Entwicklung von systemisch applizierbaren, endothelspezifischen Gentransfervektoren

Inaugural-Dissertation

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

> vorgelegt von Gregor Müller aus Brühl / Rheinland

Düsseldorf, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Referent:Prof. Dr. med. J. SchraderKorreferent:Prof. Dr. rer. nat. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2002

Meinen Eltern

Familie Gärtner

Frau H. Hamann

"Die Menschheit muss in dieser Periode ihrer Entwicklung zeigen, ob sie des großen Geschenks des technischen Fortschritts würdig ist durch einen, dem technischen Fortschritt parallel laufenden Fortschritt der menschlichen und brüderlichen Gesinnung. Das ist die Schicksalsfrage für die nächste Periode der Geschichte der Menschheit."

(Konrad Adenauer am 26. Januar 1931 zur Eröffnung der Amerikanischen Handelskammer in Köln)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. J. Schrader danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Wagner für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. A. Herrmann gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit, für seine Ratschläge und die sich daraus ergebenen Diskussionen.

Ich möchte mich bei den gesamten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie sowie bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Firma Cardion AG, Erkrath, für ihre wertvollen "Tipps & Tricks" im Laboralltag bedanken.

Ich möchte meinen Eltern, Verwandten und meinen Freunden ganz herzlich für ihre langjährige Unterstützung danken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

<u>INHALT</u>

1.1. Gentherapie 1 1.1.1. Grundlagen der Gentherapeutische Vektor 3 1.2. Der ideale gentherapeutische Vektor 3 1.2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutischen Vektors 4 1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS 5 1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie 7 1.3.1. Virale Vektoren 10 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.1. Polyethylenimin (PEI) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch verzeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nac	1.EINL	EITUNG	1
1.1.1. Grundlagen der Gentherapie 1 1.2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutischen Vektors 4 1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS 5 1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie 7 1.3.1. Virale Vektoren 10 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 10 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Dipsomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Lipoplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. Entwicklung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfektion von Endothelzellen match Pseudovirionen-Transfektion 23 <	1.1	I. Gentherapie	1
1.1.2. Der ideale gentherapeutische Vektor 3 1.2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutische DNS 5 1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS 5 1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren 7 1.3.1. Virale Vektoren 10 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Dipplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting Modul 16 1.4.1. Targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.3. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.4. Kargeting durch Peptide 28 3.2.7. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 28		1.1.1. Grundlagen der Gentherapie	1
1.2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutischen Vektors 4 1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS 5 1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie 7 1.3.1. Virale Vektoren 7 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 12 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch Zucker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3.1. Generierung von Pseudovirionen-Transfektion 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.2. No-broduktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI		1.1.2. Der ideale gentherapeutische Vektor	3
1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS 5 1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren 7 1.3.1. Virale Vektoren 7 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 7 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 72 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 74 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 75 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 75 1.4.7. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.3. targeting durch Zucker 18 1.4.5. targeting durch Zucker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. Lin Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Analyse der zytoxischen Effekte nach der Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.4. Analyse der zytoxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.2.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 23 3.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden P	1.2	2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutischen Vektors	4
1.2.2. NO-Synthasen 6 1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie 7 1.3.1. Virale Vektoren 10 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 12 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 12 1.3.2. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2. Delymer / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2. Polymet / DNS Komplexe (Lipoplexe) 15 1.3.2. A. Polymet / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2. A. Polymet / DNS komplexe (Lipoplexe) 15 1.3.2.4. Polymet / DNS komplexe (Polyplexe) 15 1.4. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch Vacker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. I. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.4. Analyse der zylotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29		1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS	5
1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie 7 1.3.1. Virale Vektoren 7 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 10 1.3.2.1. Nicht-virale Vektoren 12 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch Vecker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 1.4.5. targeting durch Peptide 19 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 21 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 23 3.1.1. Komplexeildung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Heffer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfizierter Zellen mit Polykationen 28 3.2.1. Komplexeildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfizierterkeit von human umbilical vein endothetial cells mit PEI 30		1.2.2. NO-Synthasen	6
1.3.1. Virale Vektoren 7 1.3.2. Nicht-virale Vektoren 10 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting durch viralen Tropismus 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. ERGEBNISSE 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Seudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.2.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 30 3.2.3. Selektion der VCAM-1 Expression 36 3.2.4. Kopplung von VCAM-1 Expression 36 3.2.5. Nachweis de	1.3	3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie	7
1.3.2. Nicht-virale Vektoren 10 1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.1. Viposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch Vialen Tropismus 17 1.4.4. targeting durch Pexplote 18 1.4.5. targeting durch Pexplote 18 1.4.5. targeting durch Peplide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. ERGEBNISSE 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 10 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 30 3.2.5. Nachweis der VCAM		1.3.1. Virale Vektoren	7
1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor 12 1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting-Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Peptide 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. I. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 28 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfixerbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 30		1.3.2. Nicht-virale Vektoren	10
1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe) 14 1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting/Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Zucker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1. No-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 23 3.1.4. Naalyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 28 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 30 3.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide 32 3.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Pep		1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor	12
1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe) 15 1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting-Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.4. targeting durch Zucker 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. ERGEBNISSE 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 28 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 33 3.2.5. Nachweis der VCAM-1 bindenden Peptide 32 3.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptide 32 3.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolamin		1.3.2.2. Liposomen / DNS Komplexe (Lipoplexe)	14
1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI) 15 1.4. Targeting-Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Peptide 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. ERGEBNISSE 20 3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1.1. Generierung von Pseudovirionen 20 3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen 28 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfektion der VCAM-1 bindenden Peptide 32 3.2.3. Selektion der VCAM-1 Expression 36 3.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression 36 3.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptide 32 <		1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe)	15
1.4. Targeting-Modul 16 1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus 17 1.4.2. Transkriptionelles targeting 17 1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose 17 1.4.4. targeting durch Peptide 18 1.4.5. targeting durch Peptide 18 2. FRAGESTELLUNG 19 3. ERGEBNISSE 20 3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen 20 3.1. Op-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion 21 3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion 22 3.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion 23 3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor 25 3.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 29 3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI 29 3.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI 30 3.2.5. Nachweis der VCAM-1 bindenden Peptide 32 3.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptide 32 3.2.7. HUVEC-Transfektion 38 3.3.1. Synthese der N-		1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI)	15
1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus171.4.2. Transkriptionelles targeting171.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose171.4.4. targeting durch Zucker181.4.5. targeting durch Peptide182. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VOAM-1 bindenden Peptide323.3.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.3.4. Größenbestimmung der Liposomen413.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen in vitro433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen413.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	1.4	ł. <i>Targeting</i> -Modul	16
1.4.2. Transkriptionelles targeting171.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose171.4.4. targeting durch Zucker181.4.5. targeting durch Peptide182. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 Expression363.2.5. Nachweis der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen45		1.4.1. <i>Targeting</i> durch viralen Tropismus	17
1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose171.4.4. targeting durch Zucker181.4.5. targeting durch Peptide182. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.5. Nachweis der VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Halbwertzeit der Liposomen in vivo433.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen in vivo433.4. ZUSAMMENFASSUNG51		1.4.2. Transkriptionelles <i>targeting</i>	17
1.4.4. targeting durch Zucker181.4.5. targeting durch Peptide182. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide363.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptide373.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomen formulierungen403.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		1.4.3. <i>targeting</i> durch rezeptorvermittelte Endozytose	17
1.4.5. targeting durch Peptide182. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide na PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomen formulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		1.4.4. <i>targeting</i> durch Zucker	18
2. FRAGESTELLUNG193. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)433.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		1.4.5. <i>targeting</i> durch Peptide	18
3. ERGEBNISSE203.1. Virale Transduktion von Endothelzellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	2. FRA	GESTELLUNG	19
3.1. Virale Transduktion von Endotheizellen203.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide323.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	3. ERG	EBNISSE	20
3.1.1. Generierung von Pseudovirionen203.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide nan PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	3.1	I. Virale Transduktion von Endothelzellen	20
3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion213.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide nan PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.1.1. Generierung von Pseudovirionen	20
3.1.3. Entwicklung der Zeitzani nach Pseudovirionen-Transfektion223.1.4. Analyse der zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide323.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomen formulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion	21
3.1.4. Analyse der Zytotxischen Effekte nach der Transfektion233.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide nan PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomen formulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3. I.3. Entwicklung der Zeilzahl nach Pseudovirionen-Transfektion	22
3.1.5. Nachweis der Rekombination von Heiter- und Expressionsvektor253.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptide an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3. 1.4. Analyse der Zytotxischen Effekte nach der Transfektion	23
3.2. Transfektion von Endotneizellen mit Polykationen283.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3. I.5. Nachweis der Rekombination von Heiter- und Expressionsvektor	25
3.2.1. Komplexbilduing von DNS mit verzweigten PET293.2.2. Transfizierbarkeit von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> mit PEI303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	3.4	2.2.1. Kompleyhildung von DNS mit vorzweigten DEL	28
3.2.2. Transizier barkert von Truman unbincar vem endotnenar cens mit PET303.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.0 Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PET	29
3.2.5. Selection der VCAM-1 bindenden Peptide323.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.0 Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.2.2. Italistizielbaikeit voit <i>numan umbilical vein enuotitellai celis</i> itili PEI	ა0 აე
3.2.4. Roppung von VCAM-1 Endenden Peptiden an PET333.2.5. Nachweis der VCAM-1 Expression363.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.0 Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		2.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Dentiden an DEL	ა∠ ეე
3.2.0. Nachweis der VCAM-T Expression303.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden373.2.7. HUVEC-Transfektion383.3.0 Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.2.5. Nachweis der VCAM 1 Expression	33 26
3.2.0. Adsbidding von Folypexen Zwischen Divs and FErmit geköppetter Feptiden3.2.7. HUVEC-Transfektion3.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate3.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate3.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen3.3.3. Größenbestimmung der Liposomen3.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)3.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 3.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 3.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen4. ZUSAMMENFASSUNG		3.2.6 Aushildung von Polynleven zwischen DNS und PEL mit gekonnelten Pentiden	30
3.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i> 383.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.2.7 HIVEC-Transfektion	30
3.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate393.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	2 3	8 Ontimierung der Vektorhalbwertzeit <i>in vivo</i>	38
3.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen403.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51	0.0	3.3.1 Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate	39
3.3.3. Größenbestimmung der Liposomen413.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.3.2 Verwendete Liposomenformulierungen	40
3.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)423.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.3.3. Größenbestimmung der Liposomen	41
3.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i> 433.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)	42
3.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i> 463.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.3.5. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vitro</i>	43
3.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen484. ZUSAMMENFASSUNG51		3.3.6. Halbwertzeit der Liposomen <i>in vivo</i>	46
4. ZUSAMMENFASSUNG 51		3.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen	48
	4. ZUS	AMMENFAŠSUNG	51

5. DISKUSSION	53	
5.1. Transfizierbarkeit von Endothelzellen durch einen viralen Vektor		
5.2. targeting von Endothelzellen durch VCAM-1 bindende Peptide	58	
5.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit in vivo durch Lipidmodifikationen in Lipo-	62	
somen		
5.4. Alternativen	65	
6. MATERIAL UND METHODEN	68	
6.1. Allgemeine Materialien	68	
6.1.1. Vektoren und Oligonukleotide	68	
6.1.2. VCAM-1 bindende Peptide	69	
6.1.3. Antikörper	69	
6.2. Allgemeine Methoden	69	
6.2.1. Molekularbiologische Methoden	69	
6.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNS	69	
6.2.1.2. Präparation von Gesamt-RNS aus BHK21-Zellen	70	
6.2.1.3. Denaturierende Agarosegele	70	
6.2.1.4. Isolierung von DNS aus Agarosegelen	70	
6.2.1.5. Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmid-DNS	70	
6.2.1.6. Klonierung von miNOS in pSinRep5	71	
6.2.1.6.1. pSinRep5lacZ	71	
6.2.1.6.2. DH-(BB)-5'SIN	71	
6.2.1.7. In vitro Transkription	72	
6.2.1.8. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaktion)	72	
6.2.1.9. Kontrolle der miNOS Position in Sindbisvirionen nach Rekombination	73	
6.2.2. Proteinschemische Methoden	74	
6.2.2.1. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	74	
6.2.2.2. Western-Blot VCAM-1	75	
6.2.2.3. Extraktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen	75	
6.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	75	
6.2.2.5. Kopplung von SPDP an PEI (25 kDa (v))	75	
6.2.2.6. Ninhydrin-Test	76	
6.2.2.7. Thiopyridol-Test	76	
6.2.2.8. Kopplung von Peptiden an derivatisiertes PEI	76	
6.2.3. Lipidchemische Methoden	77	
6.2.3.1. Synthese von N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivaten	77	
6.2.3.2. Reinigung der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivaten	77	
6.2.3.3. Liposomenpräparation durch Reversed phase evaporation	78	
6.2.3.4. Liposomenpräparation durch Lipidfilm Rehydrieren und Ultraschall	78	
6.2.3.5. Beladen von Liposomen mit Carboxyfluorescein und Fluoreszenz-	78	
messung		
6.2.3.6. Reinigung der Liposomen von nicht eingeschlossenem CF	79	
6.2.3.7. Interaktion von freiem CF mit der Liposomenhülle	79	
6.2.3.8. Größenbestimmung von Liposomen	79	
6.2.4. Methoden der Zellkultur	79	
6.2.4.1. Bakterienkultivierung	79	
6.2.4.1.1. Herstellung von kompetenten Zellen	80	
6.2.4.1.2. Transformation von kompetenten Zellen	80	

6.2.4.2. Zellkultur eukaryontischer Zellen		
6.2.4.2.1. HUVEC-Präparation	81	
6.2.4.2.2. Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	81	
6.2.4.2.3. Elektroporation von BHK21 Zellen	82	
6.2.4.2.4. Nitrit-Messung im Mediumüberstand	82	
6.2.4.2.5. Ernte und Kryokonservierung der Sindbis-Pseudovirionen	82	
6.2.4.2.6. Titerbestimmung bei lacZ-Pseudovirionen	83	
6.2.4.2.7. Titerbestimmung bei miNOS-Pseudovirionen	83	
6.2.4.2.8. Induktion von VCAM-1 auf HUVECs	84	
6.2.4.2.9. FACS-Analyse	84	
6.2.4.2.10. HUVEC Transfektion mit PEI 25 kDa (v)	85	
6.2.4.2.11. Herstellung der PEI / DNS Komplexe für die Transfektion	85	
6.2.4.2.12. Transfektionsanalyse durch Luziferase vermittelte Chemolu-	85	
mineszenz		
6.2.5. Methoden der Tierversuche		
6.2.5.1. Schwanzvenen-Injektion	86	
6.2.5.2. Organentnahme		
6.2.5.3. CF-Bestimmung im Blutplasma		
6.2.5.4. CF-Bestimmung in Organen		
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		
8. LITERATURVERZEICHNIS		

<u>1. EINLEITUNG</u>

1.1. Gentherapie

Viele Krankheiten, wie Krebs oder Erbkrankheiten, können auch heute noch, trotz moderner Medizintechnologie, nur symptomatisch behandelt werden. Die bisher angewandten klassischen Behandlungsmethoden könnten in Zukunft durch eine entsprechende Gentherapie ersetzt werden, die im besten Fall nicht nur die Symptome lindert sondern auch die Krankheitsursache beseitigt.

Die Gentherapie ist eine neue Therapieform, die sich in den letzten Jahren aus der Molekularbiologie und der Gentechnologie entwickelt hat. Das allgemeine Konzept der Gentherapie beruht auf dem Einsatz von Nukleinsäuren, die eine Fehlfunktion im Organismus beheben. Ermöglicht wurde die Entwicklung dieser neuen Therapieform durch das Wissen um die biochemischen und genetischen Grundlagen der meisten heute bekannten Erkrankungen. Die Integration der Gentherapie in die standardmäßig eingesetzten medizinischen Behandlungsmethoden von Krankheiten ist das Ziel der Weiterentwicklung der heutigen Gentherapieansätze.

Die Strategie der Gentherapie wird von der Ursache der jeweiligen Krankheit bestimmt, wobei zwei Punkte besonders beachtet werden müssen.

Erstens muss gewährleistet sein, dass der Einsatz von genetischem Material präzise stattfindet, so dass keine zusätzlichen Veränderungen im Genom des Patienten hervorgerufen werden. Zweitens muss sich die Behandlungsmethode nach den physiologischen Belangen des Patienten richten ^[1].

1.1.1. Grundlagen der Gentherapie

Die Gentherapie basiert auf dem Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen bzw. in einen bestimmten Subtyp von Zellen des zu behandelnden Patienten. Das erfolgreich eingeschleuste Gen / Nukleinsäure wirkt, mit Ausnahme der *anti-sense*-Methode, durch eine mehrfache Verstärkung des Gens.

Die initiale Verstärkung erfolgt durch die Transkription einer Kopie der therapeutischen DNS zu zahlreichen mRNS-Molekülen. Jedes einzelne mRNS-Molekül wird mehrfach translatiert und produziert somit mehrere therapeutische Proteinmoleküle. Handelt es sich bei dem therapeutischen Protein um ein Enzym, kann der Substratumsatz den therapeutischen Effekt weiter verstärken ^[2].

Das Potential der Gentherapie liegt darin, dass mit ihrer Hilfe angeborene und erworbene Krankheiten gleichermaßen behoben werden können. Sie hat ein sehr großes Anwendungsspektrum für die Behandlung von Krebs, Erbkrankheiten und anderen Indikationsgebieten wie den zahlreichen vaskulären Erkrankungen ^[3].

Je nach Krankheitsursache werden unterschiedliche Methoden der Gentherapie eingesetzt, die im wesentlichen auf vier unterschiedlichen Strategien beruhen:

- 1. <u>Substitutionsmethode:</u> Im Rahmen der Substitutionsmethode werden defekte Gene durch heterologe Gene ersetzt, deren Genprodukte die therapeutische Aufgabe erfüllen.
- <u>Additionsmethode</u>: Durch die Additionsmethode werden zusätzlich zu den defekten Genen Kopien des gesunden Gens eingeschleust, welche die ursprüngliche Aufgabe erfüllen. Alternativ werden Gene eingeschleust, die eine therapeutische Wirkung (z.B. Suizidgene in Tumoren, iNOS-Gen bei Restenose) in der betreffenden Behandlung erfüllen.
- 3. <u>Reparaturmethode:</u> Die Reparaturmethode korrigiert defekte Sequenzstücke eines Gens durch homologe Rekombination mit einem eingeschleusten Sequenzabschnitt, der die orginale Basenabfolge enthält.
- <u>anti-sense-Methode</u>: Bei dieser Methode wird die Translation des defekten Gens verringert oder verhindert, indem die RNS-Transkripte des Zielgens mit Nukleinsäuren, der entsprechenden Komplementärsequenz, zu einem Doppelstrang paaren und somit nicht für die Translation in den Ribosomen zugänglich sind.

Um die besten Heilungschancen für den Patienten zu gewährleisten muss die jeweils angewendete Methode für jede Krankheitsform optimiert werden.

Die ersten klinischen Versuche einer Gentherapie wurden 1990 an einem Patienten mit schwerem kombinierten Immundefizienz-Syndrom (SCID, *severe combined immunodeficiency syndrome*) durchgeführt. Der Patient hatte einen angeborenen genetischen Defekt in dem Enzym Adenosin-Desaminase (ADA). Das Fehlen der ADA, die am Purinkatabolismus beteiligt ist, führt zu defekten T- und B-Zellen. Mit Hilfe eines retroviralen Vektors (MLV, *murine leukemia retroviral vector*) wurden periphere T-Lymphozyten *ex vivo* mit dem Adenosin-Desaminase-Gen (ADA) transfiziert. Nach drei Jahren konnte in 30 % der zirkulierenden T-Zellen des Patienten das Transgen nachgewiesen werden. Ein zweiter Patient, der nach derselben Methode behandelt wurde, besaß hingegen nach drei Jahren nur in 1 % der zirkulierenden T-Zellen das Transgen ^[4].

Nach einer Dekade mit Schwerpunkt auf der Grundlagenforschung konnte die erste erfolgreiche Gentherapie im Jahr 2000 an zwei Patienten im Alter von 1 und 11 Monaten durchgeführt werden. Sie litten unter dem schweren kombinierten Immundefizienz-Syndrom-X1 (SCID-X1) einer angeborenen X-chromosomal gekoppelten Krankheit, bei der es zu einer frühzeitigen Blockade in der Differenzierung von T-Zellen und natürlichen Killerzellen kommt. Ihre Knochenmarkstammzellen (CD34⁺) wurden *ex vivo* mit komplementärer DNS der γ C-Untereinheit des Zytokinrezeptors transfiziert. Auch bei diesem Ansatz wurde ein defekter retroviraler MLV verwendet. Nach zehn Monaten war bei beiden Patienten die γ C- Expression in T-Zellen und in natürlichen Killerzellen unverändert nachweisbar. Der besondere Erfolg bestand darin, dass die Anzahl und die Funktion der Zellen vergleichbar mit der von gleichaltrigen gesunden Babys war. Auch das gesetzte Ziel, die Sicherheit des Gentransferprotokolls zu beweisen, konnte in diesem Versuch erreicht werden ^[5].

