

Liposomale Transfektionsstrategien zum Gentransfer in Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Veronika Hasse
aus Velbert

Düsseldorf, 2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Schrader

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C.P. Hollenberg

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung	5
2.1 Gefäßaufbau	5
2.2 Funktionen des Endothels	5
2.3 Molekularbiologische Ansätze zur Erforschung der Endothelzellfunktion	8
2.3.1 Virale Transfektionssysteme	9
2.3.2. Nicht-virale Vektoren	10
2.3.2.1. Liposomen	10
2.3.2.2. Transfektion mit kationischen Peptiden	13
2.3.2.3. Zielgerichtete Transfektion	13
3. Aufgabenstellung	15
4. Material und Methoden	16
4.1. Materialien	16
4.1.1. Chemikalien	16
4.1.2. Enzyme	16
4.1.3. Antikörper	16
4.1.4. Plasmide	17
4.1.5. Kits	17
4.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden	17
4.2.1. Präparation von DNA	18
4.2.1.1. Mini-Präparation	18
4.2.1.2. Maxi-Präparation	18
4.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	18

4.2.3. Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmid-DNA	18
4.2.4. Klonierung des Marburg-Glykoproteines	19
4.2.4.1. Klonierung in den Expressionsvektor pMT2	19
4.2.4.2. Klonierung in das Plasmid pSinRep5	19
4.2.5. Arbeiten mit RNA	20
4.2.5.1 <i>In vitro</i> Transkription	20
4.2.5.2. Denaturierende Agarosegele	20
4.3. Bakterienkultivierung	20
4.3.1. Stamm	20
4.3.2. Medien für die Bakterienkultivierung	21
4.3.3. Herstellung kompetenter Zellen	21
4.3.4. Transformation kompetenter Zellen	22
4.4. Zellbiologische Methoden	22
4.4.1. Zelllinien	22
4.4.2. Primäre Zellen	22
4.4.3. Zellkulturmedien	22
4.4.4. Transfektion von COS-7-Zellen für die Expression des Marburg-Glykoproteins	23
4.4.5. Transfektion von BHK-21-Zellen mit mRNA	23
4.4.6. Transfektion mit kationischen Liposomen	24
4.4.7. Transfektionen mit Peptid/DNA-Komplexen	24
4.4.8. Transfektionen mit Peptid/DNA/Liposomen-Komplexen	25
4.4.9. Transfektionen mit Sendai-Virosomen	25
4.4.10. Analyse der iNOS-Genexpression	26
4.4.11. β -Galaktosidasefärbung	26
4.5. SDS-Gele	27
4.6. Western-Blot-Analyse	27
4.7. Proteinbestimmung	28
4.8. Arbeiten mit <i>Sendai Viren</i>	28
4.8.1 Anzucht der <i>Sendai Viren</i>	28
4.8.2. Präparation der Sendai-Virosomen	29
4.8.3. Fusionstest mit Fluoreszenz markierten Liposomen	30
4.9. Arbeiten mit kationischen Peptiden	30

4.9.1. Peptidsynthesen	30
4.9.2. Abspaltung der synthetisierten Peptide vom Syntheseharz	31
4.9.3. Chromatographische Aufreinigung der Peptide	31
4.9.4. Lyophyllisierung der Peptide	32
4.9.5. Retardationsassay	32
4.9.6. DNaseI- Schutzexperiment	32
4.9.7. Ethidiumbromidverdrängung	33
4.9.8. Elektronenmikroskopie	33
5. Ergebnisse	34
5.1. Transfektion von PAEC mit kationischen Liposomen	34
5.2. Transfektion mit rekonstituierten Virosomen	35
5.2.1. Expression des Marburg-Glykoproteines	35
5.2.1.1. Expression in COS-7-Zellen	35
5.2.1.2. Expression in BHK-21-Zellen	37
5.2.2. Sendai-Virosomen	39
5.2.2.1. Aufreinigung der Sendai-Virus-Proteine F und HN und Rekonstitution in Virosomen	39
5.2.2.2. Fusionstest der rekonstituierten Virosomen	41
5.2.2.3. Transfektion mit Sendai-Virosomen	42
5.3. Kationische Peptide	43
5.3.1. Synthese DNA-kondensierender Peptide	43
5.3.2. Synthese Endothel-bindender Peptide	46
5.3.3. Charakterisierung der DNA/Peptid-Komplexe	47
5.3.3.1. Retardation im Agarosegel	47
5.3.3.2. Ethidiumbromidverdrängung	50
5.3.3.3. Elektronenmikroskopie der DNA/Peptid-Komplexe	54
5.3.3.4. DNase-Schutz der DNA/Peptid-Komplexe	55
5.3.4. Transfektion mit kationischen Peptiden	58
5.3.5. Transfektion mit PAEC-bindenden Peptiden	61
5.3.6. Zytotoxizität der Peptid/DNA-Komplexe	62
5.4. Transfektionen mit Peptiden und kationischen Liposomen	63

6. Diskussion	65
6.1. Problemstellung	65
6.2. Transfektion von Endothelzellen mit kationischen Liposomen	65
6.3. Transfektion von Endothelzellen mit Virosomen	66
6.4. Kationische Peptide	70
6.5. Ausblick	74
7. Zusammenfassung	77
8. Anhang	79
8.1. Literatur	79
8.2. Plasmidkarten	98
8.3. Eidesstattliche Erklärung	101
8.4. Danksagung	102

2. Einleitung

2.1. Gefäßaufbau

Alle größeren Blutgefäße zeigen einen im Prinzip ähnlichen Aufbau: die *Tunica interna* (oder Intima) besteht aus einer einzelligen Schicht, dem Endothel, das die luminale Oberfläche der Gefäße auskleidet, einer dünnen Bindegewebsschicht, dem *Stratum subendotheliale* und der *Membrana elastica interna*, die die Grenze zur *Tunica media* (Media) bildet. Die Media besteht aus einer Schicht glatter Muskelzellen (SMC = smooth muscle cells, die in eine Matrix aus Kollagen, Elastin und Proteoglycanen eingelagert sind. Die Muskelzellen der Media können sich in einen kontraktilen (k-Myozyt) oder einen metabolischen (m-Myozyt) Phänotyp differenzieren. In größeren Gefäßen schließt sich an die Media eine *Membrana elastica externa* an, die die Grenze zur *Tunica externa* (Adventitia) bildet. Die *Tunica externa* besteht aus elastischem Bindegewebe, in das kleinere Blutgefäße eingelagert sind (Überblick bei Junqueira und Carneiro, 1991).

2.2. Funktionen des Endothels

Durch seine Lokalisation im Gefäß kommen dem Endothel zahlreiche Schlüsselfunktionen zu, da es sowohl das Zielgewebe physiologischer Signale aus dem Blutraum darstellt, als auch durch die Sekretion zahlreicher Stoffe an der Regulation der Hämostase, der Angiogenese und des Blutgefäßtonus durch ihren Einfluß auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur teilnimmt (Überblick bei Pearson, 1999). Die Aufgaben des Endothels bei der Hämostase können unter vier Aspekten zusammengefaßt werden: die Produktion von Komponenten der Blutgerinnungskaskade, die Regulation der Fibrinolyse, die Hemmung gerinnungsfördernder Proteine und die Produktion von Faktoren, die die Plättchenaggregation regulieren. Das Endothel produziert und sezerniert die Blutgerinnungsfaktoren V und VIII sowie das Gewebethromboplastin (Faktor III), das als Teil der extravaskulären Blutgerinnungskaskade den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert. Dieser wiederum aktiviert den Faktor X, der zusammen mit dem Faktor V und Ca^{2+} -Ionen die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin bewirkt und damit die Blutgerinnung

einleitet (Überblick bei Nordt und Bode, 2000; Sagripanti und Carpi, 2000). Die entgegengesetzte Reaktion, die Fibrinolyse, wird durch die Bildung von Plasmin aus einem Vorläuferprotein, dem Plasminogen, eingeleitet. Sowohl die urokinaseartigen Plasminogen-Aktivatoren (uPA) als auch die Gewebsaktivatoren (tPA) werden von Endothelzellen sezerniert (van Hinsberg et al., 1988; Newby et al., 1999). Zudem kann die Spaltung von Plasminogen durch einen Plasminogen-Aktivator leichter erfolgen, wenn Plasminogen an die Oberfläche von Endothelzellen gebunden ist. Außer den Plasminogen-Aktivatoren können Endothelzellen auch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) freisetzen (Loskutoff et al., 1989; Dosne et al., 1978). Auf der Oberfläche des Endothels steigern geringe Mengen Heparinsulfat die Aktivität des Antithrombin-III und des Lipoprotein-assoziierten Koagulations-Inhibitors (LACI) (Broze et al., 1990). LACI, das durch das Endothel sezerniert wird, bildet mit Apolipoprotein A-II einen Komplex, der inhibitorisch auf den Blutgerinnungsfaktor Xa wirkt.

Auch an der Thrombosebildung und -inhibition sind Endothelzellen regulierend beteiligt: sie sezernieren antithrombogene Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder das Prostacyclin (PGI₂). Auch das prothrombotische Thromboxan A₂ wird zum Teil von Endothelzellen sezerniert. Im physiologischen Zustand befinden sich antithrombotische und prothrombotische Substanzen im Gleichgewicht. Eine verringerte NO-Freisetzung führt zu einer Aktivierung von Plättchen und thrombogenen Proteinen wie des Gewebefaktors und des PDGF (platelet derived growth factor) (Überblick bei de Meyer et al., 1997).

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels liegt in der Regulation des vaskulären Tonus. Endothelzellen synthetisieren chemische Transmittersubstanzen, die zum einen zu einer Relaxation der benachbarten glatten Muskulatur führen, wie das bereits erwähnte Stickstoffmonoxid, EDHF (endothelium derived hyperpolarization factor) und die Prostanoiden (Furchgott et al., 1980; Beny et al., 1991; Bunting et al., 1976). Aber auch kontraktile Substanzen wie Thromboxan A₂, Endothelin oder EDCF (endothelium derived contracting factor) (Shimamoto et al., 1978; Suzuki et al., 1991; Masaki et al., 1991; Shirahase, H. et al., 1988) werden vom Endothel sezerniert. Das auf der Endothelzelloberfläche lokalisierte „Angiotensin-Converting-Enzyme“ (ACE) (Stock et al., 1995) bildet aus Angiotensin-I das kontraktile aktive Angiotensin-II, so daß durch das Zusammenspiel von relaxierenden und kontrahierenden Substanzen, die durch die Endothelzellen sezerniert werden, ein bestimmter Gefäßtonus eingestellt und

aufrechterhalten wird. Einer der vom Endothel produzierten Mediatoren, das Stickstoffmonoxid, und die NO-vermittelte Vasodilatation sollen hier genauer dargestellt werden: Endothelzellen produzieren in Antwort auf Stimuli wie Bradykinin oder Acetylcholin vermehrt NO (Furchgott et al., 1980), das in den darunterliegenden SMCs die lösliche Guanylatzyklase stimuliert. Durch die vermehrte Produktion von cGMP werden cGMP-abhängige Ca^{2+} -Transporter stimuliert, so daß Ca^{2+} vermehrt aus der Zelle transportiert wird. Dies führt zu einer geringeren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die in einer Relaxation der glatten Muskulatur resultiert. (Review: Milbourne und Bygrave, 1995; Kerwin et al., 1995). Bei einer verringerten endothelialen NO-Produktion beobachtet man bei Gabe von Acetylcholin keine Vasodilatation (Ludmer et al., 1986; Werns et al., 1989). Böger und Panza konnten zeigen, daß die NO-vermittelte Vasodilatation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Böger et al., 1997) und bei Patienten mit chronischer Hypertonie (Panza et al., 1990) vermindert ist.

Ein weiteres Krankheitsbild, an dem eine verringerte endotheliale NO-Produktion wesentlich beteiligt ist, ist die Arteriosklerose. Bei ihrer Entstehung wird im Kaninchenmodell ein Verlust der NO-vermittelten Vasodilatation beobachtet, bevor histologische Veränderungen in der Gefäßwand auftreten (Lloyd-Jones et al., 1996; Anderson et al., 1995; Kolodgie et al., 1990; Mc Lenachan, 1991). Die Sensitivität der glatten Gefäßmuskelzellen für NO ist unverändert (Verbeuren et al., 1986), was auf eine Störung der NO-Produktion durch das Endothel schließen läßt (Review: Vogel, R.A., 1997).

Auch die periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK) wird wahrscheinlich durch eine endotheliale Dysfunktion ausgelöst. Durch einen langsamen Verschuß peripherer Gefäße werden die Extremitäten schlecht durchblutet, so daß die betroffenen Patienten über Belastungs-induzierte Schmerzen klagen (Überblick bei Pentecost et al., 1994). Bei diesen Patienten wurden erhöhte Thrombomodulinspiegel als Hinweis auf eine gestörte Endothelfunktion gemessen (Vita et al., 1990). Außerdem kann ein endothelialer Gendefekt zu Störungen der Blutgerinnung oder zu einer gestörten Regulation des vaskulären Tonus führen.

Neben einer gestörten endothelialen Sekretion kann auch eine veränderte Gefäßwandoberfläche der Auslöser kardiovaskulärer Erkrankungen sein. Diese Oberflächenveränderung kann verschiedene Ursachen haben. Ein Beispiel für eine mechanisch erzeugte Läsion ist die Denudation des Endothels als Folge einer

Ballonangioplastie (PTCA = perkutane transluminale Koronarangioplastie). Diese wird bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder peripherer arterieller Verschlusskrankung angewendet, wobei das Endothel im behandelten Gefäßabschnitt häufig durch den verwendeten Ballonkatheter zerstört wird. Aufgrund der denudierten Gefäßwand werden Plättchen durch die Bindung an freigelegtes Kollagen oder den von-Willebrand-Faktor aktiviert und aggregieren verstärkt (Förstermann et al., 1989; Radomski et al., 1990; Stamler et al., 1989). Glatte Gefäßmuskelzellen werden durch die veränderte Gefäßwandoberfläche und durch die Aktivierung von Plättchen (PDGF) zur Proliferation angeregt (Überblick bei Shirotani et al., 1993; Libby et al., 1997; Bauters, C. und Isner, J.M., 1997). Zusätzlich wirkt der Verlust der endothelialen NO-Produktion proliferationsfördernd (Garg, U.C. und Hassid, A., 1989). Durch die Migration der SMC aus der Media und einer verstärkten Teilung wird in ca 30-40% der Fälle innerhalb der ersten Wochen nach der Angioplastie eine Neointima gebildet: das Gefäßlumen wird deutlich verkleinert und eine erneuten Okklusion des Gefäßes, die Restenose, entsteht.

2.3. Molekularbiologische Ansätze zur Erforschung der Endothelzellfunktion

Um die Entstehungsmechanismen der beschriebenen kardiovaskulären Erkrankungen besser verstehen bzw. gentherapeutisch eingreifen zu können, ist es für die Grundlagenforschung von großer Bedeutung, endotheliale Gene in der Endothel-Zellkultur zu exprimieren bzw. durch Antisense-Oligonukleotide die Translation bestimmter Gene zu steuern. Dafür ist eine effiziente Transfektion von Endothelzellen unerlässlich. Für eine mögliche Gentherapie entstehender oder bereits existenter kardiovaskulärer Erkrankungen muß das Endothel als mögliches Target auch *in vivo* effizient genetisch verändert werden können.

Eukaryontische Zellen besitzen einen natürlichen Schutz gegen das ungewollte Eindringen fremder DNA in ihren Zellkern. Die Plasmamembran der Zelle stellt eine mechanische Barriere für die Aufnahme großer geladener Moleküle, also auch von DNA-Molekülen, dar. Diese können dennoch über die Plasmamembran durch Endozytose aufgenommen werden und gelangen ins Endosom, wo sie durch zelleigene DNAsen fast vollständig degradiert werden. Diese Schutzmechanismen der Zelle müssen umgangen werden, das heißt, die Aufnahme der DNA ins Zellinnere muß erleichtert und die Degradation im

Endosom verhindert werden, um Zellen effizient zu transfizieren. Zudem wird DNA, die im Zytoplasma vorliegt, nur schlecht in den Zellkern transportiert. Dieser Transport kann aber durch Zellkernproteine (die ein nukleäres Targetsignal tragen) erleichtert werden (Kaneda et al., 1997). Für eine mögliche Anwendung der Transfektionsmethode *in vivo* im Hinblick auf eine mögliche Gentherapie wäre neben der hohen Transfektionseffizienz eine geringe Zytotoxizität erstrebenswert. Transfektionsmethoden wie die DEAE-Dextran-Transfektion, die CaPO₄-Transfektion und die Elektroporation, die bei anderen Zelltypen hohe Transfektionseffizienzen erzielen, führen bei *in vitro* Transfektionen zu weniger als 1% transfizierter primärer Endothelzellen (HUVECs) bzw. 2% transfizierter Zellen einer endothelialen Zelllinie (Ea.hy926) (Schwachtgen et al., 1994; Teifel et al., 1997). Alternative Transfektionsmethoden wie die virale Transfektion, Virosomen, kationische Peptide oder kationische Liposomen sind bislang wenig für die Endothelzell-Transfektion angewendet worden (Nathwani et al., 1994).

2.3.1. Virale Transfektionssysteme

Virale Transfektionssysteme nutzen die Eigenschaften viraler Oberflächenproteine, die dem Virus zur Adsorption und Fusion mit der Wirtszelle dienen, aus: so kann eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden, da die DNA durch gezielte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran (oder Endosomenmembran) in die Targetzelle eingeschleust wird. Bislang ist nichts über die Effizienz dieser Methode in bezug auf die Transfektion von Endothelzellen bekannt. Finkel et al. berichten bei der Verwendung adenoviraler Vektoren von 70% transfizierten glatten Muskelzellen (aus der Ratte) *in vitro* und von 25-75% *in vivo* (Finkel, T. und Epstein, S.E., 1995).

Für rekombinante Adenoviren der ersten und zweiten Generation, die noch virale Strukturproteingene tragen, besteht das Risiko einer Rekombination mit dem Wirtsgenom. Zudem sind im Tiermodell nach der Infektion mit replikationsdefekten Adenoviren Reaktionen des Immunsystems auf transfizierte Zellen und lokale Entzündungsprozesse beobachtet worden (Byrnes et al., 1995). Eine Weiterentwicklung dieser Vektoren stellen die adenoviralen Vektoren der dritten Generation dar. Diese tragen keine Protein-kodierenden Sequenzen mehr und können bis zu 37kb fremder DNA aufnehmen (Überblick bei Kochanek, S., 1999).

Retrovirale Vektoren wurden zu Beginn der 80er Jahre entwickelt. Sie enthalten nur Teile des retroviralen Genoms und können daher alleine keine Virushüllproteine und infektiöse Partikel bilden. Sie müssen wie adenovirale Pseudovirionen mit Hilfe von Verpackungszelllinien vermehrt werden. Um eine stabile Expression des Transgens zu gewährleisten, müssen sie sich ins Genom der teilenden Zellen integrieren und können von dort erneut mobilisiert werden. Da sie ein mitotisch aktives Gewebe benötigen, sind sie für die Transfektion von differenziertem Endothel nicht geeignet (Miller et al., 1990). Auch retrovirale Transfektionsvektoren sind in der Größe der zu transfizierenden DNA limitiert und können maximal 10kb fremder DNA aufnehmen.

2.3.2. Nicht-virale Vektoren

2.3.2.1. Liposomen

Liposomen lassen sich je nach Nettoladung der Lipide in neutrale, anionische oder kationische Liposomen unterteilen. Neutrale Liposomen bestehen aus einer Phospholipidhülle, die einer biologischen Membran sehr ähnlich ist. In der wässrigen Phase im Inneren der Liposomen können sowohl Pharmaka als auch DNA oder RNA gelöst werden (Gregoriadis et al., 1996). Die Synthese der Liposomen und die DNA-Inkorporation kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, z.B. durch Ultraschallbehandlung, mit Hilfe eines Detergenz oder durch „*Reversed Phase Evaporation*“. Bei der letzteren Methode werden die Lipide zunächst in einem flüchtigen Lösungsmittel (meist Ether) gelöst, die wässrige Phase wird danach hinzugefügt. Das flüchtige Lösungsmittel wird dann unter Vakuum langsam entfernt, wobei sich spontan Liposomen bilden (Szoka Jr., F., 1980).

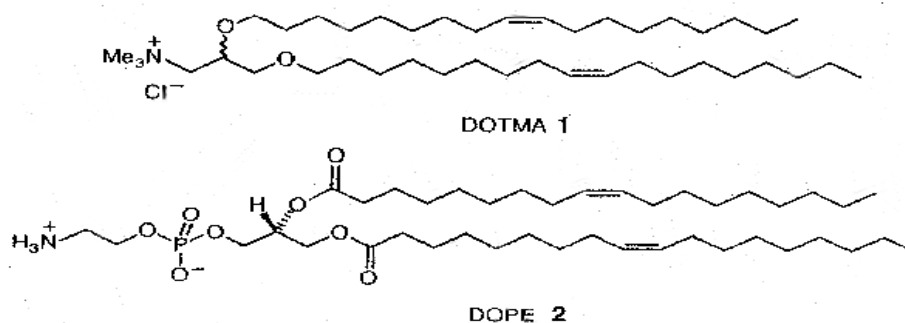


Abb.1: Als Beispiel eines kationischen Liposoms ist die chemische Struktur von Lipofectamin dargestellt, einer 1:1 Formulierung aus DOTMA1 und DOPE2.

Kationische Liposomen bestehen meist aus einem Gemisch eines Lipides mit hydrophobem und kationischem Anteil, dem sogenannten Cytofectin und einem neutralen Lipid (Review: Miller, A. D., 1998). Das kationische Lipid Lipfectamin zum Beispiel besteht aus einer 1:1 Formulierung des Cytofectins DOTMA1 und des Lipids DOPE2 (Abb.1).

In wässriger Phase bilden diese Liposomen micellare Strukturen, die an ihrer Oberfläche positiv geladen sind. Gibt man negativ geladene DNA hinzu, bindet sie an die positiv geladene Oberfläche der Liposomen, wird neutralisiert und kann zusammen mit den kationischen Liposomen durch Endozytose aufgenommen werden (Wrobel, I. und Collins, D., 1995). Diesen Komplex aus DNA und kationischem Liposom bezeichnet man als Lipoplex (Felgner et al., 1997). Der genaue Mechanismus der DNA-Freisetzung und ihr Transport in den Zellkern sind noch ungeklärt. Takeshita et al. benutzten bereits 1994 einen kationischen Lipoplex, um isolierte aortale Gefäße zu transfizieren (Takeshita et al., 1994). Mit dem benutzten kationischen Lipid, Lipofectamin, wurden jedoch nur geringe Transfektionseffizienzen an nicht denudierten im Vergleich zu denudierten Aorten beobachtet, was auf eine gute Transfektionseffizienz dieses kationischen Liposoms bei SMC im Vergleich zu Endothelzellen hindeutet. Die Effizienz anderer kationischer Liposomen in bezug auf eine endotheliale Transfektion wurde bislang nicht getestet.

Unter Virosomen versteht man Liposomen, die in ihrer Hülle virale Oberflächenproteine tragen. Dadurch sollen ähnlich wie bei den viralen Transfektionssystemen die zellspezifische Adsorption und die Fusion mit den Zielzellen erleichtert und damit die Transfektionseffizienz erhöht werden. Durch die Verpackung der DNA ins Innere der Virosomen können DNA-Fragmente bis zu einer Größe von etwa 40kb in die Targetzellen eingebracht werden. Nachfolgend werden das *Marburg Virus* und das *Sendai Virus* als potentielle Donoren viraler Oberflächenproteine für die Rekonstitution von Virosomen kurz vorgestellt.

Das *Marburg Virus* gehört zur Familie der Filoviren, besitzt ein ca. 19kb großes RNA-Genom und trägt auf seiner Oberfläche nur ein einziges Protein, das GP (Glycoprotein) heißt (Feldmann et al., 1992; Will et al., 1993; Review: Fields et al., 1996). Das Glykoprotein des *Marburg Virus* ist ein Typ1-Transmembranprotein, das als Homotrimer in der Virusmembran lokalisiert ist (Feldmann et al., 1991). Deglykosyliert hat es ein apparentes Molekulargewicht von 75kDa, glykosyliert etwa 170kDa. Das *Marburg Virus* zeigt eine hohe Humanpathogenität: es verursacht nach ersten, erkältungsähnlichen

Symptomen ein hämorrhagisches Fieber, das innerhalb von zehn Tagen nach Infektion bei ca. 30% der Patienten zum Tod führt (Feldmann et al., 1993; Peters et al., 1994). Das Oberflächenprotein GP muß, da es das einzige Protein auf der Virushülle ist, sowohl für die Adsorption an die Zelle als auch für die Fusion mit der Zelle verantwortlich sein. Schnittler et al. konnten 1993 zeigen, daß das *Marburg Virus* humane Endothelzellen infizieren und sich in diesen vermehren kann (Schnittler et al., 1993). Das spricht dafür, daß auch rekonstituierte Virosomen mit dem Marburg-Glykoprotein in der Lage sein sollten, an Endothelzellen zu binden und mit diesen zu fusionieren.

Das *Sendai Virus*, auch HVJ (hämagglutinierendes Virus aus Japan) gehört zu der Familie der Paramyxoviren, ist mit dem Influenzavirus verwandt, zeigt aber im Gegensatz zu diesem keine Humanpathogenität (Fields et al., 1996; Modrow et al., 1997), weshalb die Virusproteine aus intakten Virionen isoliert werden können. Für die Fusion mit der Plasmamembran sind die beiden Virusproteine F (Fusionsprotein) und HN (Hämagglutinin/Neuraminidase) verantwortlich (Überblick bei Lamb, R. A., 1993). Abb.2 gibt einen möglichen Mechanismus der Virusfusion mit der Plasmamembran der Zelle wieder.

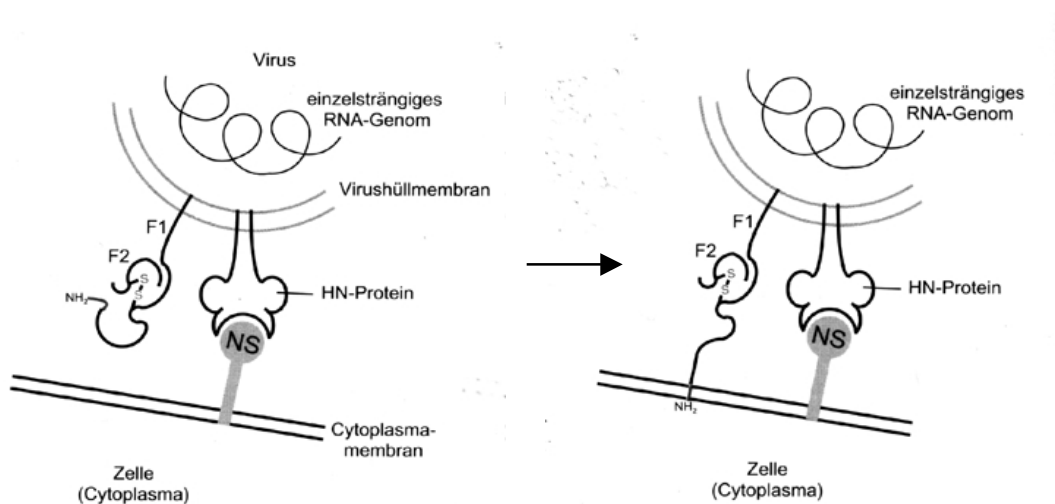


Abb.2: Schema der Fusion von Sendai Viren mit der Plasmamembran von Zellen. (Abbildung aus Modrow, S. und Falke, D., 1997).

Diesem Mechanismus zufolge bindet das Virus mit dem HN-Protein an einen Sialinsäurerest eines Oberflächenrezeptors. Das F₁-Protein vermittelt eine Fusion mit der Targetzelle, das heißt die beiden Proteine F und HN sind ausreichend, um eine Fusion des

Virus mit der Zielzelle zu vermitteln. Die Sendai-Virionen werden üblicherweise in bebrüteten Hühnereiern angezogen (Kaneda et al., 1989). Die Virushülle kann mit einem Detergenz solubilisiert und das Nukleocapsid abgetrennt werden. Nach der Zugabe von DNA zu der Proteinlösung, die die beiden Virusproteine F und HN enthält, können Virosomen rekonstituiert werden. Bislang wurden mehrere Methoden beschrieben, Sendai Viren mit Hilfe von Detergenzien aufzuschließen, die Virusproteine F und HN aufzureinigen und in Virosomen zu rekonstituieren (Volsky et al., 1978; Hsu et al., 1979). Diese rekonstituierten Virosomen fusionieren gut mit HepG2-Zellen und Erythrozytenmembranen (Bagai et al., 1993b; Chejanovsky et al., 1985). Es gibt Hinweise darauf, daß das F-Protein ausreicht, um eine Fusion zu vermitteln (Tomasi, M. und Loyer, A., 1981). Im Widerspruch dazu wurde jedoch auch beobachtet, daß das F-Protein alleine keine Fusion vermittelt (Hsu et al., 1979; Bagai et al., 1994b). Das HN-Protein hingegen kann auch ohne F-Protein Fusionen bei sauren pH vermitteln (Chejanovsky et al., 1986).

2.3.2.2. Transfektion mit kationischen Peptiden

Kationische Peptide sind aufgrund ihrer positiven Ladung wie kationische Lipide in der Lage, elektrostatische Wechselwirkungen mit DNA einzugehen und Komplexe mit dieser zu bilden. So zeigten Gosule und Schellman, daß Polyamine wie z.B. Putrescin oder Spermidin DNA effizient binden und kondensieren (Gosule, L.C. und Schellman, J.A., 1978). Andere Proteine wie das Histon H1 können ebenfalls dazu benutzt werden, DNA zu kondensieren. Mit diesen Komplexen konnten bereits Fibroblasten (NIH-3T3) und Nierenzellen (COS-7) transfiziert werden (Fritz et al., 1996).

