoulos-Sternberg B., D'Souza G.G. (2003); *Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes;* Proc Natl Acad Sci U S A; 100 (4): 1972-7.

van der Aa M.A., Mastrobattista E., Oosting R.S., Hennink W.E., Koning G.A., Crommelin D.J. (2006); *The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery;* Pharm Res; 23 (3): 447-59.

Vercauteren D., Rejman J., Martens T.F., Demeester J., De Smedt S.C., Braeckmans K. (2012); On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods; J Control Release; 161 (2): 566-81.

Vercauteren D., Vandenbroucke R.E., Jones A.T., Rejman J., Demeester J., De Smedt S.C., Sanders N.N., Braeckmans K. (2010); *The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls;* Mol Ther; 18 (3): 561-609.

Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G. (1993); *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation;* J Cell Biol; 123 (5): 1107-17.

Weng A., Bachran C., Fuchs H., Krause E., Stephanowitz H., Melzig M.F. (2009); *Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins--more than stimulation of endocytosis;* Chem Biol Interact; 181 (3): 424-9.

Werner G., Hagenmaier H., Drautz H., Baumgartner A., Zahner H. (1984); *Metabolic products of microorganisms.* 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. *Production, isolation, chemical structure and biological activity;* J Antibiot (Tokyo); 37 (2): 110-7.

Wong A.W., Scales S.J., Reilly D.E. (2007); *DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus;* J Biol Chem; 282 (31): 22953-63.

Xu Y., Szoka F.C., Jr. (1996); *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection;* Biochemistry; 35 (18): 5616-23.

Yoshimori T., Yamamoto A., Moriyama Y., Futai M., Tashiro Y. (1991); *Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type* H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells; J Biol Chem; 266 (26): 17707-12.

Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A., Welsh M.J. (1995); *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid;* J Biol Chem; 270 (32): 18997-9007.

Zanta M.A., Belguise-Valladier P., Behr J.P. (1999); Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus; Proc Natl Acad Sci U S A; 96 (1): 91-6.

Zelphati O., Liang X., Hobart P., Felgner P.L. (1999); *Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA;* Hum Gene Ther; 10 (1): 15-24.

Zhang S., Zhao Y., Zhao B., Wang B. (2010); *Hybrids of nonviral vectors for gene delivery;* Bioconjug Chem; 21 (6): 1003-9.

Zuhorn I.S., Engberts J.B., Hoekstra D. (2007); *Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers;* Eur Biophys J; 36 (4-5): 349-62.

Zuhorn I.S., Kalicharan R., Hoekstra D. (2002); *Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis;* J Biol Chem; 277 (20): 18021-8.

Zuidam N.J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y. (1999); *Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection efficiency;* Biochim Biophys Acta; 1419 (2): 207-20.