Wie oben beschrieben wurde hängt eine erfolgreiche Behandlung mittels Gentherapie von einer geeigneten Applikationsform des Vektors ab. Je nach Applikationsort wird zwischen der lokalen und der systemischen Gentherapie unterschieden.

Bei der lokalen Gentherapie wird der Vektor in unmittelbarer Nähe zum Wirkort appliziert. Findet die Gentherapie z.B. in hämatopoetischen Stammzellen *ex vivo* statt, wird der Vektor in das Kulturmedium der Zellen gegeben. Bei einer lokalen Gentherapie *in vivo* erfolgt eine direkte Injektion des Vektors z.B. in einen Tumor, wobei ein operativer Eingriff je nach Lokalisation des Tumorgewebes oft unumgänglich ist. Der Einsatz von lokal verwendeten Vektoren erfordert keine hohen Ansprüche an Zellspezifität und Stabilität. Präzise vorgeschobene Injektionskatheter und minimalinvasive Chirurgie tragen bei dieser Methode hauptsächlich zum Erfolg der Behandlung bei.

Bei einer systemischen Gentherapie erfolgt die Applikation des Vektors je nach Anwendung in den Blutstrom, den Verdauungstrakt oder in die Atmungsorgane. Der Vektor gelangt mit dem jeweiligen Trägermedium zu seinen Zielzellen, was sehr hohe Ansprüche an die Halbwertszeit des Vektors *in vivo* und die Zellspezifität stellt, da der chirurgische Eingriff auf die Applikation des Vektors reduziert ist.

1.1.2. Der ideale gentherapeutische Vektor

Für einen systemischen Gentransfer sollte ein zellspezifischer Vektor idealerweise die folgenden Punkte erfüllen:

 <u>Einfache Produktion</u>: Es müssen hohe Titer, bzw. große Mengen des Vektors mit geringem Kostenaufwand im kommerziellen Maßstab produzierbar sein. Die Stabilität sollte ausreichen, um lange Transportwege und Lagerzeiten überbrücken zu können. Eine möglichst hohe Konzentration in einem kleinen Volumen sollte durch die Formulierung möglich sein. Wünschenswert wäre eine möglichst breite Zellzahlenspanne von z.B. 1x10² Zellen bei hämatopoetischen Stammzellen bis zu 1x10¹¹ Zellen bei Leberzellen die mit dem Vektor transfiziert werden können.

Für die Effizienz des Vektors sind von Bedeutung:

• <u>Aufrechterhaltung der Funktion</u>: Die Expression der therapeutischen Gene muss für die Dauer der Therapie aufrecht erhalten werden und bei Bedarf auch reguliert werden können.

• <u>Kapazität:</u> Die Aufnahmekapazität des Vektors für therapeutische Gene mit den benötigten regulatorischen Genelementen darf nicht größenlimitiert sein.

Die Vorraussetzungen für eine sichere Anwendung sind:

- <u>Immunologisch inert:</u> Der Vektor darf weder eine humorale Immunantwort auslösen, noch eine zelluläre Immunantwort, damit eine repetitive Injektion des Vektors im Rahmen der Therapie bei Bedarf möglich ist und transfizierte Zellen nicht durch das patienteneigene Immunsystem eliminiert werden.
- <u>Biologischer Abbau</u>: Der Vektor muss nach dem Nukleinsäuretransport vollständig aus dem Organismus ausgeschieden oder vom Organismus resorbiert werden ohne das es zu einer Intoxifikation durch Vektormetabolite kommt.
- <u>Zell- oder Gewebespezifität:</u> Nur die gewünschten Zielzellen sollen durch den Vektor spezifisch transfiziert werden, auch wenn sie im Organismus verteilt vorliegen (hämatopoetisches System) oder sehr heterogene Populationen bilden (Gehirn).

In Abhängigkeit der therapeutischen Verwendung des Vektors gilt:

- <u>Replikation, Segregation, Integration:</u> Der Vektor sollte sich spezifisch in einem definierten Lokus innerhalb eines Chromosoms der Zielzelle integrieren oder episomal im Nukleus vorliegen und bei einer Zellteilung mit repliziert werden.
- Infektion von teilenden und nicht-teilenden Zellen: Neben mitotisch aktiven Zellen sollten auch, je nach Fragestellung, postmitotische Zellen wie z.B. Neurone oder Kardiomyozyten transfiziert werden können ^[6].

Die bis zum Ende des 20. Jahrhundert entwickelten Vektoren erfüllen nicht alle der oben genannten Punkten gleichzeitig. Bei ihrer Anwendung muss im Hinblick auf das Therapieziel der jeweils bestmögliche Kompromiss aus allen Bedingungen eingegangen werden.

1.2. Aufbau eines zellspezifischen gentherapeutischen Vektors

Ein zellspezifischer Vektor für einen systemischen Gentransfer besteht aus drei Komponenten: der

therapeutischen DNS, dem Vektor und dem Modul für eine hohe Bindungsaffinität an die Zielzellen (*targeting*-Modul) (siehe Abbildung 1).

Die Aufgabe der therapeutischen DNS besteht, nicht notwendigerweise, in der Bereitstellung einer Transkriptionsvorlage für die Synthese therapeu-



<u>Abbildung 1:</u> schematische Zeichnung eines zellspezifischen Vektors für systemischen Gentransfer.

tischer Proteine, sondern auch als Hybridisierungspartner mit antisense Orientierung zu RNS-

Molekülen. Der Vektor fungiert als Träger und Degradationsschutz der therapeutischen DNS und des *targeting*-Moduls. Das *targeting*-Modul ist für die Zellspezifität des Vektors verantwortlich, wodurch eine selektive Transfektion der Zielzellen ermöglicht werden soll. Mit Hilfe dieses Moduls können die Effizienz und die Sicherheit des Vektors im gentherapeutischen Einsatz nachhaltig modifiziert werden.

1.2.1. Die verwendete therapeutische DNS

Für den Erfolg eines Gentransfers, mit Ausnahme der *anti-sense*-Methode, ist die Anzahl der DNS-Moleküle entscheidend, die in den Zellkern gelangen und transkribiert werden. Für die Annahme, dass 1 Molekül von 10⁴ - 10⁵ Molekülen die Zielzelle erreicht, endozytiert und aus dem Endosom freigesetzt wird gilt, dass mindestens 10⁷ - 10⁸ DNS-Moleküle für jede Zielzelle bei einem *in-vivo*-Gentransfer eingesetzt werden müssen ^[7].

Eine besondere Herausforderung an die systemische Gentherapie stellen Herz-Kreislauferkrankungen dar, da die meisten Ansätze einer vaskulären Gentherapie die Transfektion des Gefäßendothels erfordern. Diese einzellige Endothelschicht der Blutgefäße ist sowohl auf der luminalen als auch auf der basalen Seite an zahlreichen Prozessen beteiligt, deren Beeinträchtigung zu pathologischen Veränderungen führen kann. Die Zellspezifität eines Vektors für einen intravaskulären Einsatz sollte so spezifisch sein, dass ausschließlich die Endothelzellen in den erkrankten Arealen erfolgreich transfiziert werden. Die Zellen des übrigen Endothels dürfen von dem Vektor nicht transfiziert werden, da durch die ungewollte Transfektion des therapeutischen Gens eine Disbalance in der Physiologie der gesunden Endothelzellen zu erwarten ist. Nachteilig auf die Transfizierbarkeit *in vitro* und *in vivo* wirkt sich die natürliche Funktion der Endothelzellen als regulierbare Barriere der Blutgefäße mit selektiver Permeabilität aus. Um Endothelzellen dennoch erfolgreich transfizieren zu können, kamen bis jetzt hauptsächlich Transfektionssysteme mit viralen Vektoren wie Adenoviren oder Retroviren zum Einsatz. Für eine erfolgversprechende therapeutische Anwendung ist die Effektivität dieser bisher verwendeten Vektoren allerdings zu gering ^[8,9].

In Tierversuchen hat man erfolgreich den systemischen Gentransfer mit Hilfe von Reportergenexpression nachweisen können. Durch das Einschleusen von Reportergenen, wie lacZ (β-Galaktosidase) oder GFP (*green fluorescent protein*) konnte eine Identifizierung und Lokalisierung erfolgreich transfizierter Zellen erfolgen. Mit Reportergenen wie Luziferase oder der induzierbaren NO-Synthase konnte man zudem die Effektivität des Gentransfers anhand der Enzymaktivität nachweisen. Die induzierbare NO-Synthase hat mit ihrem Produkt NO den Vorteil, dass die transfizierten Zellen nicht aufgeschlossen werden müssen, um die Aktivität des Enzyms zu bestimmen. NO bzw. die Umwandlungsprodukte Nitrit und Nitrat lassen sich im Zellkulturmedium mit Hilfe der Griess-Reaktion photometrisch ermitteln, was für kinetische Studien der Langzeit-Reportergenexpression von größtem Nutzen ist.

1.2.2. NO-Synthasen

Die NO-Synthasen (EC 1.14.13.39) treten in 3 Isoformen auf, die aufgrund ihrer Lokalisation und

Regulation in die neuronale NO-Synthase (nNOS; NOS I) mit einem Molekulargewicht von 160 kDa, die induzierbare NO-Synthase (iNOS; NOS II) mit einem Molekulargewicht von 130 kDa und die endotheliale NO-Synthase (eNOS; NOS III) mit einem Molekulargewicht von 135 kDa unterschieden werden ^[10,11]. Die ursprüngliche Nomenklatur von nNOS und eNOS wurde 1991 geändert, da sie ein spezifisches Expressionsmuster suggerierte. Diese Isoformen



<u>Abbildung 2:</u> Schematischer Aufbau und Lokalisation von Kofaktor-Bindungsstellen bei NO-Synthasen (aus NO and Cardiovascular Homeostasis; J-B Michel eds. Menarini International 1996, 9).

werden jedoch auch in anderen Zellen und Geweben exprimiert ^[12]. Lokalisiert sind die humanen NO-

Synthasen auf dem Chromosom 12 (NOS I), Chromosom 17 (NOS II) und Chromosom 7 (NOS III). Sie besitzen hoch konservierte Sequenzen in den Bereichen, an denen ihre Kofaktoren binden (siehe Abbildung 2).

Die Wirkungsweise der NO-Synthasen besteht in der Oxidation der Guanidingruppe von L-Arginin zu L-Citrullin und NO ^[13,14] (vergleiche Abbildung 3). Für diese Reaktion werden die Kofaktoren NADPH, FAD, Calmodulin, eine



<u>Abbildung 3:</u> Schematische Darstellung der Funktionsweise einer NO-Synthase (aus NO and Cardiovascular Homeostasis; J-B Michel eds. Menarini International 1996, 10).

Hämgruppe sowie Tetrahydrobiopterin als Elektronentransporter benötigt ^[15].

NO ist das bisher kleinste bioaktive Molekül, das von den meisten Säugerzellen hergestellt werden kann. Es wurde 1980 als ein endothelabhängiger Faktor entdeckt, der nach Applikation von Acetylcholin zu einer Dilatation von Blutgefäßen führte und deshalb EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) genannt wurde ^[16]. Erst 1987 konnte die Identität des EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) festgestellt werden ^[17,18].

1.3. Verwendete Vektoren in der Gentherapie

Für den Transport der therapeutischen DNS an ihren Wirkort werden Vektoren eingesetzt, die neben dem Schutz der therapeutischen DNS auch einen zielgerichteten Gentransfer ermöglichen sollen. Unterteilt werden die für gentherapeutische Zwecke eingesetzte Vektoren in zwei große Gruppen. Zum einen in die Gruppe der viralen Vektoren und zum anderen in die Gruppe der nicht-viralen Vektoren ^[19].

1.3.1. Virale Vektoren

Virale Vektoren bestehen aus replikationsdefizienten Viren, bei denen die therapeutischen Gene den Platz viraler Gene einnehmen, die für die Virus-Replikation von Bedeutung sind. Je nach Vektorkonzept wird das rudimentäre virale Genom in mehrere Vektoren aufgespalten, um größere therapeutische Sequenzen einsetzen zu können und um die Möglichkeit von unerwünschten Rekombinationen zu vermindern.

Die häufigsten verwendeten viralen Vektoren wurden von Retroviren, Adenoviren und Adenoassoziierten Viren abgeleitet ^[20]. Bei der Verwendung dieser viraler Vektoren *in vivo* kann es zu deren Eliminierung durch das Komplement-System kommen und zu einer starken Immunantwort, die sich gegen das eingebrachte virale Protein richtet. Ein weiterer Nachteil beim Einsatz von retroviralen Vektoren stellt die unspezifische Integration in das Zielzellgenom dar, wobei durch Insertionsmutagenese Gene zerstört werden können. Im Falle von adenoviralen und Adeno-assoziierten viralen Vektoren wirkt sich negativ aus, dass über 30% der erwachsenen Bevölkerung bereits Antikörper gegen die WT-Viren aufweisen und somit nicht erfolgversprechend mit Vektoren dieser Typen behandelt

werden können ^[21]. Die oben genannten Nachteile dieser Vektoren sollte bei der Verwendung von Vektoren aus Sindbis Viren nur im geringerem Umfang auftreten.

Das Sindbisvirus ist der Prototyp der Alphaviren aus der Familie der Togaviridae (Mantelviren). Der "Mantel" besteht aus der Plasmamembran der Wirtszelle und maskiert das Kapsid vor dem Immunsystem. Das Virus wurde 1952 aus *Culex* Mücken in der Umgebung des ägyptischen Dorfes



<u>Abbildung 4:</u> RNS-Populationen, die bei der Vermehrung des Sindbisvirus benötigt werden. Quelle: S. Schlesinger and M. J. Schlesinger. Togaviridae: The viruses and their Replication in Fields Virology 3rd edition B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al. eds. Lippincott-Raven Philadelphia 1996. Vol 1 S.828.

Sindbis im Nildelta isoliert ^[22]. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen unsegmentierten (+)-Strang-RNS von 11703 Nuk-leotiden Länge, das am 5'-Ende mit einer 7-Methylguanosin-Kappe und am 3'-Ende durch Polyadenylierung vor Abbau durch RNAsen geschützt wird ^[23]. Die genomische RNS besteht aus zwei Modulen und bietet den Vorteil das sie nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren kann (vergleiche Abbildung 4).

Am 5'-Ende kodieren 66 % der Nukleotide für die Nichtstrukturproteine (nsP), die verantwortlich für die Transkription und die Replikation des Virus sind. Von dem 3'-Ende der genomischen RNS wird eine subgenomische (-)-Strang-RNS als Matrize synthetisiert, die für die Strukturproteine kodiert. Es handelt sich dabei um das Capsidprotein und um die Glycoproteine E1 und E2 ^[24].

Das synthetisierte Polyprotein der Nichtstrukturproteine wird posttranslational modifiziert und in 4 Polypeptide (nsP1-4) gespalten ^[25-27]. Das Kapsidprotein bildet das icosaedrische Nukleokapsid, das von der Plasmamembran ummantelt wird ^[28,29]. In der Lipiddoppelschicht des Virusmantels bilden die Glycoproteine E1/E2- Heterodimere ^[30]. Über das Glycoprotein E2 verläuft die Interaktion des Virus mit dem Wirtszell-Rezeptor, der bei BHK21 (*baby hamster kidney*)- und anderen Säugerzellen der 67 kDa Laminin-Rezeptor ist ^[31-33]. Die Lipidkomposition des Virusmantels entspricht in etwa der Wirtszell-membran, mit der Ausnahme, dass der Cholesterin- und der Proteinanteil in der Membran erhöht ist und diese eine geringere Fluidität besitzt ^[34,35].

Entwickelt wurde das Sindbis-Expressionssystem 1993 von S. Schlesinger durch eine funktionelle Aufspaltung des Sindbisvirusgenoms, wobei die Strukturproteine und die Nichtstrukturproteine in separaten Vektoren vorliegen ^[36] (vergleiche Abbildung 5).

Der Expressionsvektor kodiert das Verpackungssignal, die Nichtstrukturproteine sowie das zu exprimierende therapeutische Gen bzw. ein Reportergen. Das Reportergen und die Strukturproteine sind hinter subgenomischen den Promotor (P_{SG}) kloniert, um eine hohe Expression dieser Proteine zu gewährleisten. Der Helfervektor kodiert die notwendigen Strukturproteine, damit die rekombinante



<u>Abbildung 5:</u> Schematische Darstellung der funktionellen Aufspaltung des Sindbisvirusgenoms.

RNS des Expressionsvektors verpackt werden kann.

Um von der Plasmid-DNS zu der verpackbaren RNS zu gelangen, muss die DNS *in vitro* transkribiert werden. Die gewonnenen RNS-Transkripte des Helfer- und Expressionsvektors werden durch Elektroporation in BHK21 Zellen eingebracht. Die Produktion von Pseudovirionen erfolgt in den Zellen, die beide RNS-Sorten aufgenommen haben. Mit Hilfe der zelleigenen Proteinbiosynthesemaschinerie werden die eingeschleusten (+)-Strang-mRNS-Moleküle von (1) Expressions- und (2) Helfervektor



<u>Abbildung 6:</u> Schematische Darstellung der Produktion von miNOS-Pseudovirionen in Zellen mit Hilfe des Sindbis Expressionssystems. Erklärung siehe Text.

translatiert (siehe Abbildung 6). Die viralen Nichtstrukturproteine Replikase und Transkriptase vervielfältigen zum einen die RNS des Expressionsvektors (3), zum anderen synthetisieren sie, angetrieben durch den subgenomischen Promotor (P_{SG}), bis zu 10.000 Moleküle Helfervektor-RNS pro Zelle. Nach Translation (4) der amplifizierten Helfervektor-RNS kapseln die Kapsidproteine die RNS-Moleküle des Expressionsvektors, die ein Verpackungssignal ψ aufweisen, in das Nukleokapsid ein (5). Die ebenfalls von der Helfervektor-RNS translatierten viralen Glykoproteine lagern sich in der Plasmamembran der Wirtszelle ein. Die Nukleokapside interagieren mit den viralen Glykoproteinen in der Plasmamembran und umgeben sich auf diese Weise mit einem "Plasmamembranmantel", bevor sie sich vollständig von der Wirtszelle abknospen (6). Die Pseudovirionen können nur Zellen infizieren, sich aber nicht mehr vermehren, da sie nur die RNS für die Nichtstrukturproteine und das rekombinante Gen, nicht aber die RNS der Strukturproteine enthalten.

Der wesentliche Vorteil des Sindbis-Systems liegt in dem geringem Zeitintervall das nach der Transduktion verstreicht bis die heterologe Proteinexpression nachgewiesen werden kann, dem breiten Wirtsspektrum und der hohen Expression an heterologen Protein die innerhalb weniger Stunden nach Transduktion erreicht wird. Somit wurden diverse Vektoren entwickelt, um schwer zu transfizierende Zellen wie Kardiomyozyten zu transfizieren ^[37-42]. Auch sind bereits Arbeiten zu einem Tropismus-wechsel von Sindbis-Vektoren gemacht worden, die ein chimäres Hüllprotein aus viralem Glykoprotein

und Protein A aus *Staphylococcus aureus* verwenden um IgG-Moleküle als *targeting*-Module zu koppeln ^[43].

1.3.2. Nicht-virale Vektoren

Die Alternative zu den viralen Vektoren bilden die nicht-viralen Vektoren. Die nicht-viralen Vektoren weisen eine geringere Toxizität gegenüber viralen Vektoren, eine nicht vorhandener Immunogenität und eine vereinfacht durchführbare Produktion größerer Mengen auf. Nachteilig ist die im Vergleich zu viralen Vektoren viel geringere Effektivität beim Einschleusen heterologer DNS in ihre Zielzellen. Die nicht-viralen Vektoren wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht, um die extrazellulären (*in vivo*) und intrazellulären Barrieren bei der Einschleusung und Expression von heterologer DNS zu ver-

bessern.

Diese Restriktionen bei der Transfektion von Zellen durch nicht-virale Vektoren sind:

 <u>Applikationsort und Transport zu den Zielzellen:</u> Die intravenöse Applikation ist der effektivste Weg, nicht-virale Vektoren in den Organismus zu bringen. Nach der Applikation werden sie in der Leber und in der Milz durch das RES (*reticular endothelial system*) größtenteils aus dem Blutstrom entfernt ^[44]. Alternativ können die nicht-viralen Vektoren subcutan oder intramuskulär verabreicht werden, wenn sie auf diesem Wege ihre Zielzellen erreichen können ^[45]. Diese Applikationsform wiederum ist abhängig von der beabsichtigten Therapie. Intratracheal applizierte nicht-virale Vektoren werden zur Therapie der zystischer Fibrose eingesetzt, hierbei werden vor allem Epithelzellen transfiziert ^[46,47].