2.3.2.3. Zielgerichtete Transfektion

Alle bisher vorgestellten Methoden weisen keine Zellspezifität auf, die im Hinblick auf eine mögliche gentherapeutische Anwendung der Methode wünschenswert wäre (Review: Perales et al., 1994). Zelltypspezifisch exprimierte Oberflächenproteine können zur Synthese zelltypspezifischer Antikörper benutzt werden. Diese können an DNA-haltige Liposomen gekoppelt werden, so daß man sogenannte Immunoliposomen erhält (Review:

Martin et al., 1981; Martin, F.J. und Papahadjopoulos, D., 1982). So synthetisierten Park et al. Immunoliposomen, die einen tumorspezifischen Antikörper trugen und selektiv an Tumorzellen *in vitro* banden (Park et al., 1995). Auch Nässander et al. benutzten Antikörper gegen Zellen eines menschlichen Ovarkarzinoms (OVCAR-4), um eine zelltypspezifische Bindung zu erzielen. Diese Autoren konnten jedoch keine Internalisierung der Immunoliposomen beobachten (Nässander et al., 1995). Batra et al. benutzten ein Fusionsprotein aus einer Interleukin-2-bindenden Sequenz und dem Pseudomonas Exotoxin. Sie konnten zeigen, daß dieses Fusionsprotein zytotoxisch für Zellen ist, die den Interleukin-2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen (Batra et al., 1990). Kleinere Liganden, die an Oberflächenproteine binden, können ebenfalls für eine zellspezifische Bindung benutzt werden (Review: Cristiano, R.J. und Roth, J.A., 1995; Guy et al., 1995; Rihova, B., 1997). Bis jetzt wurden verschiedene solche Liganden gegen Oberflächenrezeptoren wie das Transferrin oder Folat benutzt (Cristiano et al., 1995), die für eine Verwendung bei der rezeptorvermittelten Transfektion geeignet scheinen. Auch Komplexe aus Transferrin und Polylysine können Zellen (HD-3) transfizieren (Wagner et al., 1990). Wu et al. synthetisierten Konjugate aus Asialoorosomucoid und Poly-L-Lysin, versetzten sie mit DNA und transfizierten mit diesem Polyplex HepG2-Zellen (Wu, G.Y. und Wu, C.H., 1987). Mit einem Transgen für humanes Serumalbumin konnten diese Autoren eine Albumindefizienz im Tiermodell zum Teil komplementieren (Wu et al., 1988). Remy et al. nutzten Galaktolipide für eine leberspezifische Transfektion (Remy et al., 1995).

Auch Peptidsequenzen von nur wenigen Aminosäuren reichen aus, um eine spezifische Bindung an Zellen zu vermitteln. Nishiya und Sloan zeigten, daß ein Peptid von nur vier Aminosäuren aus der Zellbindungsdomäne des Fibronectins, das die drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Glutamin (RGD) enthält, an Plättchen binden kann (Nishiya, T. und Sloan, S., 1996).

Für die Selektion neuer endothelzellbindender Peptide bieten sich zwei Selektionssysteme an: Phagen-Display (Review: Felici et al., 1996) oder die Peptid präsentierende Bakterienbank FLITRX (Lu et al., 1995). Die Bakterienbank zeigt dabei gegenüber der Phagenbank einige Vorteile: das rekombinante Fusionsprotein kann bei der FLITRX-Bank bis zu 20% des gesamten Zellproteins ausmachen und das Peptid wird als Fusionsprotein im dreidimensionalen Kontext präsentiert. Die Bakterien eignen sich besonders für eine Selektion im intakten Gefäß, da keine schnelle Extravasation auftritt.

3. Aufgabenstellung

Da eine endotheliale Dysfunktion die Ursache für eine Reihe häufig auftretender kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt, ist es von großem Interesse, Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Sinne einer Gentherapie genetisch verändern zu können. Bislang sind keine Methoden bekannt, Endothelzellen zufriedenstellend zu transfizieren. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Methoden entwickelt werden, diese Zellen effizient und nicht zytotoxisch zu transfizieren. Dabei wurde bewußt auf die Verwendung viraler Transfektionsmethoden verzichtet, um die entwickelte Methode auch *in vivo*, im Hinblick auf eine mögliche Gentherapie kardiovaskulärer Erkrankungen einsetzen zu können. Verschiedene liposomale Ansätze mit unterschiedlichem Aufbau und die zielgerichtete Rezeptor-vermittelte Aufnahme von DNA sollten für die Transfektion von Endothelzellen optimiert werden.

Zunächst war es das Ziel, verschiedene kommerziell erhältliche kationische Liposomen und drei verschiedene helikale kationische Peptide auf ihre Fähigkeit getestet werden, Endothelzellen *in vitro* zu transfizieren. Darüberhinaus sollten Virosomen mit den Oberflächenproteinen des *Marburg Virus* und des *Sendai Virus* rekonstituiert werden. Dazu sollte das Glykoprotein des *Marburg Virus* in COS-7-Zellen exprimiert und aufgereinigt werden. Nach der Rekonstitution dieses Glykoproteins in Virosomen sollten diese hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz getestet werden. Analog hierzu sollten die beiden Proteine F und HN des *Sendai Virus* aus intakten Viren isoliert, ebenfalls in Virosomen eingebaut und auf ihre Transfektionseffizienz untersucht werden.

Um eine Rezeptor-vermittelte Transfektion bei Endothelzellen zu erzielen, sollten verschiedene Peptide, für die vermutet wurde, daß sie an Endothelzellen binden, mit einem Oligolysinschwanz synthetisiert und dann auf ihre DNA-bindenden Eigenschaften getestet werden. Die Komplexe aus Peptiden und DNA sollten auch auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Endothelzellen zu transfizieren.

Um die erzielte Transfektionseffizienz beurteilen zu können, sollte die murine induzierbare NO-Synthase als Markergen verwendet werden, wobei das gebildete NO als Nitrit im Kulturmedium durch die Griess-Reaktion nachgewiesen werden kann.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

F-moc-Aminosäuren: Bachem, Heidelberg

Amidharz: Applied Biosystems, Weiterstadt

Cholesterin, Phosphatidylethanolamin aus Schafshirn, Polylysin (MW 0,4-1,5kDa; 30-70kDa; 150-300kDa), Fungizone, Penicillin/Streptomycin-Lösung, Ponceau-S-Lösung: Sigma, München

Supelpak™-2 beads: Supelco, Bellefonte, USA

DOTAP, DOSPER, DAC30, Fugene: Boehringer Mannheim

Lipofectamin, Lipofectamin PLUS, DMEM, M199: Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Phosphatidylcholin: Nattermann, Köln

Phosphatidylethanolamin-Lissamin-Rhodamin ($R_1=R_2$, 16:0): Avanti Polar Lipids Inc., USA

FCS und NCS: Biochrom KG, Berlin

4.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme: Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Calf Intestine Phosphatase (CIP), DNaseI: Boehringer, Mannheim

Ligase: Ready To Go™ - Ligase, Pharmacia, Heidelberg

4.1.3. Antikörper

Anti Marburg-GP IgG, aus Kaninchen, Heinz Feldmann, Institut für Virologie, Marburg

Anti Kaninchen IgG1, Peroxidase-gekoppelt, Sigma, München

4.1.4. Plasmide

pBluescript® SK(+): Stratagene, Heidelberg

pBGP: diese Arbeit, Karte siehe Anhang

pMT₂: Kaufman et al., 1989

pMTGP: diese Arbeit, Karte siehe Anhang

pSinRep5: Invitrogen NV Leek, NL

pSinGP: diese Arbeit, Karte siehe Anhang

pHβAPr1-neo: Gunning et al., 1987

pHβAPr1GP: Heinz Feldmann, Institut für Virologie, Marburg, Karte siehe Anhang

pSCMV-iNOS: A. Gödecke, unveröffentlichte Daten, Karte siehe Anhang

pSgeo: J. Hirchenhain, unveröffentlichte Daten

4.1.5. Kits

InvitroScript™CAP SP6 in vitro Transcription Kit, Sindbis Expression System Version A:

Invitrogen, NV Leek, NL

DNA-Präparationskit: Qiagen, Hilden

ECL-Kit: Amersham Life Science, Little Chalfont, England

4.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und im weiteren nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Arbeitsmethoden wie DNA-Ligation, DNA-Agarosegele, Phenol/Chloroform-Extraktion, DNA-Konzentrationsbestimmung und DNA-Ethanol-Präzipitation wurden nach Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook et al., 1989; Molecular Cloning).

4.2.1.Präparation von DNA

4.2.1.1. Mini-Präparation

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte leicht verändert nach Birnboim und Doly (Birnboim, C. und Doly, J., 1979). Nach Zugabe der NaOH/SDS-Lösung wurde jedoch nicht bei 4°C inkubiert und die DNA-Lösung nicht durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Die Fällung der DNA erfolgte mit Hilfe von 96%igem Ethanol bei Raumtemperatur.

4.2.1.2. Maxi-Präparation

Die Präparation größerer Mengen (>5µg) DNA wurde mit Hilfe des Qiagen DNA-Präparationskits durchgeführt. Von einer Übernachtskultur transformierter *E.coli* wurde eine 1-Liter-Kultur angeimpft und erneut bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 bei 37°C unter Schütteln bei 80Upm inkubiert. Die Präparation der DNA erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

4.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die zu isolierenden DNA-Fragmente im Agaroseblock unter UV-Licht (366nm) ausgeschnitten und durch eine Elektroelution isoliert. Dazu wurden die Gelblöcke in einen Dialyseschlauch mit 500µl TE gefüllt und 30min bei 150V eluiert. Der DNA-haltige TE-Puffer wurde aus dem Dialyseschlauch entnommen, eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die Konzentration der DNA im TE-Puffer auf einem Agarose-Gel abgeschätzt.

4.2.3. Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmid-DNA

Durch Restriktionsverdau linearisierte Vektor-DNA wurde durch die Behandlung mit

alkalischer Phosphatase (CIP) an ihren 5'-Enden dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors bei einer nachfolgenden Ligation zu verhindern. Dazu wurde 1 µg geschnittene Plasmid DNA mit 1/10 Volumen 10 X Dephosphorylierungspuffer versetzt und nach Zugabe von 2 µl alkalischer Phosphatase (1U/µl) 1h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

4.2.4. Klonierung des Marburg-Glykoproteines

4.2.4.1. Klonierung in den Expressionsvektor pMT2

Für die Expression des Marburg-Glykoproteines in eukaryontischen Zellen wurde DNA des Musoke-Stammes des *Marburg Virus* verwendet. Die für das Glykoprotein kodierende DNA wurde als EcoRI-Fragment aus dem Plasmid pHβA1PrGP (Karte siehe Anhang) geschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pMT2 kloniert. Nach Elektroelution und Phenol/Chloroform-Extraktion wurden 50ng Vektor DNA mit 75ng Glykoprotein-Fragment zusammen präzipitiert und ligiert. Die Klone wurden durch Restriktion mit BamHI auf den Einbau und die korrekte Orientierung des Glykoprotein-Gens überprüft.

4.2.4.2. Klonierung in das Plasmid pSinRep5

Zunächst wurde das 3,2kb EcoRI Fragment des Plasmides pHβA1PrGP (Karte siehe Anhang) in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pBluescript SK[®] (+) ligiert und die cDNA des Glykoproteins aus dem neuen Plasmid pBGP (Karte siehe Anhang) mit EcoRV und SmaI „*blunt end*“ isoliert. Weiter wurde das Plasmid pSinRep5 mit StuI geschnitten und mit dem Glykoprotein-Fragment ligiert. Die Orientierung und der korrekte Einbau des Fragmentes im neuen Plasmid pSinGP (Karte siehe Anhang) wurde mit KpnI überprüft.

4.2.5. Arbeiten mit RNA

4.2.5.1 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde ein *in vitro*-Transkriptionskit benutzt und laut Angaben des Herstellers verfahren. Das Plasmid pSinGP wurde vor der *in vitro* Transkription mit XhoI linearisiert und 0,5µg für die Reaktion eingesetzt. Die Menge und die Größe der transkribierten RNA wurden auf einem denaturierenden Agarose-Gel kontrolliert.

4.2.5.2. Denaturierende Agarose-Gele

Für die Analyse der transkribierten RNA wurden 1%-ige Agarose-Gele (1% Agarose, 0,5 X MOPS-Puffer, 6,5% Formaldehyd und 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml)) benutzt. Die RNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit dem gleichen Volumen Denaturierungspuffer (2,5x MOPS, 9% Formaldehyd, 0,25% Bromphenolblau und 50% Formamid) versetzt, 10min bei 60°C inkubiert und danach sofort auf Eis überführt. Die Proben wurden bei 80V zwei Stunden mit MOPS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

MOPS-Puffer:	MOPS	41,9g
	Na-Acetat	68g
	EDTA	3,7g
	Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.	

4.3. Bakterienkultivierung

4.3.1. Stamm

Escherichia coli Stamm XL-1-blue, Stratagene, Heidelberg.

4.3.2. Medien für die Bakterienkultivierung

Für die Anzucht der Bakterien wurde LB-Medium verwendet, dessen pH-Wert vor dem Autoklavieren auf 7,4 eingestellt wurde. Für die antibiotikahaltigen Medien wurde nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml steril hinzugefügt.

LB-Medium	10g Bacto-Trypton
	5g Yeast-Extract
	10g NaCl
	auf einen Liter, bei 120°C 20 min feucht autoklaviert

4.3.3. Herstellung kompetenter Zellen

100ml LB-Medium wurden mit einer 2ml Übernachtskultur XL1-blue in LB angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 - 0,5 schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden steril pelletiert, in 30ml TFB1-Lösung resuspendiert und 90min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen erneut steril pelletiert und in 4ml TFB2-Lösung aufgenommen. Aliquots von 100µl wurden bei -80°C eingefroren und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

TFB1	NaCl	100mM
	MnCl ₂	50mM
	K-Acetate, pH5,8	30mM
	CaCl ₂	10mM
	Glycerin	15%

TFB2	MOPS	10mM
	NaCl	10mM
	CaCl ₂	75mM
	Glycerin	15%

Der pH-Wert von TFB2 wurde auf pH 8,0 eingestellt, und beide Lösungen unmittelbar vor der Verwendung steril filtriert.

4.3.4. Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation der kompetenten *E. coli* wurde nach Hanahan durchgeführt (Hanahan et al., 1983). Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurde die Hälfte (10µl), für die Retransformation eines Plasmides 50ng verwendet.

4.4. Zellbiologische Methoden

4.4.1. Zelllinien

COS-7	DSMZ, Braunschweig
BHK-21	DSMZ, Braunschweig
Ea.hy926	Edgell et al., 1983
NIH3T3	CAMR, Salisbury, UK
HepG ₂	DSMZ, Braunschweig

4.4.2. Primäre Zellen

Schweineaortenendothelzellen (PAEC) wurden aus Schlachthof-Material isoliert: dazu wurden Schweineaorten in kalter NaCl-Lösung (150mM) transportiert, aufgeschnitten und mit der gleichen Lösung von restlichem Blut befreit. Die Endothelzellschicht wurde vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt und die Zellen in Medium mit doppelter Antibiotikakonzentration überführt und ausplattiert. Am nächsten Tag wurde Medium mit einfacher Antibiotikakonzentration auf die Zellen gegeben.

4.4.3. Zellkulturmedien

COS-7, NIH3T3, HepG₂, BHK-21 und Ea.hy926 wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS (bei BHK-21 nur 5%), 2% Fungizone (250µg/ml Amphotericin B) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000U/ml bzw. 10.000µg/ml) auf Zellkulturschalen bei

5%CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. PAEC wurden mit M199-Medium, 20%NCS, 2% Fungizone und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung unter den gleichen Bedingungen angezogen. Alle Zellen wurden in Medium mit der doppelten Konzentration an Serum und 10% DMSO zunächst zwei Stunden bei -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4.4. Transfektion von COS-7-Zellen für die Expression des Marburg-Glykoproteines

COS-7-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% mit dem Plasmid pMTGP nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Dafür wurden pro 10cm-Schale 10µg Plasmid-DNA in 500µl PBS verdünnt und mit einer Mischung aus 500µl PBS und 80µl DEAE-Dextran-Lösung (10mg DEAE-Dextran/ml PBS, steril filtriert) versetzt, gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Während der 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Zellkulturschale alle 5min leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Benetzung aller Zellen mit dem Transfektionansatz zu gewährleisten. Danach wurde mit 10ml Medium aufgefüllt und 40µl einer 40mM Chloroquinlösung in PBS (steril filtriert) hinzugegeben. Nach einer 2,5-stündigen Inkubation bei 37°C im Zellinkubator wurde 1ml DMSO vorsichtig ins Medium gegeben, verteilt und das Gemisch nach zwei Minuten abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Analyse der Genexpression transfizierter Zellen erfolgte nach 72h. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1ml Lysispuffer (10mM Tris/HCl, pH 7,4; 150mM NaCl; 1% Triton-X 100) aufgenommen und ein Aliquot des Lysates für die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

4.4.5. Transfektion von BHK-21-Zellen mit mRNA

Für die Transfektion mittels Elektroporation wurden 70-90% konfluente BHK-21-Zellen trypsiniert und die Reaktion mit 10ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 1000 x g und zweimaliges Waschen mit PBS gereinigt, in 800µl PBS aufgenommen und mit 5µg *in vitro* transkribierter RNA 15 min auf Eis

inkubiert. Danach wurde das Zell/RNA-Gemisch in eine Elektroporationsküvette (0,2cm Durchmesser) gegeben. Die Elektroporation erfolgte in einem Biorad Pulse Controller mit folgenden Einstellungen:

Spannung = 1,5 kV

Kapazität = 25µF

Widerstand = $\infty\Omega$

Dabei beträgt die Zeitkonstante $\tau \cong 6,5$. Nach der Elektroporation wurden die Zellen 5min auf Eis inkubiert und dann in frischem Medium kultiviert. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte nach 72h.

4.4.6. Transfektion mit kationischen Liposomen

Für die Transfektion mit kationischen Liposomen wurden zu 70-90% konfluente PAEC verwendet. Lipofectamin, Lipofectamin PLUS, DAC30, Fugene, DOSPER und DOTAP wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Transfektionen von PAEC zu vermitteln. Die Komplexe aus dem Plasmid pSCMV-iNOS und den kationischen Lipiden wurden laut Angaben der jeweiligen Hersteller synthetisiert und über Nacht auf die Zellen gegeben. Bei der Transfektion wurde Medium ohne Serum verwendet. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch Medium mit Serum ersetzt. Die Analyse der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe der Griess-Reaktion nach 48h.

4.4.7. Transfektionen mit Peptid/DNA-Komplexen

Für die Transfektion mit Hilfe von Peptid/DNA-Komplexen wurden 70-90% konfluente Zellen auf 6-well-Schalen eingesetzt. Bei Verwendung von RC36Lys/DNA-Komplexen wurden die PAEC vor der Transfektion mit Zellkulturmedium mit Lipopolysaccharid (10ng/ml), TNF α (500U/ml) und INF1- β (10U/ml) im Zellkulturmedium 6h stimuliert. Die Peptid/DNA-Komplexe wurden wie folgt hergestellt: Pro Ansatz wurden 5µg pSCMV-iNOS Plasmid in 250µl Medium ohne Serum gegeben. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden unterschiedliche Mengen Peptid (Ladungsverhältnisse 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 oder

32) auf 250µl mit Medium ohne Serum aufgefüllt. Die beiden Ansätze wurden tropfenweise miteinander gemischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Medium ohne Serum gewaschen, mit 500µl Medium ohne Serum versehen und mit dem Transfektionsansatz versetzt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 2 und 16 Stunden. Danach wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und Medium mit Serum und Chloroquin (100µM für COS-7-Zellen; 30µM für PAEC) für zwei Stunden auf die Zellen gegeben. Bei Übernachttransfektionen (16h) erfolgte die Inkubation mit dem Transfektionsansatz in Gegenwart von Chloroquin (100µM bzw. 30µM für PAEC). Nach der Chloroquin-Behandlung wurde das Medium durch 2ml frisches Medium ohne Chloroquin ausgetauscht und die Genexpression des auf dem Plasmid kodierten Markergens, der m-iNOS, nach 48h überprüft.

4.4.8. Transfektionen mit Peptid/DNA/Liposomen-Komplexen

Für die Transfektionen von COS-Zellen und PAEC mittels dieser Polyplexe wurden die kationischen Peptide zunächst in 250µl Medium ohne Serum mit der pSCMV-iNOS Plasmid-DNA inkubiert. Dabei wurden pro Transfektion eines 6-wells 5µg DNA verwendet (Ladungsverhältnis Peptid/DNA = 0,5). Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz 5µl Lipofectamin in 250µl Medium ohne Serum gegeben und vor der Transfektion erneut 15min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und drei Stunden mit den neu formierten Komplexen in Medium ohne Serum inkubiert. Wenn Komplexe mit dem Peptid RC36Lys verwendet wurden, so wurden die Zellen wie zuvor (siehe 4.4.7.) stimuliert. Danach wurde das Medium gegen frisches Medium mit Serum ausgetauscht und die Nitritakkumulation 48h später mit der Griess-Reaktion gemessen.

4.4.9. Transfektion mit Sendai-Virosomen

Die Zellen wurden in 6-wells einen Tag vor der Transfektion ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-90% inkubiert. Vor der Transfektion wurden sie zweimal mit kaltem BSS-Puffer mit 2mM CaCl₂ (siehe 4.8.2) gewaschen und auf Eis gestellt. Die Sendai-

Virosomen wurden dann vorsichtig in 100µl Medium ohne Serum auf die Zellen pipettiert und diese weiter unter gelegentlichem Schwenken 5min auf Eis belassen. Nach Zugabe von weiteren 500µl Medium ohne Serum wurden sie nach 37°C überführt und dort über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2ml Medium versehen. Die Analyse der Genexpression erfolgte nach 48h.

4.4.10. Analyse der iNOS-Genexpression

Das durch die m-iNOS gebildete NO wurde durch einen indirekten Nachweis quantifiziert. Das stabile Abbauprodukt des NO, das Nitrit, wird von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben und kann spektrophotometrisch durch die Griess-Reaktion (Green et al., 1982) bestimmt werden. 500µl Medium wurden mit gleichem Volumen Griess-Reagenz (2% Sulfanilamid; 0,2% Naphtylethylendiamin in 2,5%iger H_3PO_4) gemischt und die Extinktion bei 540nm nach 15min gemessen. Zur quantitativen Bestimmung des gebildeten Nitrits wurde eine Eichgerade mit 0,1-1 nmol Nitrit aufgenommen.

4.4.11. β -Galaktosidasefärbung

Die Expressionsanalyse der mit dem Plasmid pSgeo transfizierten β -Galaktosidase erfolgte zwei Tage nach der Transfektion. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann 5 Minuten in Fixierlösung bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit der Färbelösung 4-6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Fixierlösung	2% p-Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd
---------------------	--

Färbelösung	2mM $MgCl_2$ 5mM K-Hexacyanoferrat II 5mM K-Hexacyanoferrat III 0,05 % 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
--------------------	---

4.5. SDS-Gele

Denaturierende Proteingelelektrophoresen wurden nach Lämmli, U.K., 1970, durchgeführt.

4.6. Western-Blot-Analyse

Für die Expressionsanalyse des Marburg-Glykoproteins wurde eine Westernanalyse (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Die 6%igen Polyacrylamidgele wurden in 3h mit 1,5mA pro cm² auf Nitrocellulose mit Hilfe einer Biometra Semidryblot-Apparatur geblottet. Zur Anfärbung des Protein-Größenstandards wurden die Membranen in einer 0,2%-igen Ponceau-S-Lösung (2%-ige Lösung 1:10 in PBS verdünnt) in 2min gefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Banden des Standards wurden markiert, bevor eine vollständige Entfärbung vollzogen war. Danach wurden die Nitrocellulosefilter mit einer 2%igen BSA-Lösung in PBS mindestens eine Stunde abgesättigt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln mit einer 1:200 Verdünnung eines Marburg-Glykoprotein-spezifischen Antikörpers in der gleichen Lösung behandelt. Die Membran wurde dreimal für je 20min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und dann eine Stunde lang mit dem zweiten Antikörper (Anti Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt) in einer 2%igen Lösung von BSA in PBS leicht bei Raumtemperatur geschüttelt. Dabei wurde der Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Nach erneutem Waschen wie zuvor wurde die Peroxidaseaktivität auf der Membran und somit indirekt die Antikörperbindung durch eine Chemoluminiszenzreaktion (ECL-Kit) mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Dabei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Liter Puffer:

Blotpuffer	Glycin	2,93g
	Tris	5,81g
	SDS	1g
	Ethanol	200ml

4.7. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der transfizierten Zellen wurde nach Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt. Dafür wurden die Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen eines 6-wells in 1ml 0,2N NaOH, 1%igem SDS aufgenommen. Vor der spektrophotometrischen Messung bei 576nm wurden die Proben zwei Minuten bei 13.000rpm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. und der Überstand in eine Meßküvette überführt.

4.8. Arbeiten mit *Sendai Viren*

4.8.1 Anzucht der *Sendai Viren*

Für die Präparation der Sendai-Virosomen wurden zunächst *Sendai Viren* (auch hämagglutinierendes Virus aus Japan = HVJ) in bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Dazu wurden weiße Bruteier bei 35,5°C und 70%iger relativer Luftfeuchte 10 Tage in einem Brutschrank inkubiert und dabei alle 4h gewendet. Die Entwicklung der Embryonen wurde mittels Durchleuchtung kontrolliert und nur Eier mit Embryonen angeimpft. Dazu wurde ein Loch kurz oberhalb der Luft/Chorionallantoisgrenze in die Eischale gebohrt und 100µl einer 1:200 Verdünnung von Viren des Z-Stammes (Y.Kaneda, Osaka) (5HAU/ml) in sterilem BSS (siehe 4.8.2.) in die Chorionallantoisflüssigkeit steril injiziert. Das Loch wurde mit Wachs verschlossen und die Eier für weitere 3 Tage ohne Wenden bebrütet. Danach wurden sie mindestens 2h bei 4°C gelagert und die Chorionallantoisflüssigkeit mit den Sendai Viren geerntet. Der Virustiter wurde mit einem HAU-Test (Hämagglutininase-Einheiten-Test nach Toister, Z. und Loyter, A., 1970) bestimmt. Die Viren wurde bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt; Aliquots wurden als neue Stocks in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.8.2. Präparation der Sendai-Virosomen

Die Präparation der Sendai-Virosomen wurde verändert nach Bagai durchgeführt (Bagai et al., 1993c). 200.000 HAU der Virussuspension wurden zunächst durch zweimalige Zentrifugation bei 4°C 10min in einer Falcon-Zentrifuge bei 3000rpm von Resten der Eierschalen und Hühnererythrozyten befreit. Die Viren wurden dann bei 27.000 x g und 4°C in 30min aus dem Überstand sedimentiert, mit BSS gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Danach wurden sie in 2ml SP-Puffer mit 2% TritonX-100 aufgenommen und 1h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lysat wurde bei 100.000g und 4°C 1h zentrifugiert und der Überstand weiter verwendet. 500µg pSCMV-iNOS wurden mit 125µl HMG1-Lösung (1,3mg/ ml) aus Kalbsthymus 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu 1ml des Überstandes wurden zunächst die DNA/HMG-Komplexe und dann 450mg Feuchtgewicht aktivierte (Aktivierung laut Hersteller) Supelpak™-2 beads gegeben und 2h bei 4°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 900mg „beads“ wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 900mg „beads“ zugegeben und das Gemisch für die gleiche Zeit unter heftigem Schütteln inkubiert. Die Flüssigkeit wurde dann bei 100.000g und 4°C eine Stunde zentrifugiert. Das Pellet enthielt die Sendai-Virosomen, die in 500µl BSS aufgenommen und deren hämagglutinierende Eigenschaft mit einem HAU-Test kontrolliert wurde. Die Menge der eingebauten DNA wurde mit Hilfe eines DNase-Testes bestimmt. Dazu wurde zu einem Aliquot (50µl) der Virosomen die gleiche Menge DNase-Puffer (10mM MgCl₂, 10mM CaCl₂) gegeben und der Ansatz halbiert. Während eine Hälfte unbehandelt blieb, wurden zur anderen 10U DNaseI gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Menge der eingeschlossenen DNA auf einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert.

Die Mengenangaben beziehen sich auf 1Liter Puffer.

BSS	Tris	1,21g
	NaCl	8g
	KCl	0,4g
	auf pH 7,6 eingestellt, für das Arbeiten in der Zellkultur bei 120°C feucht autoklaviert.	

SP-Puffer	1M Tris/HCl, pH 7,4	10ml
	1M MgCl ₂	10ml
	1M CaCl ₂	10ml

Die Größe der rekonstituierten Virosomen wurde mittels Laserbeugung in BSS-Puffer in einem Zetasizer der Firma Malvern Instruments gemessen.