Bevor ein nicht-viraler Vektor von den Zielzellen aufgenommen werden kann, muss die DNS-Degradation und die Inaktivierung durch Serumproteine, Opsonine, degradative Enzyme und Makrophagen verhindert werden.

 <u>Aufnahme durch die Zielzellen:</u> Die Aufnahme der Komplexe in die Zelle erfolgt über Endozytose wenn positiv geladene nicht-virale Vektoren an die negativ geladenen Oberflächen der Zielzellen gebunden haben oder Rezeptoren mit gebundenem Liganden internalisiert werden (siehe Abbildung. 7). Die jeweilige Aufnahmerate der Komplexe differiert von Zelltyp zu Zelltyp und ist größenlimitiert wodurch große Komplexe für die Transfektion der Zellen wirkungslos sind [48,49]. <u>Verlassen des Endosoms</u>: Im Anschluß an die Endozytose muß der nicht-virale Vektor das Endosom verlassen, damit die DNS in den Lysosomen nicht degradiert wird ^[50]. Die verwendeten Strategien benutzen fusogene Lipide (DOPE, Dioleylphosphatidylethanolamin) oder Peptide, welche die Integrität der Endosomenmembran durch Entstehung invertierter hexa-



<u>Abbildung 7:</u> Restriktionen bei der Transfektion von eukaryotischen Zellen. Verändert nach A.P. Polland, From genes to gene medicines: Recent advances in nonviral gene delivery, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys. (1998) **15**(2), 157.

gonaler Struktren oder Porenbildung zerstören ^[51]. Ein anderer Ansatz verwendet Polyethylenimin (PEI) als Vektorsystem. PEI besitzt eine große Pufferkapazität, die den pH-Wert-Abfall im Lysosom kompensiert und durch osmotische Schwellung das Endosom / Lysosom zum Platzen bringt ^[52].

- 4. <u>Stabilität im Zytoplasma:</u> Die DNS darf zwischen Freisetzung aus dem Endosom und Eintritt in den Zellkern nicht abgebaut oder inaktivert werden.
- 5. <u>Zellkernimport</u>: Die aus dem Endosom / Lysosom ausgeschleuste DNS muss in den Nukleus gelangen, um transkribiert zu werden. Der Kerntransport der DNS ist ein bis dato nicht vollständig verstandener Prozess und wird in seiner Effizienz durch das mögliche Vorhandensein von zytosolischen Nukleasen vermindert. Die DNS-Moleküle, die in den Zellkern importiert werden, dürfen keine Vektorkomponenten beinhalten, da diese eine Transkription verhindern

^[53]. Eine Beschleunigung des sequenzspezifischen Zellkernimportes läßt sich durch die Einklonierung viraler Sequenzen (ORI, *origin of replication*, Promotoren) in die DNS herbeiführen ^[54].

Um für die große Anzahl nicht-viraler Vektoren mit ihren unterschiedlichen Bestandteilen ein allgemeingültiges Ordnungskriterium für zukünftige Publikationen zu erstellen, wurde im Jahr 1997 eine einheitliche Nomenklatur für die nicht-viralen Vektoren eingeführt ^[55]. Demnach gilt für

Komplexe:

	Lipoplex:	kationisches Lipid / Nukleinsäure-Komplex
	Polyplex:	kationisches Polymer / Nukleinsäure-Komplex
Transfektion:		
	Lipofektion:	Nukleinsäuretransfer vermittelt durch kationische Lipide
	Polyfektion:	Nukleinsäuretransfer vermittelt durch kationische Polymere
Komposition (N/P-Wert):	
	Ladungsverhältnis:	positive Ladungsäquivalente der kationischen Komponente (N)
		im Verhältnis zu negativen Ladungsäquivalenten der Nuklein-

säurekomponente (P).

Eine einheitliche Nomenklatur für Liposomen, die als nicht-virale Vektoren eingesetzt werden, gibt es nicht. Die Verwendung von Liposomen zum Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen wird allgemein als Transfektion bezeichnet. Die Ladungsverteilung der Liposomenkomponenten ermöglicht eine Unterscheidung in neutrale und geladene Liposomen. Mit Hilfe der Lipidzusammensetzung ist es ebenfalls möglich die verwendeten Liposomen in unterschiedliche Gruppen einzuteilen.

Die Hauptvertreter der heute zur Verfügung stehenden großen Palette nicht-viraler Vektoren werden im folgenden kurz erläutert ^[56-58].

1.3.2.1. Neutrale Liposomen als Vektor

Neutrale Liposomen wurden 1965 das erste Mal charakterisiert ^[59]. Bei neutralen Liposomen handelt es sich um mikroskopisch kleine Vesikel, die aus mindestens einer Doppelschicht amphiphiler Moleküle (Lipide) bestehen und ein wässriges Kompartiment in ihrem Innern umschließen. In das Lumen der Liposomen bzw. in die Membran(en) können unterschiedlichste Substanzen wie Nukleinsäuren, Peptidhormone, Pharmazeutika oder Ionen eingeschlossen werden ^[60].

Die Liposomen werden anhand ihrer Morphologie in drei Klassen unterschieden:

- <u>SUV (*small unilamellar vesicles*):</u> Liposomen mit einem Durchmesser, der sich dem kleinstmöglichen theoretischen Durchmesser von 15 – 25 nm annähert. Die obere Größenlimitierung liegt bei einem Durchmesser von 100 – 150 nm. Die Größenverteilung in einer SUV-Population ist relativ homogen.
- <u>LUV (*large unilamellar vesikles*):</u> Liposomen mit einem Durchmesser ab 150 bis >1000 nm werden unter dem Begriff LUV vereint. In LUV-Populationen ist die Größenverteilung sehr inhomogen und nur durch eine nachträgliche Größenselektion einzugrenzen.
- 3. <u>MLV (*multilamellar vesicles*):</u> Diese Liposomen mit Durchmessern von 100 bis >1000 nm weisen mehrere konzentrische Lipiddoppelschichten auf.

Die Bezeichnungen REV (*reverse-phase evaporation vesicle*), DRV (*dried-reconstituted vesicle*), MVL (*multivesicular liposome*) und SSL (*sterically stabilized liposomes*) beziehen sich nicht auf die Größe, sondern auf die Herstellungsmethode der Liposomen.

Liposomen wurden erstmals 1979 verwendet, um Nukleinsäuren einzukapseln ^[61]. Es handelte sich bei diesen liposomalen Vektoren um LUV, die mit Hilfe der REV-Methode hergestellt wurden ^[62]. Da Liposomen aufgrund ihrer Lipidhülle biokompatibel, nicht immunmodulatorisch und toxisch sind und außerdem die eingeschlossene Nukleinsäure vor Degradation schützen, fanden Liposomen als gentherapeutische Vektoren Verwendung.

Werden Liposomen intravenös appliziert, kommt es zur Interaktion mit zwei unterschiedlichen Gruppen von Plasmaproteinen:

- HDL (*high density lipoproteins*): Bei der Interaktion von Liposomen mit HDL im Plasma erfolgt ein Lipidaustausch, in dessen Konsequenz es zum Ausstrom eingeschlossener Substanzen kommt. Der Lipidaustausch findet vermehrt bei Liposomen aus DOPC (Dioleylphosphatidylcholin) statt, die bei 37°C eine hochfluide Membran haben. Wählt man Lipide, die eine höhere Phasenübergangstemperatur haben, wie z.B. DSPC (Distearoylphosphatidylcholin), erhält man bei 37°C rigidere Membranen, die einen Lipidaustausch mit HDL erschweren.
- <u>Opsonine</u>: Liposomen, die sich im Blutstrom befinden, werden von Opsoninen erkannt, die an deren Oberfläche adsorbieren. Zu diesen Opsoninen gehören Immunglobuline ^[63], Fibronektine ^[64] und das Komplementsystem mit dem C3-Protein als maßgeblichen Vertreter ^[65]. Diese mit Opsoninen markierten Liposomen werden von MPS-(*mononuclear phagocyte system*) Makrophagen, auch RES (*reticulo endothelial system*) genannt, primär in der Leber endozytiert und aus dem Blutstrom eliminiert ^[66].

Auch nicht-phagozytierende Zellen interagieren mit den Liposomen im Blutstrom, indem sie die Vesikel stabil adsorbieren, endozytieren, fusionieren oder auch Lipide austauschen ^[67].

Das Hauptziel bei der Entwicklung von gentherapeutisch verwendbaren Liposomen für die systemische Anwendung besteht in der Verlängerung ihrer Halbwertzeit *in vivo*. Eine längere Plasmaverweildauer kann durch die Verwendung von sterisch stabilisierten Liposomen erreicht werden, die Glykolipide ^[68] oder Polymere wie Polyethylenglykol auf der Liposomenoberfläche enthalten ^[69].

In Bezug auf die Verlängerung der Liposomenhalbwertzeit ist das bestuntersuchte Polymer Polyethylenglykol (PEG), das durch freie Rotation des einzelnen Polymers die Interaktion der Plasmaproteine mit den Liposomen sterisch verhindert bzw. behindert ^[70].

Über den Mechanismus, mit dem die Interaktion verhindert wird, gibt es unterschiedliche Theorien. Diese Theorien postulieren die Repulsion durch Polymerkonstriktion, Bindung von Disopsoninen, Verhinderung der Antikörpermodulation durch die flexible Polymergestalt, Ausbildung einer "molekularen Wolke" als Schutzschild und die Ausbildung einer Hydrathülle ^[71-75].

Weitere Möglichkeiten, die Halbwertzeit der Liposomen *in vivo* zu verlängern, bestehen in der Verringerung des Durchmessers bis auf 100 nm, in der Erhöhung des Cholesterinanteils der Lipidhülle und in der Verwendung von Lipiden, die eine rigide Liposomenhülle bewirken. Liposomen bis zu einem Durchmesser von 30 nm penetrieren durch das fenestrierte Endothel der Leber und Milz und werden so aus dem Blutstrom entfernt. Größere Liposomen mit Durchmessern bis zu >1 µm werden von Opsoninen (s.o.) attackiert und eliminiert. Zudem bergen sie die Gefahr von Embolien, indem sie Kapillargefäße verstopfen ^[76].

1.3.2.2. Liposom / DNS Komplexe (Lipoplexe)

Lipoplexe sind nicht-virale Vektoren die aus kationischen Liposomen und DNS bestehen. Die Interaktion zwischen den Komplexkomponenten erfolgt durch die elektrostatische Anziehungskraft zwischen positiv geladenen Liposomen und negativ geladener DNS ^[77]. Die kationischen Liposomen enthalten neben kationischen Lipiden wie z.B. DOTMA, N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N,-trimethylammoniumchlorid, DOTAP, 1,2-Dioleyl-3-tri-methyl-ammoniumpropan, oder DOSPER, 1,3-Di-oleoyloxy-2(6-carboxy-sper-midyl)propyl-amid-4-acetat noch sogenannte Helferlipide (DOPE s.o.), die einen Austritt aus den Endosomen vermitteln, und neutrale Lipide. Durch ein hohes Verhältnis an kationischem Lipid zu DNS konnte eine höhere heterologe Genexpression nach intravenöser Applikation gemessen werden, weil ein Überschuss an positiver Ladung das Transgen besser vor Degradierung schützt ^[78].

Eingesetzt wurden kationische Liposomen erstmals 1987 und sind bis heute die am meisten verwendeten nicht-viralen Vektoren ^[79]. Bereits in klinischen Phase I-Studien wurden kationische Liposomen (DMRIE/DOPE) verwendet um bei 9 Patienten zystische Fibrose durch einen Gentransfer des *cystic fibrosis gene* (pGT-1) zu behandeln ^[80].

Die Nachteile dieser positiv geladenen Lipidformulierungen bestehen bei einem Gentransfer in der unspezifischen Aufnahme durch alle Zelltypen die über eine negative Oberflächenladung verfügen.

1.3.2.3. Polymer / DNS Komplexe (Polyplexe)

Kationische Polymere sind nicht-virale Vektoren die durch elektrostatische Wechselwirkungen die DNS auf ihrer Oberfläche kondensieren und kleine Partikel mit unterschiedlicher Morphologie bilden. Die Größe der DNS-Moleküle spielt dabei keine limitierende Rolle. Die DNS wird auf diese Weise vor Degradierung geschützt und durch Endozytose der Polyplexe vermehrt in die Zellen aufgenommen. Die am häufigsten verwendeten Polymere in den Polyplexen sind Poly-(L-Lysin) und Polyethylenimin (s. 1.3.2.4.)^[81,82].

Diese Polymere bilden unter physiologischen Bedingungen leicht Aggregate, die zu groß sind um feste Gewebe penetrieren zu können oder um von den Zellen durch Endozytose aufgenommen zu werden, entsprechend groß muss die Verdünnung gewählt werden um diesen Nachteil auszuschließen.

1.3.2.4. Polyethylenimin (PEI)

PEI ist ein gut charakterisiertes kationisches Polymer für den Gentransfer, da es die negativen Ladungen der DNS maskiert ^[52]. Es ist ein kationisches Polymer, das entweder linear mit der Summenformel {H(-NHCH₂CH₂-)_nNH₂} oder verzweigt mit der Summenformel {-NHCH₂CH₂-)_x[-

N(CH₂CH₂NH₂)CH₂CH₂)]_y} in definierten Größen von 1–1000 kDa vorliegen kann. Das DNS-Molekül wird kondensiert und tritt bei einem Überschuss an positiven Ladungen mit den negativen Ladungen der Proteoglykane auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung (vergleiche Abbildung 8) ^[83].

Um DNS vollständig durch PEI zu komplexieren, ist ein N/P-Wert von mindes-



<u>Abbildung 8:</u> Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen DNS und PEI bei der Polyplexbildung und bei der Adsorption des Polyplexes auf der Plasmamembran der Zielzelle.

tens 2 nötig. Verwendet man ein verzweigtes PEI von 25 kDa, beträgt die Oberflächenladung (Zetapotential) des Polyplexes –50 mV, bei einem N/P-Wert von 2, was zu einer Abstoßung der Polyplexe von der Zelloberfläche führt. Das Zetapotential wird bei einem N/P-Wert von 3,5 neutral und erreicht bei einem N/P-Wert von 10 positive Werte von 20 mV ^[84].

Der kritische Punkt bei der Polyfektion ist der Transport durch die Plasmamembran. Da die Polyplexe die Membran nicht penetrieren können, wird ein Transportmechanismus benötigt. *In vitro* konnte eine große Anzahl an Zelllinien und Primärzellen erfolgreich transfiziert werden. Die Aufnahme der Polyplexe erfolgt über unspezifische adsorptive Endozytose ^[85,86]. Die Transfektionseffizienz liegt bei PEI in dem selben Bereich wie bei den besten zur Zeit erhältlichen Vektoren aus kationischen Lipiden ^[52,82].

In vivo konnten Neurone und Gliazellen im Gehirn von adulten und neugeborenen Mäusen mit der selben Menge an Polyplexen wie für primäre neuronale Zellkulturen erfolgreich transfiziert werden, ohne dass sich die Reizweiterleitung und Membrandepolarisierung bei den Zellkulturen veränderte oder sich an der Injektionstelle eine Nekrose bildete ^[87,88]. Nach einer systemischen Applikation von linearem PEI in die Schwanzvene von Mäusen konnte selektiv die Lunge transfiziert werden ^[89].

Vorteilhaft für den Gentransfer mit Hilfe von PEI ist die postulierte Funktion als Protonenschwamm, die eine Verwendung von endosomolytischen Substanzen überflüssig macht. PEI ist unter physiologischem pH-Wert nur partiell protoniert und nimmt bei der Ansäuerung der Endosomen / Lysosomen von pH 7,3 auf pH 5 – 4,5 die einströmenden Wasserstoffionen auf. Der Protonierungsgrad der Aminogruppen steigt von 20 auf 45 % an ^[90]. Zusätzlich zu dem H+-Ioneneinstrom erfolgt ein Einstrom von Chloridionen in die Endosomen / Lysosomen, was zum osmotischen Anschwellen und letztendlich zur Destabilisierung des Endosomen / Lysosomenkompartimentes führt, in dessen Folge die DNS in das Zytoplasma gelangt ^[91].

Der Vorteil von PEI bei *in vivo*-Applikationen besteht in der geringen Toxizität und in seiner hohen Transfektionseffizienz von unterschiedlichen Gewebetypen ^[92,93]. Als Transfektionsreagenz ist das lineare PEI mit einer Masse von 22 kDa. unter dem Namen ExGen 500[™] kommerziell erhältlich.

1.4. Targeting-Modul

Bei einem systemischen Gentransfer trägt das *targeting*-Moduls in entscheidender Weise zu der Spezifität des Gentransfers bei, da über dieses Modul der erste und über eine erfolgreiche Transfektion entscheidende Kontakt mit der Zielzelle stattfindet.

Die Zell- oder Gewebespezifität wird, durch fünf verschiedene Arten des *targeting* erreicht. Wichtig ist die rasche Internalisierung des Vektors nach dem Kontakt zwischen *targeting*-Modul und Rezeptor auf der Zielzelle.

1.4.1. Targeting durch viralen Tropismus

Bei dieser Art des *targetings* werden Viren verwendet, deren Tropismus zum Teil verändert wurde, um DNS spezifisch in die Zielzellen zu transportieren und durch die lytische Aktivität viraler Proteine aus den Endosomen zu befreien. Die therapeutische DNS befindet sich bei diesem Vektordesign auf der Aussenseite der Virushülle. Die virale Nukleinsäure im Innern des Virus muß durch geeignete Verfahren (z.B. UV-Bestrahlung) vorher inaktiviert, damit nur die erwünschte Wirkung eintritt ^[94].

Ist kein viraler Tropismus z.B. von Retroviren auf den zu transduzierenden Zellen vorhanden könnnen diese Zellen durch die Einkapselung von Retroviren in Liposomen infiziert werden. Die Liposomen werden endozytiert und in den Endosomen aufgebrochen. Die lytischen Proteine der Virushülle sorgen auch in diesem Fall für eine Ausschleusung des Virus aus dem Endosom ^[95]. Das Einschleusen von Viren mit Hilfe von Liposomen ist nicht auf Retroviren beschränkt. Mit dieser Methode konnten Polioviren und nicht-infektiöse Sindbisvirus-Kapside in Zellen eingebracht werden, die nicht zu dem Spektrum der viralen Wirtszellen gehören ^[96,97].

1.4.2. Transkriptionelles targeting

Transkriptionelles *targeting* kann erreicht werden, wenn die eingeschleuste DNS zell- oder gewebespezifische Promotoren enthält. Zellen, die nicht transfiziert werden sollen, weisen nicht die promotorspezifischen Transkriptionsfaktoren auf, die für die Initation des Transkriptionsprozesses nötig sind ^[98]. Für die gentherapeutischen Behandlung von Herz-Kreislauferkrankungen sind herzspezifische Promotoren gefunden worden die eine Genexpression selektiv nur im Atrium oder in den Ventrikeln vermitteln ^[99,100].

1.4.3. targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose

1.) Antikörper zeichnen sich durch ihre sehr hohe Bindungsspezifität aus. Wenn Antikörper oder F(ab')-Fragmente an Vektoren chemisch gekoppelt werden, ist ein sehr effizientes *targeting* möglich. Die Strukturen, die von den Vektoren gebunden werden, sollten jedoch Oberflächenproteine sein, die internalisiert werden, da die DNS nur in der Zelle transkribiert werden kann. Mit bivalenten Antikörpern konnte man den Tropismus von adenoviralen Vektoren von CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) zu EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ändern ^[101]. Verwendet wurde diese Form des *targeting* auch bei nicht-viralen Vektoren, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern spezifisch Thrombomodulin auf Lungenepithelzellen oder CD3 auf T-Zellen erkennen und an diese Zellen hochaffin binden ^[102,103]. 2.) Rezeptoren, die nach der Bindung ihres Liganden endozytiert werden und anschließend wieder zu der Plasmamembran rezirkulieren, stellen mögliche Ziele für ein *targeting* dar. Durch ihre erhöhte endosomale Durchsatzrate können mehr Vektoren gebunden und in die Zelle geschleust werden.

Der Transferrin-Rezeptor wird nach Ligandenbindung rasch internalisiert. Der Ligand, Transferrin, wird in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 5:1 an PEI gekoppelt um ein ausreichendes *targeting* zu erzielen ^[104-106]. Dieses System ist unter dem Namen Duofect[™] kommerziell erhältlich.

1.4.4. targeting durch Zucker

Bei Zellen, die Lektine auf ihren Oberflächen exprimieren, z.B. Hepatozyten bietet sich ein *targeting* durch Zuckerstrukturen an. Diese Zellen exprimieren einen bereits gut charakterisierten Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R oder Gal / GalNAc-Rezeptor), der sich für den Gentransfer verwenden lässt [107,108].

Humane Hepatocarzinomazellen (HepG2) und murine Hepatozyten (BNL CL.2) konnten 1997 *in vitro* erfolgreich mit ungeladenen PEI / DNS-Komplexen transfiziert werden. Die Transfektion wurde durch Galaktosereste vermittelt, die an 4–10 % der Aminogruppen von verzweigten PEI gekoppelt waren ^[109]. Andere Zuckerreste binden an den Mannose-Rezeptor und können zum *targeting* von Makrophagen eingesetzt werden ^[110].

1.4.5. targeting durch Peptide

Ein targeting durch Peptide hat den Vorteil, das Peptide nur eine geringe Immunogenität, eine hohe Bindungsaffinität und eine sehr hohe Spezifität aufweisen. Sie sind im Normalfall nicht toxisch und können renal eliminiert werden.

Peptide mit beliebigen Aminosäuresequenzen lassen sich künstlich herstellen und chemisch an Vektoren koppeln. Zelloberflächenintegrine interagieren mit multiplen Arg-Gly-Asp (RGD) Peptidsequenzen, die von Zelladhäsions-, Serum-, oder Matrixproteinen präsentiert werden ^[111]. Durch künstliche Peptide mit RGD-Motiv können die natürlichen Liganden imitiert und eine intergrinvermittelte Endozytose bewirkt werden. Mit diesem, wenig zelltypspezifischen, *targeting* konnten Vektoren aus Oligolysin und DNS *in vitro* erfolgreich Epithel- und Endothelzellen transfizieren ^[112]. RGD-Peptide, die über eine Disulfidbrücken an verzweigtes PEI (25 kDa) gekoppelt wurden bewirkten eine 10 – 100-fache höhere Transfektionseffizienz bei Epithelzellen (HeLa) und Fibroblasten (MRC5) gegenüber unmodi-fizierten PEI ^[113].

2. FRAGESTELLUNG

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Transfektionsmethode für primäre Endothelzellen.

Der Schwerpunkt lag auf der Etablierung eines zellspezifischen Gentransfers in aktivierte Endothelzellen mit einem effizienten Vektorsystem. Das verwendete Vektorsystem, viral oder nicht-viral, sollte die Möglichkeit eines peptidmediierten *targeting* gegen ein Oberflächenprotein der aktiverten Endothelzellen bieten. Das Oberflächenprotein sollte bei Endzündungsprozessen verstärkt auf der Zelloberfläche von den betroffenen Zellen exprimiert werden und somit das *targeting* verstärken.

Des weiteren sollte das verwendete Vektorsystem den Bedingungen einer systemischen Applikation in den Blutstrom genügen und *in vivo* eine ausreichend lange Halbwertzeit aufweisen, um die aktivierten Endothelzellen in den zu behandelnden Gefäßearealen von der luminalen Seite des Blutgefäßes aus transfizieren zu können.

3. ERGEBNISSE

3.1. Virale Transduktion von Endothelzellen

Es wurde in einem viralen Ansatz die Transfizierbarkeit von Endothelzellen mit Hilfe des Sindbis Expressionssystem untersucht. Dieses System ist auf eine transiente Expression ausgerichtet und hat den Vorteil sehr schnell, innerhalb von 4-6 Stunden bereits signifikante Mengen an rekombinanten Protein, zu produzieren. Als Reportergen wurde die murine induzierbare NO-Synthase verwendet, um Langzeituntersuchungen der Expressionskinetik durch führen zu können, ohne die infizierten Zellen lysieren zu müssen.

3.1.1. Generierung von Pseudovirionen

Die Plasmide der drei Vektoren pSinRep5lacZ, DH-(BB)-5'SIN und pSinRep5miNOS wurden in Übernachtkulturen von *E.coli* Bakterien vermehrt. Im Anschluss wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym Xhol linearisiert um eine uniforme 3'-Terminationsstelle für die *in vitro*-Transkription zu bekommen. Die Fragmentgröße der linearisierten Plasmide pSinRep5lacZ (13,1 kb), DH-(BB)-5'SIN (6,7 kb) und pSinRep5miNOS (13,5 kb) wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel kontrolliert (siehe Abbildung 9).

Nach der Größenkontrolle wurde die Plasmid-DNS der Vektoren *in vitro* transkribiert und sowohl Größe und Integrität der RNS-Transkripte überprüft. Bei der *in vitro*



<u>Abbildung 9:</u> In einem TBE-Agarosegel wurde jeweils 1 µl, mit XhoI geschnittene, Plasmid-DNS aufgetrennt. Die Konzentrationen betrugen bei pSinRep5lacZ in Spur 1 0,93 µg/µl, bei DH-(BB)-5'SIN in Spur 2 0,62 µg/µl und bei pSinRep5miNOS in Spur 3 0,87 µg/µl. Die Größen des Markers sind auf der rechten Seite angegeben.

transkribierten RNS kommt es zu einer Größenreduktion von 1870 nt gegenüber der Plasmid-DNS, da die Vektorkomponenten für die bakterielle Vermehrung nicht transkribiert werden (siehe Abbildung 10).

Die RNS-Populationen von Helfer und Expressionsvektor wurden gemischt und in BHK21 Zellen ko-

elektroporiert. Nach 72 h wurden die Pseudovirionen geerntet und der Titer durch Auszählen von β -gal-positiven (lacZ) und Diaphorase-positiven (miNOS) BHK21 Zellen bestimmt.

Die Variationsbreite der Titer pro Präparation lag zwischen 3x10⁵ und 1x10⁷ infektiösen Einheiten [i.E.] pro Milliliter. Je nach Versuchsbedingung wurden unterschiedliche MOIs (*multiplicity of infection*) eingesetzt.



<u>Abbildung 10:</u> In einem denaturierenden Agarosegel wurden die Größen der *in vitro* transkribierte RNS bestimmt. Die Größen der RNS-Transkripte betragen bei pSinRep5lacZ 11.234 nt, bei DH-(BB)-5'SIN 4.859 nt und bei pSinRep5miNOS 11.681 nt.

3.1.2. NO-Produktion transfizierter Zellen nach Pseudovirionen-Transfektion

Die transiente Transfektion vaskulärer Zelltypen durch Pseudovirionen wurde an Schweineaorten-Endothelzellen (*pig aortic endothelial cells* PAEC) und vaskulären glatten Muskelzellen aus Schwein (*pig vascular smooth muscle cells* PVSMC) getestet. Als Kontrollzellen dienten *baby hamster kidney* (BHK21) und Affennierenzellen, aus der afrikanischen grünen Meerkatze, (COS7). In den oben genannten Zelltypen wurde die NO-Produktion für ein Zeitintervall von 72 h nach der Transfektion untersucht.

Für die nicht-vaskulären Zelltypen BHK21 und COS7 zeigt sich, dass die NO-Produktion nach ca. 24 h (COS7) bzw. 48 h (BHK21) in eine Sättigung hineinläuft (siehe Abbildung 11a).

Bei den vaskulären Zelltypen PAEC und



<u>Abbildung 11:</u> Aufsummierte NO-Produktion im Überstand von jeweils 10^5 transfizierten Zellen nach 4 h-Transfektion mit 10^7 miNOS-Pseudovirionen (MOI: 100). a) BHK21 und COS7 b) PAEC und PVSMC [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

PVSMC wurde in dem untersuchten 72 h-Intervall keine Sättigung erreicht. Statt dessen wurde ein

steiler Anstieg der NO-Produktion bis 24 h nach Ende der Transfektion beobachtet, dem sich ein weitaus flacherer Anstieg der NO-Produktion über 48 h anschloß (siehe Abbildung 11b).

Die Summe an produziertem NO bzw. des Reaktionsproduktes Nitrit war bei den untersuchten nichtvaskulären Zelltypen BHK21 und COS7 um den Faktor 8-9 höher als bei den untersuchten vaskulären Zelltypen PAEC und PVSMC.

Bei Betrachtung des Zeitverlaufes von nicht-vaskulären Zellen in Abbildung 12, zeigte sich bereits nach 6 h ein starker Anstieg der NO-Produktion, die nach 9 Stunden das Maximum erreichte. Aufgrund einer beobachteten Zelllyse fällt die Expression schon nach 1-2 Tagen wieder ab.





<u>Abbildung 12:</u> NO-Produktion pro Stunde von 10^5 nicht-vaskulären Zellen BHK21 und COS7 nach Infektion mit miNOS-Pseudeovirionen (MOI: 100). Das Medium der Zellen wurde alle 24 h erneuert. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

<u>Abbildung 13:</u> NO-Produktion pro Stunde von 10^5 vaskulären Zellen PAEC und PVSMC nach Infektion mit miNOS-Pseudovirionen (MOI: 100). Das Medium der Zellen wurde alle 24 h erneuert. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

Der Anstieg in der NO-Produktion erfolgte in den vaskulären Zellen PAEC und PVSMC erst nach 9 h und erreichte das Maximum in dem Zeitintervall von 12 h bis 24 h nach Transfektion (siehe Abbildung 13). Am Ende des Untersuchungszeitraumes lagen die Werte der NO-Produktion beider Zelltypen in etwa wieder auf Ausgangsniveau.

In wie weit die NO-Produktion, nach Pseudovirionentransfektion, das Zellwachstum und die Proliferation beeinflusst sollte anhand des Verlaufs der Zellzahlen analysiert werden.

3.1.3. Entwicklung der Zellzahl nach Pseudovirionen-Transfektion

Transfizierte BHK21 Zellen zeigten ab dem Zeitpunkt von 24 h nach der Transfektion (Maximum) eine Abnahme der Zellzahl von lebenden Zellen auf annähernd Null. Die Zellzahl unbehandelter Kontrollzellen der selben Linie stieg in dem untersuchten Intervall um das Dreifache an lebenden Zellen an. Die NO-Produktion stieg stetig bis zum Maximum bei 48 h an und sank im Intervall bis 60 h wieder ab (siehe Abbildung 14). Morphologisch korrelierte die Abnahme der Zellzahl mit zytotoxischen Effekten, die nur bei transfizierten Zellen auftraten. Hohe, zytotoxische, Konzentrationen an NO oder die Blockade der Proteinbiosynthesemaschinerie durch den hohen Gehalt an subgenomischer RNS in den Zellen könnten hierfür mögliche Ursachen gewesen sein [132]. In den folgenden Versuchen sollten die zytotoxischen Effekte näher untersucht werden.



<u>Abbildung 14:</u> Zellzahlvergleich lebender Zellen, zwischen unbehandelten Zellen und transfizierten Zellen ($2x10^5$ BHK21 Zellen infiziert mit miNOS-Pseudovirionen, MOI: 5). [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

3.1.4. Analyse der zytotoxischen Effekte nach der Transfektion

Um Hinweise auf die molekularen oder biochemischen Vorgänge der zytotoxischen Effekte zu bekommen, wurde ein miNOS-Pseudovirionen-Titer gewählt bei dem maximal 50 % der Zellen transfiziert werden konnten (MOI: 0,5). Bei dem gewählten Titer sollten bis 120 h nach der Transfektion eine NO-Produktion messbar sein und nur geringe zytotoxische Effekte auftreten.

Die NO-Produktion erreichte nach 36 h ein Maximum, danach fiel der Wert wieder ab, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass Zellen abgestorben sind (siehe Abbildung 15).



<u>Abbildung 15:</u> 4 h-Infektion von 1×10^5 PAEC mit 5×10^4 miNOS-Pseudovirionen (MOI: 0,5). Das Medium wurde alle 24 h erneuert und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

Entgegen den Erwartungen schloß sich eine zweite Phase, mit höhern NO-Produktionswerten, in dem Zeitintervall ab 48 h an. Die NO-Produktion stiegt innerhalb von 24 h erneut an und erreichte bei 72 h ein zweites Maximum.

Da das Zellkulturmedium alle 24 h gewechselt wurde, lagt die Vermutung nahe, dass sich durch rekombinatorische Prozesse replikationskompetente Wildtyp-Viren (WT-Viren) gebildet haben, die nun die Funktion von Helferviren für die miNOS-Pseudovirionen übernahmen und so eine Sekundärinfektion ermöglichten. Diese Vermutung wurde in dem folgenden Experiment bestätigt.

Mit unterschiedlich hohen miNOS-Pseudovirionen-Titern (MOI: 0,0017; 0,017; 0,17) und Mediumwechsel zwischen jedem der einzelnen Zeitpunkte wurde der minimale Titer ermittelt, bei dem noch eine Sekundärinfektion detektierbar ist.

Es wurden BHK21 Zellen verwendet, die kein endogenes NO produzieren, um auch geringe Mengen an NO bzw. Nitrit detektieren zu können. Bis 30 h nach der Transfektion war kein NO nachweisbar bzw. lag unterhalb des Detektionsniveaus. Erst 42 h nach Transfektionsende war eine NO-Produktion detektierbar, deren Kinetik in Abhängigkeit des Titers verlief. Hohe Titer erzeugten schneller eine nachweisbare NO-Produktion als geringere Titer. Die Reihenfolge in den Anstiegen der NO-Produktion entsprach den Titern, abnehmend von der höchsten zu der geringsten Konzentration



<u>Abbildung 16:</u> 1 h-Infektion von $3x10^5$ BHK21 Zellen mit unterschiedlichem Titer an miNOS-Pseudovirionen 500 i.E., 5.000 i.E., 50.000 i.E..Das Medium wurde zu den angegebenen Zeitpunkten erneuert. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

(siehe Abbildung 16). Die Maximalwerte der NO-Produktion lagen bei allen verwendeten Titern in dem selben Bereich. Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich tatsächlich um replikationskompetente WT-Viren handelte wurden die entstandenen Virionen für eine Sekundärinfektion von unbehandelten Zellen verwendet.

Infizierte Zellen wurden 36 h ohne Mediumwechsel inkubiert, um die Bildung von replikationskompetenten WT-Viren zu ermöglichen und um genügend infektiöse Einheiten an miNOS-Pseudovirionen und WT-Viren zu generieren. Eine Titerbestimmung mittels Diaphorasefärbung ergab einen Wert von 5x10⁴ i.E. pro Milliliter. Anschließend wurde der Überstand verwendet, um unbehandelte BHK21 Zellen zu infizieren (MOI: 1). Die infizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, um alle ungebundenen Viren aus der Kulturschale zu entfernen,



<u>Abbildung 17:</u> Sekundärinfektion (4 h) von BHK21 Zellen mit 5 x 10^4 miNOS-Virionen die 36 h nach der Primärinfektion geerntet wurden. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

und mit frischen Medium überschichtet. Der Maximalwert der NO-Produktion wurde 24 h nach Infektion gemessen (siehe Abbildung 17).

Die Zunahme an zytotoxischen Effekten durch einen erhöhten Anteil an rekombinanten WT-Viren korrelierte direkt mit der Zellzahl lebender Zellen. Zum Zeitpunkt 12 h nach der Sekundärinfektion

befanden sich 1,3x10⁵ lebende Zellen in der Kulturschale. Die infektiösen Einheiten an miNOS-Pseudovirionen und WT-Viren, die nach der Primärinfektion entstanden sind, verringern die Zellzahl 36 h nach der Sekundärinfektion fast bis auf Null (siehe Abbildung 18).

Unbehandelte Kontrollschalen enthielten zu diesem Zeitpunkt 1,7x10⁵ lebende Zellen. Das Zeitintervall bis zur Abtötung der gesamten Zellen in der Kulturschale durch miNOS-Pseudo-



<u>Abbildung 18:</u> Abnahme der Zellzahl von sekundär infizierten BHK21 Zellen. [Mittelwerte von $n = 3, \pm$ Standardabweichung]

virionen und WT-Viren reduzierte sich von 60 h (s. Abb.14) auf 36 h.

Eine Sekundärinfektion war nur für WT-Viren möglich, daher stellte sich die Frage an welcher Stelle konnte eine Rekombination zwischen den Transkripten von Helfer- und Expressionsvektor stattfinden, damit replikationskompetente WT-Viren entstanden.

3.1.5. Nachweis der Rekombination von Helfer- und Expressionsvektor

Das Sindbis Expressionsystem wurde durch eine funktionelle Aufspaltung des WT-Virusgenoms hergestellt (s.o.), somit sind im Helfer- und Expressionsvektor virale Sequenzen vorhanden, die eine homologe Rekombination begünstigen ^[36]. Die möglichen Stellen für eine homologe Rekombination zwischen der RNS des Helfervektors und der RNS des Expressionsvektors sind in der Abbildung 19 aufgeführt. Diese Sequenzen befinden sich in beiden Vektoren im 5'-Bereich vor dem SP6-Promotor. In dem Konstrukt des Helfervektors sind die Nichtstrukturproteine nur teilweise, erst ab dem RNS-Verpackungssignal, deletiert. Eine weitere Sequenzhomologie gibt es bei beiden Vektoren im Bereich des subgenomischen Promotors und im 3'-Bereich.

Transkript des Helfervektors (4859 nt)



Transkript des Expressionsvektors (11681 nt)

<u>Abbildung 19:</u> Lage der Sequenzhomologien (dunkelgraue Kästchen) in den Transkripten des Helfer- und des Expressionsvektors.

Für die Generierung von replikationskompetenten WT-Viren müssen Nichtstrukturproteine und Strukturproteine in einer genomischen RNS codiert werden, die in ein Kapsid verpackt werden kann. Ein Verpackungssignal ist in der Sequenz der Nichtstrukturproteine vorhanden. Dementsprechend ist der Replikationslokus im Bereich des subgenomischen Promotors zu suchen. Die relative Lage der Nicht-Strukturproteingene und der Strukturproteingene wurde mit Hilfe einer PCR untersucht. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide hybridisieren im Genbereich des Nichtstrukturprotein 4 (2nsp4-sense) und im Genbereich des Kapsides (2capsid-anti). Je nach Lage bzw. Reihenfolge der Gene für die Nichtstrukturproteine, Strukturproteine und der miNOS erhält man unterschiedliche große PCR-Fragmente. Befindet sich das Gen der miNOS zwischen den Genen der Nichtstrukturproteine und den Genen der Strukturproteine entsteht ein 4,2 kb großes PCR-Fragment, das zwei BamHI-Restriktionstellen enthält. Folgen die Strukturproteine direkt den Nichtstrukturproteinen im Genom (WT-Virus) wird ein PCR-Fragment von 650 bp amplifiziert, das nur eine BamHI-Restriktionstelle beinhaltet (siehe Abbildung 20).



<u>Abbildung 20:</u> Lage der PCR-Oligonukleotide für die Untersuchung der relativen Anordnung der Gene für Nichtstruktur- und Strukturproteine und der miNOS in den rekombinanten Pseudovirionen. Das amplifizierte Fragment hat entweder eine Größe von 4,2 kb oder von 650 bp und beinhaltet zwei bzw. eine BamHI-Schnittstelle. Nach einer BamHI-Restriktion erhält man im ersten Fall drei Subfragmente von 467 bp, 750 bp und 2,95 bp Größe und im zweiten Fall ein 467 bp und 183 bp großes Subfragment.

Um WT-Viren zu erhalten wurden BHK21 Zellen sekundär mit miNOS- und lacZ-Virionen infiziert. Nach

der Sekundärinfektion wurde aus den infizierten Zellen die Gesamt-RNS präpariert. Mit der präparierten RNS aus sekundärinfizierten BHK21-Zellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Aus jedem Ansatz wurde ein Aliquot ohne BamHI- und ein Aliquot mit BamHI-Restriktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spuren der Kontrollzellen (nicht infiziert) zeigten keine sichtbare Bande. Die Spuren von miNOS-Virionen und lacZ-Virionen zeigten ohne BamHI-Restriktion



<u>Abbildung 21:</u> RT-PCR von RNS, die aus sekundärinfizierten BHK21 Zellen isoliert wurde.

ein 650 bp-Fragment, das nur dann amplifiziert werden konnte, wenn die Gene der Nichtstrukturproteine in unmittelbarer Nähe in *cis* zu den Genen der Strukturproteinen liegen. Mit der BamHI-Restriktion ließ sich in beiden Fällen das 650 bp-Fragment in ein 467 bp-Subfragment und ein 183 bp-Subfragment unterteilen.

Auf Grund der beobachteten Rekombinationsereignisse wurde das Sindbis Expressionssystem nicht weiter verwendet um Endothelzellen zu transfizieren. Für die nachfolgenden Experimente wurden nichtvirale Vektoren (Polyplexe und Liposomen) eingesetzt, die ein erhöhtes Maß an Sicherheit vor Rekombinationen gewährleisten.

3.2. Transfektion von Endothelzellen mit Polykationen

Ein *targeting* von Endothelzellen wurde mit Peptiden untersucht, die kovalent an den Vektor gekoppelt wurden. Bei den Peptiden handelte es sich um hochaffin bindende Liganden für ein endothelzellspezifische Zelloberflächenmolekül.

Das Zielmolekül auf den Endothelzellen war VCAM-1 (*vascular cells adhesions molecule-1*, CD106, INCAM-110), da der Rezeptor nicht konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert, sondern erst nach Stimulation der Endothelzellen durch Endzündungsmediatoren expremiert wird.

VCAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin Superfamilie und wurde erstmals 1989 aus stimulierten HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) kloniert ^[114].