4.8.3. Fusionstest mit Fluoreszenz-markierten Liposomen

Zur Kontrolle ihrer fusogenen Eigenschaften wurden *Sendai Viren* und rekonstituierte Virosomen auf ihre Fähigkeit getestet, mit neutralen Liposomen zu fusionieren. Dazu wurden zunächst neutrale Liposomen aus insgesamt 50mg Gesamtlipid und 500µl wässriger Phase (BSS) nach der „*Reversed Phase*“ Methode hergestellt. Dabei wurden Phosphatidylcholin, Cholesterin, Rhodamin-Lissamin-Phosphatidylethanolamin und das Gangliosid G_{D1a} in einem Molverhältnis von 85 : 10 : 5 : 1 eingesetzt. Nachdem die Liposomen über eine Sephadex-G50-Säule aufgereinigt worden waren, wurden sie 1: 1000 verdünnt und nach Zugabe von CaCl₂ (2mM Endkonzentration) im Spektrofluorometer (Shimadzu RF-540) in 2ml Volumen gemessen. Die Excitationswellenlänge betrug 560nm, die Emissionswellenlänge 590nm und der Slit =3. Da das eingesetzte Rhodamin-Lissamin-Phosphatidylethanolamin sich unter diesen Bedingungen selber quencht, können Fusionsereignisse als Dequenching mit einer Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Eine maximale Fluoreszenz wurde durch die Zugabe von 100µl 10%igem SDS hervorgerufen.

4.9. Arbeiten mit kationischen Peptiden

4.9.1. Peptidsynthesen

Die Synthese erfolgte an einem Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) unter Anwendung der F-moc-Kopplungschemie (Sheppard, R.C. und Williams, B.J., 1982). Es wurde ein Amidharz mit einem Beladungsgrad von 0,64mmol/g

benutzt. Folgende Peptide wurden im 0,1 mMol Maßstab hergestellt:

Tabelle1: Liste der synthetisierten Peptide im Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz, Anzahl der Aminosäuren und die berechnete Gesamtladung des Peptides bei pH 7,0.

Peptid	Aminosäuresequenz	Aminosäuren	Ladung
DNAKond1	RLAKRLAKRLRKLARKLG	18	+10
DNAKond2	RLAKRLAKRLRKLARKLGRLAKRLAKRLRKG	31	+17
NLSKond1	PKKKRKVGGGRLAKRLAKRLRKLARKLG	28	+15
PAEC4Lys	RQWGGGRPQFFICGP(K) ₁₆	31	+19
RC36Lys	SQRWTQLWQWIGGG(K) ₁₆	30	+18
AlaETLys	ASASSLMDKEAVYFAHLDIIWGGG(K) ₁₆	40	+16
RGDLys	GRGDNSFGRGDIRNGGG(K) ₁₆	33	+18

4.9.2. Abspaltung der synthetisierten Peptide vom Synthescharz

Zur Abspaltung von 0,05mMol Peptid wurde ein Abspaltungsreagenz zu dem Peptidharz gegeben, nach zweistündiger Inkubation unter Rühren das Harz über eine Glasfritte abgetrennt und das Peptid mit kaltem (4°C) Diethylether aus der Lösung gefällt. Nach mehrmaligem Waschen mit frischem Ether (4°C) und Abzentrifugieren wurde das Peptid für die chromatographische Aufreinigung eingesetzt.

Abspaltungsreagenz

- 0,75 g Phenol
- 0,25ml Ethandithiol
- 0,5 ml Thioanisol
- 0,5 ml H₂O
- 10 mL Trifluoressigsäure

4.9.3. Chromatographische Aufreinigung der Peptide

Nach der Synthese wurden alle Peptide außer den gekauften Polylysinen chromatographisch über eine 3ml Pharmacia RPC Säule aufgereinigt. Die Peptide wurden

mit einem Puffer von 0,1% Trifluoressigsäure, 5% Acetonitril in Wasser an die Säule gebunden und mit einem Gradienten von 5% bis 90% Acetonitril eluiert.

4.9.4. Lyophyllisierung der Peptide

Bevor die Peptide für weitere Untersuchungen eingesetzt wurden, wurden sie nach der chromatographischen Aufreinigung zunächst in dem Acetonitril/Wasser-Gemisch bei -80°C eingefroren und in einer Lyovac GT2 Lyophylle von Leybold-Heraeus lyophyllisiert.

4.9.5. Retardationsassay

Für den Retardationsassay wurde zunächst das Ladungsverhältnis der DNA-bindenden Proteine bei Ladungsausgleich mit dem Plasmid pSCMV-iNOS berechnet:

Ein Verhältnis von eins bedeutet dabei gleich viele negative Ladungen seitens der DNA wie positive Ladungen durch die Peptide und somit Ladungsausgleich. Die Formel:

$$\frac{\text{Ladung DNA}}{\text{MW DNA}} \times \frac{\text{MW Peptid}}{\text{Ladung Peptid}}$$

gibt das Gewichtsverhältnis Peptid/DNA bei Ladungsausgleich an. Für den Retardationsassay wurden 0,5µg DNA mit steigenden Mengen (Ladungsverhältnisse Peptid/DNA: 0; 0,5; 1; 2; 4 und 8) DNA-bindender Peptide in Bindungspuffer (20mM Tris/HCl, pH 7,4; 150mM NaCl) gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf einem 0,8%igen Agaosegel analysiert.

4.9.6. DNaseI- Schutzexperiment

1µg pSCMV-iNOS DNA wurden wie beim Retardationsassay mit steigenden Mengen DNA-bindender Peptide (Ladungsverhältnisse Peptid/DNA 0; 0,5; 1; 2; 4 und 8) in 80µl Bindungspuffer (siehe 4.9.5.) gemischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20µl einer 10mM MgCl₂ und 10mM CaCl₂- Lösung hinzugegeben und der Ansatz

halbiert. Während eine Hälfte unbehandelt blieb, wurde zu der zweiten 1µl DNaseI (2U/µl) gegeben. Beide Ansätze wurden 10min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 10µl 1%igem SDS versetzt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden beide Ansätze auf einem 0,8%igen Agarosegel ausgewertet. Der Ansatz ohne DNaseI diente als Kontrolle.

4.9.7. Ethidiumbromidverdrängung

Die Fluoreszenzstudien wurden mit einem Spektrofluorometer (Shimadzu, RF-540) durchgeführt. Die Excitationswellenlänge wurde auf 516nm, die Emissionswellenlänge auf 598nm festgelegt (Sliteinstellung = 3). Die zu messenden Peptide wurden in Wasser gelöst. Zu 2ml Meßpuffer wurden 0,1µg Ethidiumbromid gegeben und die Emission gleich 0 gesetzt. Dann wurden 1µg pSCMV-iNOS Plasmid hinzugefügt und erneut die Emission gemessen. Dieser Wert wurde als 100% definiert. Aliquots der Peptidlösung in Wasser wurden dann unter Rühren in den Meßansatz gegeben, die Emission bestimmt und nach Korrektur des Verdünnungseffektes auf den 100%-Wert bezogen. Folgende Meßpuffer wurden dabei verwendet:

Na-Phosphatpuffer-Puffer, 20mM (150mM NaCl)	pH4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0
Na-Phosphatpuffer-Puffer, 20mM (pH7,0)	50mM;100mM;150mM NaCl.

4.9.7. Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden nach der sukzessiven Auftropfmethode kontrastiert. Dafür wurden zunächst Komplexe aus Peptiden und DNA hergestellt. Die Ladungsverhältnisse entsprachen denen bei vollkommener Retardation im Agarosegel. Die Proben wurden auf ein mit Kohlefilm benetztes Kupfernetzchen (3mm, 200 mesh) aufgetropft. Nach 2min wurde die Flüssigkeit seitlich mit einem Filterpapier abgesaugt. Dann wurde eine 2%ige Phosphorwolframsäure aufgetropft und ebenfalls nach 2min abgesaugt. Die Aufnahmen wurden unter der Mithilfe von Dr. Klaus Zanger, Institut für Anatomie der Universität Düsseldorf, in einem Hitachi H600 Elektronenmikroskop bei 50kV gemacht.

5. Ergebnisse

5.1. Transfektion von PAEC mit kationischen Liposomen

Verschiedene kommerziell erhältliche kationische Liposomen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, primäre Endothelzellen zu transfizieren. Dazu wurden Lipoplexe aus kationischen Liposomen und dem Plasmid pSCMV-iNOS hergestellt und für die Transfektion von primären Endothelzellen, hier PAEC (porcine aortic endothelial cells), eingesetzt. Das durch die murine induzierbare NO-Synthase (iNOS) gebildete NO wurde 48h nach der Transfektion indirekt als Nitrit mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Als Leerwert diente der Kulturüberstand nicht-transfizierter Zellen.

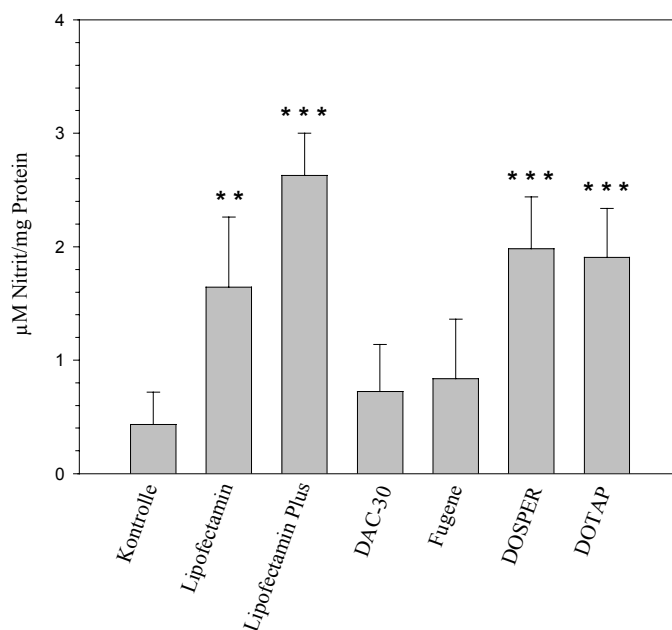


Abb.3: Nitritakkumulation nach der Transfektion von primären Schweineaorten-Endothelzellen (PAEC) mit dem Plasmid pSCMV-iNOS. Für die Bildung der Transfektions-Komplexe wurden verschiedene kationische Liposomen verwendet und die Zellen mit den Lipoplexen 16h in Medium ohne Serum inkubiert. Das gebildete Nitrit wurde 48h nach der Transfektion mittels Griess-Reaktion gemessen. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n=3 Experimenten.

In unbehandelten PAEC läßt sich bereits eine basale NO-Produktion nachweisen, die wahrscheinlich durch die endogen vorhandene e-NOS hervorgerufen wird (Abb.3). DAC30 und Fugene sind nicht in der Lage, eine Transfektion von PAEC zu vermitteln. Mit

Lipoplexen aus Lipofectamin und DNA fand sich eine geringere Transfektion als mit Lipofectamin PLUS. Sowohl DOTAP als auch DOSPER vermittelten eine noch geringere, aber dennoch signifikante, Transfektion. Damit konnte die Effizienz der Transfektion im Vergleich zu bereits publizierten Werten für die Transfektion mit Lipofectamin auf das eineinhalbfache gesteigert werden.

5.2. Transfektion mit rekonstituierten Virosomen

Unter Virosomen versteht man Liposomen, die in ihrer Lipidhülle virale Oberflächenproteine tragen, die die Adsorption an die Targetzellen und die Fusion mit der Plasmamembran oder der Endosomenmembran der Targetzelle erleichtern sollten. Um primäre Endothelzellen mit Hilfe von Virosomen transfizieren zu können, mußten zunächst virale Oberflächenproteine, hier das Glykoprotein des *Marburg Virus* und die beiden Proteine F (Fusionsprotein) und HN (Hämagglutinin/Neuraminidase) des *Sendai Virus*, isoliert werden. In einem zweiten Schritt mußten die gereinigten Proteine in die Lipidhülle neutraler, DNA-haltiger Liposomen rekonstituiert werden.

5.2.1. Expression des Marburg-Glykoproteines

5.2.1.1. Expression in COS-7-Zellen

Schnittler et al. konnten zeigen, daß das *Marburg Virus* Endothelzellen infizieren und sich in diesen vermehren kann (Schnittler et al., 1993). Das einzige Oberflächenprotein in der Virusmembran ist ein hoch glykosyliertes TypI-Transmembranprotein, das als Trimer in der Virushülle verankert ist. Dieses Protein muß sowohl für die Adhäsion an die Zelloberfläche als auch für die Fusion des Virus mit der Zelle verantwortlich sein. Das Glykoprotein kann wegen der großen Humanpathogenität des Virus nicht aus intakten Virionen isoliert werden, sondern muß in der Zellkultur exprimiert werden. Um ein Protein gewinnen zu können, dessen Glykosylierung dem der infektiösen Virionen entspricht, wurde das Glykoprotein in eukaryontischen Zellen exprimiert und sollte danach aufgereinigt und in die Lipidhülle DNA-haltiger Virosomen rekonstituiert werden. Durch

das Marburg-Glykoprotein sollte eine Fusion mit Endothelzellen erreicht werden, wobei die DNA aus dem Inneren des Virosoms ins Zytoplasma der Endothelzellen freigesetzt und nach Transport in den Kern zu einer effizienten Transfektion führen sollte.

Für die Expression des Marburg-Glykoproteins wurden COS-7-Zellen gewählt, da diese leicht transfiziert werden können und es durch ihren genetischen Hintergrund (SV40 large T Antigen) möglich ist, bis zu vierzig Kopien eines Plasmides mit einem SV40 Replikationsursprung in einer Zelle über mehrere Tage (bis Monate) zu stabilisieren. Dazu wurde das Gen für das Marburg-Glykoprotein in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2 kloniert, der neben bakteriellen Replikationssequenzen einen adenoviralen Promotor („Adeno-Late-Promotor“) trägt. Dieser ermöglicht eine effiziente Expression des klonierten Gens in COS-7-Zellen. Das Plasmid pMTGP (Karte siehe Anhang) wurde mittels DEAE-Dextran-vermittelter Transfektion in COS-7-Zellen transfiziert; als Kontrollplasmid diente pMT2, der Ursprungsvektor ohne das Gen für das Marburg-Glykoprotein. Die Analyse der Genexpression mit Hilfe von Western-Blots erfolgte nach 72h. Zur Kontrolle der Proteinexpression diente ein Lysat aus *Marburg Virus* (Heinz Feldmann, Marburg), von dem 50ng auf das Proteingel (Abb. 4) aufgetragen wurden.

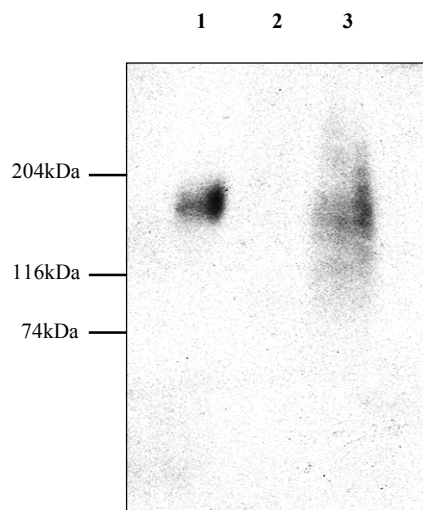


Abb.4: Western-Analyse der Marburg-Glykoprotein-Expression in COS-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels DEAE-Dextran-Transfektion transfiziert. Drei Tage danach wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe einer Westernanalyse auf die Expression des Marburg-Glykoproteins untersucht. Spur1: Marburg-Glykoprotein-Standard (50ng); Spur2: Lysat aus COS-7-Zellen nach Transfektion mit pMT2, Spur 3: Lysat aus COS-7-Zellen nach Transfektion mit pMTGP. Die Abbildung steht stellvertretend für n=5 Experimente.

Der eingesetzte Antikörper gegen das Marburg-Glykoprotein zeigte keine Kreuzreaktion und erkannte selektiv das Glykoprotein des *Marburg Virus*, das mit einem apparenten Molekulargewicht von ca 170kDa erscheint. Mit dem Kontrollplasmid (pMT2) transfizierte COS-7-Zellen exprimierten kein Marburg-Glykoprotein, wohingegen Zellen, die mit dem Plasmid pMTGP transfiziert wurden, das Glykoprotein exprimierten. Das Signal deutet auf

ein Protein hin, das mit einer Größe zwischen ca 100kDa und 250kDa ein variables Molekulargewicht besitzt als das aus intakten Virionen isolierte Kontrollprotein. Durch eine Mengenabschätzung mit dem aufgetragenen Glykoprotein-Standard wurde geschlossen, daß nur ca. 100ng des in COS-7-Zellen exprimierten Glykoproteins auf das Gel aufgetragen wurden, was einer Ausbeute von etwa 2µg Glykoprotein pro 10⁷ transfizierter COS-7-Zellen entspricht.

5.2.1.2. Expression in BHK-21-Zellen

Um größere Mengen des Marburg-Glykoproteines zu erhalten, wurde ein anderes Expressionssystem für die Produktion des Oberflächenproteines herangezogen. RNA kann wie DNA mittels Elektroporation in Zellen eingeschleust und dort direkt in das gewünschte Protein translatiert werden. Die Standardzellen für diese Methode sind BHK-21-Zellen, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die kodierende Sequenz des Marburg-Glykoproteines wurde in das Plasmid pSinRep5 kloniert. Dieses Plasmid enthält einen SP6-Polymerasepromotor, der dazu dient, Gene *in vitro* zu transkribieren. Das neue Plasmid pSinGP (Karte siehe Anhang) wurde linearisiert und als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die gebildete mRNA des Marburg-Glykoproteines wurde auf einem denaturierenden Agarosegel analysiert, um eine Aussage über die Menge der transkribierten RNA machen zu können. Dazu wurden 1,5µg Gesamt-RNA und 1/10 des Transkriptionsansatzes neben den DNA-Templates, die für die *in vitro* Transkription eingesetzt worden waren, aufgetragen. Das Plasmid pSPT18 wurde vom Hersteller als Kontrollplasmid für eine effiziente *in vitro* Transfektion mitgeliefert, pSinLuci diente als weitere Kontrolle.

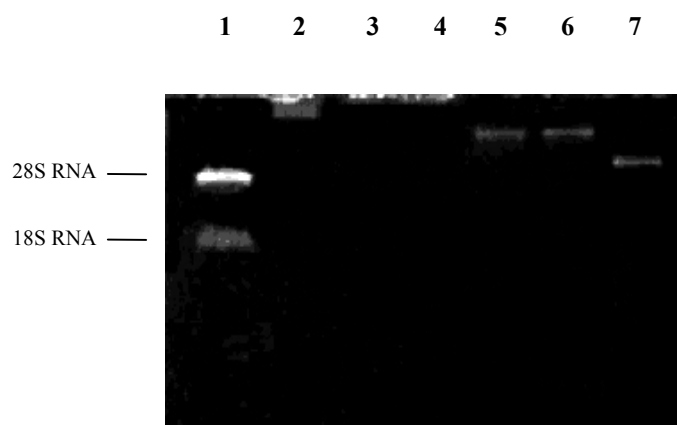


Abb.5: Mengenabschätzung der *in vitro* transkribierten RNA auf einem denaturierenden Agarosegel. Spur 1: Gesamt-RNA; Spur 2: pSinGP-DNA; Spur 3: pSinLuci-DNA; Spur 4: pSPT18-DNA; Spur 5: GP-mRNA; Spur 6: Luciferase-mRNA; Spur 7: pSPT18-Transkript

Bei dem Vergleich der *in vitro* transkribierten RNA mit der auf das Gel aufgetragenen Gesamt-RNA kann man abschätzen, daß jeweils etwa 5µg RNA *in vitro* synthetisiert wurden (Abb.5). Die gebildete mRNA des Marburg-Glykoproteines und die mRNA der Luciferase wurde in BHK-21-Zellen elektroporiert. Die Proteinlysate der transfizierten BHK-21-Zellen wurden nach 72 Stunden mittels Western-Analyse kontrolliert (Abb.6).

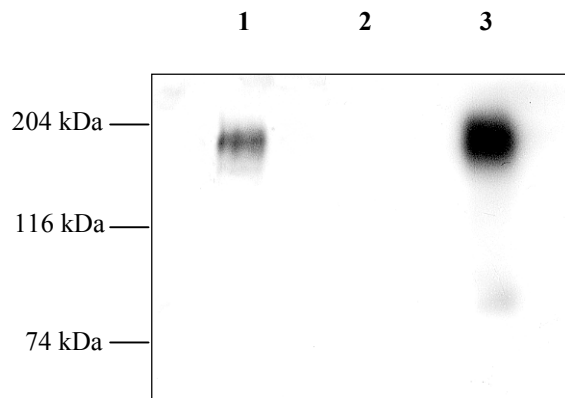


Abb.6: Western-Analyse der Marburg-Glykoproteinexpression in BHK-21-Zellen. Die mRNA für Luciferase bzw. das Marburg-Glykoprotein wurden *in vitro* transkribiert und in die Zellen mittels Elektroporation eingebracht. 72h danach wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe einer Western-Analyse auf die Expression des Marburg-Glykoproteines untersucht. Spur1: Marburg-Glykoprotein-Standard (50ng); Spur2: Zellysat nach Transfektion mit Luciferase-mRNA, Spur 3: Zellysat nach Transfektion mit Glykoprotein-mRNA. Die Abbildung stellt ein typisches Experiment dar (n=3).

Wie deutlich zu erkennen ist, zeigt der Extrakt aus Zellen, die mit der Luciferase mRNA transfiziert worden waren, kein positives Signal für das Marburg-Glykoprotein. Die Zellen, die mit mRNA für das Marburg-Glykoprotein transfiziert wurden, exprimieren das Marburg-Glykoprotein. Das apparente Molekulargewicht des synthetisierten Proteins beträgt wie das des Kontrollproteins ca 170kDa. Wie bei der Transfektion von COS-7-Zellen beträgt die gebildetete Proteinmenge pro 10^7 Zellen etwa 2µg.

Für eine effiziente Aufreinigung des gebildeten Proteines müßten schätzungsweise 1-2mg Protein synthetisiert werden, um nach Aufreinigung einige µg für eine Rekonstitution zur Verfügung zu haben. Es müßten demnach etwa 10^{10} Zellen oder etwa 1000 Zellkulturschalen von BHK-21-Zellen transfiziert werden, um ausreichend Marburg-Glykoprotein für eine Virosomenrekonstitution zu produzieren.

Da so große Mengen an Zellen nicht transfiziert werden konnten, wurde darauf verzichtet, das Glykoprotein für eine Rekonstitution in Virosomen weiter zu exprimieren und aufzureinigen.

5.2.2. Sendai-Virosomen

5.2.2.1. Aufreinigung der *Sendai Virus*-Proteine F und HN und Rekonstitution in Virosomen

Größere Mengen an viralen Proteinen lassen sich durch die Isolierung aus intakten Virionen, zum Beispiel aus *Sendai Viren* gewinnen. Die beiden Oberflächenproteine F (Fusionsprotein) und HN (Hämagglutininase/Neuraminidase), die für eine effiziente Fusion des *Sendai Virus* mit der Zielzelle verantwortlich sind, können aufgereinigt und in Virosomen rekonstituiert werden (Volsky et al., 1978; Hsu et al., 1979). In die Virosomen eingeschlossene DNA sollte bei der Fusion des Virosoms mit Zellen in das Zytoplasma entlassen werden.

Die nicht humanpathogenen Sendai Viren wurden in bebrüteten Hühnereiern angezogen und geerntet. Der Virustiter wurde nach der Ernte der Chorionallantoisflüssigkeit mittels HAU-Test bestimmt. Dabei wurden zwischen 1000 und 2000 HAU/ml gemessen. Für die Rekonstitution wurden 200.000 HAU der isolierten Virionen eingesetzt. Die Viruspartikel wurden in einer 2%igen TritonX-100 Lösung solubilisiert und die Triton-unlösliche Fraktion durch eine Ultrazentrifugation abgetrennt. Zu dem Überstand wurde DNA, die zuvor mit HMG1 komplexiert wurde, hinzugefügt. Durch sukzessive Zugabe von Detergenz-bindenden "beads" wurde das TritonX-100 entfernt und die gebildeten Virosomen durch eine weitere Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die einzelnen Zentrifugationsschritte wurden auf einem Polyacrylamidgel kontrolliert (Abb.7). Während vor der Aufreinigung das Lysat aus verschiedenen Virusproteinen bestand, lassen sich nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt nur noch die beiden Oberflächenproteine F₁ und HN erkennen. Weil ein reduzierendes Proteingel benutzt wurde, zerfällt das F-Protein in seine beiden Untereinheiten F₁ und F₂, von dem die kleinere Untereinheit F₂ in dem hier verwendeten Polyacrylamidgel wegen seiner geringen Größe nicht detektiert werden kann. Das Protein F₁ ist bei ca 45kDa gut zu sehen, das andere Glykoprotein, HN, zeigt ein Molekulargewicht von ca 65kDa. Der Überstand und das Pellet der letzten Zentrifugation wurden im Verhältnis ihrer Volumina aufgetragen, so daß eine Abschätzung möglich ist, daß etwa 80% der beiden Oberflächenproteine des Virus in die Virosomen eingebaut wurden.

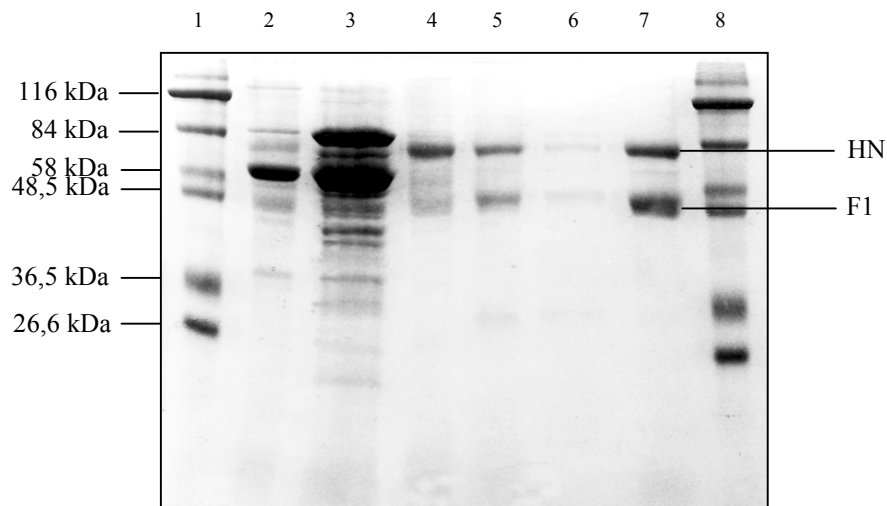


Abb.7: Kontrolle der Isolierung der beiden Sendai-Proteine F und HN auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. Spur 1: Größenstandard; Spur 2: Viruslysats; Spur 3: Pellet nach der ersten Ultrazentrifugation, Spur 4: Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation; Spur 5: Gesamt-Virosomen; Spur 6: Überstand nach der zweiten Ultrazentrifugation, Spur 7: Pellet nach der zweiten Ultrazentrifugation; Spur 8: Größenstandard.

Zur Charakterisierung der rekonstituierten Virosomen wurde die eingeschlossene Plasmid-DNA (pSgeo bzw. pSCMV-iNOS) mit Hilfe eines DNase-Testes quantifiziert. Hierbei zeigte es sich, daß 5% der eingesetzten DNA in die Virosomen eingebaut wurden (Daten nicht gezeigt). Eine Größenbestimmung der Virosomen mittels Laserbeugung (Zetasizer) ergab eine durchschnittliche Größe von 98,4nm (Abb.8).

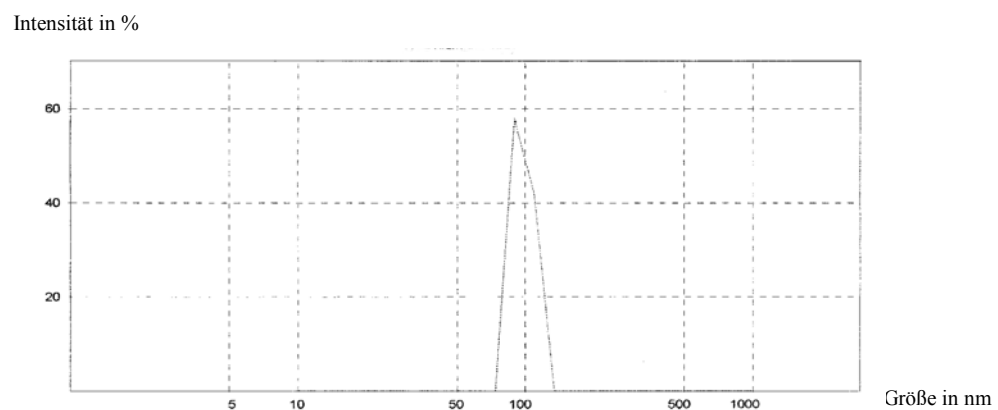


Abb.8: Größenanalyse der Sendai-Virosomen im Zetasizer. Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung gegen die Größe der Virosomen in nm.

Ein HAU-Test (Aktivitätstest der Hämagglutininase) der gebildeten Virosomen zeigte, daß etwa 50% der ursprünglich eingesetzten hämagglutinierenden Aktivität in den Virosomen zu finden war. Weiter wurde deutlich, daß zumindest das HN-Protein seine Aktivität auch nach der Rekonstitution behalten hatte. Durch die Isolierung und Aufreinigung der beiden Sendai Proteine F und HN aus intakten Virionen konnte demzufolge genügend Material gewonnen werden, um die viralen Proteine in DNA-Virosomen einzubauen.

5.2.2.2. Fusionstest der rekonstituierten Virosomen

Um zu überprüfen, ob neben dem HN-Protein auch das F-Protein als aktives Protein in der Virosomenmembran lokalisiert ist, wurden die rekonstituierten Virosomen daraufhin getestet, ob sie in der Lage sind, mit anderen Membranen zu fusionieren. Mit Hilfe von Fluoreszenz- (Lissamin-Rhodamin-) markierten Phospholipiden wurden die Fusionsereignisse bestimmt. Der Test beruht darauf, daß die fluoreszierenden Phospholipide ihre eigene Fluoreszenz ab einer bestimmten Konzentration in einer Phospholipidschicht quenchen. Eine Verdünnung der fluoreszierenden Phospholipide durch andere Phospholipide führt zu einem Dequenching-Effekt und daher einer Steigerung der gemessenen Fluoreszenz. Dieser Effekt kann auch durch die Zerstörung der Membranen durch z.B. Detergenzien erreicht werden.