Das Protein wird spezifisch auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert, die in Endzündungsherden oder deren Randbereichen lokalisiert sind. VCAM-1 ist sowohl Rezeptor für α 4 β 1-Integrin, VLA-4 (*very late activation antigen*-4) als auch für Integrin α 4 β 7. VLA-4 wird von allen Leukozyten außer Neutrophilen präsentiert, während Integrin α 4 β 7 nur von einigen Leukozytenunterklassen exprimiert wird ^[115-117]. Die Leukozyten werden mit Hilfe von VCAM-1 aus dem Blutstrom rekrutiert und gelangen so zu den Entzündungsherden in der Gefäßwand oder in dem umgebenden Gewebe ^[118,119].

In kultivierten Endothelzellen lässt sich die Expression von VCAM-1 durch Applikation von Entzündungsmediatoren in das Kulturmedium induzieren. Als derartige Entzündungsmediatoren fungieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 oder TNF α (*tumor necrosis factor* α), bakterielle Endotoxine (LPS, Lipopolysaccharide) sowie stimulatorische Zytokine für T-Zellen wie Interleukin-4 ^[120-123]. VCAM-1 kann daher als ein Entzündungsmarker genutzt werden, der nur von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird ^[124].

In stimulierten HUVECs werden zwei Formen der VCAM-1-mRNS synthetisiert. Ursprünglich wurde eine Sequenz gefunden, die aus sechs Immunglobulin (Ig)-homologen Domänen des H- oder des C2-Types bestehen ^[125]. Wesentlich häufiger kommt eine mRNS-Sequenz mit einer zusätzlichen Ig-Domäne in der Mitte vor. Die beiden Formen der mRNS entstehen wahrscheinlich durch alternatives *splicing* ^[126,127].

Als membranständiges Protein besitzt VCAM-1 eine klassische Signalpeptidsequenz am N-Terminus. Das reife Protein hat einen 19 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil, an dem sich die Transmembrandomäne anschließt. Auf der extrazellulären Seite liegen die sechs bzw. sieben Ig-Domänen mit jeweils sechs bzw. sieben N-Glykosylierungsstellen. Je nach Glykosylierungsgrad der einzelnen Ig-Domänen liegt das Molekulargewicht bei ca. 95 kDa für die Variante mit sechs und ca. 110 kDa für die Variante mit sieben Domänen ^[128].

VCAM-1 ist *in vivo* bei einer Vielzahl weiterer physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt, z.B. bei der Leukozyten-Extravasation oder der Produktion und Reifung von B-Lymphozyten. Vermutet wird auch eine Beteiligung bei der Metastasenbildung fester Tumore. Die Rekrutierung von Leukozyten
durch VCAM-1 an Endzündungsherde, Infektionsstellen oder zu Bereichen, in denen Wundheilung stattfindet, findet man nicht nur bei Endothelzellen, entzündetem Gewebe und lymphoiden dendritischen Zellen, sondern auch bei Gewebemakrophagen, reaktiven mesothelialen Zellen und auf Endothelzellen in atheriosklerotischen Plagues ^[129,130].

Natürlich auftretende Mutationen von VCAM-1 sind bisher nicht beschrieben worden. Das völlige Fehlen von VCAM-1 bei genetisch veränderten Mäusen führt zu embryonaler Letalität. Die Embryonen sterben auf Grund von Defekten in Plazenta und Koronargefäßen ^[131].

Als Vektor wurde 25 kDa großes verzweigtes Polyethylenimin (PEI) verwendet. PEI hat gegenüber dem Sindbis-Expressionssystem den großen Vorteil, dass es Sicherheit vor rekombina-torischen Ereignissen gewährleistet. Ein weiterer Vorzug ist die einfache und reproduzierbare Kopplung der *targeting*-Peptide an den Vektor, da bei PEI, im Gegensatz zu viralen Vektoren, kein Tropismus-wechsel vollzogen werden muss. Mit einem Luziferase-Reporterplasmid unter Kontrolle des CMV-Promotors wurde die jeweilige peptidmediierte Transfektionsrate nach 72 h ermittelt.

3.2.1. Komplexbildung von DNS mit verzweigten PEI

Die Komplexbildung von DNS und PEI beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNS-Rückgrates und den positiv geladenen Stickstoffatomen der Aminogruppen des PEI, wobei die statistische Verteilung der primären, sekundären und tertiären Amine von 1:2:1, in einem verzweigten PEI-Molekül, keinen Einfluss auf die Bindungsstärke hat. Statistisch gesehen ist in einem verzweigten PEI-Molekül jedes sechste Stickstoffatom positiv geladen ^[132].

Die Größe der Komplexe wurde bestimmt, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat.

Die Größe der Polyplexe ist hier exemplarisch in drei unterschiedlichen Medien, Wasser, physiologische Kochsalz- und Glukoselösung dargestellt (siehe Abbildung 22).

Für die Komplexmedien galt, dass die Polyplexe aus DNS und PEI



<u>Abbildung 22:</u> Größen der Komplexe aus 12 µg DNS und 300 µl PEI (0,1 M) von den N/P-Werten: 4, 6, 8, 10, und 12. Gemessen wurde die Komplexgrößen bei R.T. nach 0 h, 1 h und 2 h Inkubation der Komponenten in den Komplexmedien Wasser, NaCl (0,9 % w/v) und Glukose (5 % w/v). [Mittelwerte von $n = 3, \pm$ Standardabweichung]

mit zunehmender positiver Ladung (höherer N/P-Wert) kleiner wurden und untereinander in dem unter-

suchten Zeitraum von 2 h bei R.T. nicht aggregierten. Ausgenommen von diesem Verhalten waren die Größen der Polyplexe in physiologischer Kochsalzlösung bei den N/P-Werten 4 und 6. Die Polyplexgrößen bei einem N/P-Wert von 6 lagen in physiologischer Kochsalzlösung mit 400 nm Durchmesser bereits zu Beginn der Messung (0 h) signifikant über den Polyplexgrößen, die in Wasser oder Glukoselösung gebildet wurden (ca. 100 nm). Für die Dauer des zweistündigen Inkubationsintervall nahm die Polyplexgröße in physiologischer Kochsalzlösung durch Aggregation der Polyplexe untereinander bis auf 800 nm Durchmesser zu. Die Größe der Polyplexe, die in Kulturmedium angesetzt wurden, ließ sich nicht bestimmen.

3.2.2. Transfizierbarkeit von human umbilical vein endothelial cells mit PEI

Die Transfizierbarkeit und die Transfektionsrate von HUVEC, die auf Grund ihrer physiologischen Barrierefunktion schlecht mit nicht-viralen Vektoren zu transfizieren sind, wurde mit Polyplexen aus PEI untersucht. Die variierten Parameter waren die DNS-Menge, die Transfektionsdauer und die Transfektionsbedingungen.

Die Transfektion von HUVEC mit Polyplexen aus PEI sollte neben der verwendeten DNS-Menge auch auf N/P-Werte und Transfektionsbedingungen hin optimiert werden. Transfiziert wurden die Zellen mit unterschiedlichen Polyplexen für eine Stunde. Anschließend wurden sie für 48 h inkubiert und im Anschluß auf die Reportergenexpression hin analysiert Die Transfektionsbedingungen wurden durch die Zugabe von Chloroquin, DMSO (Dimethylsulfoxid) oder der Kombination aus Chloroquin und DMSO variiert. Chloroquin ist ein endosomenzerstörendes Agenz, dass eine effektive Reportergenfreisetzung aus den Endosomen in das Zytosol bewirken soll. Der Zusatz von DMSO sollte durch seine Membran permeabilisierende Eigenschaft eine verstärkte Internalisierung der Polyplexe bewirken. Die Transfektionsergebnisse sind als Quotient aus der Menge an Luziferaseprotein [ng] und Gesamtprotein [mg] dargestellt (siehe Abbildung 23 a,b).

In Bezug auf die eingesetzte DNS-Menge ist ein deutlicher Unterschied in dem Transfektionsergebnis zwischen 1,7 µg/ml und 6,7 µg/ml DNS zu erkennen. Bei einer DNS-Menge von 1,7 µg/ml werden höhere Transfektionsergebnisse erzielt (bis zu Faktor 10 bei Zellen ohne Nachbehandlung). Mit ansteigenden N/P-Werten erhält man bei der geringeren DNS-Menge höhere Transfektionsergebnisse, im Gegensatz zu der höheren DNS-Menge, bei der es zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz bei ansteigenden N/P-Werten kommt.

Bei einer eingesetzten DNS-Menge von 1,7 µg/ml (vergleiche Abbildung 23 a) wurde bei allen

untersuchten N/P-Werten das höchste Transfektionsergebnis erzielt wenn die Zellen keine weitere Behandlung durch Chloroquin und / oder DMSO erfuhren. Bei der verwendeten DNS-Menge von 6,7 µg/ml (vergleiche Abbildung 23 b) zeigte sich, dass die höchste Transfektionseffizienz bei allen N/P-Werten nach einer Chloroquinbehandlung erreicht wurde. Erfolgte nur eine Behandlung mit DMSO erreichte das Transfektionsergebnis die geringsten Werte in dieser Untersuchung.

Die in diesem Versuch gewonnenen Daten zeigten, dass ein N/P-Wert von 10 bis 12 und eine DNS-Menge von 1,7 µg/ml die besten Transfektionsbedingungen darstellten, ohne das eine Nachbehandlung der Zellen mit endosomenzerstörenden oder Zellmembran permeabilisierenden Substanzen erfolgte.

Die Aufnahme der Polyplexe in die Endothelzellen hängt von der Endozytoserate und diese wiederum von der Stoffwechselaktivität



■ohne Nachbehandlung ■Chloroquin ■Chloroquin + DMSO □DMSO <u>Abbildung 23:</u> Transfektion von HUVEC mit Komplexen aus PEI und zwei unterschiedlichen Mengen an DNS: a) = 1,7 µg/ml und b) = 6,7 µg/ml. Die Zellen sind nach der Inkubation mit den Transfektionskomplexen nicht weiter behandelt worden, für 1 h mit Chloroquin inkubiert worden, 1 h mit Chloroquin und anschließend eine Inkubation von 1 Minute mit DMSO oder nur eine abschließende Inkubation von DMSO für 1 Minute. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

der Zellen ab. Daher wurde die Länge des Zeitintervalls optimiert, in dem das Transfektionsereignis, mit Polyplexen aus 1,7 µg/ml DNS und PEI in unterschiedlichen N/P-Werten, stattfinden sollte. Die untersuchten Transfektionszeiten der HUVEC mit Polyplexen betrugen 30, 60, 120 und 240 Minuten. Bei allen verwendeten N/P-Werten war eine Abnahme in der Gesamtproteinmenge mit zunehmender Dauer der Polyplexinkubationszeit von 30 Minuten bis 240 Minuten zu erkennen (siehe Abbildung 24 a). Die Menge an Luziferaseprotein nahmen bei den untersuchten Transfektionszeiten von 60 min und 120 min mit ansteigenden N/P-Werten zu. Bei einer Transfektionsdauer von 240 min kehrte sich das Verhältnis um. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten konnte bei allen untersuchten N/P-Werten nur Spuren von Luziferaseprotein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24 b).



<u>Abbildung 24:</u> HUVEC-Transfektion mit unterschiedlich langer Transfektionszeit der Polyplexe. Gesamtproteinmenge [mg] in a): 30 min. (weiße Säulen), 60 min. (hellgraue Säulen), 120 min. (graue Säulen) und 240 min. (schwarze Säulen). Luziferaseproteinmenge [ng] in b): 30 min. (weiße Säulen), 60 min. (hellgraue Säulen), 120 min. (graue Säulen) und 240 min. (schwarze Säulen). [Mittelwerte von $n = 3, \pm$ Standardabweichung]

Die optimierten Bedingungen waren als Kompromiss aus der produzierten und nachweisbaren Luziferaseproteinmenge und der Gesamtproteinanzahl, die als Indikator der überlebenden Zellen diente, hervorgegangen. Die folgenden Transfektionen von HUVEC wurden mit einem Polyplex aus 1,7 µg/ml DNS und PEI mit einem N/P-Wert von 12 bei einer Transfektionsdauer von 60 Minuten durchgeführt, da die Standardabweichung für die Werte der Gesamt- und Luzifersaseproteinmenge für diese Kombination geringer ist als bei 120 Minuten Transfektion mit Polyplexen des N/P-Wertes 10.

3.2.3. Selektion der VCAM-1 bindenden Peptide

Durch Peptide die von VCAM-1 mit hoher Affinität gebunden werden, sollte es möglich sein, ein

targeting so zu gestalten, dass nur pathologisch verändertes Endothel von einem Vektor transfiziert wird, der diese Peptide als *targeting*-Modul verwendet.

In der Arbeitsgruppe von Dr. A. Herrmann im Zentrum für Herz- und Kreislaufphysiologie an der Universität Düsseldorf wurde nach VCAM-1 bindenden Peptiden, mit Hilfe peptidpräsentierenden einer (pFliTrx[™]), Bakterienbank gesucht [134]



<u>Abbildung 25</u>: Assoziation von Peptid 1 bis 5 an VCAM-1. Auf der X-Achse sind die untersuchten Peptide, auf der Y-Achse ist die Assoziation (resonance units, RU) und auf der Z-Achse ist die eingesetzte Konzentration der Peptide angegeben. Für die Konzentration der eingesetzten Peptide vergl. Legende.

Aus den ca. 100 erhaltenen Klonen wurden, nach der Sequenzanalyse, korrespondierende Peptide synthetisiert, gereinigt und mittels SPR (*surface plasmon resonance*) auf ihre Bindung an VCAM-1 untersucht. Die Peptide mit der höchsten Affinität zu VCAM-1 wurden in den hier beschriebenen Experimenten verwendet (siehe Abbildung 25).

An PEI 25 kDa (v) gekoppelte Peptide						
Peptid 1	C-ADPRLLWQRLTR	8 Peptide = PEI-1 P8 111,0 nmol/µl N				
Peptid 2	C-VPQWPRRRTYLK	35 Peptide = PEI-2 P35	46,1 nmol/µl N			
		38 Peptide = PEI-2 P38	34,8 nmol/µl N			
		40 Peptide = PEI-2 P40	37,6 nmol/µl N			
Peptid 3	C-GHRWKNIFYIKNENKLPTGG	2 Peptide = PEI-3 P2	29,5 nmol/µl N			
		2 Peptide = PEI-3 (n) P2	5,9 nmol/µl N			
Peptid 4	C-YRLAIRLNERRENLRIALRY	25 Peptide = PEI-4 P25	5,9 nmol/µl N			
Peptid 5	C-VNAFAWRRRWRG	2 Peptide = PEI-5 P2	180 nmol/µl N			
		18 Peptide = PEI-5 P18	60 nmol/µl N			
Peptid 6	C-PGDATAEGVPDS	17 Peptide = PEI-6 P17	34,0 nmol/µl N			
"Kontrolle"		20 Peptide = PEI-6 P20	20,0 nmol/µl N			

<u>Tabelle 1:</u> In der ersten Spalte steht die Peptidnomenklatur und in der zweiten Spalte die Sequenz. Die dritte Spalte gibt die Kopplungsausbeute der Peptide an, die an ein Molekül PEI gekoppelt haben. Die letzte Spalte zeigt die Konzentration der Stickstoffatome, die sich in den Aliquots befinden und wichtig für die Bestimmung der N/P-Werte bei der Polyplexbildung ist.

In der Tabelle 1 sind alle verwendeten Peptide aufgeführt, die als *targeting*-Module für den zielgerichteten Gentransfer in Endothelzellen verwendet wurden. Die Peptide 1 bis 5 sind VCAM-1 bindende Peptide, das Peptid 6 ist ein ICAM-2 bindendes Peptid. Bei der Sequenzangabe in der Tabelle 1 ist das N-terminale Cystein hervorgehoben, da es nur für die Kopplung benötigt wird und nicht an der Bindung beteiligt ist.

3.2.4. Kopplung von VCAM-1 bindenden Peptiden an PEI

Um einen zielgerichteten Gentransfer zu ermöglichen, wurden VCAM-1 bindende Peptide als *targeting*-Module mittels eines bivalenten Verbindungsmoleküls an die Stickstoffatome primärer Aminogruppen des PEI gekoppelt. Für die Kopplung wurden 5 verschiedene VCAM-1 bindende Peptide (Peptide 1- 5) und ein ICAM-2 bindendes Peptid (Peptid 6) verwendet (s.o.). Die Kopplung der Peptide an das PEI verläuft in zwei Stufen (siehe Abbildung 26). In der ersten Stufe wird das bivalente Verbindungsmolekül SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat), unter der Abspaltung der Abgangsgruppe NHS (N-hydroxysuccinimid), an das PEI kovalent

gebunden. Das PEI mit der gebundenen Kopplungsfunktion PDP (2-Pyridyldithiopropionat) wird in der zweiten Stufe mit dem Peptid verbunden. Das Peptid verdrängt die Abgangsgruppe 2-TP (2-Thiopyridol) und bindet über eine Disulfidbrücke kovalent an das PEI. Das Peptid ist nach der Kopplung durch einen 0,68 nm langen *spacer* von dem PEI getrennt um eine bestmögliche Interaktion mit seinem Rezeptor zu gewährleisten. Nach der ersten und zweiten Kopplungsstufe wurden die Abgangsgruppen (NHS, 2-TP) bzw. die jeweiligen ungebundenen Kopplungsreaktanten (SPDP, Peptid) von den Kopplungsprodukten (PEI-PDP, PEI-Peptid) abgetrennt und die Konzentration an



<u>Abbildung 26:</u> Flussschema der Kopplung von Peptiden an PEI. Erklärung siehe Text.

gekoppelten PDP bzw. Peptid sowie die Konzentration des PEI photometrisch bestimmt.

Die Menge PDP, die an PEI gekoppelt hat, lässt sich indirekt photometrisch nachweisen, indem, nach Zugabe von DTT (Dithiothreitol), die zweite Abgangsgruppe (2-TP) von SPDP bei allen gebundenen PDP-Molekülen abgespalten wird. Die OD₃₄₃ wird photometrisch bestimmt und anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von 2-TP die vorhandene Menge in der Probe ermittelt. Das molare Verhältnis

von PDP zu 2-TP ist 1:1, da jedes Molekül nur eine 2-TP-Abgangsgruppe besitzt. Somit entspricht die Menge an abspaltbarer 2-TP-Abgangsgruppe der Menge an PEI gekoppelten PDP. Aus der Differenz von abspaltbaren 2-TP-Abgangsgruppen vor der Peptidkopplung zu den abspaltbaren 2-TP-Abgangsgruppen nach der Peptidkopplung lässt sich die Menge an gekoppelten Peptid ermitteln.



<u>Abbildung 27:</u> Kopplung von SPDP an PEI mit Peptidsimulation. Nach jedem Schritt der Kopplung wurde die Menge an 2-TP anhand der OD₃₄₃ bestimmt. Aufgetragen sind die Werte die ohne DTT gemessen wurden, nach Zugabe von DTT und die Differenz der beiden Werte. [Mittelwerte von n = 3, \pm Standardabweichung]

Bei einer SPDP-Kopplung an PEI mit anschließender Simulation einer Peptidkopplung in der zweiten Stufe der Kopplungsreaktion, wurde ermittelt wie viele Kopplungsstellen für Peptide nach dem Kopplungsprozedere zur Verfügung standen und ob diese Anzahl an Kopplungsstellen durch eine Autoreduktion (Abspaltung von 2-TP) von PDP verringert wurde (siehe Abbildung 27).

Für die Peptidkopplung standen 0,54 nmol des eingesetzten PDP, nach Abtrennung von freiem SPDP zur Verfügung (siehe Abbildung 27). Nach der Simulation der Peptidkopplung waren noch 0,32 nmol des eingesetzten PDP an das PEI gebunden und somit putative Peptidträger. Es kam bei diesem Verfahren der Peptidkopplung zu einer Autoreduktion von 2-Pyridyldithiopropionat von 7,9 % des eingesetzten SPDP, was die OD₃₄₃-Messwerte von 2-Thiopyridol ohne DTT-Zugabe ergaben.

Der Vergleich zwischen einer Peptidkopplung und einer SPDP-Kopplung mit Peptidsimulation (Pseudokopplung) ermöglichte eine genaue Interpretation der gemessen Werte in Bezug auf die Ausbeute an gekoppelten Peptiden. Ausgehend von 100 % freien Peptidkopplungsstellen, die nach dem Abtrennen von freiem SPDP vorhanden waren, erhielt man nach der Kopplung und dem Abtrennen von freiem

Peptid, bzw. Puffer als Peptidsimulation, Werte aus deren Differenz man die tatsächliche Menge an gebundenen Peptiden bestimmen konnte (s.o.). Nach der Abtrennung von freien Peptiden waren noch 20 % der Peptidkopplungsstellen bei der Kopplung von Peptid 6 unbesetzt (vergleiche Abbildung 28). Bei der Pseudokopplung waren es hingegen noch ca. 60 % der Peptidkopplungsstellen.



<u>Abbildung 28:</u> Vergleich der Kopplungsausbeuten zwischen SPDP-Kopplung mit Peptidsimulation und Kopplung des Peptides 6. Die Werte OD_{343} (2-TP) wurden nach der Abtrennung von ungekoppeltem SPDP gleich 100 % gesetzt. [Mittelwerte von n = 3, ± Standardabweichung]

Der Fehler bei der Ermittlung der Kopplungsausbeuten von Peptiden an PEI wurde wie folgt ermittet:

Peptid-6-Kopplungsausbeute [80%] – Pseudokopplungsausbeute [40%] = Fehler der Kopplungsausbeute durch falsch positive Werte [40%]

Anhand diese Untersuchung wurden sämtlicher Kopplungsausbeuten, der durchgeführten Peptidkopplungen an PEI, bestimmt.

3.2.5. Nachweis der VCAM-1-Expression

Die VCAM-1-Expression ist nur bei primären Endothelzellen mit einer geringer Passagenzahl (p < 4)

durch inflamatorische Zytokine induzierbar ^[135-137]. Um den Erfolg der Endothelzellaktivierung nachzuweisen, wurde die VCAM-1-Expression mittels *Western-blot* detektiert, nachdem HUVEC mit einem Gemisch aus Interferon γ (IF γ), Interleukin 1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Lipopolysacchariden (LPS) zu der Expression von VCAM-1 auf der Zelloberfläche angeregt wurden. Das induzierte Oberflächenprotein hatte eine Größe von ca. 110 kDa. (in Abhängigkeit der Glykosylierungen) und war nur nach Aktivierung von Endothelzellen nachweisbar (vergleiche Abbildung 29).

Mit Hilfe der FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Analyse wurde der Anteil an lebenden HUVEC nach der Stimulation durch Endzündungsmediatoren ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem membranimpermeabelen, interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid inkubiert. Die Abbildung 30 zeigt, dass 69 % der eingesetzten Zellen vital waren.

Der Anteil an HUVEC, die nach der Stimulation VCAM-1 auf ihrer Zelloberfläche präsentierten, wurde mit einem murinen VCAM-1 bindenden Antikörper ermittelt. VCAM-1 positiv waren 84 % der Zellen (siehe Abbildung 31). Der Anteil an toten Zellen ließ sich nicht aus der gemessenen Zellpopulation VCAM-1 positiver Zellen ausschliessen, da die toten Zellen im *scatter-plot* keine eigene Population bildeten. Der Anteil an le-



<u>Abbildung 29:</u> Western-blot von unterschiedlichen Proteinmengen aus 1×10^5 HUVEC nach 16 h Stimulation mit IF γ , IL-1 β , TNF α und LPS mit anti-VCAM-1-Detektion.



<u>Abbildung 30:</u> FACS-Analyse der Viabilität von 1×10^6 HUVEC nach 8 h Simulation durch Endzündungs-mediatoren (IL1 β , IFN γ , TNF α , LPS).



<u>Abbildung 31:</u> FACS-Analyse von 1×10^6 VCAM-1 exprimirenden HUVEC nach 8 h Stimulation mit Endzündungsmediatoren (IL1 β , IFN γ , TNF α , LPS).

benden HUVEC, die VCAM-1 auf der Zelloberfläche exprimieren betrugt, nach Abschätzung der lebenden Zellen und VCAM-1 exprimierenden Zellen, 58 % der eingesetzten, stimulierten Zellpopulation.

3.2.6. Ausbildung von Polyplexen zwischen DNS und PEI mit gekoppelten Peptiden

Die Komplexe zwischen DNS und PEI bildeten die Transfektionseinheit bei dem hier gewählten Ansatz. Die Bindung von Peptiden, die einen zielgerichteten Gentransfer vermitteln sollen, dürfen die Interaktion

von PEI und DNS nicht negativ beeinflussen.

Untersucht wurde die Ausbildung der Komplexe durch Retardierung von DNS mittels Gelelektrophorese. Die DNS wurde mit drei unterschiedlichen N/P-Werten (4, 8, 12) an PEI komplexiert, um eine Zunahme der Retardierung von DNS durch Komplexbildung mit Ladungsabschirmung zu erzielen.

An dem eingesetzten PEI waren die VCAM-1 bindende Peptide 2, 3 und 5 mit unterschiedlicher Kopplungsanzahl von 2 bis 40 Peptiden gebunden. Das durch die gekop-



<u>Abbildung 32:</u> Gelretardierung von Polyplexen mit gekoppelten Peptiden. Es wurden pro Spur 400 ng Plasmid-DNS mit PEI komplexiert (N/P-Werten 4, 8 und 12).

pelten Peptide modifizierte PEI zeigte keinen Unterschied in dem Komplexierungsvermögen von DNS zu unbehandelten PEI. Bei einem N/P-Wert von 12, der als ein optimaler Parameter für die Transfektion von HUVEC ermittelt wurde, blieb der Hauptteil der komplexierten DNS in der Geltasche, was auf eine vollständige Komplexierung der DNS durch das PEI hindeutete. Als Positivkontrolle wurde das kommerziell erhältliche Transfektionsreagenz ExGen 500[™], ein lineares Polyethylenimin, verwendet. Bei der Verwendung von ExGen 500[™] findet eine vollständige Retardierung der DNS bereits bei dem geringsten untersuchten N/P-Wert von 4 statt.

Mögliche toxische Einflüsse der modifizierten PEI-Moleküle auf HUVEC wurden mittels Bestimmung der Gesamtproteinmenge untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei allen untersuchten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Menge des Gesamtproteins 48 h nach der Transfektion ergaben (vergleiche Abbildung 33).



<u>Abbildung 33:</u> Gesamtprotein aus HUVEC 48 h nach Transfektion (60 min). 1×10^5 Zellen wurden mit Polyplexen transfiziert die aus einem N/P-Wert von 12 bestanden. [Mittelwerte von n = 9, ± Standardabweichung]

3.2.7. HUVEC-Transfektion

Die *in vitro*-Transfektion von stimulierten Endothelzellen mit VCAM-1-bindenden Peptiden zeigt die Abbildung 34. Durch das gekoppelte VCAM-1-bindende Peptid (Peptid Nr. 3) wird eine erhöhte Transfektionseffizienz von stimulierten Endothelzellen gegenüber unstimulierten Endothelzellen erzielt. Das Transfektionsergebnis zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Transfektion von stimulierten Endothelzellen und unstimulierten Endothelzellen. Bei den untersuchten Polyplexen aus PEI-3 P2 mit unterschiedlichen N/P-Werten konnte jeweils eine erhöhte Transfektionseffizienz bei stimulierten HUVEC gegenüber unstimulierten HUVEC gemessen werden.



<u>Abbildung 34:</u> Transfektion von unstimulierten und stimulierten HUVEC mit Peptid 3 modifizierten PEI (2 Peptide pro PEI-Molekül gekoppelt) in unterschiedlichen N/P-Werten. [Mittelwerte von $n = 3, \pm$ Standardabweichung]

3.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit in vivo

Der zielgerichtete Gentransfer in aktivierte Endothelzellen wurde *in vivo* durch eine systemische Applikation von Liposomen untersucht. Eine wichtige Bedingung neben der Liposomengröße und der Spezifität des Zielgewebes ist die Halbwertzeit der Liposomen im Blutstrom. Die Lipidzusammensetzung der Liposomen kann eine schnelle Eliminierung durch Plasmaproteine verhindern. Durch sterische Einflüsse kann das Komplementsystem an der Eliminierung der Liposomen gehindert werden indem ein Andocken des lytischen Komplexes behindert wird. Der Lipidaustausch zwischen Liposomen und HDL kann durch eine festere Liposomenhülle, z.B. durch die Acylierung des Stickstoffatoms von Phosphatidylethanolamin (PE), vermindert werden. Um die Liposomenhülle rigider zu gestalten, wurden natürlich vorkommende trikaternäre negativ-geladene Phospholipide (N-acylphosphatidylethanolamin, N-acyl-PE) in die Membran eingebaut ^[138]. Diese N-acyl-PE Formen sind Bestandteil der Membranen von Mikroorganismen und Pflanzen bis hin zu Säugerzellen und weisen eine gesättigte N-acyl-Kette von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen auf ^[139].

In Liposomen bewirken die N-acyl-PE Formen ab einer N-acyl-Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen eine Rigiditätszunahme der Liposomenmembran durch Interkalation der N-Acylkette in die Lipiddoppelschicht. Infolge der Interkalation kommt es bei den Liposomen zu einem stabilisierenden Effekt auf ungesättigte PE-Moleküle in der Liposomenmembran, zu einer Permeabilitätsverringerung und zu einer Größenzunahme ^[138,140].

Für die nachfolgenden Versuche wurde kein N-acyl-PE aus natürlichen Quellen verwendet, sondern künstlich hergestellte N-acylierte PE-Derivate mit einer definierten Acylkettenlänge.

3.3.1. Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate

Für die Synthese der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate wurde PE als Grundbaustein

verwendet und mit Fettsäurechloriden umgesetzt. Das PE wurde in wasserfreien Pyridin gelöst und mit Fettsäurechloriden, die in Tetrahydrofuran gelöst waren, unter einer Argonatmosphäre inkubiert (siehe Abbildung 35). Die Länge der zu koppelnden Acylkette wurde von 14 Kohlenstoffatomen bis 22 Kohlenstoffatomen variiert um eine möglichst lange Halbwertzeit in vivo zu erreichen. Die Nacylierten Endprodukte wurden gereinigt und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37). Nach der Reinigung wurden die N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivate lyophilisiert und unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon bei - 20 °C gelagert.



<u>Abbildung 35:</u> Reaktionsschema der N-Acylierung von Phosphatidylethanolamin mit Myristoyl-, Palmityl-, Stearyl- und Behenoylsäurechloriden.



<u>Abbildung 36:</u> Dünnschichtchromatographie: Spur 1 Pyridin, Spur 2: Myristoylchlorid, Spur 3: ungereinigtes Kopplungsprodukt, Spur 4: PE aufgetragen. Laufmittel: Chloroform, Methanol, Ammoniak und Wasser in den Anteilen (60/35/2/2). Lipide durch Veraschung sichtbar gemacht



<u>Abbildung 37:</u> DC der gereinigten Endprodukte. Aufgetragen sind NMPE (N-Myristoylphosphatidylethanolamin), NPPE (N-Palmitoylphosphatidylethanolamin), NSPE (N-Stearylphosphatidylethanolamin) und NBPE (N-Behenoylphosphatidylethanolamin). Das verwendete Laufmittel und die Veraschung war analog Abb.37. Die Pfeile geben die Lage der Acylierungsendprodukte (EP) und die Lage von unacylierten Phosphatidylethanolamin (PE) wieder.

3.3.2. Verwendete Liposomenformulierungen

Die Liposomenhalbwertzeit in vivo ist ein Parameter der maßgeblich von der Lipidzusammensetzung der Liposomen abhängt. Die längstmögliche Halbwertzeit *in vivo* wurde durch eine rigidere Liposomenhülle mit N-acylierten PE-Derivaten untersucht. Die auf diese Weise erreichten Halbwertzeiten wurden mit den Halbwertzeiten der Liposomen verglichen, die durch eine sterische Barriere aus Polyethylenglykol (PEG) vor einer frühzeitigen Eliminierung geschützt wurden. Die nachfolgende Tabelle 2 gibt das Molverhältnis und die Lipidzusammensetzung der 18 hergestellten und verwendeten Liposomenpopulationen wieder:

Lipidkomposition	Molverhältnis		
PC/C	2	1	
	4	3	
	16	3	
	18	1	
PC/C/PE	4	3	2
	16	1	2
	16	3	1
PC/C/LPC	16	3	1
PC/C/PE-PEG	4	3	2
	16	3	1
PC/C/NMPE	4	3	2
	16	3	1
PC/C/NPPE	4	3	2
	16	3	1
PC/C/NSPE	4	3	2
	16	3	1
PC/C/NBPE	4	3	2
	16	3	1

<u>Tabelle 2:</u> Verwendete Liposomenzusammensetzungen. In der ersten Spalte ist die Lipidkomposition, in den Spalten 2 bis 4 das Molverhältnis, des jeweiligen Lipids eingetragen.

3.3.3. Größenbestimmung der Liposomen

Als Größenvorgabe, einer *in vivo*-Applikation der Vehikel in das vaskuläre System, sollten bei der Liposomenpräparation ein mittlerer Durchmesser (Z_{Ave}) von 150 nm nicht unterschritten und von 350 nm nicht überschritten werden. Bei einem Unter- oder Überschreiten könnte die Bioverfügbarkeit der Liposomen durch physikalische oder immunspezifische Parameter abnehmen.

Untersucht wurden die Liposomengrößen von 18 unterschiedlichen dualen und trimeren Lipidzusammensetzungen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (vergleiche Abbildung 38 a,b). Die Liposomen aus den aufgeführten Lipidkompositionen wurden auf zwei unterschiedliche Arten hergestellt. Zum einen durch *reversed-phase-evaporation* (REV-Methode) (8 verschiedene Lipidzusammensetzungen) oder zum andern durch die Rehydrierung eines Lipidfilmes mittels Ultraschall (10 verschiedene Lipidzusammensetzungen). Die Liposomen aus den synthetisierten N-acylierten PE-Derivaten wurden alle mittels Ultraschall hergestellt, da sich die PE-Derivate nicht mit Diethylether in Lösung bringen ließen.



<u>Abbildung 38:</u> Größenverteilung der gemittelten Liposomendurchmesser. a) zeigt die Durchmesser der Liposomen, die mittels *reversed-phase-evaporation* hergestellt wurden. b) zeigt die Durchmesser der Liposomen, die mittels Ultraschall generiert wurden. Die Zahlen in den Klammern hinter der Lipidzusammensetzung gibt das Molverhältnis der Lipide untereinander an. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

Je nach Lipidzusammensetzung variierte der Durchmesser bei der Präparation mittels *reversed-phaseevaporation* von 139 nm bei PC/C/LPC (16:3:1) bis zu 781 nm bei PC/C/PE (16:3:1). Die Variationsbreite von 642 nm zwischen den trimären Lipidzusammenstellungen PC/C/LPC (16:3:1) und PC/C/PE (16:3:1) wurde allein durch den Austausch von LPC, mit einer Fettsäure am Glyzerolgrundgerüst (C₃), nach PE, mit zwei Fettsäuren am Glyzerolgrundgerüst (C₃, C₂) erreicht, wodurch die Krümmung der Liposomenoberfläche flacher wurde. Verringerte sich der C-Anteil bei PC/C (16:3) auf PC/C (18:1) so nahm der Durchmesser um 177 nm zu. Bei trimären PE-haltigen Lipidkompositionen nahm der Liposomendurchmesser, mit abnehmendem PE-Anteil von PC/C/PE (4:3:2) über PC/C/PE (16:1:2) nach PC/C/PE (16:3:1), zu.

Die Liposomendurchmesser der Präparation mittels Rehydrieren eines Lipidfilm durch Ultraschall lagen zwischen 147 nm bei PC/C/PE-PEG (16:3:1) und 261 nm bei PC/C/NSPE (4:3:2). Die deutlichste Größenzunahme der Durchmesser erfolgte von PC/C/PE-PEG (16:3:1) nach PC/C/PE-PEG (4:3:2), durch einen erhöhten Anteil an PE-PEG in den Liposomen. Bei den trimären Lipidkompositionen aus den synthetisierten PE-Derivaten mit einer Kettenlänge von 18 und 22 Kohlenstoffatomen nahm der Durchmesser mit steigen-dem Anteil an PE-Derivaten zu. Bei einer Acylkettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen bestand kein Größenunterschied zwischen erhöhtem und niedrigem NPPE-Anteil. Eine Umkehrung der Größenent-wicklung zeigten die Liposomen aus PC/C/NMPE mit einer Acylkettenlänge, des PE-Derivates, von 14 Kohlenstoffatomen. Der Durchmesser nahm mit steigenden Anteil an NMPE ab.

3.3.4. Liposomen mit Carboxyfluorescein (CF)

Die Liposomen sollten auf ihre Stabilität und Dichtigkeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der wasserlöslicher Marker Carboxyfluorescein (CF) in das Lumen der Liposomen eingeschlossen. CF ist

ein Fluorophor das sich in Konzentrationen größer 100 mM, wie sie in dem Lumen der Liposomen eingestellt wurde, selber *quencht* und erst durch die Verdünnung nach Leckaustrom aus den Liposomen zum fluoreszieren angeregt werden kann.

Die Verteilung des CF in den Liposomen und an den Lipiden der Außenseite wurde untersucht, um den Wert in der CF-Fluoreszenzmessung zu bestimmen, der nicht durch austretendes CF verursacht wird.

Nach der CF-Beladung der Liposomen wurden die Liposomen von dem überschüssigen CF durch eine Gelfiltrationssäule abgetrennt. Bei einem Aliquot der frisch gereinigten Liposomen wurde die CF-Fluoreszenz vor und nach der Zerstörung der Liposomen



□ an Liposomen ■ in Liposomen

<u>Abbildung 39:</u> Prozentuale Verteilung von dem gesamt eingesetzten CF bei der Liposomenpräparation. [Mittelwerte von $n = 3, \pm$ Standardabweichung] durch Detergenz photometrisch bestimmt. Die Fluoreszenz, die vor der Liposomenzerstörung gemessen werden konnte, wurde von CF verursacht, dass an der Außenseite der Liposomen haftete. Dieser Außenanteil an CF macht 0,4 % des gesamten eingesetzten CF aus. Demgegenüber stand ein um den Faktor 42 größerer Anteil von 16,8 % des gesamten eingesetzten CF, der nach der Präparation in den Liposomen eingeschlossen ist (siehe Abbildung 39).

3.3.5. Halbwertzeit der Liposomen in vitro

Die Stabilität der Liposomen wurde *in vitro* untersucht, um die aussichtsreichsten Lipidformulierungen mit der größten Stabilität für spätere *in vivo* Experimente zu ermitteln. Die Halbwertzeit als Maß für die Liposomenstabilität wurde *in vitro* als CF-Leckausstrom gemessen. Als Halbwertzeit wurde der Fluoreszenzwert gewählt der der Hälfte des maximal durch Detergenz freisetzbaren CF entsprach. Eingesetzt wurden 18 verschiedene Lipidzusammensetzungen (s.o.) die 120 h in NCS (*new born calf serum*) inkubiert wurden. Die Fluoreszenz des freigesetzten CF wurde zu 15 verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und aus dem Verhältnis von CF-Leckausstrom und maximal durch Detergenz freisetzbare CF-Fluoreszenz die Halbwertzeit abgeleitet.

Die ermittelten Halbwertzeiten bei Lipidformulierungen ohne N-acylierte PE-Derivate lagen im Bereich



<u>Abbildung 40:</u> In vitro Liposomenstabilität gemessen in *new born calf serum* als Halbwertzeit des maximalen CF-Leckausstroms. In a) sind die Liposomen durch *reversed phase evaporation*, in b) sind die Liposomen durch Ultraschall hergestellt worden. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

von 5 h bei PC/C (18:1) bis zu 120 h bei PC/C/PE (16:3:1) (vergleiche Abbildung 40 a). Die Länge der Halbwertzeit variiert bei den Lipidkompositionen mit N-acylierten PE-Derivaten von 26 h bei PC/C/NMPE (16:3:1) bis zu 115 h bei PC/C/PE-PEG (4:3:2) (vergleiche Abbildung 40 b).

Bei der Verwendung von dualen Lipidzusammensetzungen nahm die Halbwertzeit der Liposomen mit steigendem Cholesteringehalt von 5 h bei PC/C (18:1) bis auf 35 h bei PC/C (4:3) zu. Eine, nicht signifikante, längere Halbwertzeit von 43 h wiesen Liposomen aus PC/C (2:1) auf, was auf ein besseres Molverhältnis im Bereich von PC/C (4:2-3) hindeutete (siehe Abbildung 41).



<u>Abbildung 41:</u> *In vitro* Halbwertzeit von Liposomen der dualen Lipidzusammensetzung PC/C. Auf der X-Achse sind die Molverhältnisse aufgetragen. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

Bei der Verwendung von trimeren Lipidverbindungen verlängerte sich die Halbwertzeit bis auf 120 h bei PC/C/PE (16:3:1). Eine erste Verlängerung der Halbwertzeit von 16 h bei PC/C/LPC (16:3:1) auf 35 h

bei PC/C/PE (16:1:2) wurde durch die Verwendung von PE an statt von LPC in der Lipidzusammensetzung erreicht. Die zweite Verlängerung der Halbwertzeit auf 69 h bei PC/C/PE (4:3:2) erfolgte durch einen erhöhten C-Anteil in den Liposomen. Bei Liposomen die aus PC/C/PE (16:3:1) bestanden wurde die längste Halbwertzeit erreicht, was auf ein optimales Verhältnis der Lipide, in Hinblick auf die Liposomenstabilität, schließen ließ (siehe Abbildung 42).