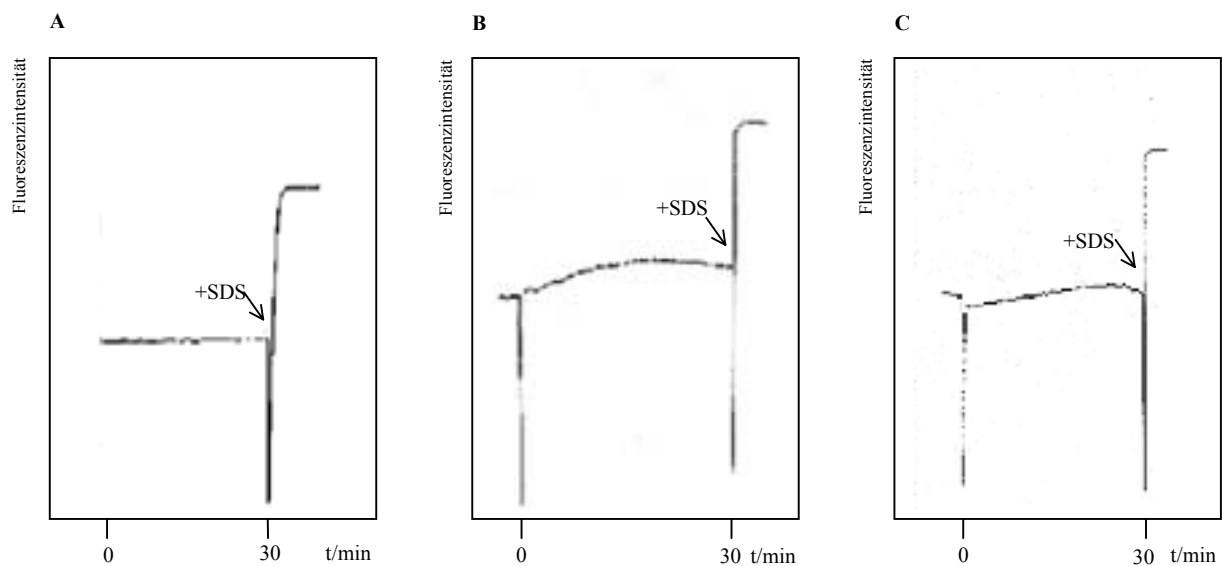


Abb.9: Fusionstest der rekonstituierten Virosomen. Durch eine Verdünnung fluoreszierender Lipide wird eine Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielt (Dequenching). Die Fluoreszenz der Liposomen wurde bei 560nm angeregt und die Emission bei 590nm gemessen. Nach 30min wurde SDS hinzugefügt (Endkonzentration von 0,5%). A: Kontrolle; B: Sendai-Viren; C: rekonstituierte Virosomen. x-Achse: Zeit in Minuten, Y-Achse: Fluoreszenzintensität. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus n=3 Experimenten.

Als Positivkontrolle dient zum einen die Fusion der fluoreszierenden Liposomen mit intakten Virionen, zum anderen die Solubilisierung durch das Detergenz SDS, was zu einer vollständigen Lyse der Liposomen und damit zu einem maximalen Dequenching-Effekt führte. Sowohl die intakten Virionen als auch die rekonstituierten Virosomen waren in der Lage, mit Liposomen aus Phosphatidylcholin, Cholesterin, einem Gangliosid und Rhodamin-Lissamin-Phosphatidylethanolamin zu fusionieren (Abb.9).

5.2.2.3. Transfektion mit Sendai-Virosomen

Nachdem die Fusogenität der rekonstituierten Virosomen *in vitro* nachgewiesen worden war, sollten die Virosomen dazu verwendet werden, Zellen in der Zellkultur zu transfizieren. Für die Virosomen-vermittelte Transfektion verschiedener Zelltypen wurden Aliquots einer Virosomenpräparation eingesetzt. Neben primären Endothelzellen, den PAEC (porcine aortic endothelial cells) wurden eine endotheliale Zelllinie, Ea.hy926-Zellen, COS-7-Zellen, HepG2-Zellen und NIH3T3-Zellen mit den rekonstituierten Sendai-Virosomen transfiziert (Abb.10). Dabei wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet: zum einen pSCMV-iNOS, das für die murine induzierbare NO-Synthase kodiert, zum anderen pSgeo, das das Gen für eine β -Galaktosidase trägt. So konnten zwei verschiedene Nachweismöglichkeiten für ein erfolgreiches Transfektionsereignis genutzt werden. Eine erfolgreiche Transfektion mit dem Plasmid pSgeo wurde mit Hilfe einer β -Galaktosidasefärbung nachgewiesen.

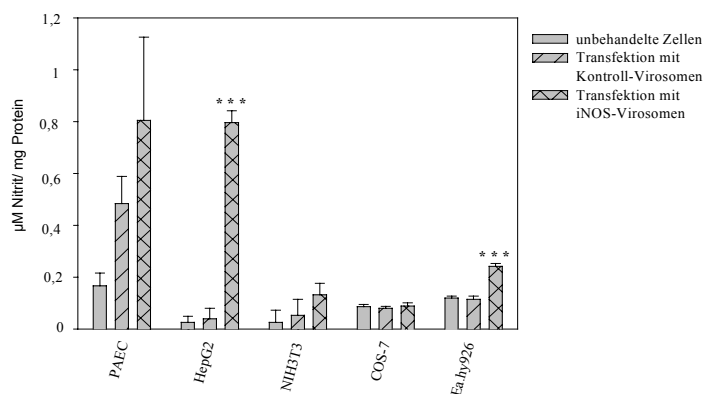


Abb.10: Transfektion verschiedener Zelltypen mit rekonstituierten Sendai-Virosomen. Gemessen wurde die Nitritakkumulation im Medium 48h nach der Transfektion mit Kontroll-Virosomen (enthalten pSgeo) und den i-NOS-Virosomen (enthalten pSCMV-iNOS). Die statistische Auswertung vergleicht dabei die Transfektion mit Kontroll-Virosomen mit der Transfektion mit i-NOS-Virosomen für jeden Zelltyp. Die abgebildeten Werte sind die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

Die PAEC zeigten sowohl nach Transfektion mit Kontroll-Virosomen (mit pSgeo) als auch durch Virosomen mit dem Plasmid pSCMV-iNOS einen deutlichen Anstieg der NO-Produktion. Dies spricht für eine Stimulation der endogenen e-NOS in diesen primären Endothelzellen durch die Sendai-Virosomen, aber nicht für eine erfolgreiche Transfektion. Bei den HepG2-Zellen und Ea.hy926-Zellen wurde eine signifikante Transfektion durch die Virosomen erreicht, wohingegen durch die Behandlung mit Kontroll-Virosomen keine erhöhte NO-Produktion beobachtet wurde (Abb.10).

Eine β -Galaktosidasefärbung der mit dem Plasmid pSgeo transfizierten Zellen zeigte, daß ca. 0,5% der NIH3T3- und COS-7-Zellen eine positive Färbung aufwiesen. Keine Färbung wurde beobachtet, wenn die Zellen mit dem Plasmid pSCMV-iNOS transfiziert wurden. Die PAEC zeigten keine positive Färbung für die β -Galaktosidase. Die Sendai-Virosomen können demnach Ea.hy926 und HepG2 gut, NIH3T3-Zellen und COS-7-schlecht und die hier verwendeten primären Endothelzellen nicht transfizieren.

5.3. Kationische Peptide

5.3.1. Synthese DNA-kondensierender Peptide

Neben kationischen Liposomen können auch kationische Peptide dazu benutzt werden, DNA zu kondensieren und Zellen zu transfizieren. Die negative Ladung der DNA sollte durch die DNA-bindenden Peptide neutralisiert werden, um eine effiziente Aufnahme über die negativ geladene Plasmamembran der Zielzellen zu erlauben. Zudem sollte eine Komplexierung der DNA die endozytotische Aufnahme in die Zellen erleichtern. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst drei Peptide synthetisiert, die ihrer Aminosäuresequenz entsprechend eine α -helikale Struktur aufweisen müßten. Eine Seite ihrer Helix sollte positiv geladen sein, um an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA binden zu können, die andere Seite der Helix sollte einen hydrophoben Bereich aufweisen, der Wechselwirkungen mit anderen hydrophoben Bereichen anderer Peptide eingehen und so zu einer Kondensierung des Peptid/DNA Komplexes führen sollte (Abb.11).

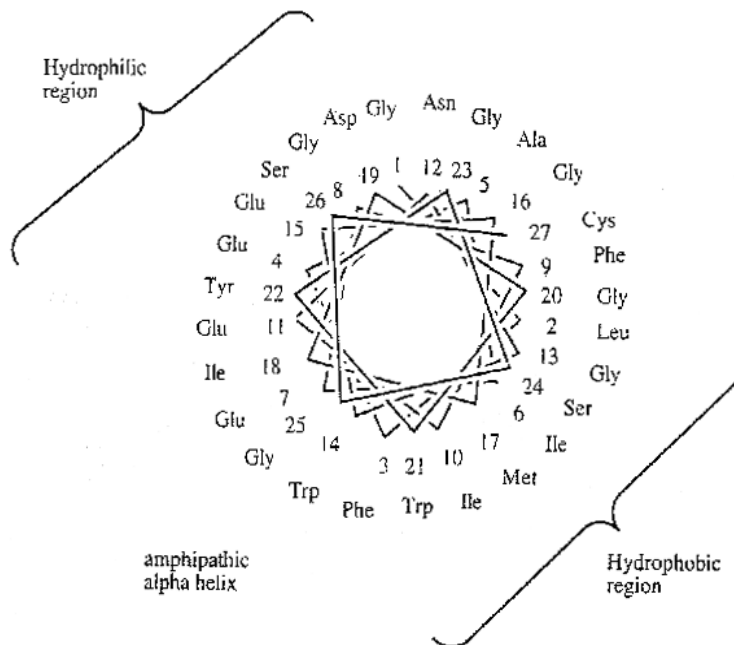


Abb.11: Abbildung einer amphipathischen Peptidhelix, verändert nach Wolfert, M.A. und Seymour, L.W., 1998.

Diese drei Peptide wurden als DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1 bezeichnet (Aminosäuresequenz siehe Material und Methoden). DNAKond1 und DNAKond2 bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne und unterscheiden sich nur in ihrer Kettenlänge: DNAKond1 besteht aus 18 Aminosäuren, während DNAKond2 31 Aminosäuren besitzt; NLSKond1 enthält zusätzlich das Kernlokalisierungssignal des SV40 Virus, um eventuell einen besseren Transport in den Kern zu vermitteln und damit eine höhere Transfektionseffizienz zu erzielen.

Nach der Abspaltung vom Synthescharz wurden die Peptide chromatographisch aufgereinigt, lyophilisiert und auf ihr Molekulargewicht hin untersucht.

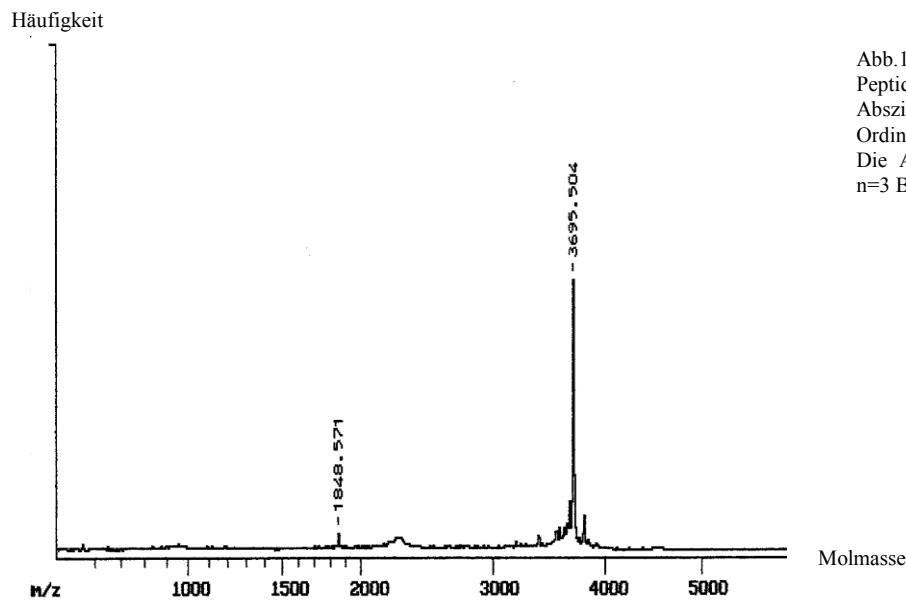


Abb.12: Massenspektrogramm des Peptides DNAKond2. Auf der Abszisse ist die Molmasse, auf der Ordinate die Häufigkeit aufgetragen. Die Abbildung ist repräsentativ für n=3 Bestimmungen.

Das für DNAKond2 berechnete Molekulargewicht betrug 3692Da. Abb. 12 gibt beispielhaft das Ergebnis der Massenspektroskopie des Peptides DNAKond2 wieder. Der Hauptpeak liegt bei 3695D, was im Rahmen der bestimmbaren Massengenauigkeit mit der vorhergesagten Molmasse von DNAKond2 übereinstimmt.

Tabelle 2 gibt einen Vergleich der berechneten Molekulargewichte und der durch Massenspektroskopie bestimmten Molekulargewichte aller drei Peptide wieder.

Tabelle 2: Vergleich berechneter (monoisotopisch M+1) mit gemessenen Molekulargewicht (monoisotopisch) der drei Peptide DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1.

Peptid	berechnetes Molekulargewicht	bestimmtes Molekulargewicht
DNAKond1	2146Da	2060Da
DNAKond2	3692Da	3695Da
NLSKond1	3181Da	3181Da

Die berechneten Molekulargewichte stimmten außer für das Peptid DNAKond1 mit den gemessenen sehr gut überein. Es kann davon ausgegangen werden, daß die korrekten Peptide synthetisiert und aufgereinigt wurden. Auch für DNAKond1, dessen ermitteltes Molekulargewicht deutlich vom berechneten abwich, ergab die Analyse des Syntheseprotokolls, daß das korrekte Peptid synthetisiert wurde.

5.3.2. Synthese Endothel-bindender Peptide

Für die Selektion Endothelzell-bindender Peptide wurde eine Peptid-präsentierende Bakterienbank, FLITRX, benutzt. Die Selektion erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden (1.: PAEC auf Kulturschalen, 2.: denudierte Rattencarotis; siehe medizinische Doktorarbeit Marco Pieper, Düsseldorf; Herrmann et al., 1999). Es wurde beschlossen, ein Peptid der ersten Selektionsmethode mit einem Oligolysinschwanz (PAEC4Lys) zu versehen und weiter zu untersuchen. Bei der zweiten Selektionsmethode wurde ein Klon isoliert, der Homologien zum humanen α -IV-Integrin aufwies, weshalb auch dieses Peptid mit einem Polylysinschwanz (RC36Lys) versehen und weiter untersucht werden sollte. Nachfolgend ist ein Vergleich der Proteinsequenzen von RC36 und dem α -IV-Integrin dargestellt. Gleiche Aminosäuren sind hervorgehoben.

RC36: SQRWTALWQWIG

α _{IV}-Integrin: TKRWSASWQWIG

Als weitere Peptide wurde ein leicht verändertes Endothelin1 (AlaETLys), das spezifisch an den EndothelinB-Rezeptor bindet (Nakamichi et al., 1992) und ein Peptid mit zwei RGD-Motiven (RGDLys) synthetisiert. Nach der Synthese wurden auch diese Peptide chromatographisch aufgereinigt und mittels Massenspektroskopie auf ihre Molmasse untersucht. Tabelle 3 gibt die berechneten Molekulargewichte im Vergleich zu den bestimmten Molekulargewichten wieder.

Tabelle 3: Vergleich der berechneten Molekulargewichte (monoisotopisch M+1) von PAEC4Lys, RC36Lys, AlaETLys und RGDLYs mit den durch Massenspektroskopie (monoisotopisch) bestimmten Molekulargewichten.

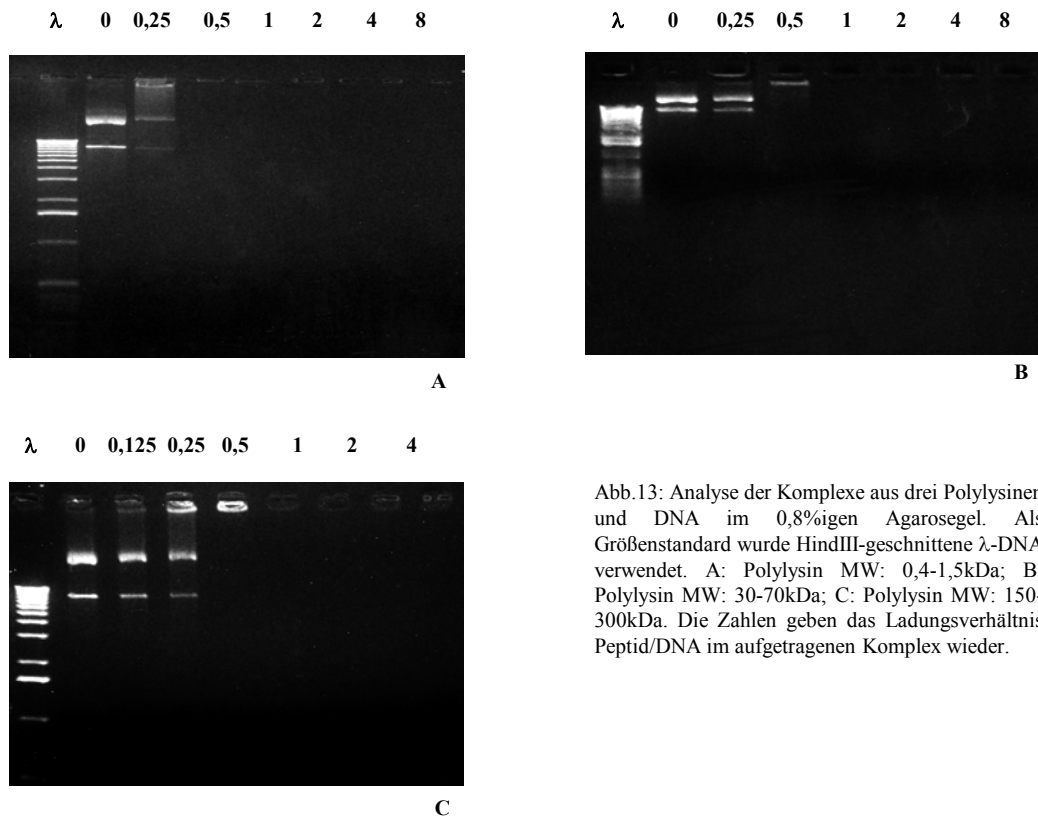
Peptid	berechnete Molmasse	bestimmte Molmasse
PAEC4Lys	3522Da	3521Da
RC36Lys	3750Da	3749Da
AlaETLys	4585Da	4583Da
RGDLys	3739Da	3729Da

Auch bei diesen Peptiden stimmen die berechneten Molekulargewichte mit den gemessenen sehr gut überein. Daher kann auch hier davon ausgegangen werden, daß die korrekten Peptide synthetisiert und aufgereinigt wurden.

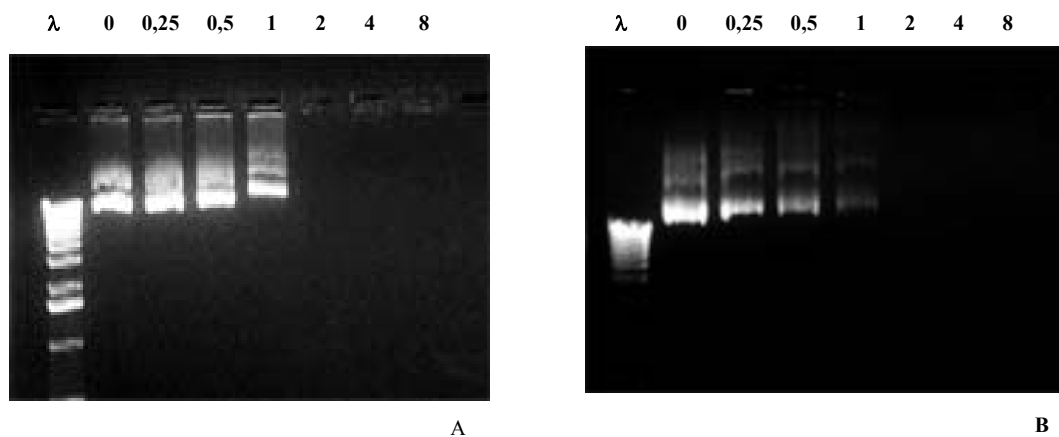
5.3.3. Charakterisierung der DNA/Peptid-Komplexe

5.3.3.1. Retardation im Agarosegel

Durch Bindung der kationischen Peptide an die DNA sollte ein Ladungsausgleich erreicht werden, so daß neutrale Komplexe gebildet werden, deren Laufverhalten im elektrischen Feld im Vergleich zu nicht komplexierter DNA verändert sein sollte. Plasmid-DNA wurde mit den drei kationischen Peptiden DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1 in unterschiedlichen Ladungsverhältnissen inkubiert, wobei nur die Ladung der DNA-bindenden Funktion und nicht die des Gesamtpeptides berücksichtigt wurde. Danach wurden die Peptid/DNA-Proben auf einem 0,8%igen Agarosegel analysiert. Dabei diente unkomplexierte Plasmid-DNA als Kontrolle. Weiter wurden Komplexe aus verschieden großen Polylysinen mit der gleichen DNA synthetisiert und ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt (Abb.13).



Bei allen Polylysinen konnte ab einem Ladungsverhältnis von 0,5 keine DNA mehr detektiert werden; die Komplexe aus DNA und den drei Peptiden DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1 zeigten ein ähnliches Verhalten (Abb.14).



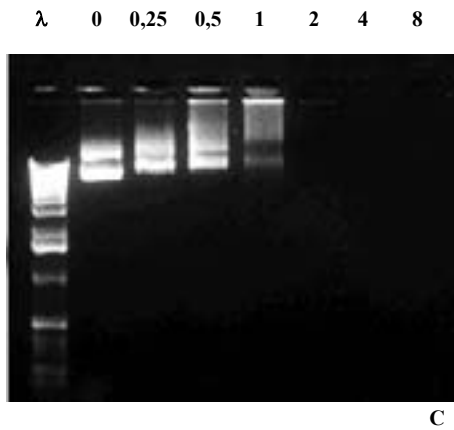
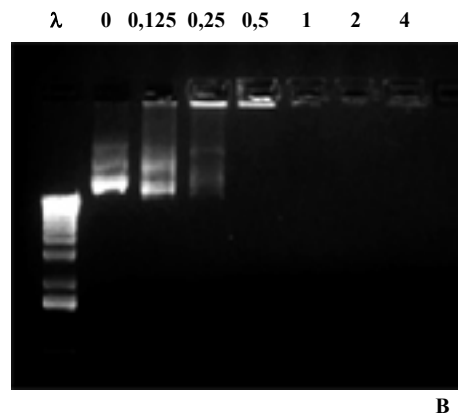
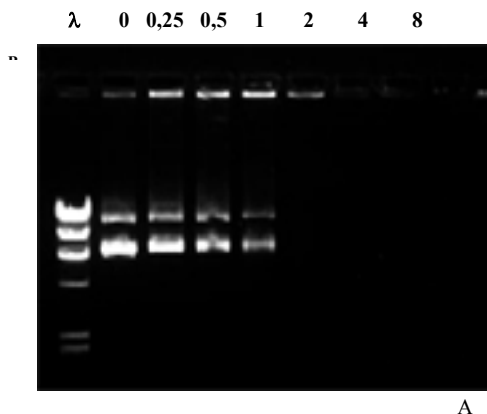


Abb.14: Analyse der Komplexe aus drei kondensierenden Peptiden und DNA im 0,8%igen Agarosegel. Als Größenstandard wurde HindIII-geschchnittene λ -DNA verwendet. A: DNAKond1; B: DNAKond2; C: NLSKond1. Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im aufgetragenen Komplex wieder.

Während die nackte DNA unbeeinflusst blieb, wurde die DNA in den Peptidkomplexen bereits bei Ladungsverhältnissen $\text{Peptid/DNA} > 1$ im Gel retardiert. Ab einem Ladungsverhältnis von zwei kann keine DNA im Agarosegel mehr detektiert werden. Bei PAEC4Lys, RGDlys und RC36Lys konnte bereits ab einem Ladungsverhältnis von 1 keine DNA mehr beobachtet werden, bei AlaETLys bei einem Verhältnis von 2 (Abb. 15). Ab einem bestimmten Ladungsverhältnis Peptid/DNA kann bei allen verwendeten Peptiden keine DNA mehr detektiert werden. Entweder wurden Komplexe aus den Peptiden und DNA gebildet, die zu groß waren, um in das Gel einzuwandern oder die gebildeten Komplexe liefen im elektrischen Feld, waren aber durch das Ethidiumbromid nicht mehr anfärbbar. In beiden Fällen muß eine Wechselwirkung zwischen den Peptiden und der DNA für das veränderte Laufverhalten im Agarosegel verantwortlich sein.



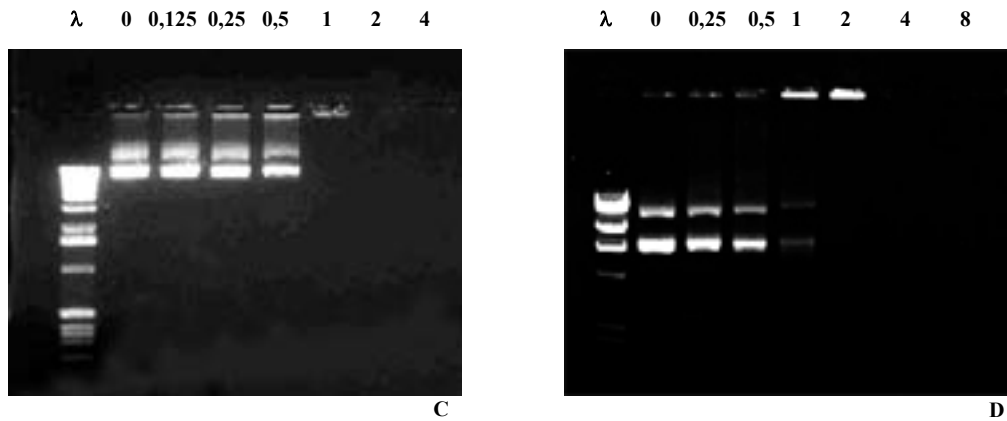


Abb.15: Analyse der Komplexe aus den PAEC-bindenden Peptiden und DNA im 0,8%igen Agarosegel. Als Größenstandard wurde HindIII-geschchnittene λ -DNA verwendet. A: AlaETLys; B: PAEC4Lys; C: RC36Lys; D: RGDlys. Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im aufgetragenen Komplex wieder.

5.3.3.2. Ethidiumbromidverdrängung

Um zu überprüfen, ob die DNA-bindenden Peptide die Wechselwirkung von DNA mit Ethidiumbromid beeinflussen, wurde ein Ethidiumbromid-Verdrängungstest durchgeführt. Dabei wurde DNA mit Ethidiumbromid versetzt, im Fluorometer bei einer Wellenlänge von 516nm angeregt und die Emission bei 598nm gemessen. Die Emission von Ethidiumbromid alleine wurde als 0%, die Emission von DNA mit Ethidiumbromid als 100% definiert. Danach wurden Aliquots einer wässrigen Lösung der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Peptide zu dem DNA/Ethidiumbromid-Gemisch gegeben und die Emission nach jeder Zugabe erneut bestimmt. Als Kontrollen dienten wieder die drei verschiedenen großen Polylysine. Aus Abb. 16 geht deutlich hervor, daß bei Zugabe aller drei Polylysine die Emission des DNA/Ethidiumbromid-Gemisches stark eingeschränkt wurde.

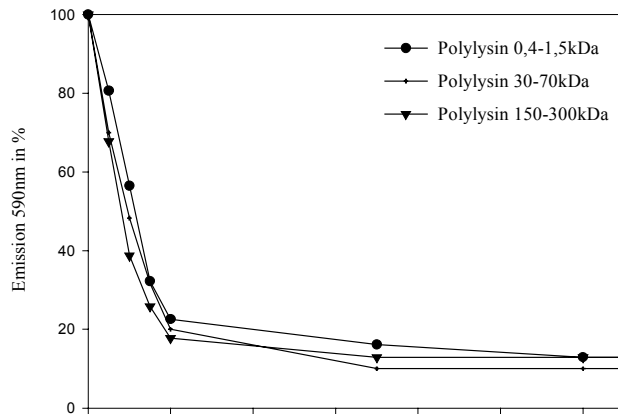


Abb.16: Fluoreszenz der DNA/Ethidiumbromid-Komplexe nach Zugabe von verschiedenen großen Polylysinen. Zunächst wurde DNA in eine Ethidiumbromid-haltige Pufferlösung (pH 7,0; 150mM NaCl) gegeben und die gemessene Emission als 100% definiert. Nach Zugabe verschiedener Mengen dreier Polylysine wurde erneut die Emission gemessen und nach Korrektur um den Verdünnungsfaktor auf den ursprünglichen Wert bezogen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus n=3 Experimenten.

Auch die beiden Peptide DNAKond2 und NLSKond1 schränken bei einer Salzkonzentration von 150mM NaCl die Fluoreszenz des DNA/Ethidiumbromid-Gemisches stark ein (Abb. 17). Anders sah die Emissionskurve für das zugegebene Peptid DNAKond1 aus, es zeigte keinen Einfluß auf die DNA/Ethidiumbromid-Emission. Deshalb wurde untersucht, inwieweit die Ethidiumbromid-Verdrängung aus dem DNA/Ethidiumbromid-Komplex durch die Peptide vom Salzgehalt des Puffers abhängt.

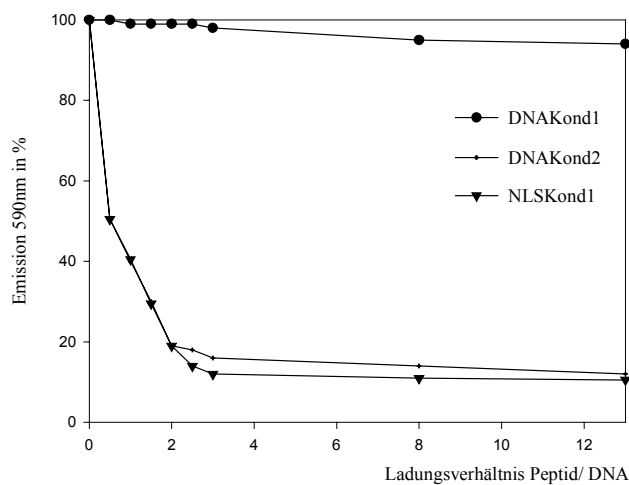


Abb.17: Fluoreszenz der DNA/Ethidiumbromid-Komplexe nach Zugabe von drei DNA-kondensierenden Peptiden bei einer NaCl-Konzentration von 150mM. Sonst wie Abb.16.

Der Einfluß des Peptides DNAKond1 auf die Emission des DNA/Ethidiumbromid-

Gemisches war stark von der Salzkonzentration abhängig (Abb. 18). Für alle anderen Peptide wurden gleiche Emissionskurven auch bei geringeren Salzkonzentrationen oder unterschiedlichen pH-Werten ermittelt (Daten nicht gezeigt).

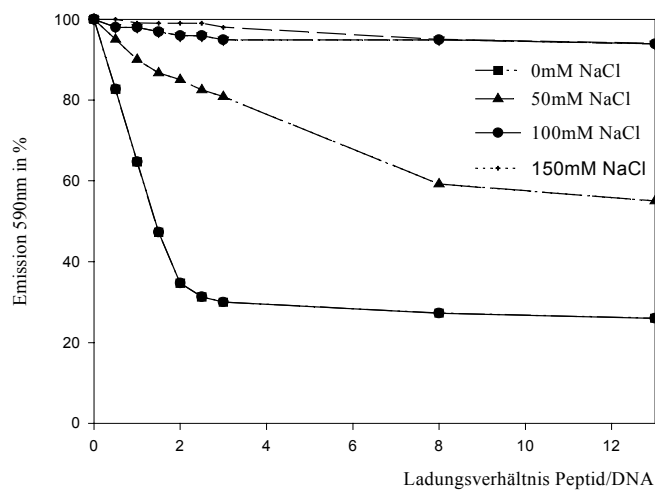


Abb.18: Fluoreszenz des DNA/Ethidiumbromid-Gemisches nach Zugabe von DNAKond1 bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Sonst wie Abb.16.

Die PAEC bindenden Peptide besaßen zusätzlich zu der Zellbindungsfunktion noch einen DNA-bindenden Polylysinschwanz mit dem auch sie die DNA-Ethidiumbromid-Wechselwirkung beeinflussen konnten (Abb. 19).

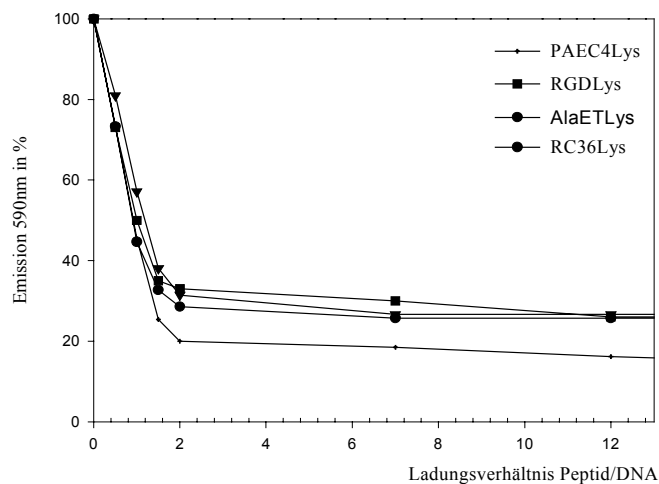


Abb.19: Fluoreszenz des DNA/Ethidiumbromid-Gemisches nach Zugabe der PAEC-bindenden Peptiden. Sonst wie Abb.16.

Um den Einfluß der verschiedenen Peptide auf die Emission des Ethidiumbromid/DNA-Komplexes quantifizieren und vergleichen zu können, wurde der IC_{50} -Wert als das Ladungsverhältnis Peptid/DNA definiert, bei dem die halbmaximale Fluoreszenz auftrat. Tabelle 4 gibt die IC_{50} -Werte der verschiedenen Peptide wieder (Mittelwerte aus $n=3$). Für DNAKond1 wurde der IC_{50} -Wert bei 0mM NaCl bestimmt, für alle anderen Peptide bei 150mM NaCl. Dabei wurde deutlich, daß die beiden DNA-bindenden Peptide DNAKond2 und NLSKond1 die Emission des Ethidiumbromid/DNA-Gemisches am stärksten beeinflussten, wohingegen DNAKond1 und die Peptide mit Oligolysinschwanz einen geringeren Effekt zeigten.

Tabelle 4: IC_{50} -Werte der DNA-bindenden Peptide. Der Wert für DNAKond1 wurde bei 0 mM NaCl bestimmt, alle anderen Werte bei 150 mM NaCl.

Peptid	IC_{50} -Wert
Polylysin klein	1,2
Polylysin mittel	1,0
Polylysin groß	0,9
DNAKond1	1,5
DNAKond2	0,6
NLSKond1	0,6
AlaETLys	1,0
PAECLys	1,2
RC36Lys	1,2
RGDLys	1,1

5.3.3.3. Elektronenmikroskopie der DNA/Peptid-Komplexe

Um beurteilen zu können, ob die untersuchten Peptide mit der DNA Komplexe bilden, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von der nackten DNA und den Peptid/DNA-Gemischen angefertigt. Als Kontrolle wurden erneut die drei verschieden großen Polylysine verwendet. Die Komplexe wurden auf Kohle-beschichtete Kupfer-Netzchen aufgebracht und mit Phosphorwolframsäure kontrastiert. Alle Polylysine bildeten mit der DNA Komplexe (Daten nicht gezeigt). DNAKond1 bildete mit der DNA Komplexe, die etwa 0,5µm groß waren, wohingegen DNAKond2 und NLSKond1 deutlich größere Komplexe bildeten (Abb.20). Die Komplexe aus AlaETLys und DNA waren etwa 2-3µm groß, RC36Lys, RGDlys, PAEC4Lys und bildeten ebenfalls Komplexe, die mit 0,5µm bis 1µm jedoch deutlich kleiner waren.

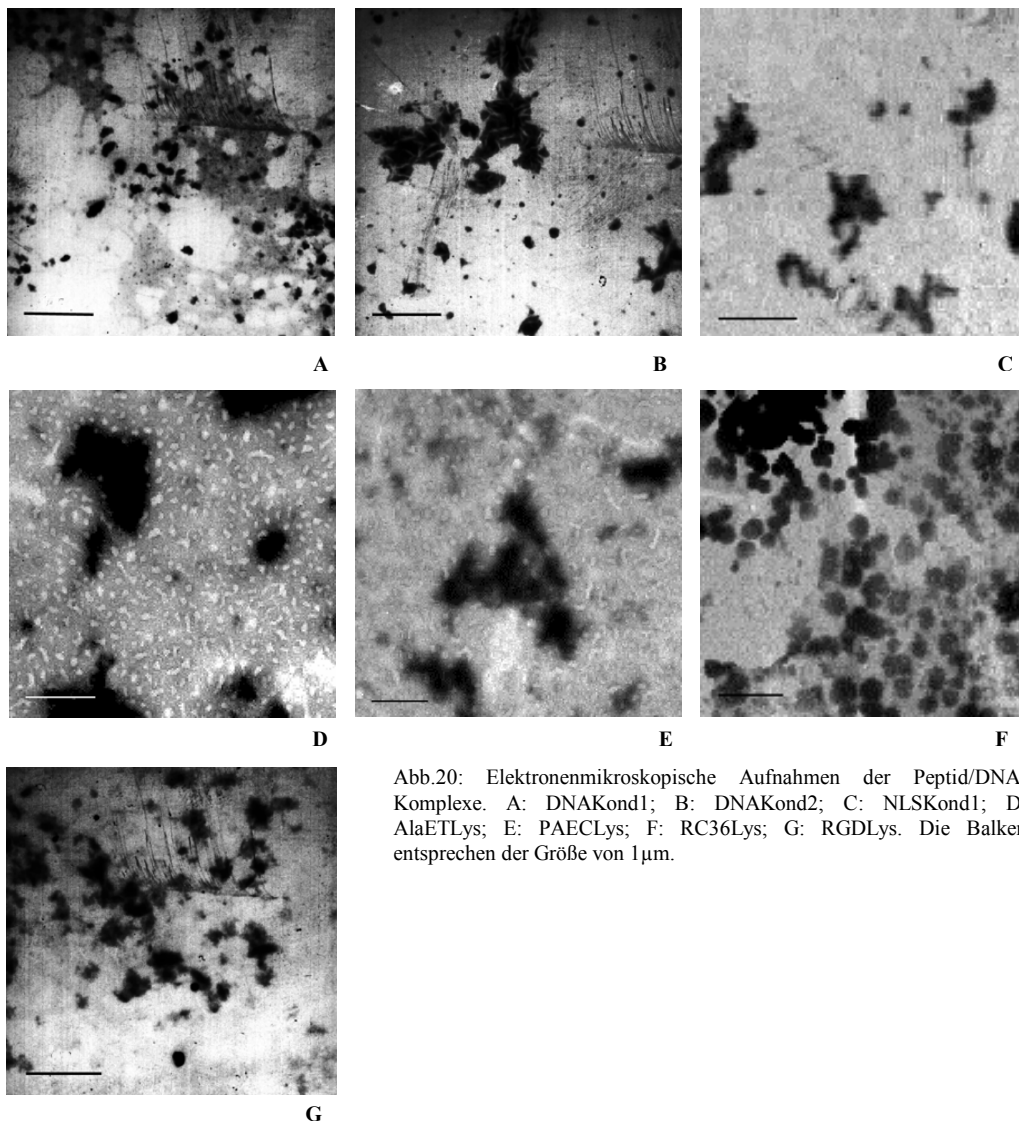


Abb.20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Peptid/DNA-Komplexe. A: DNAKond1; B: DNAKond2; C: NLSKond1; D: AlaETLys; E: PAEC4Lys; F: RC36Lys; G: RGDlys. Die Balken entsprechen der Größe von 1µm.

5.3.3.4. DNase-Schutz der DNA/Peptid-Komplexe

Um die Stärke der Peptid/DNA-Wechselwirkung in den Komplexen zu testen, wurden zunächst wie zuvor Peptid/DNA- Komplexe synthetisiert. Danach wurde die komplexierte DNA der Spaltung durch DNase-I ausgesetzt. Nach SDS-Zugabe wurde die nicht restringierte DNA aus den Komplexen mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion von Protein befreit und auf einem 0,8%igen Agarosegel analysiert. Wieder dienten die drei verschieden großen Polylysine als Kontrolle. Die unkomplexierte Plasmid-DNA wurde im Versuch vollständig degradiert (Abb.21). Das kleine wie das große Polylysin vermittelten einen DNase-Schutz ab einem Ladungsverhältnis von eins, wohingegen das mittelgroße Polylysin ein Ladungsverhältnis von zwei benötigte, um einen Schutz der DNA vor dem degradierenden Enzym zu vermitteln.

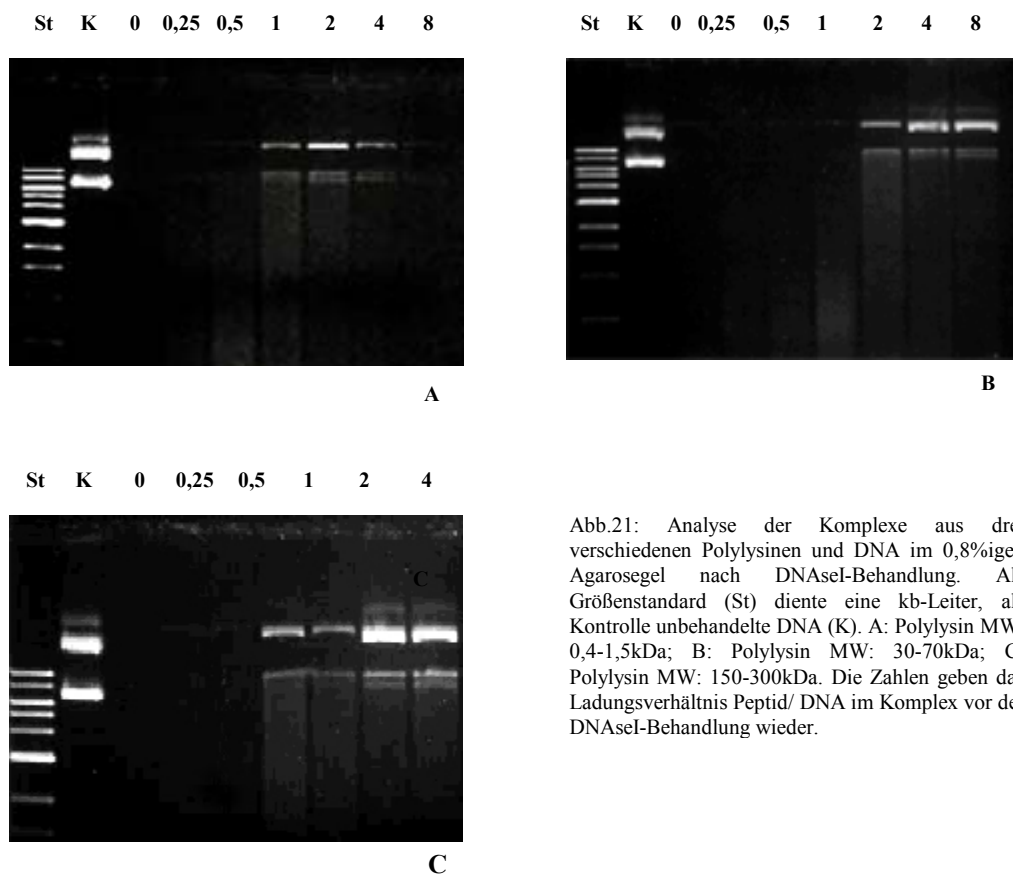


Abb.21: Analyse der Komplexe aus drei verschiedenen Polylysinen und DNA im 0,8%igen Agarosegel nach DNaseI-Behandlung. Als Größenstandard (St) diente eine kb-Leiter, als Kontrolle unbehandelte DNA (K). A: Polylysin MW: 0,4-1,5kDa; B: Polylysin MW: 30-70kDa; C: Polylysin MW: 150-300kDa. Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/ DNA im Komplex vor der DNaseI-Behandlung wieder.

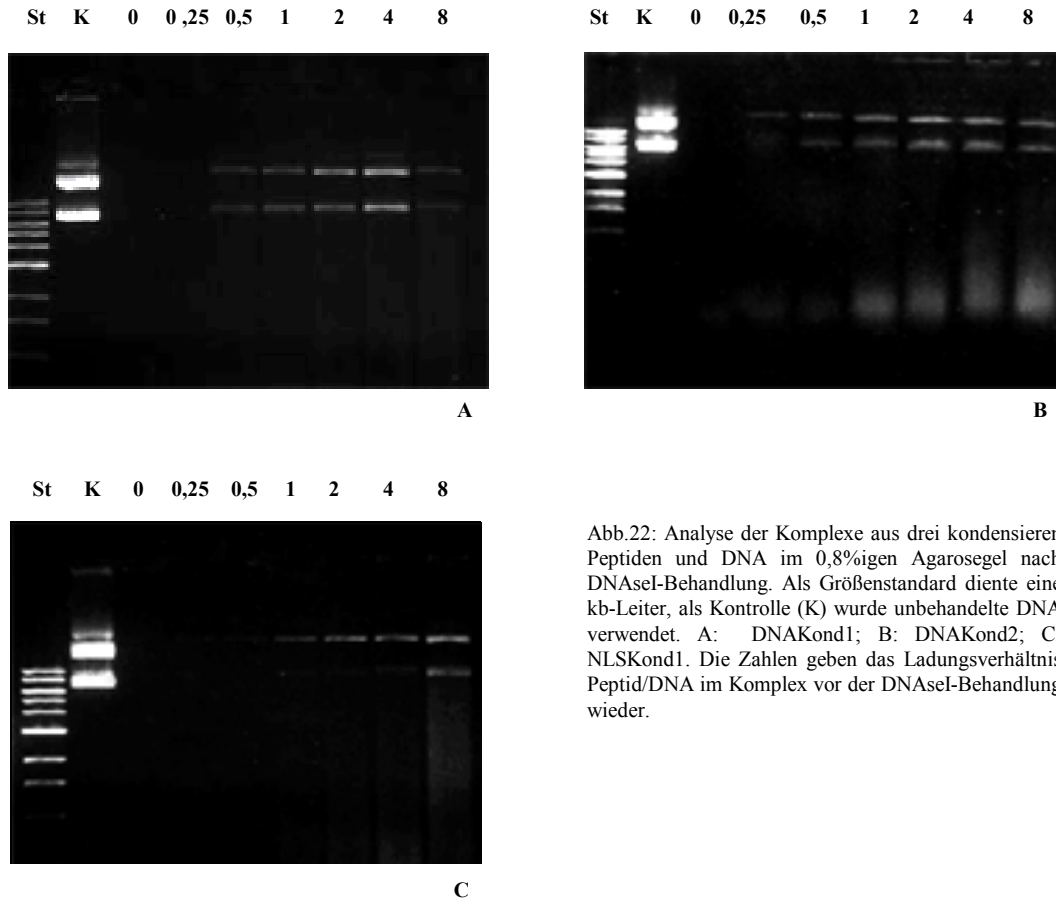


Abb.22: Analyse der Komplexe aus drei kondensieren Peptiden und DNA im 0,8%igen Agarosegel nach DNaseI-Behandlung. Als Größenstandard diente eine kb-Leiter, als Kontrolle (K) wurde unbehandelte DNA verwendet. A: DNAKond1; B: DNAKond2; C: NLSKond1. Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im Komplex vor der DNaseI-Behandlung wieder.

Auch die drei DNA-bindenden Peptide DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1 konnten einen deutlichen Schutz der DNA vor der DNase-I Hydrolyse vermitteln (Abb.22). DNAKond2 vermittelt bereits ab einem Ladungsverhältnis von 0,25 einen Schutz. Die DNA/Peptid-Komplexe mit NLSKond1 wiesen dagegen erst ab einem Ladungsverhältnis von 1 einen effektiven DNase-Schutz auf, wohingegen die Komplexe aus DNAKond1 und DNA bei Ladungsverhältnissen von 2 und 4 den größten Schutz der DNA zeigten. Die Peptide mit dem Polylysinschwanz RGDlys, PAEC4Lys, AlaETLys und RC36Lys zeigten ebenfalls die Eigenschaft, DNA im Komplex vor dem Angriff durch DNase zu schützen (Abb. 23). Während für RGDlys und PAEC4Lys erst ab einem Ladungsverhältnis von 2 ein deutlicher Schutz der DNA auftrat, kam es bei dem Peptid AlaETLys schon ab einem Verhältnis von eins zu einem DNase Schutz der DNA im Komplex.

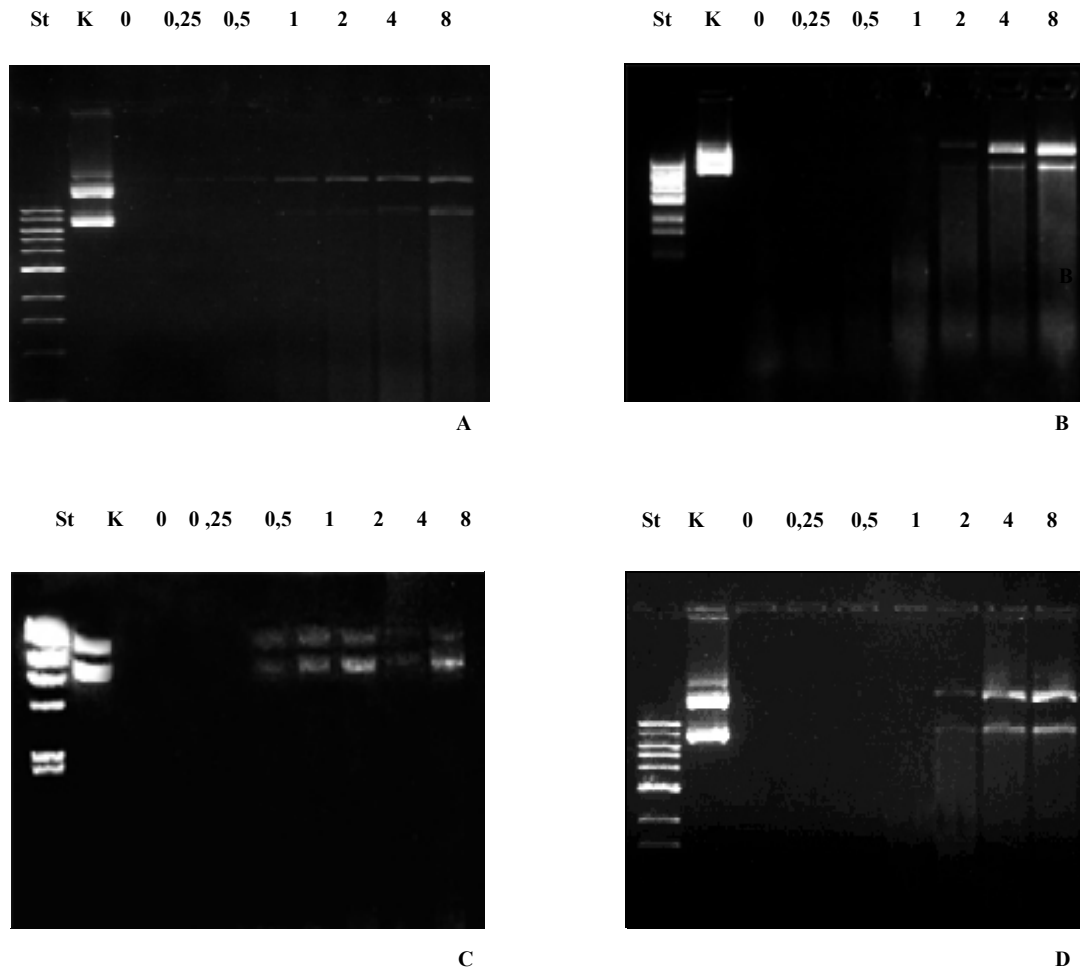


Abb.23: Analyse der Komplexe aus den PAEC-bindenden Peptiden und DNA im 0,8%igen Agarosegel nach DNaseI-Behandlung. Als Größenstandard (St) wurde eine kb-Leiter verwendet, als Kontrolle diente unbehandelte DNA (K). A: AlaETLys; B: PAEC4Lys; C: RC36Lys; D: RGDlys. Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im Komplex vor DNaseI-Behandlung wieder.

Die Ergebnisse des Retardationstestes im Agarosegel, die Ethidiumbromid-Verdrängung, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der DNaseI-Schutz-Test der synthetisierten Peptid/DNA-Komplexe zeigen deutlich, daß alle hier verwendeten Peptide in der Lage waren, an DNA zu binden, Komplexe mit der DNA zu bilden, diese zu kondensieren und die DNA in den Komplexen vor dem Angriff durch DNaseI zu schützen.

5.3.4. Transfektionen mit kationischen Peptiden

Nachdem die Komplexbildung der hier untersuchten Peptide mit Plasmid-DNA durch verschiedene Methoden bewiesen worden war, sollten die Komplexe aus kationischen Peptiden und DNA auf ihre Transfektionsfähigkeit *in vitro* getestet werden. Dazu wurden zunächst Komplexe aus DNA und Peptiden synthetisiert. Wie zuvor wurden unterschiedliche Ladungsverhältnisse von Peptid zu DNA benutzt, um zu sehen, ob das Ladungsverhältnis einen Einfluß auf die Transfektionseffizienz besitzt.

Als Kontrolle für Peptide, die eine Transfektion vermitteln können, wurden erneut die drei unterschiedlich großen Polylysine benutzt. Außerdem wurden die Transfektionen jeweils mit oder ohne Chloroquin durchgeführt, um beurteilen zu können, ob die Aufnahme der DNA über Endozytose verläuft. Neben PAEC wurden COS-7-Zellen als nicht-endotheliale Kontrollzellen transfiziert. Bei der Transfektion von COS-7-Zellen mit einem der Polylysin-DNA-Komplexe konnte eine deutliche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von dem Ladungsverhältnis Peptid/DNA auf beobachtet werden (Abb.24): die größte Transfektionseffizienz wurde bei einem Ladungsverhältnis Peptid/DNA von 8 beobachtet. Ohne die Zugabe von Chloroquin konnte keine Transfektion erzielt werden.

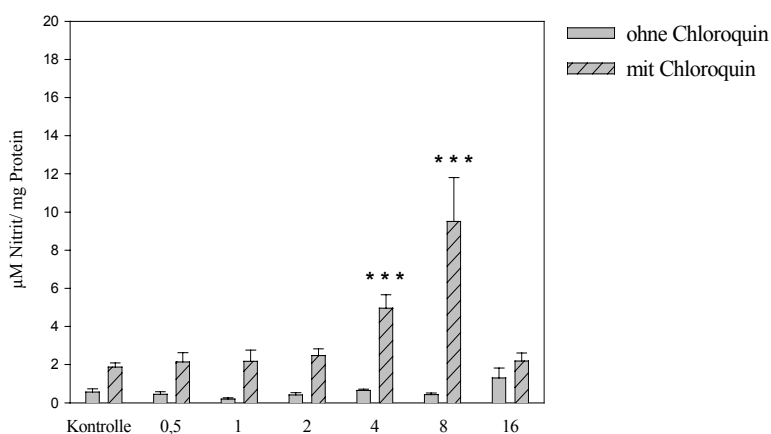


Abb.24: Transfektion von COS-7-Zellen mit Komplexen aus Polylysin (MW: 30-70kDa). Die Zahlen geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im verwendeten Komplex wieder. Die Zellen wurden 16h mit den Komplexen aus DNA und Polylysin in Medium ohne Serum inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches Medium mit Serum ersetzt und die Nitritakkumulation nach 48h bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus n=3 Experimenten dar.

Im folgenden werden nur noch die Ergebnisse dargestellt, die jeweils das optimale Peptid/DNA-Verhältnis für das jeweilige Peptid repräsentieren. Abb. 25 faßt die Ergebnisse der Transfektion von COS-7-Zellen mit den drei Polylysinen zusammen.

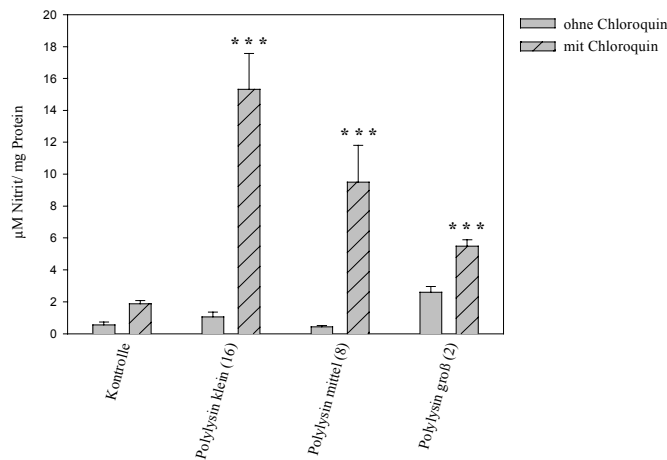


Abb.25: Transfektion von COS-7-Zellen mit Komplexen aus drei verschiedenen Polylysinen (0,4-1,5kDa; 30-70kDa; 150-300kDa). Die Zahlen in Klammern geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im verwendeten Komplex wieder. Die Zellen wurden 16h mit den Komplexen aus DNA und Polylysin in Medium ohne Serum inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches Medium mit Serum ersetzt und die Nitritakkumulation nach 48h bestimmt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

Eine deutliche Transfektion wurde nur mittels des kleinen und mittleren Polylysins bei einem Ladungsverhältnis von 16 bzw. 8 beobachtet. Kürzere Transfektionszeiten (2-6h) führten zu keiner meßbaren Transfektion (Daten nicht gezeigt). Bei den COS-7-Zellen lassen sich durch Transfektion mit den Komplexen aus Plasmid DNA und den Polylysinen NO-Produktionsraten erzielen, die den Kontrollwert um das siebenfache übersteigen. Dabei ist das Polylysin mit dem geringsten Molekulargewicht am besten für die Transfektion von COS-7-Zellen geeignet. Eine Transfektion von PAEC über Nacht (16h Inkubation) mittels Polylysin-kondensierter DNA war kaum erfolgreich (Abb. 26). Mit den Komplexen aus Polylysin und DNA konnte der doppelte Basalwert erzielt werden. Dabei erwies sich das Polylysin mit dem mittleren Molekulargewicht als am ehesten geeignet, die Transfektion von primären Endothelzellen zu vermitteln.