Die Lipidkompositionen mit einem geringeren Anteil an derivatisierten PE (16:3:1) zeigten in der Länge ihrer Halbwertzeit keine Abhängigkeit von der gekoppelten Acylkette. Eine Abhängigkeit von der Acylkettenlänge war bei der Verwendung von Lipidkompositionen mit erhöhten derivatisierten PE-Anteil (4:3:2) festzustellen. Die Länge der Halbwertzeit stieg



<u>Abbildung 42:</u> *In vitro* Halbwertzeit von Liposomen der trimeren Lipidzusammensetzung. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]



<u>Abbildung 43:</u> *In vitro* Halbwertzeit der Liposomen aus der Lipidkomposition (4:3:2) in Abhängigkeit der Acylkettenlänge des PE-Derivates. Aufgetragen auf der X-Achse sind PC/C/NMPE (14), PC/C/NPPE (16), PC/C/NSPE (18), PC/C/NBPE (22) und PC/C/PE-PEG als Vergleich. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

von 40 h bei PC/C/NMPE (4:3:2) und einer Acylkettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen mit zunehmender Kettenlänge auf 101 h bei PC/C/NBPE (4:3:2) mit einer Acylkettenlänge von 22 Kohlenstoffatomen (siehe Abbildung 43). Damit waren die Liposomen mit PE-Derivaten ab einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen genauso stabil wie die Liposomen mit PE-PEG und haben dabei den Vorteil, das bei ihnen ein *targeting* viel definierter durchzuführen ist.

Die Liposomen aus trimeren Lipidkompositionen weisen keinen direkten Zusammenhang zwischen einer verlängerten Halbwertzeit und einen erhöhten C-Anteil auf. Die Werte für R² lagen bei 0,0393 für die Vesikel aus der REV-Präparation und bei 0,4199 für die Vesikel aus der Ultraschall-Präparation. Auch ein Zusammenhang zwischen Liposomengröße und verlängerter Halbwertzeit konnte nicht signifikannt festgestellt werden. Die Werte von R² lagen bei den Liposomen, die durch die REV-Methode hergestellt wurden bei 0,5293 bzw. bei 0,5022 für die Liposomen die mittels Ultraschall hergestellt wurden (siehe Abbildung 44).



<u>Abbildung 44:</u> Korrelation zwischen der Liposomengröße (Y-Achse) und der Liposomenhalbwertzeit (X-Achse) *in vitro*. a) zeigt die 8 Liposomenformulierungen die bei der REV-Methode eingesetzt wurden. b) zeigt die 10 Liposomenformulierungen die bei der Präparation mit Ultraschall eingesetzt wurden. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

Ein Einfluss auf die Stabilität konnte durch die Verwendung von PE und PE-Derivaten sowohl bei den Liposomen die durch die REV-Methode, als auch bei den Liposomen, die mittels Ultraschall hergestellt wurden, gezeigt werden. Ebenso konnte eine Verlängerung der Halbwertzeit durch die Verwendung von trimeren Lipidkompositionen erreicht werden (siehe Tabelle 3).

Liposomenhalbwertzeit in vitro						
		Mittelwert [h]	Standardabweichung			
REV	Duale Lipidkomp.	26,1	14,2			
	Trimere Lipidkomp.	60,9	38,9			
	Gesamt	43,5	34,1			
Ultraschall	16 : 3 : 1	47,3	22,2			
	4:3:2	84,7	26,2			
	Gesamt	66,0	30,6			

Tabelle 3: Liposomenhalbwertzeit in vitro.

3.3.6. Halbwertzeit der Liposomen in vivo

Die Halbwertzeit der Liposomen *in vivo* wurde in Ratten untersucht. Nach Bolusinjektion der Liposomen in die Schwanzvene wurde die Fluoreszenz im Rattenplasma nach 1 h, 2 h, 4 h und 24 h gemessen. Als

Halbwertzeit wurde die Zeit definiert in der die Hälfte des maximal durch Detergenz freisetzbaren CF aus den Liposomen ausgetreten war. Die Abnahmegeschwindigkeit des prozentualen CF-Anteils war von der Lipidzusammensetzung abhängig. Die Liposomen aus unmodifizierten PE wurden bei den beiden untersuchten Molverhältnissen von 4:3:2 und 16:3:1 am schnellsten aus dem Blutstrom eliminiert (siehe Abbildungen 45, 46). Die Lipidzusammensetzung mit NPPE zeigte für das Molverhältnis von 4:3:2 die größte Liposomenstabilität, da 50 % des CF, bezogen auf den Nullwert, nach einer Stunde noch in den Liposomen eingeschlossen waren (vergleiche Abbildung 45). Für die Liposomen mit dem molaren Lipidverhältnis von 16:3:1 lagen die Werte für den prozentualen Anteil an eingeschlossenem CF über den Werten der Liposomen mit dem molaren Lipidverhältnis 4:3:1. Auch hier



<u>Abbildung 45:</u> Prozentualer CF-Anteil eingeschlossen in Liposomen aus PC/C/PE, PC/C/NMPE, PC/C/NPPE, PC/C/NSPE PC/C/NBPE und PC/C/PE-PEG (molares Verhältnis 4:3:2). [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]



<u>Abbildung 46:</u> Prozentualer CF-Anteil eingeschlossen in Liposomen aus PC/C/PE, PC/C/NMPE, PC/C/NPPE PC/C/NSPE, PC/C/NBPE und PC/C/PE-PEG (molares Verhältnis 16:3:1). [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

zeigte sich das die Liposomen aus NPPE neben Liposomen aus PE-PEG die größte Stabilität *in vivo* aufwiesen (vergleiche Abbildung 46).

In vivo kehrte sich das Verhältnis von dem Anteil an N-acylierten PE-Derivaten zur Stabilität, im Vergleich zu den *in vitro*-Untersuchungen, um. Die Liposomen mit der längeren Halbwertzeit *in vivo* bestanden aus Lipidzusammensetzungen mit einem geringem Anteil (16:3:1) an PE-Derivaten. Die Spanne der ermittelten Halbwertzeiten *in vivo* lag zwischen 10 Minuten bei PC/C/PE bzw. (4:3:2) und 43 Minuten bei PC/C/PE-PEG (16:3:1) (vergleiche Abbildung 47).



<u>Abbildung 47:</u> *In vivo* Liposomenstabilität gemessen in Rattenplasma als Halbwertzeit des maximalen CF-Leckausstrom. Eingesetzt wurden Liposomen aus PC/C/PE (dunkelgraue Säulen) bzw. PE-Derivate (hellgraue Säulen) in den Molverhältnissen von 4:3:2 und 16:3:1. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

Die geringste Halbwertzeit von 10 Minuten hatten Liposomen die aus dem Lipidverhältnis PC/C/PE

(4:3:2) bestanden, gefolgt von den Halbwertzeiten der Liposomen aus PE-Derivaten in dem Molverhältnis von 4:3:2. Hier lagen die Halbwertzeiten zwischen 10 und 32 Minuten. Die längste Halbwertzeit *in vivo* wiesen auch hier die Liposomen aus PC/C/NPPE auf, deren Länge der gekoppelten Acylkette 16 Kohlenstoffatome beträgt (siehe Abbildung 48).

Bei den Liposomen mit einem geringen Anteil an PE-Derivaten in dem Molverhältnis 16:3:1 konnten insgesamt längere Halbwertzeiten von 23 Minuten (PC/C/PE) bis 43 Minuten (PC/C/PE-PEG) ermittelt werden als bei Liposomen mit höherem Anteil an PE-Derivaten (4:3:2). Die längsten Halbwertzeiten wurden auch in diesem Ansatz bei den Liposomen mit NPPE-Anteil neben den Liposomen mit PE-PEG erreicht (siehe Abbildung 49).

Die Besonderheit *in vivo* stellten die Halbwertzeiten der Liposomen aus PC/C/NPPE (4:3:2)



<u>Abbildung 48:</u> *In vivo* Halbwertzeit der Liposomen aus dem molaren Verhältnis (4:3:2). [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]



<u>Abbildung 49:</u> *In vivo* Halbwertzeit der Liposomen aus dem molaren Verhältnis (16:3:1). [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

und PC/C/NPPE (16:3:1) dar, da sie fast eine identische Länge von 32 Minuten (4:3:2) bzw. 31 Minuten (16:3:1) aufwiesen (vergleiche Abbildungen 48, 49). Die PE-Derivate mit einer Acylkettenlänge von 16

Kohlenstoffatomen schienen als Komponente somit sehr gut geeignet zu sein um Liposomen für *in vivo*-Applikationen mit *targeting* zu formen.

Eine Korrelation zwischen der Größe und der Halbwertzeit *in vivo* konnte bei den Liposomen, die mittels Ultraschall hergestellt wurden, nicht signifikant festgestellt werden. Der Wert für R² lag bei 0,2449 (vergleiche Abbildung 50).



<u>Abbildung 50:</u> Korrelation zwischen der Liposomengröße (Y-Achse) und der Halbwertzeit (X-Achse) *in vivo*. Aufgezeigt sind die 10 Liposomenformulierungen die mittels Ultraschall präpariert wurden. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

3.3.7. Organverteilung von CF-Liposomen

Die Liposomen aus PC/C/NPPE (4:3:1) und (16:3:1) wurden auf Grund ihrer gleichlangen Halbwertzeit *in vivo* verwendet, um die Organverteilung der Liposomen nach Bolusinjektion in die Schwanzvene zu

untersuchen. Die folgenden Organe wurden auf ihren CF-Gehalt hin untersucht: Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz.

Bei den Liposomen aus PC/C/NPPE (4:3:2) zeigte sich zum Zeitpunkt 1 h nach der Injektion ein geringer *firstpass*-Effekt. Nach der mehrmaligen Passage des Blutstroms durch die Leber waren nur 0,7 % des gesamten injizierten CF in dem Überstand des Organhomogenats nachweisbar (ver-



<u>Abbildung 51:</u> Organverteilung des gesamten injizierten CF von PC/C/NPPE (4:3:2) in Prozent. Die untersuchten Organe waren Herz, Lunge, Leber und Milz. [Mittelwerte von n = 4, \pm Standardabweichung]

gleiche Abbildung 51). Dieser Wert verringerte sich 24 h nach der Injektion auf 0,1 %. Für das Herz lagen die Werte des CF-Gehaltes um den Faktor 4, bei Lunge und Milz lagen die Werte des CF-Gehaltes um den Faktor 8 niedriger.

Die Auswirkungen auf die Organverteilung und den CF-Gehalt der einzelnen Organe waren bei der

Bolusinjektion von Liposomen aus PC/C/NPPE (16:3:1) geringer als bei dem Molverhältnis von 4:3:2 (siehe Abbildung 52). Die Werte für den CF-Gehalt in der Leber lagen zu diesen Zeitpunkt bei 0,16 % des injizierten CF. Die Werte verringerten sich 24 h nach Injektion auf 0,03 %. Die Werte des CF-Gehaltes aus Herz, Lungen und Milz lagen bereits 1 h nach Injektion unter 0,05 % des gesamten injizierten CF. Dieser Anteil verringerte sich nach 24 h auf Werte von 0,01 % des injizierten CF.



<u>Abbildung 52:</u> Organverteilung des gesamten injizierten CF von PC/C/NPPE (16:3:1) in Prozent. Die untersuchten Organe waren Herz, Lunge, Leber und Milz. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

CF wird als wasserlöslicher Marker nach der Inkorporation durch die Liposomeninjektion renal ausgeschieden. Anhand der Werte für den CF-Gehalt in der Niere ließ sich die Ausscheidung von CF, das aus den zerstörten Liposomen im Plasma freigesetzt wird, über den gesamten Zeitverlauf verfolgen. Für Liposomen aus PC/C/NPPE (4:3:2) konnten annähernd gleiche Werte für den CF-Gehalt ermittelt werden wie bei der Leber, was mit der stärkeren Durchblutung der Niere, korreliert. Der CF-Gehalt betrug 1 h nach der Injektion in der Niere 0,8 %, 24 h nach der Injektion wurde noch 0,1 % des gesamten injizierten CF detektiert (siehe Abbildung 53 a).

Die Liposomen aus PC/C/NPPE (16:3:1) zeigten eine länger Halbwertzeit *in vivo*, was sich auch in dem geringeren CF-Gehalt der Niere wiederspiegelte (siehe Abbildung 53 b). Die höchsten Werte an CF-



<u>Abbildung 53:</u> Menge von CF in den Nieren nach Liposomenapplikation von a) PC/C/NPPE (4:3:2) und b) PC/C/NPPE (16:3:1). [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

Gehalt waren 1 h nach der Injektion in der Niere mit 0,35 % des gesamten injizierten CF zu finden. Der CF-Gehalt der Leber betrug zu diesem Zeitpunkt 0,16 %. Ab dem 2 h-Wert war kein Unterschied zwischen den Werten für die Leber und für die Niere festzustellen. Der CF-Gehalt sank in der Niere bis auf 0,03 % bei 24 h ab. Ob eine lineare Eliminierung im Fall der Liposomen aus PC/C/NPPE (4:3:2) und eine exponentielle Eliminierung im Fall der Liposomen aus PC/C/NPPE (16:3:1) vorlag konnte nicht ermittelt werden.

In der Abbildung 54 ist die prozentuale Verteilung des CF in den Organen zusammenfassend angezeigt. Der gemessene Wert nach 2 Minuten wurde gleich 100 Prozent gesetzt. In allen Organen spiegelt sich die Abnahme der CF-Konzentration, analog der Abnahme im Plasma wieder.

Bei den Liposomen (4:3:2) lagen die Werte des CF-Anteils der stark kapillarisierten Organe Herz und Milz nach 1 Stunde bei 40 % des Ausgangswertes, während die übrigen Organe nur Werte um die 20 % aufwiesen. Die Abnahmerate der CF-Konzentration war bei Herz, Lunge, Leber und Niere gleich groß, die Ausnahme bildete die Abnahmerate der Milz die schneller als in den übrigen Organen verlief. Bei den Liposomen (16:3:1) lagen die Werte des prozentualen CF-Anteils höher, 51 % im Herzen und 83 %



<u>Abbildung 54:</u> Organverteilung von CF in Prozent bezogen auf den 2 Minutenwert, der gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Die eingesetzten Molverhältnisse von der Liposomenzusammensetzung PC/C/NPPE war 4:3:2 und 16:3:1. Die untersuchten Organe waren Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz. [Mittelwerte von $n = 4, \pm$ Standardabweichung]

in der Milz waren nach 1 Stunde noch nachweisbar. Die Abnahmerate der CF-Konzentration war bei diesem Verhältnis für Herz, Lunge und Leber gleich. Die Abnahmerate für die CF-Konzentration in der Niere verlief flacher, die der Milz steiler.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es einen spezifischen Gentransfervektor für Endothelzellen zu entwickeln, der systemisch appliziert werden kann.

Primäre Endothelzellen wurden *in vitro* erfolgreich durch eine virales Vektorsystem transfiziert. Zum Nachweis der Transfektion wurde das Gen der murinen induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (miNOS) verwendet. Innerhalb von 72 Stunden nach der Transfektion wurde eine erhöhte NO-Produktion bei PAEC (*pig aortha endothelial cells*) und eine geringere NO-Produktion bei PVSMC (*pig vascular smooth muscle cells*) gemessen. Die höchste NO-Expression lag bei PAEC und PVSMC zwischen 12 und 24 Stunden nach der Transfektion. Eine biphasische NO-Expressionskinetik wurde nach der Transfektion von BHK21 Zellen mit einer MOI von 0,5 gemessen. Die NO-Expressionskinetik bei der Verwendung eines Minimaltiter (MOI: 0,0017) zeigte, dass durch Rekombination zwischen Helfer- und Expressionsvektor vermehrungsfähige Wildtyp Viren entstanden waren. Die Rekombinationsstelle konnte durch RT-PCR im Übergang zwischen den viralen Genen der Nichtstrukturproteinen und den Strukturproteinen lokalisiert werden.

Durch Polyfektion mit nicht-viralen Vektoren aus verzweigten Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 25 Kilodalton ließen sich primäre Endothelzellen ebenfalls erfolgreich transfizieren. Das verwendete Reportergen war das Luziferasegen, das eine sensitive Messung der exprimierten Luziferaseproteinmengen ermöglichte. Als optimale Transfektionsbedingung für HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) mit Polyplexen wurde eine DNS-Menge von 1,7 µg/ml bei einem N/P-Wert von 12 und einer Transfektionsdauer von 60 Minuten ohne eine Nachbehandlung durch Chloroquin und / oder DMSO ermittelt.

Im Rahmen der Arbeit wurde bei Polyplexen aus PEI ein *targeting* von stimulierten gegenüber unstimulierten primären Endothelzellen durch ein VCAM-1 bindendes Peptid gezeigt. Insgesamt wurden fünf verschiedene VCAM-1 bindende Peptide und ein ICAM-2 bindendes Kontrollpeptid auf ihre *targeting*-Kapazität hin untersucht. Die Peptide waren aus einer Peptid-präsentierenden Bakterienbank selektioniert und ihre Affinität zu dem jeweiligen Rezeptor mit Hilfe der SPR-Methode bestimmt worden. Über eine Disulfidbrücke wurden die Peptide an PEI gekoppelt. Die Anzahl der gekoppelten Peptide pro PEI-Molekül lag zwischen 2 und 40. Die Expression von VCAM-1 auf stimulierten HUVEC wurde mittels *western-blot* und FACS-Analyse untersucht. Die DNS-komplexierenden Eigenschaften des PEI mit gekoppelten *targeting*-Peptiden wurde durch Gelretardierung nachgewiesen. Eine gesteigerte Toxizität wurde bei den *targeting*-Polyplexen nicht festgestellt.

Neutrale Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC), Cholesterin (C) und N-Palmitylphosphatidylethanolamin (NPPE) mit einer *in vivo*-Halbwertzeit von 30 Minuten und einer *targeting*-Möglichkeit wurden aus 18 unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen ermittelt.

Insgesamt wurden vier N-acylierte PE-Derivate mit Acylkettenlängen von 14, 16, 18 und 22 Kohlenstoffatomen synthetisiert und in Liposomen eingebaut. Die Liposomengröße, die Halbwertzeit *in vitro*, die Halbwertzeit *in vivo* sowie die Organverteilung der Liposomen nach Injektion in die Schwanzvene von Ratten wurden untersucht. Die Liposomendurchmesser variierten ohne eingebaute N-acylierte PE-Derivate um 642 nm, bei Liposomen mit N-acylierten PE-Derivaten lagen die Durchmesser in dem Bereich zwischen 148 nm bis 261 nm. Eine Abhängigkeit der Liposomengröße von der Länge der N-Acylkette konnte nicht festgestellt werden. Die Stabilitätsmessungen und die Organverteilung erfolgten durch die Messung des Leckausstrom von Carboxyfluorescein (CF) aus den Liposomen bzw. des CF-Gehaltes in den Überständen der untersuchten Organenhomogenate Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz.

Die Halbwertzeit *in vitro* wurde in NCS (*new born calf serum*) bestimmt. Die geringste Halbwertzeit von 5 Stunden wiesen Liposomen aus PC/C, die längste Halbwertzeit mit >120 Stunden wiesen Liposomen aus PC/C/PE auf. Kurze gekoppelte Acylketten wirkten sich in Liposomen mit einem molaren Verhältnis an PE-Derivaten von (16:3:1) nicht negativ auf die Halbwertzeit aus. Eine Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen erwirkte in dieser Untersuchung die längste Halbwertzeit. Bei den Liposomen aus N-acylierten PE-Derivaten in dem Molverhältnis (4:3:2) verlängerte sich die *in vitro*-Halbwertzeit auf 101 Stunden bei PC/C/NBPE in Abhängigkeit der länger werdenden, gekoppelten Acylketten.

Die Halbwertzeit *in vivo* wurde im Blutplasma von Ratten bestimmt. Die geringste Halbwertzeit wiesen Liposomen aus PC/C/NSPE mit 10 Minuten, die längste Halbwertzeit wiesen Liposomen aus PC/C/NPPE mit 32 Minuten auf. Bei beiden untersuchten molaren Lipidverhältnissen (4:3:2) und (16:3:1) wurde bei den N-acylierten PE-Derivaten mit einer gekoppelten Acylkette von 16 Kohlenstoffatomen die längste Halbwertzeit von über 30 Minuten erreicht.

Die Organverteilung der Liposomen wurde für die Lipidzusammensetzung aus PC/C/NPPE in den Molverhältnissen (4:3:2) und (16:3:1) untersucht. Es konnte keine Akkumulation von CF in einem der analysierten Organen festgestellt werden.

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnten zum einen die erfolgreiche Transfektion von Endothelzellen mit viralen und nicht-viralen Vektoren gezeigt werden und zum andern die Lipidzusammensetzung ermittelt werden, die Liposomen *in vivo* eine verlängerte Halbwertzeit verleiht. Ein *targeting* von primären Endothelzellen (HUVEC) konnte durch ein VCAM-1 bindendes Peptid erreicht werden ebenso wie eine erhöhte Expressionsrate des Reportergens gegenüber Vektoren ohne *targeting*.