Abb. 27 gibt die Ergebnisse der Transfektion von COS-7-Zellen mit den Komplexen aus DNAKond1, DNAKond2, NLSKond1 und DNA nach einer Übernachtinkubation der Zellen mit den Komplexen wieder. Wie deutlich zu sehen ist, konnte DNAKond1 keine Transfektion der COS-7-Zellen vermitteln, wohingegen DNAKond2 und NLSKond1 zu einer Transfektion der COS-Zellen bei Behandlung mit Chloroquin führten.

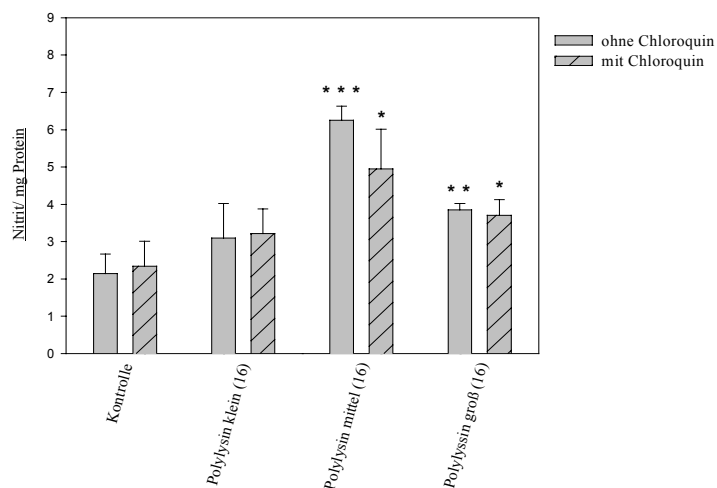


Abb.26: Transfektion von PAEC mit Komplexen aus drei verschiedenen großen Polylysinen (0,4-1,5kDa; 30-70kDa; 150-300kDa) und DNA. Gemessen wurde die Nitritakkumulation 48h nach der Transfektion. Die Zahlen in Klammern geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im Transfektions-Komplex wieder. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

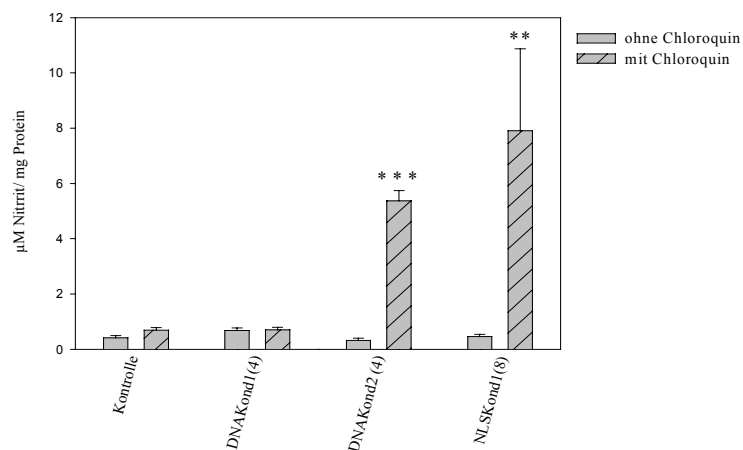


Abb. 27: Transfektion von COS-7-Zellen mit Komplexen aus DNA und den DNA-bindenden Peptiden DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1. Die Zahlen in Klammern geben das Ladungsverhältnis Peptid/DNA im verwendeten Transfektions-Komplex wieder. Gemessen wurde die Nitritakkumulation 48h nach der Transfektion. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

Bei kürzeren Inkubationszeiten (2-8h) mit den Peptid/DNA-Komplexe konnten keine Transfektionen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Übernachtbehandlung von PAEC traten bei allen drei Komplexen Transfektionen auf, unabhängig davon, ob mit Chloroquin behandelt wurde oder nicht (Abb.28). DNAKond1 führt wie bei den COS-7-Zellen zu keiner Steigerung des basalen NO-Spiegels, wohingegen sowohl DNAKond2 als auch NLSKond1-Komplexe zu einer deutlichen Transfektion der PAEC führten.

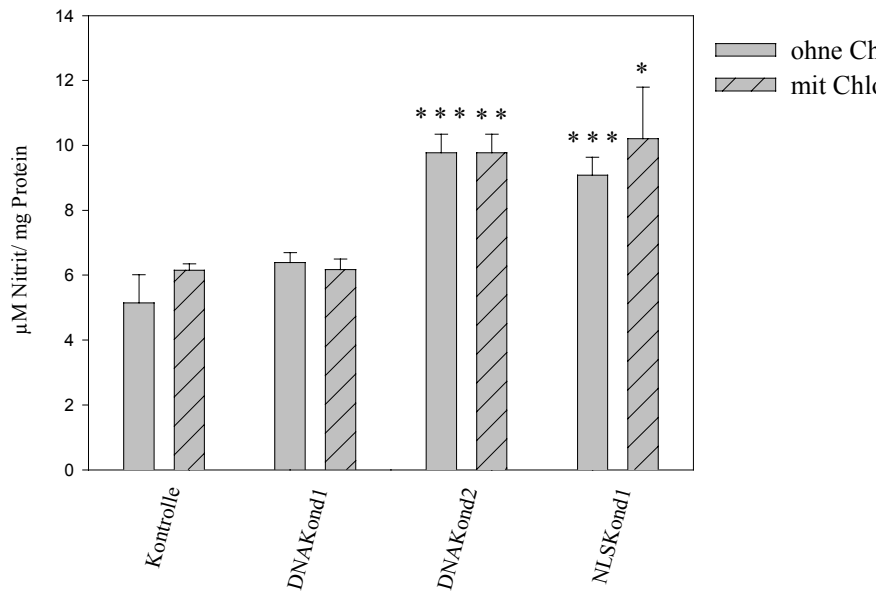


Abb. 28: Transfektion von PAEC mit Komplexen aus DNA und den DNA-bindenden Peptiden DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1. Es wurden die gleichen Ladungsverhältnisse Peptid/DNA wie bei der Transfektion von COS-7-Zellen verwendet (siehe Abb.27). Die Nitritakkumulation wurde 48h nach der Transfektion gemessen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

5.3.5. Transfektionen mit PAEC-bindenden Peptiden

Auch die Komplexe aus AlaETLys, PAEC4Lys, RC36Lys, RGDlys und DNA sollten dahingehend getestet werden, ob sie Transfektionen von PAEC vermitteln können. Dazu wurden wie oben Komplexe unterschiedlicher Ladungsverhältnisse von Peptid/DNA synthetisiert und für unterschiedliche Zeiten auf den Zellen belassen. In den Abbildungen sind jeweils nur die Ladungsverhältnisse mit den besten Transfektionseffizienzen wiedergegeben.

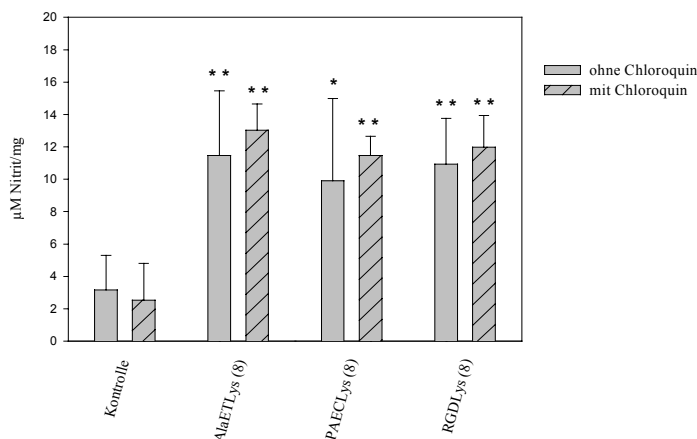


Abb.29: Transfektion von PAEC mit PAEC-bindenden Peptiden. Die Zahlen in Klammern repräsentieren das Ladungsverhältnis Peptid/DNA. Die Nitritakkumulation wurde 48h nach der Transfektion bestimmt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

Bei dem Ansatz für die Transfektion mit den Komplexen aus RC36Lys und DNA wurden die PAEC vor der Transfektion mit Entzündungsmediatoren stimuliert (siehe Material und Methoden 4.4.7), um den mutmaßlichen Rezeptor für das Peptid verstärkt zu exprimieren. Die PAEC konnten durch Peptid/DNA-Komplexe aus AlaETLys, PAECLys und RGDlys und DNA sowohl mit als auch ohne Chloroquin transfiziert werden (Abb.28). Dabei wurde mit allen Komplexen etwa der vierfache Kontrollwert erreicht. RC36Lys-Komplexe vermittelten keine Transfektion, unabhängig davon, ob die Zellen vorher mit Entzündungsmediatoren stimuliert worden waren oder nicht (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten COS-7-Zellen und PAEC-Zellen unterschiedliches Verhalten im Hinblick auf die Transfektionen mit oder ohne Chloroquin. Während COS-7-Zellen sich nur in Gegenwart von Chloroquin mit Peptid/DNA-Komplexen transfizieren ließen, spielte das Chloroquin bei der Transfektion von PAEC hier keine Rolle.

5.3.6. Zytotoxizität der Peptid/DNA-Komplexe

Obwohl die durch die Peptid/DNA-Komplexe erzielte Transfektionseffizienz niedrig war, sollte diese Methode auf ihre Zytotoxizität in bezug auf primäre Endothelzellen getestet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die benutzten Peptid/DNA-Komplexe weniger zytotoxisch sind als die verwendeten kationischen Liposomen. PAEC wurden über Nacht mit den Komplexen aus den DNA-bindenden Peptiden und der DNA inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit den Lipoplexen aus der gleichen DNA und den kationischen Peptiden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und die überlebenden Zellen als Maß für die Zytotoxizität der Transfektionsmethode ausgezählt (Abb.29).

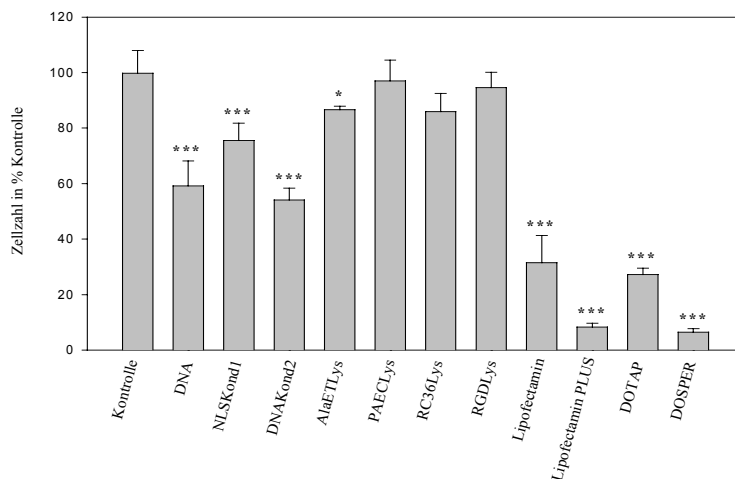


Abb.29: Zellzahlbestimmung nach über-Nacht (16h) Inkubation von PAEC mit den verschiedenen Transfektionsreagenzien. Die Zellen wurden trypsinisiert und jeweils drei mal gezählt.

Die kationischen Liposomen, die vorher zu einer Transfektion von PAEC geführt hatten, waren extrem zytotoxisch. Dabei wurde für Lipofectamin PLUS mit 7% und DOSPER mit 6% die geringste Überlebensrate bestimmt; DOTAP und Lipofectamin lagen in der Zytotoxizität deutlich darunter. Die Komplexe aus den verwendeten Peptiden mit DNA zeigten keine oder, wie für DNAKond2 mit etwa 60% überlebender Zellen nur geringe Zytotoxizität.

5.5.4. Transfektionen mit Peptiden und kationischen Liposomen

In diesem Ansatz sollte getestet werden, ob durch die Kombination aus der Lipofektion und der Transfektion mit kationischen Peptiden eine Steigerung der Transfektionseffizienz erzielt werden kann. Dazu wurde die DNA zunächst mit jeweils zwei verschiedenen Mengen an Peptid (Ladungsverhältnis 0,5 und 0,25) für 15min inkubiert. Danach wurde Lipofectamin hinzugefügt und sowohl COS-7-Zellen als auch PAEC mit diesem Polyplex aus DNA, Peptid und kationischem Lipid für verschiedene Zeiten inkubiert. Bei Verwendung der geringeren Mengen an DNA-kondensierenden Peptiden (Ladungsverhältnis Peptid/DNA 0,25) wurde sowohl für COS-7-Zellen als auch für PAEC keine Steigerung der Transfektionseffizienz im Vergleich zu Lipofectamin beobachtet (Daten nicht gezeigt).

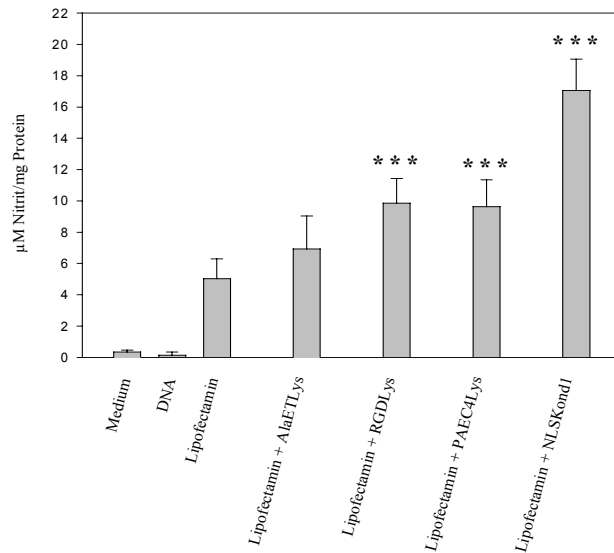


Abb.30: Transfektion von COS-7-Zellen mit Lipofectamin und kationischen Peptiden. 5µg DNA wurden zunächst mit den kationischen Peptiden (Ladungsverhältnis Peptid/DNA 0,5) für 15min inkubiert. Danach wurde 5µl Lipofectamin zu dem Ansatz gegeben und erneut 15min inkubiert. Der Polyplex wurde für 3h mit den Zellen inkubiert und dann das Medium erneuert. Die Bestimmung des akkumulierten Nitrits erfolgte nach 48h. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus n=3 Experimenten.

Wurden die Peptide PAEC4LYs, RGDLYs oder NLSKond1 verwendet, so konnten Steigerungen der Transfektionseffizienz von COS-7-Zellen im Vergleich zu Lipofectamin bis auf das dreifache erzielt werden (Abb.30). AlaETLys führte zu keiner Steigerung der Transfektionseffizienz. Keines der verwendeten Peptide führte zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz von PAEC im Vergleich zu Lipofectamin (Abb.31). Bei der Verwendung von RGDLYs, RC36LYs und NLSKond1 konnte eine signifikante Hemmung der Transfektion im Vergleich zu Lipofectamin allein beobachtet werden (Abb.31).

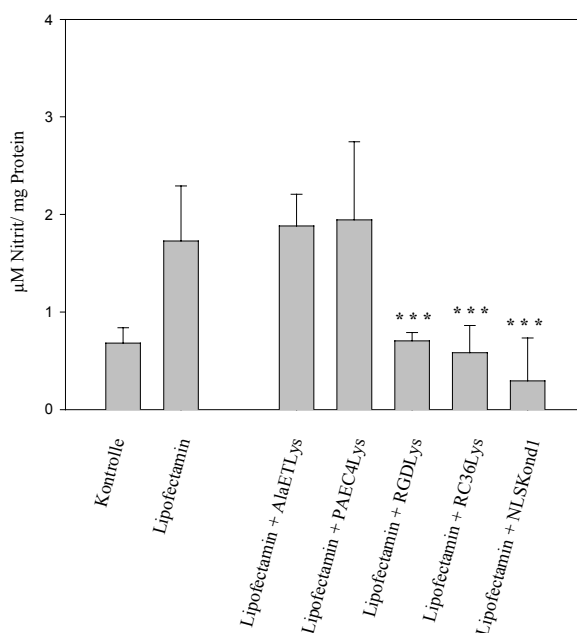


Abb.31: Transfektion von PAEC mit Lipofectamin und kationischen Peptiden. Die Polyplexe wurden wie bei Transfektion von COS-7-Zellen (Abb.30) hergestellt und die Transfektion ebenso durchgeführt.

6. Diskussion

6.1. Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nicht-virale Verfahren zu untersuchen, mit denen Endothelzellen möglichst effizient bei geringer Zytotoxizität zu transfizieren. Bislang konnten mit herkömmlichen Methoden wie CaPo_4 , DEAE-Dextran und Elektroporation maximal 1% primärer Endothelzellen bzw. 2% einer endothelialen Zelllinie transfiziert werden (Teifel et al., 1997). Takeshita et al. erzielten durch die Verwendung des kationischen Lipids Lipofectamin Transfektionseffizienzen, die unter 1% in bezug auf Endothelzellen lagen (Takeshita et al., 1994). Andere kationische Liposomen wurden bislang nicht für die Transfektion von Endothelzellen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere kationische Liposomen und andere liposomale Transfektionsmethoden für die genetische Veränderung von Endothelzellen getestet. Außerdem wurden verschiedene kationische Peptide für die Transfektion von Endothelzellen verwendet.

6.2. Transfektion von Endothelzellen mit kationischen Liposomen

Verschiedene kationische Liposomen wurden in der vorliegenden Arbeit daraufhin getestet, primäre Endothelzellen *in vitro* zu transfizieren. Während DAC-30 und Fugene keine Transfektion vermitteln, wurden mit Lipofectamin, Lipofectamin Plus, DOSPER und DOTAP primäre Endothelzellen (PAEC) transfiziert. Dabei konnte mit Lipofectamin PLUS eine Steigerung der Effizienz im Vergleich zu Lipofectamin auf das 1,5 fache erzielt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielte Transfektionseffizienz liegt damit bei etwa 1,5% transfizierter Endothelzellen. DOSPER, DOTAP waren ebenfalls in der Lage, eine signifikante Transfektion zu vermitteln. Die Transfektionseffizienz der verwendeten kationischen Liposomen stieg *in vitro* mit ihrer Zytotoxizität für die primären Endothelzellen an. Bei Verwendung eines Gemisches aus γ -AP-DLRIE (einem weiteren kationischen Lipid) und DOPE wurden bis zu 20% humaner Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) transfiziert (Tanner et al., 1997). Widersprüchlich bei dieser Arbeit ist, daß bei

der Verwendung des gleichen Plasmides mit zwei unterschiedlichen Promotoren (CMV-Promotor bzw. RSV-Promotor) sehr unterschiedliche Transfektionseffizienzen erzielt wurden (20% gegenüber 0,07%). (Eine Erklärung für diese Unterschiede wird von den Autoren nicht gegeben. Möglicherweise spielt eine erhöhte Mortalitätsrate der mit dem RSV-Promotor transfizierten Zellen eine Rolle). Die gleiche Arbeitsgruppe erzielte bis zu 60% transfizierte Zellen, wenn ein Gemisch von DOPE und DOGS verwendet wurde (Thierry et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Transfektionseffizienzen können neben der Art des verwendeten kationischen Lipides andere Gründe haben: so ist die Fusion kationischer Liposomen von der Ladung der Targetmembran, also hier der Plasmamembran der Endothelzellen, abhängig. Aber auch der Anteil der gesättigten Fettsäuren und der Cholesteringehalt in der Plasmamembran der transfizierten Zellen spielt eine wichtige Rolle (Bailey, A.L. und Cullis, P.R., 1996). Da in der vorliegenden Arbeit Endothelzellen aus der Schweineaorta und keine HUVECs verwendet wurden, könnten die Unterschiede in den Transfektionseffizienzen darin begründet sein.

6.3. Transfektion von Endothelzellen mit Virosomen

Virosomen sind Liposomen, die in ihrer Hülle virale Oberflächenproteine tragen. Mit Hilfe dieser viralen Proteine sollte eine Bindung an die natürlichen viralen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und eine nachfolgende Fusion mit der Plasmamembran (oder nach endozytotischer Aufnahme mit der Endosommembran) der Zelle erfolgen. Enthalten die Virosomen hydrophile Substanzen wie zum Beispiel DNA, so werden diese bei der Fusion der Virosomen in das Zytoplasma der Zellen entlassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus zwei verschiedenen Viren für eine nachfolgende Rekonstitution in Virosomen aufgereinigt. Zum einen wurde das Marburg-Glykoprotein, das das einzige Oberflächenprotein des *Marburg Virus* ist, in Zellkultur exprimiert und die beiden Proteine F und HN des *Sendai Virus*, da bei diesem keine Humanpathogenität besteht, aus intakten Viren isoliert und rekonstituiert.

Welche Zellen für die Expression des Marburg-Glykoproteins geeignet sind, war bislang nicht bekannt. Aufgrund der sonst guten Expression von rekombinanten Proteinen wurden zunächst COS-7-Zellen mit dem Gen für das Marburg-Glykoprotein unter einem starken Promotor („Adeno-Late-Promotor“) transfiziert. Sowohl das aus intakten Viren isolierte,

als auch das in COS-7-Zellen exprimierte Protein zeigten im Polyacrylamidgel eine starke Glykosylierung. Das in COS-7-Zellen exprimierte Protein wich in seiner Größe von der des Proteins aus intaktem Virus ab, was auf eine abweichende Glykosylierung durch die COS-7-Zellen schließen läßt. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß COS-7-Zellen ein anderes Glykosylierungsmuster zeigen als E6-Zellen, die Zellen, in denen das Virus zuvor vermehrt worden war. In CV-1-Zellen, der Vorläuferzelllinie von COS-7-Zellen, werden im Gegensatz zu E6-Zellen terminale Sialinsäurereste in einer $\alpha(2-3)$ Verknüpfung verbunden (Feldmann et al., 1993). Um größere Mengen des Marburg-Glykoproteines gewinnen zu können, wurde ein weiteres Expressionssystem getestet. Dazu wurden BHK-21-Zellen mit *in vitro* transkribierter mRNA des Marburg-Glykoproteines transfiziert. Wie bei E6- und COS-7-Zellen handelt es sich bei den BHK-21-Zellen um eine Nierenzelllinie. Neben einer glykosylierten Form (170kDa) wurde hier auch ein kleineres Protein mit ca. 100kDa nachgewiesen, bei dem es sich möglicherweise um eine weniger glykosylierte Form des Glykoproteines handelt. Das größere Protein zeigte das gleiche Molekulargewicht (und eine ähnliche Größenvarianz) wie das funktionale Protein aus E6-Zellen. BHK-21-Zellen oder E6-Zellen scheinen demnach für die Produktion des viralen Glykoproteines in Zellkultur geeigneter zu sein als COS-7-Zellen. Die Menge des synthetisierten Proteines reichte mit $2\mu\text{g}/10^7$ Zellen jedoch nicht aus, um es zu reinigen und in Virosomen zu rekonstituieren.

Größere Mengen an viralen Proteinen können gewonnen werden, wenn sie direkt aus intakten Virionen isoliert werden. Dazu wurde ein anderes Virus, das *Sendai Virus*, für die Isolierung viraler Proteine herangezogen. Sendai Viren wurden in bebrüteten Hühnereiern vermehrt und danach zusammen mit der Chorionallantoisflüssigkeit geerntet. Der mittels HAU-Test bestimmte Virustiter lag zwischen 1000 und 2000HAU/ml, was gut mit den von Toister bestimmten Virustitern übereinstimmte (Toister, Z. und Loyter, A., 1973). Die beiden viralen Proteine F und HN wurden aufgereinigt und danach in Virosomen rekonstituiert. Etwa 80% der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge und ca. 30% der eingesetzten hämagglutinierenden Aktivität konnte in den Virosomen nachgewiesen werden. Etwa 5% der bei der Rekonstitution eingesetzten Plasmid-DNA wurde in der vorliegenden Arbeit in die Virosomen eingeschlossen, wohingegen Ramani et al. etwa 7% der eingesetzten DNA in ihre Virosomen einschließen konnten (Ramani et al., 1997). Ein Fusionstest mit fluoreszierenden Phospholipiden zeigte, daß die rekonstituierten Virosomen mit Liposomen aus Phosphatidylcholin, Cholesterin, Rhodamin-Lissamin-Phosphatidyl-

ethanolamin und dem Gangliosid G_{D1a} fusionieren können.

Den beschriebenen Ergebnissen zufolge wurden Virosomen rekonstituiert, die aktive Virusproteine in ihrer Phospholipidhülle trugen und Plasmid-DNA in ihrem Inneren eingeschlossen hatten. Diese beiden Eigenschaften stellten die Voraussetzung für eine nachfolgende Transfektion von Zellen in der Zellkultur dar.

Bislang wurden in der Literatur zwei verschiedene Fusionswege für das *Sendai Virus* beschrieben. Die klassische Virusfusion verläuft über die Bindung des HN-Proteins an einen Sendai-Virus-Rezeptor in der Zellmembran der Targetzelle. Dabei bindet das HN-Protein zunächst an einen Sialinsäurerest dieses Rezeptors, danach soll das F₁-Protein Kontakt zur Membran aufnehmen und eine Fusion einleiten. So konnte gezeigt werden, daß das Sendai-Virus über diesen klassischen Mechanismus an NIH3T3-Zellen bindet und diese effizient infiziert (Bitzer et al., 1997). Der andere Fusionsmechanismus verläuft über den Asialoglykorezeptor, der unter anderem auf HepG2-Zellen lokalisiert ist. Das *Sendai Virus* bindet über einen Galaktoserest des F-Proteins an diesen Rezeptor (Bagai, S. und Sakar, D., 1994a). Dieser Prozeß wird, da er nicht wie der „klassische Weg“ über das HN-Protein vermittelt wird, als alternativer Weg bezeichnet. Es wurde gezeigt, daß das Virus nach der Interaktion des F-Proteins mit dem Asialoglykorezeptor zwei Möglichkeiten hat, in die HepG2-Zellen einzudringen: Zum einen über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose, zum anderen über einen aktiven Fusionsprozeß (Bagai, S. und Sarkar, D., 1993b). Ramani et al. zeigten, daß auch die Transfektion von HepG2-Zellen mit rekonstituierten Virosomen unabhängig vom HN-Protein abläuft (Ramani et al., 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten HepG2-Zellen effizient über diesen alternativen Rezeptor transfiziert werden. Das spricht dafür, daß das F-Protein auch nach Einbau in die Virosomenhülle noch eine Bindung an Zellen und eine Fusion mit diesen vermitteln kann.

Die in der vorliegenden Arbeit rekonstituierten Virosomen wurden weiterhin daraufhin getestet, Fusionen mit Zellen über den klassischen *Sendai-Virus*-Rezeptor zu vermitteln. Dazu wurden NIH3T3-Zellen und COS-7-Zellen mit den rekonstituierten Virosomen transfiziert. Die Zellen beider Zelllinien zeigten nur einzelne (durch β -Galaktosidasefärbung nachgewiesene) Transfektionsereignisse. Es bestand folglich ein Widerspruch darin, daß NIH3T3-Zellen zwar vom *Sendai Virus* infiziert, nicht jedoch durch die hier rekonstituierten Virosomen transfiziert werden konnten. Eine Möglichkeit besteht darin, daß das HN-Protein durch die Aufreinigung und Rekonstitution soweit inaktiviert wurde, daß es keine Oberflächenbindung mehr eingehen kann. Dagegen spricht,

daß die rekonstituierten Virosomen in der Lage waren, mit Liposomen, die das Gangliosid G_{D1a} als HN-Rezeptor trugen, zu fusionieren. Außerdem wurde in einem HAU-Test gezeigt, daß die rekonstituierten Virosomen über das HN-Protein an Erythrozyten binden konnten.

Daß die virosomale Transfektion von bestimmten Zelltypen über den klassischen Rezeptor nicht sehr effektiv verläuft, zeigten auch andere Arbeitsgruppen: HVJ-Liposomen, die durch Fusion des inaktivierten Virus mit DNA-haltigen Liposomen hergestellt wurden, transfizierten primäre Endothelzellen bei Administration in einem Aerosol kaum (Yonemitsu et al., 1997). Bei der Gabe von HVJ-Liposomen in der Carotidarterie von Ratten (mit einem Doppellumenkatheter) transfizierten sie die glatten Muskelzellen zu über 80%, die Endothelzellen wurden, trotz guten Kontaktes zu den applizierten HVJ-Liposomen, nur vereinzelt transfiziert (Yonemitsu et al., 1996). Neben glatten Muskelzellen scheinen auch andere Zelltypen wie Leberzellen, Gliomazellen und neuronale Zellen durch HVJ-Liposomen (oder rekonstituierte Virosomen) effizient transfiziert zu werden (Volsky, D.J. und Loyter, A., 1978; Wu et al., 1996, Yonemitsu et al., 1997; Ramani et al., 1997; Mabuchi et al., 1997; respektive).

Neben den bereits beschriebenen Zelltypen wurden eine endotheliale Zelllinie, Ea.hy926, und primäre Endothelzellen (PAEC) untersucht. Die primären Endothelzellen konnten mit den rekonstituierten Virosomen nicht transfiziert werden, wohingegen Ea.hy926-Zellen eine signifikante Transfektion zeigten. Welcher der beiden Fusionswege - der klassische oder der alternative- für die Transfektion der Ea.hy926-Zellen verantwortlich ist, bleibt unklar, da weder ein klassischer Sendai-Rezeptor noch der Asialoglykorezeptor bislang auf diesen Zellen gefunden wurde. Der Unterschied im Verhalten der primären Endothelzellen und der endothelialen Zelllinie könnte darin bestehen, daß es sich bei der Zelllinie um eine Hybridomazelllinie aus menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen und einer Lungenkarzinom-Zelllinie (A549) handelt, sie also zum Teil das Expressionsmuster eines anderen Zelltypus (Lungenparenchymzellen) trägt. Da bei der Transfektion mit Sendai-Virosomen zwei verschiedene Fusionsmechanismen involviert sind, läßt es sich erklären, warum HepG2, nicht aber NIH3T3-Zellen durch die rekonstituierten Virosomen transfiziert werden konnten.

Für eine Transfektion primärer Endothelzellen und eine eventuelle Anwendung in Hinblick auf eine Gentherapie endothelialer Dysfunktionen sind die in der vorliegenden Arbeit rekonstituierten Sendai-Virosomen ungeeignet. Zum einen ließ sich bei den primären

Endothelzellen keine statistisch signifikante Transfektion nachweisen, zum anderen reagierten die Endothelzellen mit einer Steigerung der basalen NO-Produktion auch bei Verwendung von Kontroll-Virosomen, ohne transfiziert zu sein. Ob eine Induktion der induzierbaren oder eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase für diesen Anstieg in der basalen NO-Produktion verantwortlich ist, bleibt abzuklären.

6.4. Kationische Peptide

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei kationischen Peptide DNAKond1, DNAKond2 und NLSKond1 synthetisiert, die mit großer Wahrscheinlichkeit eine α -helikale Struktur aufweisen. Die eine Seite der Helix war positiv geladen, die andere hydrophob. Außerdem wurden vier weitere Peptide (AlaETLys, PAEC4Lys RGDlys und RC36Lys) hergestellt, die eine Endothelzell-Bindefunktion und einen Oligolysinschwanz hatten, um an DNA binden zu können.

Um die Identität der synthetisierten Peptide zu überprüfen, wurden sie mit Hilfe der Massenspektroskopie auf ihre Größe überprüft. Mit Ausnahme des Peptides DNAKond1 stimmten die berechneten Molekulargewichte mit den gemessenen nahezu exakt überein. Daher konnte gefolgert werden, daß die korrekten Peptide synthetisiert wurden, keine falsche Aminosäure eingebaut oder die Peptidkette unterbrochen wurde. Auch für das Peptid DNAKond1 ergab die Analyse des Syntheseprotokolls, daß das korrekte Peptid synthetisiert worden war. Danach wurden die Peptide mit der DNA gemischt und die Komplexbildung von DNA und den synthetisierten Peptiden durch Retardation im Agarosegel, Ethidiumbromidverdrängung, elektronenmikroskopische Aufnahmen und DNase-Schutz nachgewiesen: beim Retardationsexperiment wurde gezeigt, daß alle drei α -helikalen Peptide an DNA banden, Komplexe mit dieser bildeten und die Beweglichkeit der DNA im elektrischen Feld ab einem Ladungsverhältnis von 2:1 Peptid/DNA stark einschränkten. Mit ähnlich strukturierten Peptiden fanden Niidome et al. bereits bei geringeren Ladungsverhältnissen eine Retardation im Agarosegel, zum Teil bereits bei einem Ladungsverhältnis Peptid/DNA unter 1 (Niidome et al., 1997). Das kann, da kein Ladungsausgleich erreicht wurde, nur durch die Bildung großer Komplexe erklärt werden, die nicht mehr in das Agarosegel einwandern konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung von drei verschiedenen großen Polylysinen beobachtet,

die ebenfalls bei einem Ladungsverhältnis unter 1 eine vollständige Retardation der DNA erzielen. Aber auch die Peptide AlaETLys, PAEC4Lys, RC36Lys und RGD4Lys konnten DNA im Komplex im Agarosegel retardieren. Das dabei benötigte Ladungsverhältnis von Peptid/DNA von 1 entspricht einem Ladungsausgleich. Harbottle et al. benötigten bei der Verwendung eines N-terminalen Oligolysins ein doppelt so großes Peptid/DNA-Verhältnis, um die DNA zu retardieren (Harbottle et al., 1998). Da eine Retardation der DNA erst bei vollständigem Ladungsausgleich erzielt wurde, kann geschlossen werden, daß Harbottle et al. kleinere Komplexe synthetisierten als die Komplexe in der vorliegenden Arbeit.

Ein weiterer Nachweis der Komplexbildung erfolgte im Ethidiumbromid-Verdrängungs-Experiment: Durch die Zugabe DNA-bindender Peptide zu präformierten DNA/Ethidiumbromid-Komplexen wurde die Fluoreszenz dieser Komplexe stark eingeschränkt, was durch eine Verdrängung des Ethidiumbromides aus den Komplexen durch die zugefügten Peptide erklärt werden könnte. Dabei diente die Ethidiumbromid-Verdrängung als Maß für die Stabilität der Peptid/DNA-Komplexe. Der IC_{50} -Wert eines Peptides gibt dabei an, bei welchem Ladungsverhältnis Peptid/DNA die Hälfte der maximal möglichen Fluoreszenz gemessen werden kann. Sowohl der IC_{50} -Wert von DNAKond2 als auch NLSKond1 lag bei etwa 0,6 (bei 150mM NaCl), wohingegen DNAKond1 bei der gleichen Salzkonzentration keine Ethidiumbromidverdrängung zeigte. Das deutet auf eine deutliche Abhängigkeit der DNA-Bindung von der Salzkonzentration für DNAKond1 im Gegensatz zu den beiden anderen Peptiden hin. Auch bei 0mM NaCl erzielte DNAKond1 mit etwa 1,5 einen deutlich höheren IC_{50} Wert als die anderen kationischen Peptide. Da sich die beiden Peptide DNAKond1 und DNAKond2 nur durch ihre Länge voneinander unterscheiden, muß geschlossen werden, daß dieser Unterschied für die verschiedene Ethidiumbromidverdrängung und eine unterschiedliche Komplexgröße verantwortlich war. Die IC_{50} -Werte aller Peptide mit Oligolysinschwanz lagen zwischen 1,0 und 1,2, was in etwa denen der Polylysine (0,9 bis 1,2) entsprach. Die hier verwendeten Peptide DNAKond2 und NLSKond1 erreichten den für Protaminsulfat bestimmten Wert von 0,83 (Sorgi et al., 1997) und wiesen demnach eine ähnlich starke Bindung zur DNA auf.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Komplexe aus den Peptiden PAEC4Lys, RC36Lys und dem Peptid DNAKond1 zeigten eine Komplexgröße zwischen 0,6 μ m und 1 μ m, was gut mit anderen Befunden übereinstimmt (Harbottle et al., 1997). Die Komplexe aus den DNA-kondensierenden Peptiden AlaETLys, DNAKond2 und NLSKond1 waren

mit 0,5µm bis 3µm deutlich größer. Das deutet darauf hin, daß diese Peptide in der Lage sind, durch Wechselwirkungen mit weiteren Peptiden größere Aggregate zu bilden. Offensichtlich spielt das Verhältnis der positiv geladenen zur hydrophoben Seite des sogenannte "helical wheels" eine wichtige Rolle. Je größer der hydrophobe Teil des α -helikalen Peptides ist, desto größer werden die Komplexe aus diesem Peptid und DNA. So können Größen bis 2µm erreicht werden (Ohmori et al., 1998). Mit Polyargininen, die keine helikale Struktur und keine hydrophoben Bereiche aufweisen, konnten ebenfalls Komplexe von bis zu 10µm Größe gebildet werden (Emi et al., 1997).

Alle Oligolysine sowie DNAKond2 vermittelten einen DNase-Schutz ab einem Ladungsverhältnis Peptid/DNA von 1,0, das Peptid NLSKond1 bereits bei der Hälfte. Den gleichen Schutz vermittelte das Peptid AlaETLys. Die anderen Peptide mit Oligolysinschwanz benötigten das doppelte Ladungsverhältnis, um einen effizienten Schutz der DNA sicherzustellen. Im allgemeinen scheint die Regel zu bestehen, daß die Peptide, die größere Komplexe bilden, bereits bei geringeren Ladungsverhältnissen Peptid/DNA einen effizienten Schutz der DNA vor dem enzymatischen Abbau im Komplex vermitteln (Emi et al., 1997). Warum das Peptid DNAKond1 auch hier eine Ausnahmrolle einnimmt, bleibt unklar.

Nachdem die Komplexbildung der Peptide mit Plasmid-DNA durch verschiedene Methoden nachgewiesen worden war, wurden die Komplexe daraufhin getestet, Transfektion von COS-7-Zellen und PAEC zu vermitteln. Alle verwendeten Peptid/DNA-Komplexe außer denen mit dem Peptid DNAKond1 und RC36Lys zeigten die Fähigkeit, Zellen *in vitro* zu transfizieren. Dabei wurde deutlich, daß die Transfektionseffizienz stark vom Ladungsverhältnis Peptid/DNA abhing. Emi et al. weisen darauf hin, daß eine Steigerung der Transfektionseffizienz für Komplexe aus Polyarginin und DNA in Abhängigkeit der Komplexgröße auftritt (Emi et al., 1997). Ogris et al. zeigten deutlich, daß der Komplexierungsgrad der DNA vom Ladungsverhältnis kationisches Agenz/DNA abhängt und verantwortlich für die Transfektionseffizienz ist (Ogris et al., 1998). Für COS-7-Zellen konnte die Transfektionseffizienz aller Peptid/DNA-Komplexe durch die Verwendung des lysosomotropen Agens Chloroquin um ein Vielfaches gesteigert werden. Chloroquin verhindert die Ansäuerung des Lysosoms und somit die enzymatische Degradation der aufgenommenen DNA. Außerdem kann es die Peptide aus den Komplexen verdrängen und so die DNA für einen Transport in den Kern vorbereiten (Erbacher et al., 1996).

Die endothelspezifischen Peptide RC36Lys, PAEC4Lys und AlaETLys konnten nur eine sehr geringe Transfektion von PAEC vermitteln. Zumindest der Rezeptor für AlaETLys, der ET-B-Rezeptor, wird auf Endothelzellen exprimiert, weswegen eine deutliche, durch Chloroquin noch verstärkbare, Transfektion erwartet wurde. Cramer et al., zeigten 1998, daß der ET-B-Rezeptor, im Gegensatz zum ET-A-Rezeptor, schnell inaktiviert wird und bereits 5 Minuten nach Stimulation nur noch zu 5% aktiv ist. Außerdem konnte gezeigt werden, daß gebundenes Endothelin zusammen mit dem Rezeptor (Endothelin-A-Rezeptor) internalisiert wird, jedoch schlecht vom Rezeptor dissoziiert (Wu-Wong et al., 1995). Diese beiden Tatsachen können ursächlich für die geringe Transfektionseffizienz sein. Auch mit dem Peptid RGDlys konnten geringe Transfektionen beobachtet werden. Dennoch konnten hier nicht die von anderen Arbeitsgruppen mit einem ähnlichen Peptid beobachteten Transfektionseffizienzen erreicht werden (Hart et al., 1995; Colin et al., 1998). Möglicherweise spielt eine Zyklisierung des RGD-Motivs eine wichtige Rolle bei der Rezeptorerkennung. Hart et al. konnten bei Verwendung von Lipofectin eine Steigerung der Transfektionseffizienz auf das dreifache für COS-7-Zellen bzw. dreißigfache für eine Endothelzelllinie erzielen (Hart et al., 1998).

In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei der Kombination der Peptid-vermittelten Transfektion mit der Lipofektion mit Hilfe von Lipofectamin bei Verwendung des Peptides NLSKond1 eine dreifache Steigerung der Transfektionseffizienz im Vergleich zu Lipofectamin erreicht wird. Bei den primären Endothelzellen PAEC fanden sich ähnliche Transfektionseffizienzen wie mit Lipofectamin PLUS. Interessanterweise sind die Peptid/DNA-Komplexe mit 60-100% überlebenden Zellen nach der Transfektion weniger zytotoxisch als alle verwendeten kationischen Liposomen, bei denen nur zwischen 6% und 20% der Zellen die Transfektion überlebten. Eine Steigerung der Transfektionseffizienz durch Chloroquin wurde bei den PAEC nicht beobachtet. Das deutet auf zwei verschiedene Aufnahmemechanismen für die Peptid/DNA-Komplexe hin: einen, der über das Endosom führt und durch Chloroquin beeinflusst werden kann und einen zweiten, Endosom-unabhängigen.

Bei dem Vergleich der drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transfektionsmethoden „kationische Liposomen“, „kationische Peptide“ und „Virosomen“ sind die letzteren mit dem größten experimentellen Aufwand verbunden. Nach Anzucht der verwendeten *Sendai Viren* in Hühnereiern müssen die viralen Oberflächenproteine aufgereinigt und aufwendig rekonstituiert werden. Sowohl die kationischen Peptide als

auch die kationischen Liposomen sind in ihrer Handhabung wesentlich weniger aufwendig handhabbar, selbst wenn die Peptide vor ihrer Verwendung noch chromatographisch aufgereinigt werden müssen. Zudem müssen für die Rekonstitution von Virosomen große Mengen gereinigter DNA eingesetzt werden, da nur 5% ins Virosomeninnere aufgenommen werden. Ein weiterer Nachteil der virosomalen Transfektionsmethode sind die in dieser Arbeit erzielten niedrigen Transfektionseffizienzen für Endothelzellen. Während die Endothelzelllinie Ea.hy926 nur gering transfiziert wurde, konnten primäre Endothelzellen nicht signifikant transfiziert werden. Im Hinblick auf eine mögliche gentherapeutische Anwendung erscheint dabei eine effiziente Transfektion primärer Endothelzellen als besonders erstrebenswert. Obwohl die erzielten Transfektionseffizienzen von kationischen Liposomen und kationischen Peptiden in der vorliegenden Arbeit etwa vergleichbar sind, weisen die kationischen Peptide gegenüber den Liposomen einen großen Vorteil auf: Sie sind weniger zytotoxisch und könnten daher auch für eine *in vivo* Transfektion eingesetzt werden.

6.5. Ausblick

In dieser Arbeit wurden systematisch verschiedene Strategien untersucht, um Endothelzellen effizient transfizieren zu können. Aus den *in vitro* erzielten Ergebnissen erscheint eine weitere Optimierung der Transfektionseffizienz für die folgenden Strategien möglich:

Für eine effizientere Transfektion mit Hilfe von Virosomen müßte die Bindung an die Endothelzellen verbessert werden. Durch den Einbau membranständiger Antikörper in die Virosomen kann die Bindefunktion des HN-Proteins übernommen werden (Gitman, G.A. und Loyter, A. 1984). Es wäre möglich, endothelspezifische Antikörper oder Liganden in die Membran der rekonstituierten Virosomen einzubauen und so die Oberflächenbindung an die Endothelzellen zu verbessern. Denkbar wären Antikörper gegen spezifisch exprimierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie KDR oder direkt der endothelspezifische Wachstumsfaktor VEGF.

Der größte Nachteil der kationischen Liposomen ist ihre Zytotoxizität. Diese ist von der chemischen Struktur der Komponenten abhängig und könnte durch Verwendung eines anderen kationischen Lipides herabgesetzt werden. Dafür müßten weitere kationische

Liposomen für die Transfektion von Endothelzellen getestet werden.

Für die Verwendung kationischer Peptide gilt, daß eine Kombination eines Peptides mit Kernlokalisierungssignal und einem Targetpeptid zu einem besseren Transport der transfizierten DNA in den Kern führen sollte. Wie wichtig eine solche Kernlokalisierungssequenz bei der Transfektion mit fremder DNA ist, zeigt der Unterschied in der Transfektionseffizienz, der durch DNAKond1 und NLSKond1 erreicht wurde.

Bei einer *in vivo* Anwendung des vorgestellten Systems kann die Rolle des Chloroquins, das heißt das Verhindern der lysosomalen Degradation der DNA, durch inaktivierte adenovirale Partikel übernommen werden. Bereits 1992 begannen Wagner et al. damit, die zielgerichtete mit der adenoviralen Transfektion zu verbinden. Sie koppelten Transferrin zusammen mit Polylysin/DNA an Adenoviren und erzielten damit eine Steigerung der Transfektionseffizienz um mehr als das 1000-fache im Vergleich zu einem Polylysin/Transferrin-Komplex (Wagner et al., 1992). Eine effiziente Zerstörung des Endosoms kann auch ohne jede virale Komponente erreicht werden: Es konnte gezeigt werden, daß ein Peptid, das aus der Hämagglutininase des Influenzavirus stammt, bei niedrigen pH-Werten das Lysosom zerstören kann (Wolfert et al., 1998). Aber auch andere, synthetische Peptide können dazu verwendet werden (Gottschalk et al., 1996; Ohmori et al., 1997).

Insgesamt am erfolgversprechendsten scheint der Ansatz mit den kationischen Peptiden zu sein. Die Effizienz dieser Methode könnte gesteigert werden, wenn man eine direkte Fusion des Transfektionskomplexes mit der Plasmamembran der Targetzelle erzielen könnte. Midoux et al. z.B. tauschten in der Sequenz der Influenzahämagglutininase einige Aminosäuren durch Histidine aus und konnten so das pH-Optimum für die Lysosomendisruption auf einen pH-Wert von 6,8 erhöhen (Midoux et al., 1998). Das von Midoux et al. vorgestellte Peptid wäre ebenfalls in der Lage, bei leicht saurem pH-Wert des Mediums eine Fusion mit der Plasmamembran der Zelle zu vermitteln. Aber auch andere kurze Peptide sind dazu in der Lage: z.B. konnte ein solches Fusionspeptid des AIDS-Virus, das aus dem HIV-GP41 stammt, die Fusion mit Zellen in Kultur vermitteln. Bei Verbindung mit der Kernlokalisierungsdomäne des SV40-Virus konnten diese Zellen effizient mit einem Komplex aus diesem Peptid und DNA transfiziert werden (Morris et al., 1997). Da hier die Aufnahme des Transfektionskomplexes direkt über die Plasmamembran verläuft und nicht über das Endosom, scheint dieser Ansatz für eine

effiziente Transfektion von Endothelzellen sehr vielversprechend. Außerdem können bei einem solchen Ansatz zusätzlich endothelspezifische Targetpeptide in den Transfektionskomplex einbezogen und damit die Effizienz weiter gesteigert werden.

7. Zusammenfassung

Das Endothel besteht aus einem einzelligen Zellrasen und ist an der Grenzschicht zwischen dem Lumen eines Gefäßes und der glatten Gefäßmuskulatur angesiedelt. Kapillaren bestehen praktisch nur aus einem Endothelschlauch und stellen eine wichtige Barriere beim Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe dar. Das Endothel nimmt eine Schlüsselstellung bei der Regulation der Hämostase, der Angiogenese und des Blutgefäßtonus ein und eine endotheliale Dysfunktion ist für die Entstehung einer Arteriosklerose von entscheidender Bedeutung. Die Therapie eines dysfunktionellen Endothels setzt jedoch Techniken voraus, „therapeutische Gene“ im Sinne einer Gentherapie effektiv in die Zellen einzuschleusen. Die bisher eingesetzten Verfahren führten lediglich zu einer Transfektionseffizienz von 1%. In der vorliegenden Arbeit wurden daher systematisch eine Reihe nicht-viraler Methoden zur Endothelzelltransfektion untersucht. Neben verschiedenen liposomalen Ansätzen wurden auch Komplexe aus kationischen Peptiden und DNA zur Transfektion eingesetzt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Verschiedene kommerziell erhältliche kationische Liposomen (Lipofectamin, Lipofectamin Plus, DAC-30, Fugene, DOSPER und DOTAP) wurden zur Transfektion von primären  endothelzellen aus der Schweineaorta eingesetzt. Mit Lipofectamin Plus konnte die Transfektionseffizienz gegenüber bisher publizierten Werten auf etwa das Doppelte gesteigert werden; aber auch Lipofectamin, DOSPER und DOTAP waren in der Lage, Endothelzellen zu transfizieren. Die geringste Zytotoxizität aller untersuchten Liposomen wies Lipofectamin mit 30% überlebender Zellen auf.
2. Zur Rekonstitution von Virosomen wurden zwei Ansätze verfolgt: das Marburg-Virus Glykoprotein wurde in der Zellkultur exprimiert, konnte jedoch aufgrund der geringen Ausbeute nicht in Virosomen rekonstituiert werden. In einem zweiten Ansatz wurden die beiden Oberflächenproteine des Sendai Virus (auch Hämagglutinierendes Virus aus Japan= HVJ) aus intakten Viren aufgereinigt und in Virosomen rekonstituiert. Etwa 80% des eingesetzten Protein wurde in die Virosomenhülle eingebaut. Die viralen Proteine waren auch nach der Rekonstitution aktiv, wie mit einem Hämagglutinationstest und einem Fusionstest nachgewiesen wurde. Sowohl HepG2-Zellen als auch eine  endotheliale Zelllinie (Eahy.926) konnten mit diesen Virosomen

transfiziert werden, nicht jedoch primäre Endothelzellen.

3. Es wurden drei kationische Peptide synthetisiert, die gemäß ihrer Primärstruktur eine amphipatische α -Helix bilden sollten. Die Komplexbildung dieser Peptide mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Retardationstests im Agarosegel, Ethidiumbromid-Verdrängung und mittels Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen. In DNase-Schutzexperimenten konnten die synthetisierten Peptide die DNA vor dem Abbau schützen. Zwei dieser Peptide konnten sowohl COS-7-Zellen als auch primäre Endothelzellen transfizieren, und wiesen eine deutlich geringere Zytotoxizität auf als die kationischen Liposomen.
4. Es wurden vier Peptide synthetisiert, die eine Endothel-bindende Sequenz und einen Oligolysinschwanz für die DNA-Bindung enthielten. Die Komplexbildung mit Plasmid-DNA und der Schutz vor DNase-Abbau wurde wie zuvor nachgewiesen. Mit drei dieser Peptide konnte eine Transfektion von primären Endothelzellen erreicht werden, wobei die Zytotoxizität geringer als bei den kationischen Liposomen war.

8. Anhang

8.1. Literatur

Anderson, T.J.; Gerhard, M.D.; Meredith, I.T.; Charbonneau, F.; Delagrang, D.; Creager, M.A.; Selwyn, A.P. und Ganz, P., 1995: Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis; *Am. J. Cardiol.* 75: B71-74

Baffour, R.; Berman, J.; Garb, J.L.; Rhee, S.W.; Kaufman, J. und Friedmann, P., 1992: Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: Dose-response effect of basic fibroblast growth factor; *J. of Vascular Surgery* 16: 181-191

Bagai, Sangeeta und Sarkar, Debi, P., 1993a: Targeted delivery of hygromycin B using reconstituted Sendai viral envelopes lacking hemagglutinin-neuraminidase; *FEBS letters* 326: 183-188

Bagai, Sangeeta und Sarkar, Debi, P., 1993b: Reconstituted Sendai Virus envelopes as biological carriers: dual role of F protein in binding and fusion with liver cells; *Biochem. Biophys. Acta* 1152: 15-25

Bagai, S.; Puri, A.; Blumental, R. und Sarkar, D.P., 1993c: Hemagglutinin-neuraminidase enhances F protein-mediated membrane fusion of reconstituted Sendai Virus with cells; *J. of Virology* 67: 3312-3318

Bagai, S. und Sarkar, D.P., 1994a: Fusion-mediated microinjection of lysozyme into HepG2 cells through hemagglutinin neuraminidase-depleted Sendai Virus envelopes; *J. of Biol. Chem.* 269: 1966-1972

Bagai, S. und Sarkar, D.P., 1994b: Effect of substitution of hemagglutinin-neuraminidase with influenza hemagglutinin on Sendai Virus F protein mediated membrane fusion; *FEBS letters* 353: 332-336

Bailey, A.L. und Cullis, P.R., 1997: Membrane fusion with cationic liposomes: Effect of target membrane lipid composition; *Biochemistry* 36: 1628-1634

Batra, J.K.; FitzGerald, D.; Gately, M.; Chaudhary, V.K. und Pastan, I., 1990: Ant-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171: 1-6

Bauters, Christophe und Isner, J.M., 1997: The biology of restenosis; *Prog. in Cardiovascular Diseases* 40: 107-116

Beny, J.L. und von der Weid, P.Y., 1991: Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176: 378-384

Birnboim, C. und Doly, J., 1979: Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucl. Acid Reseach* 7: 1513-1523

Bitzer, M.; Lauer, U.; Baumann, C.; Spiegel, M.; Gregor, M. und Neubert, W.J., 1997: Sendai Virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires the presence of cleaved F₀ precursor proteines for this alternative route of cell entry; *J. of Virology* 71: 5481-5486

Blaese, R.M.; Culver, K.W.; Miller, A.D.; Carter, C.S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.K.L.; Chiang, Y.; Tolstoshev., 1995: T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years; *Science* 270: 475-480

Böger, R.H. und Bode-Böger, S.M., 1997: Endotheliale Dysfunktion bei peripherer arterieller Verschlüßerkrankung: Von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung; *VASA* 26: 180-184

Broze, G.J. Jr.; Girard, T.J. und Novotny, W.F., 1990: Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor; *Biochemistry* 29: 7539-7546

Bunting, S.; Gryglewski, R.; Moncada, S. und Vane, J.R., 1976: Arterial walls generate from prostaglandins endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation; Prostaglandins 12: 897-913

Byrnes, P.; Rusby, J.E.; Wood, M.J.A. und Charlton, H.M., 1995: Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain; Neuroscience 66: 1015- 1024

Caplen, N.J.; Gao, X.; Hayes, P.; Elasawarapu, R.; Fisher, G.; Kinrade, E; Chakera, A.; Schorr, J.; Hughes, B.; Dorin, J.R.; Porteous, D.J.; Alton, E.W.F.W.; Geddes, D.M.; Coutelle, C.; Williamson, R.; Huang, L. und Gilchrist, C., 1994: Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposomes-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process; Gene Therapy 1: 139-147

Caplen, N.J.; Alton, E.W.F.W.; Middleton, P.G.; Dorin, J.R.; Stevenson, B.J.; Gao, X.; Durham, S.R.; Jeffrey, P.K.; Hodson, M.E.; Coutelle, C.; Huang, L.; Porteous, D.J.; Williamson, R. und Geddes, D., 1995: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients wit cystic fibrosis; Nature Medicine 1: 39- 46

Chang, M.W.; Barr, E.; Seltzer, J.; Jiang, Y.-Q.; Nabel, G.J.; Nabel, E.G; Parmacek, M.S. und Leiden, J.M., 1995: Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product; Science 267: 518-522

Chejanovsky, N. und Loyter, A., 1985: Fusion between Sendai Virus envelopes and biological membranes; J. of Biol. Chem. 260: 7911-7918

Chejanovsky, N.; Zakai, N.; Amselem, S.; Barenholz, Y. und Loyter, A., 1986: Membrane vesicles containing the Sendai Virus binding glycoprotein, but not the viral fusion protein, fuse with phophatidylserine liposomes at low pH; Biochemistry 25: 4810-4817

Colin, M.; Harbottle, R.P.; Knight, A.; Kornprobst, M.; Cooper, R.G.; Miller, A.D.; Trugnan, G.; Capeau, J.; Coutelle, C. und Brahimi-Horn, M.C., 1998: Liposomes enhance delivery and expression of an RGD-oligolysine gene transfer vector in human tracheal cells; *Gene Therapy* 5: 1488-1498

Cooke, J.P. und Dzau, V.-J., 1997: NITRIC OXIDE SYNTHASES: Role in the genesis of vascular diseases; *Ann. Rev. med.* 48: 489-509

Cramer, H.; Muller-Esterl, W. und Schroeder, C., 1998: Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with different receptor phosphorylation; *J. Cardiovascular Pharmacol.* 31 Suppl. 1: 203-206

Cristiano, R.J. und Roth, J.A., 1995: Molecular conjugates: a targeted gene delivery vector for molecular medicine; *J. Mol. Med.* 73: 479-486

Dosne, A.M.; Dupuy, E. und Bodevin, E., 1978: Production of a fibrinolytic inhibitor by cultured endothelial cells derived from human umbilical vein; *Thromb. Res.* 12: 377- 387

Douglas, J.T. und Curiel, D.T., 1997: Strategies to accomplish targeted gene delivery to muscle cells employing tropism-modified adenoviral vectors; *Neuromuscular Disorders* 7: 284-298

Dzau, V.J.; Mann, M.J.; Morishita, R. und Kaneda, Y., 1996: Fusogenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 11421-11425

Edgell, C.J.S.; McDonald, C.C. und Graham, J.B., 1983: Permanent cell line expression of human factor VIII-related antigen established by hybridization; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3734-3737

Emi, N.; Kidoake, S.; Yoshikawa, K. und Saito, H., 1997: Gene transfer mediated by polyarginine requires a formation of big carrier-complexes of DNA aggregate; *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 231: 421-424

Epand, R.M.; Nir, S.; Parolin, M. und Flanagan, T.D., 1995: The role of the ganglioside G_{D1a} as a receptor for Sendai Virus; *Biochemistry* 34: 1084-1089

Erbacher, P.; Roche, A.C.; Monsigny, M. und Midoux, P., 1996: Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes; *Exp. Cell Research* 225: 186-194

Feldmann, H.; Will, C.; Schikore, M.; Slenczka, W. und Klenk, H.-D., 1991: Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg Virus; *Virology* 182: 353-356

Feldmann, H.; Mühlberger, E.; Randolph, A.; Will, C.; Kiley, M.P.; Sanchez, A. und Klenk, H.-D. 1992: Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle; *Virus Research* 24: 1-19

Feldmann, H.; Klenk, H.-D. und Sanchez, A., 1993: Molecular biology and evolution of filoviruses; *Arch. Virol.* 7: 81-100

Feldmann, H.; Nichol, S.T.; Klenk, H.-D.; Peters, C.J. und Sanchez, A., 1994: Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein; *Virology* 199: 469-473

Feldman, L.J.; Steg, P.G.; Zheng, L.P.; Chen, D.; Kearny, M.; McGarr, S.E.; Barry, J.J.; Dedieu, J.-F.; Perricaudet, M. und Isner, J.M., 1995: Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit; *J. Clin. Invest.* 95: 2662-2671

Felgner, P.L.; Barenholz, Y.; Behr, J.P.; Cheng, S.H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J.A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A.R.; Wagner, E. und Wu, G., 1997: Nomenclature for synthetic gene delivery systems; *Human Gene Therapy* 8: 511-512

Felici, F.; Galfre, G.; Luzzago, A.; Monaci, P.; Nicosia, A. und Cortese, R., 1996: Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera; *Methods in Enzymology* 267: 116-129

Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M.; Chanock, R.M.; Melnick, J.L.; Monath, T.P.; Roizman, B. und Straus, S.E. 1996: Virology; Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia, New York; 3. Edition

Finkel, T. und Epstein, S.E., 1995: Gene therapy for vasculat disease; FASEB J. 9: 843-851

Förstermann, U.; Mugge, A.; Alheid, U.; Rode, S.M. und Frölich, J.C., 1989: Endothelium-derived relaxing factor (EDRF). A defence mechanism against platelet aggregation and vasospasm in human coronary arteries; Eur. Heart J. 10: 36-43

Fritz, J.D.; Herweijer, H.; Zhang, G. und Wolff, J.A., 1996: Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA; Human Gene Therapy 7: 1395-1404

Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V., 1980: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; Nature 288: 373-376

Garg, U.C. und Hassid, A., 1989: Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells; J. Clin. Invest. 83: 1774-1777

Gitman, G.A. und Loyter, A., 1984: Construction of fusogenic vesicles bearing specific antibodies; J. Biol. Chem. 259: 9813-9820

Gosule, L.C. und Schellman, J.A., 1978: DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies; J. Mol. Biol. 121: 311-326

Gottschalk, S.; Sparrow, J.T.; Hauer, J.; Mims, M.P.; Leland, F.E.; Woo, S.L.C. und Smith, L.C., 1996: A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells; Gene Therapy 3: 448-457

Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S. und Tannenbaum, S.R., 1982: Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids; *Anal. Biochem.* 126: 131- 138

Gregoriadis, G.; Saffie, R. und Hart, S.L., 1996: High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: Effect on DNA integrity and transfection efficiency; *J. of Drug Targeting* 3: 469-475

Grossman, M; Raper, S.E.; Kozarsky, K.; Stein, E.A.; Engelhardt, J.F.; Muller, D.; Lupien, P.J. und Wilson, J.M., 1994: Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familiar hypercholesterolemia; *Nat. Genet.* 6: 335-341

Gunning, P.; Leavitt, J.; Muscat, G.; Ng, S.Y. und Kedes, L., 1987: A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 4831-4835

Guy, J.; Drabek, D. und Antonius, M., 1995: Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy; *Mol. Biotechnology* 3: 237-248

Guzman, R.J.; Lemarchand, P.; Crystal, R.C.; Epstein, S.E. und Finkel, T., 1993: Efficient and selective adenoviral-mediated gene transfer into vascular neointima; *Circulation* 88: 2838-2848

Hanahan, D., 1983: Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *J. Mol. Biol.* 160: 557-580

Harbottle, R.P.; Cooper, R.G.; Hart, S.L.; Ladhoff, A.; McKay, T.; Knight, S.M.; Wagner, E.; Miller, A.D. und Coutelle, C., 1998: An RGD-oligolysine peptide: A prototype construct for integrin-mediated gene delivery; *Human Gene Therapy* 9: 1037-1047

Hart, S.L.; Harbottle, R.P.; Cooper, R.; Miller, A.; Williamson, R. und Coutelle, C., 1995: Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide; *Gene Therapy* 2: 552-554

Hart, S.L.; Arancibia-Carcamo, C.V.; Wolfert, M.A.; Mailhos, C.; O'Reilley, N.J.; All, R.R.; Coutelle, C.; George, A.J.T.; Harbottle, R.P.; Knight, A.M.; Larkin, D.F.P.; Levinsky, R.J.; Seymour, L.W.; Thrasher, A.J. und Kinnon, C., 1998: Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeted vector; *Human Gene Therapy* 9: 575-585

Herrmann, A.; Pieper, M. und Schrader, J., 1999: Selection of cell specific peptides in a rat carotid injury model using a random peptide-presenting bacterial library; *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 529-536

van Hinsberg, V.W.; Sprengers, E.D. und Kooistra, T., 1987: Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells; *Thromb. Haemost.* 57: 148-153

Hsu, M.-C.; Scheid, A. und Choppin, P.W., 1979: Reconstitution of membranes with individual Paramyxovirus glycoproteins and phospholipid in cholate solution; *Virology* 95: 476-491

Isner, J. M.; Rosenfeld, K.; Losordo, D.W.; Rose, L.; Langevin Jr., R.E.; Razvi, S. und Kosowsky, B.D., 1991: Combination balloon-ultrasound imaging catheter for percutaneous transluminal angioplasty; *Circulation* 84: 739-754

Isner, J.M. und Rosenfeld, K., 1993: Redefining the treatment of peripheral artery disease; *Circulation* 88: 1534-1557

Isner, J.M.; Walsh, K.; Symes, J.; Pieczek, A.; Takeshita, S.; Lowry, J.; Rossow, S.; Rosenfield, K.; Weir, L.; Brogi, E. und Schainfeld, R., 1995: Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease; *Circulation* 91: 2687-2692

- Junqueira, L.C. und Caneiro, J., 1991: Histologie; Springer-Verlag: 285-286
- Kalderon, D.; Roberts, B.L.; Richardson, W.D. und Smith, A.E., 1984: A short amino acid sequence able to specify nuclear location; Cell 39: 499-509
- Kaneda, Y; Morishita, R. und Dzau, V.J., 1997: Prevention of restenosis by gene therapy; Ann. N.Y. Acad. Sci. 811: 299-308
- Kaneda, Y.; Iwai, K. und Uchida, T., 1989: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver; Science 243: 375-378
- Kaufmann, R.J.; Davies, M.V.; Pathak, V. und Hershey, J.W., 1989: The phosphorylation state of eucaryotic initiation factor 2 alters translational efficiency of specific mRNAs; Mol. Cell. Biol 9: 946-958
- Kay, M.A.; Rothenberg, S.; Landen, C.N.; Bellinger, D.A.; Leland, F.; Toman, C.; Finegold, M.; Thompson, A.R.; Read, M.S.; Brinkhous, K.M.; 1993: In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs; Science 262: 117-119
- Kerwin, J.F. Jr.; Lancaster, J.R. Jr. Und Feldmann, P.L., 1995: Nitric oxide: a new paradigm for second messengers; J. Med. Chem. M38: 4343-4362
- Kochanek, S., 1999: Development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy; Thromb. Haemost. 82: 547-551
- Kolodgie, F.D.; Virmani, R.; Rice, H.E. und Mergner, W.J., 1990: Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; Circ. Res. 66: 1112-1126
- Laemmli, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins of the head of bacteriophage T4; Nature 227: 680-685
- Lamb, R.A., 1993: Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes; Virology 197: 1- 11

Mc Lenachan, J.M.; Williams, J.K.; Fish, R.D.; Ganz, P. und Selwyn, A.P., 1991: Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis; *Circulation* 84: 1273-1278

Leung, D.W.; Cachianes, G.; Kuang, W.-J.; Goeddel, D.V. und Ferrara, N., 1989: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen; *Science* 240: 1306-1309

Lefkovits, J. und Topol, E.J., 1997: Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention; *Progress in Cardiovascular Diseases* 40: 141-158

Libby, P. und Tanaka, H., 1997: The molecular basis of restenosis; *Prog. in Cardiovascular Diseases* 40: 97-106

Lloyd-Jones, D.M. und Bloch, K.D., 1996: The vascular biology of nitric oxide and its role in atherosclerosis; *Ann. Rev. Med.* 47: 365-375

Loskutoff, D.J.; Sawdey, M. und Mimuro, J., 1989: Type I plasminogen activator inhibitor; *Prog. Hemost. Thromb.* 9: 87-115

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. und Randall, R.J., 1951: Protein measurement with Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

Lu, Z.; Murray, K.S.; van Cleave, V.; La Vallie, E.R.; Stahl, M.L. und Mc Coy, J.M., 1995: Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: A system designed for exploring protein-protein interactions; *Biotechnology* 13: 366-372

Ludmer, P.L.; Selwyn, A.P.; Shook, T.L.; Wayne, R.R.; Mudge, G.H.; Alexander, R.W. und Ganz, P., 1986: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries; *N. Engl. J. Med.* 315: 1046-1051

Mabuchi, E.; Shimizu, K.; Miyao, Y.; Kaneda, Y.; Tamura, M.; Ikenaka, K. und Hayakawa, T., 1997: Gene therapy by HVJ-liposome in the experimental gene therapy of murine glioma; *Gene Therapy* 4: 768-772

Martin, F.J.; Hubbell, W.L. und Papahadjopoulos, D., 1981: Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds; *Biochemistry* 20: 4229-4238

Martin, F.J. und Papahadjopoulos, D., 1982: Irreversible coupling of immunoglobulin fragment to preformed vesicles; *J. of Biol. Chem.* 257: 286-288

Masaki, T.; Kimura, S.; Yanagisawa, M. und Goto, K., 1991: Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function; *Circulation* 84: 1457-1468

de Meyer, G.R.Y. und Herman, A.G., 1997: Vascular endothelial dysfunction; *Progress in Cardiovascular Diseases* 39: 325-342

Midoux, P.; Kichler, A.; Boutin, V.; Maurizot, J.-C. und Monsigny, M., 1998: Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines; *Bioconjugate Chem.* 9: 260-267

Milbourne, E.A. und Bygrave, F.L., 1995: Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling?; *Cell Calcium* 18: 207-213

Miller, A.D., 1990: Retrovirus packaging cells; *Hum. Gene Therapy*; 1: 5-14

Modrow, S. und Falke, D., 1997: *Molekulare Virologie*; Spektrum Akademischer Verlag

Morris, M.C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F. und Divita, G., 1997: A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells; *Nucl. Acid Research* 25: 2730-2736

Nakamichi, K.; Ihara, M.; Kobayashi, M.; Saeki, T.; Ishikawa, K. und Yano, M., 1992: Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligand BQ-123 and [Ala 1, 3, 11, 15] ET-1; *Biochem and Biophys. Res. Comm.* 182: 144-150

Nässander, U.K.; Steerenberg, P.A.; De Jong, W.H.; Van Overveld, W.O.W.M.; Te Boekhorst, C.M.E.; Poels, L.G.; Jap, P.H.K. und Storm, G., 1995: Design of immunoliposomes directed against human ovarian carcinoma; *Biochem. et Biophys. Acta* 1235: 126-139

Nathwani, A.C.; Gale, K.M.; Pemberton, K.D.; Crossman, D.C.; Tuddenham, E.G. und McVey, J.H., 1994: Efficient gene transfer into human umbilical vein endothelial cells allows functional analysis of the human tissue factor gene promoter; *Br. J. Haematol.* 88: 122-128

Newby, D.E., Wright, R.A., Labinjoh, C., Ludlam, C.A., Fox, K.A., Boon, N.A. und Webb, D.J., 1999: Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction; *Circulation* 99: 1411-1415

Nicolau, C.; Le Pape, A.; Soriano, P.; Fargette, F. und Juhel, M.F., 1983: In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1068-1072

Niidome, T.; Ohmori, N.; Ichinose, A.; Wada, A.; Mihara, H.; Hirayama, T. und Aoyagi, H., 1997: Binding of α -helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells; *J. of Biol. Chem.* 272: 15307-15312

Nishiya, T. und Sloan, S., 1996: Interaction of RGD liposomes with platelets; *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*; 224: 242-245

Nordt, T.K. und Bode, C., 2000: Endothelium and endogenous fibrinolysis; *Z. Kardiol.* 89: 219-226

Ogris, M., Steinlein, P., Kurs, M., Mechtler, K., Kirchheis, R. und Wagner, E., 1998: The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells; *Gene Ther.* 5: 1425-1433

Ohmori, N.; Niidome, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Hatakeyama, T. und Aoyagi, H., 1997: The enhancing effect of anionic α -helical peptide on cationic peptide-mediated transfection systems; *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 235: 726-729

Ohmori, N.; Niidome, T.; Kiyota, T.; Lee, S.; Sugihara, G.; Wada, A.; Hirayama, T. und Aoyagi, H., 1998: Importance of hydrophobic region in amphiphilic structures of α -helical peptides for their gene transfer-ability into cells; *Biochem and Biophys. Research Comm.* 245: 259-265

Ohno, T.; Gordan, D.; San, H.; Pompili, V.J.; Imperiale, M.J.; Nabel, G.J. und Nabel, E., 1994: Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury; *Science* 265: 781-784

Osborne, W.R.A.; Ramesh, N.; Lau, S.; Clowes, M.M.; Dale, D.C. und Clowes, A.W., 1995: Gene therapy for long-term expression of erythropoietin in rats; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8055-8058

Panza, J.A.; Quyyumi, A.A.; Brush Jr., J.E. und Epstein, S.E., 1990: Abnormal endothelium-dependent relaxation in patients with essential hypertension; *N. Engl. Med.* 323: 22-27

Park, W.; Hong, K.; Carter, P.; Asgari, H.; Guo, L.Y.; Keller, G.A.; Wirth, C.; Shalaby, R.; Kotts, C.; Wood, W.I.; Papahadjopoulos, D. und Benz, C.C., 1995: Development of anti-p185^{HER2} immunoliposomes for cancer therapy; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1327-1331

Pearson, J.D., 1999: Endothelial cell function and thrombosis; *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 12: 329-341

Pentecost, M.J.; Criqui, A.H.; Dorros, G.; Goldstone, J.; Johnston, K.W.; Martin, E.C.; Ring, E.J. und Spies, J.B., 1994: Guidelines for peripheral percutaneous transluminal angioplasty of the abdominal aorta and lower extremity vessels; *Circulation* 89: 511-531

Perales, J.C.; Ferkol, T.; Molas, M. und Hanson, R.W., 1994: An evaluation of receptor-mediated gene transfer using synthetic DNA-ligand complexes; *Eur. J. Biochem.* 226: 255-266

Peters, C.J.; Sanchez, A.; Feldmann, H.; Rollin, P.E.; Nichol, S. und Ksiazek, T.G., 1994: Filoviruses as emerging pathogens; *Seminars in Virology* 5: 147-154

Pu, L.-Q.; Sniderman, A.D.; Brassard, R.; Lachapelle, K.J.; Graham, A.M.; Lisbona, R. und Symes, J.F., 1993: Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy; *Circulation* 88: 208-215

Radomski, M.W.; Palmer, R.M.; Moncada, S., 1990: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5193-5197

Ramani, K.; Bora, R.S.; Kumar, M.; Tyagi, S.K. und Sakar, D., 1997: Novel gene delivery to liver cells using engineered virosomes; *FEBS letters* 404: 164-168

Remy, J.-S.; Kichler, A.; Mordvinov, V.; Schuber, F. und Behr, J.-P., 1995: Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: A stage toward artificial viruses; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1744-1748

Rihova, B., 1997: Targeting of drugs to cell surface receptors; *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 149-169

Sagripanti, A. und Carpi, A., 2000: Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium; *Biomed. Pharmacother.* 54: 107-111

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989: *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring harbor laboratory, NY

Schnittler, H.-J.; Mahner, F.; Drenckhahn, D.; Klenk, H.-D. und Feldmann, H., 1993: Replication of Marburg Virus in human endothelial cells; *J. Clin. Invest.* 91: 1301-1309

Schwachtgen, J.L.; Ferreira, V.; Meyer, D. und Kerbiriou-Nabias, D., 1994: Optimization of the transfection of human endothelial cells by electroporation; *Biotechniques* 17: 882-887

Sheppard, R.C. und Williams, B.J., 1982: A new protecting group combination for solid phase synthesis protected peptides; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 587-589

Shimamoto, T.; Kobayashi, M.; Takahashi, T.; Takashima, Y.; Sakamoto, M. und Morooka, S., 1978: An observation of thromboxan A2 in arterial blood after cholesterol feeding in rabbits; *Jpn. Heart J.* 19 (5) : 748-753

Shirahase, H.; Usui, H.; Kurahashi, K.; Fujiwara, M. et Fukui, K., 1988: Endothelium-dependent contraction induced by nicotine in isolated canine basilar artery - possible involvement of a thromboxane A2 (TXA2) like substance; *Life Science* 42: 437-445

Shirotani, M.; Yui, Y. und Kawai, C., 1993: Restenosis after coronary angioplasty: pathogenesis of neointimal thickening initiated by endothelial loss; *Endothelium* 1: 5-22

Sorgi, F.L.; Bhattacharya, S. und Huang, L., 1997: Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer; *Gene therapy* 4: 961-968

Stamler, J.S.; Mendelsohn, M.E.; Amarante, P.; Smick, D.; Andon, D.; Davies, P.F.; Cooke, J.P. und Loscalzo, J., 1989: N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor; *Circ. Res.* 65: 789-795

Stock, P.; Liefeldt, L.; Paul, M. und Ganten, D., 1995: Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role; *Cardiology* 86 Suppl. 1: 2-8

Suzuki, T.; Hoshi, H.; Sasaki, H. und Mitsui, Y., 1991: Endothelin-1 stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. II; J. Cardiovasc. Pharmacol. Suppl 7: S 182-186

Szoka, F. Jr., 1980: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes); Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467-508

Takeshita, S.; Gal, D.; Leclerc, G.; Pickering, J.G.; Riessen, R.; Weir, L. und Isner, J.M., 1994: Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation; J. Clin. Invest. 93: 652-661

Tanner, F.C.; Carr, D.P.; Nabel, G.J. und Nabel, E.G., 1997: Transfection of human endothelial cells; Cardiovascular research 35: 522-528

Teifel, M.; Heine, L.T.; Milbredt, S. und Friedl, P., 1997: Optimization of transfection of human endothelial cells; Endothelium 5: 21-35

Thierry, A.R.; Rabinovich, P.; Peng, B.; Mahan, L.C.; Bryant, J.L. und Gallo, R.C., 1997: Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA; Gene Therapy 4: 226-237

Tomasi, M. und Loyter, A., 1981: Selective extraction of biologically active F-glycoprotein from dithiothreitol reduced virus particles; FEBS letters 131: 381-385

Toister, Z. und Loyter, A., 1970: Virus induced fusion of chicken erythrocytes; Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 523-530

Toister, Z. und Loyter, A., 1973: The mechanism of cell fusion II. Formation of chicken erythrocyte polykaryons; J. Biol. Chem. 248: 422-432

Verbeuren, T.J.; Jordaens, F.H.; Zonnekeyn, L.L.; Van Hove, C.E.; Coene, M.C. und Herman, A.G., 1986: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I.: Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits; *Circ. Res.* 58: 552-564

Vita, J.A.; Treasure, C.B.; Nabel, E.G.; Mc Lenachan, J.M.; Fish, R.D.; Yeung, A.C.; Vekshtein, V.I.; Selwyn, A.P. und Ganz, P., 1990: Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease; *Circulation* 81: 491-497

Vogel, R.A., 1997: Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: A Review; *Clin. Cardiol.* 20: 426-432

Volsky, D.J. und Loyter, A., 1978: An efficient method for reassembly of Sendai Virus envelopes after solubilization of intact virions with Triton-X 100; *FEBS Letters* 92: 190-194

Wagner, E.; Zenke, M.; Cotten, M.; Beug, H. und Birnstiel, M.L., 1990: Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3410-3414

Wagner, E.; Cotten, M.; Foisner, R. und Birnstiel, M.L., 1991: Transferrin-polycation-DNA-complexes: The effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 4255-4259

Wagner, E.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Kirlappos, H.; Mechtler, K.; Curiel, D.T. und Birnstiel, M.L., 1992: Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6099-6103

Werns, S.W.; Walton, J.A.; Hsia, H.H.; Nabel, E.G.; Sanz, M.L. und Pitt, B., 1989: Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease; *Circulation* 79: 287-291

Wickham, T.J.; Segal, D.M; Roelvink, P.W.; Carrion, M.E.; Lizonova, A.; Lee, G.M. und Kovesdi, I., 1996: Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies; J. of Virology 70: 6831-6838

Will, C.; Mühlberger, E.; Linder, D.; Slenczka, W.; Klenk, H.-D. und Feldmann, H., 1993: Marburg Virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type 1 transmembrane glycoprotein; J. of Virology 67: 1203-1210

Wolfert, M.A. und Seymour, L.W., 1998: Chloroquine and amphipatic peptide helices show synergistic transfection in vitro; Gene Therapy 5: 409-414

Wolff, J.A. und Lederberg, I., 1994: An early history of gene transfer and therapy; Human Gene Therapy 5: 469-480

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

Wu, G.Y. und Wu, C.H., 1987: Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system; J. of Biol Chem. 262: 4429-4432

Wu, G.Y.; Wilson, J.M.; Shalaby, F.; Grossman, M.; Shafritz, D.A. und Wu, C.H., 1988: Receptor-mediated gene delivery *in vivo*; J. of Biol. Chem. 266: 14338-14342

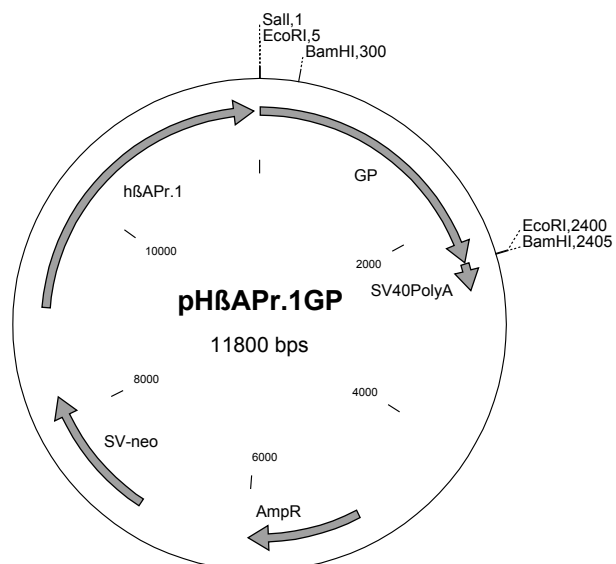
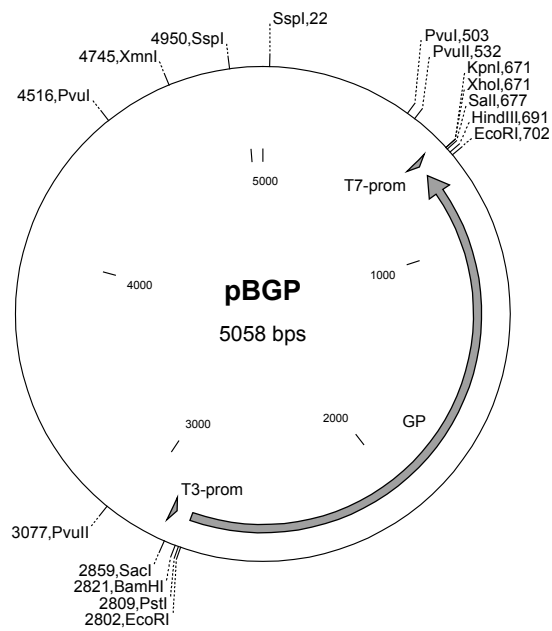
Wu, P.; de Fiebre, C.M.; Millard, W.J.; King, M.A.; Wang, S.; Bryant, S.O.; Gao, Y.-P.; Martin, E.J. und Meyer, E.M., 1996: An AAV promoter-driven neuropeptide Y gene delivery system unsing Sendai virosomes for neurons and rat brain; Gene Therapy 3: 246-253

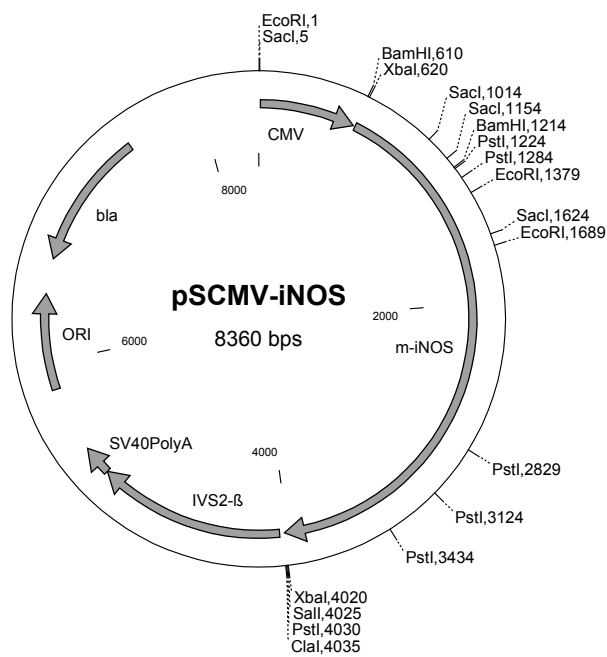
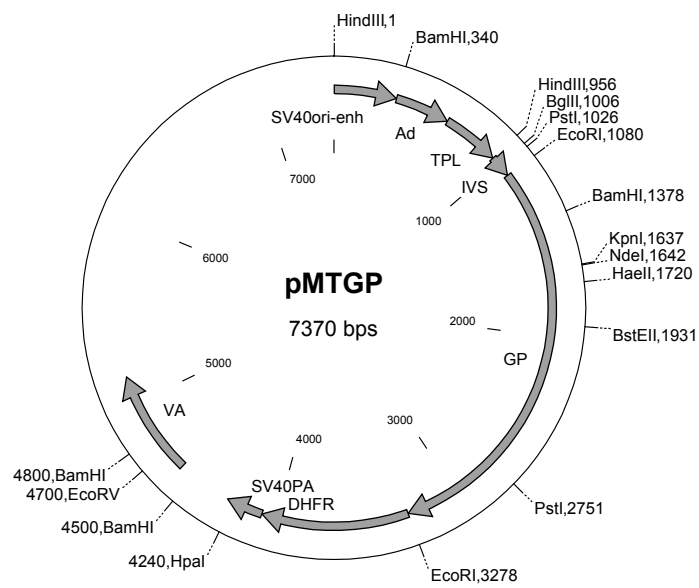
Wu-Wong, J.R.; Chiou, W.J.; Dixon, D.B. und Opgenorth, T.J., 1995: Dissociation characteristics of endothelin ETA receptor agonists and antagonists; J. Cardiovasc. pharmacol. 26 Suppl. 3: 380-384

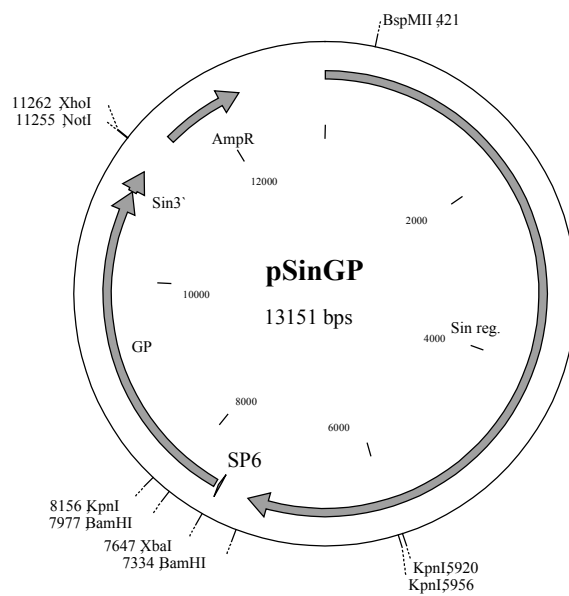
Yonemitsu, Y.; Kaneda, Y.; Morishita, R.; Nakagawa, K.; Nakashima, Y. und Sueishi, K., 1996: Characterization of in vivo gene therapy into the arterial wall mediated by the Sendai Virus (Hemagglutinating Virus of Japan) liposomes: An effective tool for the in vivo study of arterial diseases; Lab. Investigation 75: 313-323

Yonemitsu, Y.; Kaneda, Y.; Muraishi, A. Yoshizumi, T.; Sugimachi, K. und Sueshi, K., 1997: HVJ (Sendai Virus)-cationic liposomes: a novel and potentially effective liposome-mediated technique for gene transfer to the airway epithelium; Gene Therapy 4: 631-638

8.2. Plasmidkarten







8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, vorliegende Arbeit selbständig und ohne die Hilfe anderer als der erlaubter Mittel angefertigt zu haben.

Düsseldorf, den 22.12.2000

8.4. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Jürgen Schrader danken, der es mir ermöglicht hat, in seinem Institut diese Dissertation anzufertigen; Herrn Professor Cornelis P. Hollenberg für die Begutachtung; meinen beiden Betreuern Dr. Axel Gödecke und Dr. Andreas Herrmann für ihre Kritik und Hilfe; Silke Arzberger für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Transfektions-Experimenten; Dr. Steffanie Gödecke für ihre Unterweisung für das Arbeiten mit kultivierten Zellen; den Arbeitsgruppen Dr. Gödecke und Dr. Herrmann für ihre Hilfe und die nette Arbeitsatmosphäre (Danke Jaqueline, Martina, Susanne, Regina, Frau Patzer); Frau Joseph, die immer für gute Stimmung gesorgt hat und uns jeden Morgen mit frischem Kaffee reanimiert hat; allen Mitarbeiter des Institutes für Herz- und Kreislaufphysiologie in Düsseldorf für die nette Zeit.

Weiter danken möchte ich Herrn Dr. K. Zanger für seine Hilfe bei der Anfertigung der elektronen-mikroskopischen Aufnahmen; Herrn Dr. H. Feldmann, Virologie Marburg, für die freundliche Unterstützung, die cDNA des Marburg-Glykoproteins und den Glykoprotein-Antikörper.

Zum Schluß danke ich meiner Familie für ihre (nicht nur finanzielle) Unterstützung und auch für das mehrfache Korrektur-Lesen; meinem Freund Essy Dastyar dafür, daß er mich immer wieder ermutigt und aufgebaut hat.