5.1. Transfizierbarkeit von Endothelzellen durch einen viralen Vektor

Die Transfizierbarkeit von Endothelzellen *in vitro* mit dem Gen für die murine induzierbare NO-Synthase wurde durch den Einsatz des Sindbis Virus Expressionssystem gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass miNOS-Pseudovirionen in der Lage waren vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen zu infizieren. Bei den infizierten PAEC und PVSMC konnte bereits 9 Stunden nach der Transfektion die Expression der miNOS nachgewiesen werden. Die NO-Produktion der vaskulären Zelltypen liegt um den Faktor 6 unter den Werten der NO-Produktion von den Kontrollzellen BHK21 und COS7, bei denen schon 6 Stunden nach der Transfektion die Expression der miNOS nachgewiesen werden konnte und deren NO-Produktion in eine Sättigung geriet (siehe Abbildungen 11, 12, 13).

Die Gründe für die Unterschiede in der NO-Produktion könnten an der allgemeinen schlechteren Transfizierbarkeit oder an einer geringeren Dichte des 67 kD Lamininrezeptors auf der Oberfläche von Endothelzellen liegen, so dass nur eine geringere Anzahl an Pseudovirionen die Zellen transfizieren konnte.

Die Stoffwechselaktivität könnte alternativ für Unterschiede in der NO-Produktion sorgen. Bei den Endothelzellen und den vaskulären glatten Muskelzellen handelte es sich um Primärzellen, die aus ihrem ursprünglichen Gewebeverband isoliert worden waren und durch die Kontaktinhibition am Wachstum gehindert wurden, im Gegensatz zu den immortalisierten Kontrollzelllinien, die in ihrem Wachstum nicht gehindert wurden und somit über eine höhere Stoffwechselrate verfügten.

Änderungen der endogenen NO-Produktion, durch die Transfektion von Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit miNOS-Pseudovirionen, könnte das ausbalancierte Gleichgewicht der NO-vermittelten Signalkaskaden und posttranslationalen Modifikationen in diesen Zellen stören und negative Rückkopplungen auf die NO-Produktion bewirken ^[141-144].

Die Analyse der NO-Produktion ergab die ersten Hinweise auf eine Rekombination zwischen Expressions- und Helfervektor.

Der erste Hinweis auf eine Rekombination zwischen dem RNS-Transkript des Expressionsvektors und dem RNS-Transkript des Helfervektors war die Beobachtung einer phasischen NO-Produktionskinetik

von PAEC. Nach der Transfektion von miNOS-Pseudovirionen mit geringem Titer wurde ein Verlauf der NO-Produktion mit zwei Maxima sowie einem Minimum beobachtet (siehe Abbildung 15).

Der zweite Hinweis auf eine Rekombination war die Beobachtung, dass nach der Transfektion von BHK21 Zellen mit geringen Titern innerhalb der ersten 36 Stunden nach der Transfektion keine NO-Produktion nachweisbar war, obwohl das Sindbis Expressionssystem auf BHK21 Zellen optimiert worden ist. Eine gleich hohe NO-Produktion konnte erst nach 36 Stunden, bei dem hohen Titer früher als bei dem niedrigen Titer, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16).

Der dritte Hinweis auf eine Rekombination war die erfolgreiche Sekundärinfektion von unbehandelten BHK21-Zellen, die mit Mediumüberständen von miNOS-Pseudovirionen transfizierten BHK21 Zellen, durchgeführt wurde (siehe Abbildung 17). Sowie eine höhere Sterblichkeit der betroffenen Zellen (vergleiche Abbildungen 14 und 18).

Diese drei Hinweise zeigen, dass eine Rekombination zwischen den parentalen RNS-Molekülen von pSinRep5miNOS und DH-(BB)-5'SIN stattgefunden haben muss. Ansonsten würde man eine starke Korrelation zwischen dem Expressionsniveau der miNOS und der für die Infektion verwendeten Titer erwarten und in dem Mediumüberstand von infizierten Zellen dürften keine infektiöse Partikel nachweisbar sein.

Bei den Alphaviren wurden drei Formen der RNS-Rekombination identifiziert, die homologe, illegitime und aberrante homologe Rekombination ^[146-148]. Diese findet bei den RNS-Viren mit unsegmentierten Genomen häufiger statt als ursprünglich angenommen wurde ^[145].

Für die Rekombination bei dem Sindbis Expressionssystem und dem Virus selbst gibt es in der Literatur gegenläufige Meinungen. Die ersten experimentellen Beweise, dass es bei den Alphaviren zu Rekombinationen kommen kann, wurden 1988 erbracht ^[149]. Zwei Jahre später konnte homologe und nichthomologe Rekombinationen von replikationsdefizienten Sindbis-RNS-Molekülen auch in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden ^[147,148].

Im Gegensatz zu den Experimenten, die mit dem DH-(BB)-5'SIN-Helfervektor durchgeführt wurden, konnte in infizierten Zellen keine genomische oder subgenomische RNS nachgewiesen werden, was das kommerziell erhältliche Sindbis Expressionssystem für die Expression von heterologen Genen *in vitro* und *in vivo* zu einem nützlichen Instrument machte ^[36].

Die Verwendung von miNOS als Reportergen machte die Beobachtung der Rekombination in dieser Arbeit erst möglich, da die Expressionskinetik über einen mehrere Tage dauernden Zeitraum analysiert werden konnte. Zudem ermöglichten die Experimente, die mit einem geringem Titer an miNOS-Pseudovirionen durchgeführt wurden, die Beobachtung einer Sekundärinfektion durch rekombinante Virionen. Bei einem miNOS-Pseudovirionentiter mit einer MOI von 0,5 können maximal 50 % der Zellen mit jeweils einem Pseudovirion pro Zelle transfiziert werden und erst nach einer Rekombination, durch die neue Virionen entstehen, ist eine zweite Phase in der miNOS-Expression zu beobachten. Die Rekombination zwischen den Nichtstrukturproteinen exprimierenden Replikons (pSinRep5) und den Strukturproteinen exprimierenden Replikons (DH-(BB)-5'SIN) ist auch von einer anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden ^[150,151]. Diese Arbeitsgruppe konnte die genomische 49S-RNS nachweisen, nachdem sie pSinRep5 Plasmide ohne einklonierte Reportergene verwendet hatten, um BHK Zellen primär zu infizieren. Sie konnten jedoch keine rekombinanten Virionen nachweisen, die das parentale pSinRep5 Replikon trugen. Der genaue Mechanismus der RNS-Rekombination ist noch unklar. Untersuchungen zur Identifizierung des Mechanismus haben gezeigt, dass auch zelleigene RNS in das virale Genom rekombiniert wird ^[152]. Bestimmte RNS-Merkmale wie Sequenz- oder Strukturhomologie, kryptische oder authentische Polymerase-Erkennungssequenzen und potentielle Basenpaarungen zwischen den RNS-Sequenzen legten die Vermutung nahe, dass es sich um einen sogenannten *template-switching*-Mechanismus handelt wie er bereits für andere RNS-Viren beschrieben wurde ^[153-155]. Die Variabilität des *template-switching* in den infizierten Zellen lässt drei unterschiedliche Rekombinationsmöglichkeiten der viralen RNS zu, die in die Virionen eingekapselt werden.



<u>Abbildung 55:</u> Rekombinierte RNS die in Capside verpackt werden können. I) parentales pSinRep5-Replikon, das für die Gene der Nichtstrukturproteine und die miNOS kodiert. II) Durch Rekombination entstandene genomische 49S-RNS des WT-Virus. III) Durch Rekombination von pSinRep5miNOS und DH-(BB)-5'SIN entstandene RNS, die neben den Nichtstrukturproteinen sowohl für die Strukturproteine als auch für die miNOS kodiert.

Dieses sind erstens das parentale Replikon pSinRep5miNOS (I), zweitens die genomische 49S-RNS des WT-Virus mit der Fähigkeit eine subgenomische 26S-RNS zu exprimieren (II) und drittens parentale Replikons die mit DH-(BB)-5'SIN rekombiniert haben (III) (siehe Abbildung 55).

Die Infektion von einer Zelle durch ein Sindbis Virus blockiert wahrscheinlich nicht nachfolgende Infektionen (Superinfektionen) der Zelle durch weitere Sindbis Virionen. Somit wäre eine Doppelinfektion während der initialen Phase des Infektionsvorgangs möglich, was bei einem niedrigen Titer auf einen geringen Prozentsatz der transfizierten Zellen zutreffen sollte. Die Annahme, dass die sekundär infizierten Zellen die miNOS exprimieren homolog zwischen dem parentalen Replikon und dem Helfer zur genomischen WT-RNS, mit Deletion des miNOS-Gens rekombiniert haben ist somit am wahrscheinlichsten (1). Der entstandene WT-Virus stellt als Helfervirus die Strukturproteine für das pSinRep5miNOS-Replikon zur Verfügung, so dass zusätzlich miNOS-Pseudovirionen in der infizierten Zelle entstehen (2). Die beiden Populationen von WT-Viren und miNOS-Pseudovirionen lysieren die Wirtszelle und infizieren über mehrere Vermehrungszyklen weitere Zellen (3) (siehe Abbildung 56).



<u>Abbildung 56:</u> Schematische Darstellung der Pseudovirionenherstellung ohne Rekombination auf der linken Seite und mit Rekombination auf der Rechten Seite (in Fettdruck). Erklärung siehe Text.

Findet keine Deletion des miNOS-Gens statt enthält das so entstandene rekombinante RNS-Genom alle Elemente die für die Replikation und Transkription benötigt werden. Zusätzlich verfügt die rekombinante genomische RNS über die subgenomischen RNS-Sequenzen, die für die Strukturproteine und die miNOS kodieren. Die Lage des miNOS-Gens innerhalb des rekombinanten Genoms ist abhängig von der Rekombinationsstelle und kann zwischen den Genen der Nichtstrukturproteine und den Genen der Strukturproteine liegen oder am 3'-Ende der genomischen RNS, hinter den Genen der Strukturproteine.

Die Lokalisation des miNOS-Gens wurde durch RT-PCR ermittelt, die als Startmatrize Gesamt-RNS aus sekundärinfizierten BHK21 Zellen verwendete (siehe Abbildungen 20, 21). Mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden für die Nichtstrukturproteingene und die Strukturproteingene wurde ein 650 bp-Fragment amplifiziert, was eine Lokalisation der Gene für die Strukturproteine hinter den Genen für die Nichtstrukturproteine analog des WT-Virusgenom anzeigte. Das so entstandene rekombinante Genom könnte neben den viralen Genen auch das Gen für die miNOS enthalten. Das miNOS-Gen befände sich hinter einem zweiten subgenomischen Promotor, der für die Expression des Reportergens in den sekundär infizierten Zellen verantwortlich wäre. Das die Verpackungskapazität des Kapsids auch für rekombinante Genome ausreicht wurde 1995 gezeigt ^[150].

Die Lage der Rekombinationsstelle wurde durch die RT-PCR bestimmt. Sie befindet sich in der Nähe des subgenomischen Promotors. Nur wenn hier ein homologes Rekombinationsereignis statt-findet, gelangen die Gene der Strukturproteine in *cis* hinter die Gene der Nichtstrukturproteine. Es entsteht dieselbe Genabfolge wie im WT-Virusgenom (vergleiche Abbildung 57). Das rekombinierte Genom kann verpackt werden und bildet auf diese Weise vollständig funktionsfähige Viren. Die so ent-standenen Viren können Zellen infizieren, lysieren, NO-Produktion induzieren und stellen bei einer Ko-infektion mit miNOS-Pseudovirionen die Strukturproteine für eine erneute Einkapselung der rekom-binanten WT-Virus-RNS und des Expressionsvektortranskriptes zur Verfügung. Diese können ihrerseits wiederum neue Zellen infizieren und sich vermehren.

in vitro transkribierte pSinRep5miNOS-RNS (11681 nt)



<u>Abbildung 57:</u> Lage der Rekombinationsstelle (dunkelgraue Kästchen). Es entsteht die Genabfolge wie im WT-Virusgenom, in der dieGene der Strukturproteine (Kapsid) in cis hinter den Genen der Nicht-Strukturproteine (Nsp4) liegen. Die Lage der PCR-Oligonukleotide (2nsp4-sense und 2capsid-anti) sind durch schwarze Dreiecke symbolisiert. Die Zahlen geben die jeweilige Länge des Transkriptes in Nukleotiden (nt) an.

Eine Superinfektion von rekombinanten WT-Viren und miNOS-Pseudovirionen wird in dem biphasischen Verlauf der NO-Produktionskinetik wahrscheinlich, genau wie die Zunahme an zytotoxischen Effekten durch die Vermehrung von rekombinanten WT-Viren, da der Virustiter und die MOI sehr stark ansteigen ^[157]. Durch die auftretende Rekombination zwischen den beiden Vektortypen des Expressionssystems ist die gentherapeutische Anwendung des Vektors *in vivo* unkontrollierbar und zu gefährlich.

5.2. targeting von Endothelzellen durch VCAM-1 bindende Peptide

Durch die Kopplung von Peptiden an verzweigtes PEI (25 kDa) konnte ein *targeting* von Endothelzellen erreicht werden. Die verwendeten Peptide waren aus einer Peptid-präsentierenden Bakterienbank und M13-Phagenbank als Liganden für VCAM-1 selektioniert worden und sollten ein *targeting* auf aktivierten HUVEC ermöglichen, die VCAM-1, nach Zytokinstimulation, auf ihrer Zelloberfläche präsentieren.

Die erfolgreiche Transfektion von primären Endothelzellen mit dem Luziferasegen als Reporter, durch ein nicht-virales Vektorsystem, wurde gezeigt. Die Transfektion der HUVEC wurde durch Polyplexe erreicht, die auf ihren Anteil an DNS-Menge und N/P-Wert optimiert wurden. Die Transfektionsergebnisse konnten durch eine Nachbehandlung der Zellen mit endosomenzerstörenden Substanzen, wie Chloroquin, oder membranpermeabilisierenden Substanzen, wie DMSO, nicht signifikant verbessert werden (siehe Abbildung 23 a,b). Hohe Transfektionsergebnisse wurden bei der Verwendung von geringeren Mengen an Plasmid-DNS erreicht. Wurde die DNS-Menge erhöht kam es zu keiner Verbesserung des Transfektionsergebnisses mehr, sondern nur zu größeren Variationen in dem Ergebnis ^[161,162].

Die Optimierung des N/P-Wertes auf >8 (hier 12) konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden, da die so entstandenen Polyplexe eine positive Oberflächenladung aufweisen, und über elektrostatische Wechselwirkungen mit der negative geladenen Zelloberfläche interagieren können ^[51,83,163].

Für die Polyplexgrößen die in physiologischer Kochsalzlösung ermittelt wurden, konnten die Werte für eine schnelle Aggregation und Zunahme der Polydispersität aus der Literatur bestätigt werden ebenso wie eine Abnahme der Polyplexgröße mit steigendem N/P-Wert ^[164,165].

Das Ausbleiben einer Steigerung in den Transfektionsergebnissen kam durch den massiven endosomenzerstörenden Effekt von PEI zustande der den Einfluss des Chloroquins überdecken könnte und auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde [82,166]. Die Autoren beschreiben einen lysosomenzerstörenden Effekt des PEI, der nicht pH-Wert abhängig im Bereich von 5 - 8 ist und somit nicht mit der zunehmenden Protonierung des PEI im Zusammenhang steht. So konnte auch bei Gram-negativen Bakterien eine Zunahme der Permeabilität ihrer äußeren Membran durch PEI erreicht werden [167]. Ein weiterer Hinweis, dass die Aufnahme von PEI/DNS-Komplexen ohne die Beteiligung von Lysosomen vonstatten geht, konnte dadurch gezeigt werden, dass eine PEI-vermittelte Abpufferung des lysosomalen pH-Wertes erst 6 Stunden nach Applikation der Polyplexe messbar war, ein Eintritt der Polyplexe in den Nukleus erfolgt unter den selben Bedingungen bereits nach 3,5 Stunden ^[168]. Die Daten wurden an immortalisierten Zellen (E.A.hy926) erhoben und zeigten eine Wanderung der Polyplexe von der Plasmamembran zu dem Nukleus. Auch konnten Beweise gegen die "Protonenschwamm-Theorie" durch die Ermittlung einer Wanderungskinetik der Polyplexe innerhalb der Zelle gesammelt werden. Bei dem verwendeten E.A.hy926-Zellen zeigte sich, dass die Polyplexe auf der Zelloberfläche Aggregate bilden bevor sie aufgenommen werden. Erst nach 2 – 3 Stunden konnte eine Endosomenbildung und nach 3,5 – 4,5 Stunden ein Eintritt in den Nukleus beobachtet werden ohne das eine Änderung des lysosomalen pH-Wert oder eine Interaktion zwischen Lysosomen und PEI-enthaltenden Vesikeln stattfand [169].

Der Einfluss der Transfektionsdauer auf die Expression des Reportergens wurde für vier Transfektionsintervalle und für vier verschiedene N/P-Werte untersucht. Es wurden die Gesamtproteinmenge und die Luziferaseproteinmenge bestimmt, um Aussagen über die Toxizität des PEI zu erhalten. Diese spiegelte sich in einer Abnahme der Gesamtproteinmenge und in der Transfektionseffizienz wieder, die durch die Menge an Luziferaseprotein nachweisbar war (vergleiche Abbildung 24).

Das Luziferaseprotein hat den Vorteil, dass seine Menge über den Substratumsatz bestimmt wird. So werden nur die Luziferaseproteine in dem Test erfasst, die enzymatisch aktiv sind.

Die Menge an Gesamtprotein korrelierte direkt mit der Länge der Transfektionsdauer. Die Gesamtproteinmenge nahm mit zunehmender Transfektionsdauer, bei allen untersuchten N/P-Werten, ab. Mit der Zunahme des N/P-Wertes von 6 auf 12 verringerte sich die Gesamtproteinmenge um die Hälfte. Als mögliche Ursache kann hier eine Dosis-Wirkung-Beziehung von PEI diskutiert werden, in der mehr PEI, durch längere Transfektionszeiten und additiv durch höhere N/P-Werte, in die Zellen aufgenommen wurde und reduzierend (toxisch) auf die Menge an Gesamtprotein wirkte.

Für die Luziferaseproteinmenge ließen sich zwei gegenläufige Trends beobachten. Zum einen ist eine Abnahme der Luziferaseproteinmenge von über 80 % bei der längsten Transfektionsdauer mit ansteigenden N/P-Werten beobachten. Zum andern ist eine Zunahme der Luziferaseproteinmenge von über 85 % bei einer Transfektionsdauer von ein bis zwei Stunden mit ansteigenden N/P-Werten zu beobachten. Eine Abhängigkeit der Luziferaseexpression von der Transfektionsdauer war bei den untersuchten N/P-Werten 6 bis 10 zu beobachten die durch eine längere Aufnahme an Polyplexen während des Transfektionsintervalls zu erklären war. Die geringeren Luziferasemengen bei Transfektionszeiten bis 120 Minuten können dadurch zustande gekommen sein, dass die Polyplexe auf den Zelloberflächen aggregieren und somit schlechter aufgenommen wurden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Blockade der adsorptiven Endozytose durch PEI. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist noch nicht untersucht, wird aber in Verbindung mit dem *recycling* von Rezeptoren auf der Oberfläche in Verbindung gebracht ^[170].

Die Selektion von VCAM-1 bindenden Peptiden wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Herrmann an dem Physiologischen Institut der Universität Düsseldorf durchgeführt und für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt. Zwei der Peptide weisen Sequenzähnlichkeiten zu dem Integrin VLA-4 von Leukozyten auf, die *in vivo* an zytokinaktivierte Endothelzellen über VCAM-1 binden ^[171,119].

Die Kopplung der VCAM-1 bindenden Peptiden erfolgte an die primären Aminogruppen von PEI mit Hilfe des heterobifunktionalen Verbindungsmoleküls SPDP ^[172]. Mit dieser Methode konnten an PEI bereits von anderen Arbeitsgruppen zellbindende Liganden gekoppelt werden ^[173].

In dem zweistufigen Kopplungsverfahren traten in dem ersten und zweiten Schritt Verluste an Peptid-Kopplungstellen auf. Die Verluste im ersten Schritt lagen in dem Bereich von 30 % wie sie auch in der Literatur beschrieben wurden. Hingegen wurde bei dem zweiten Kopplungsschritt nur ein Verlust von 3,5 % beschrieben ^[112]. Eine beobachtete Autoreduktion des Verbindungsmoleküls ist eine mögliche Ursache für einen Teil dieses Verlustes. Der übrige Anteil entstand durch eine mögliche Dimerisierung der Peptide untereinander über eine Disulfidbrücke oder durch die Reduktion bereits bestehender Disulfidbrücken zwischen PEI und Peptiden ^[112]. Die Expression von VCAM-1 nach Stimulation durch Endzündungsmediatoren konnte für primäre Endothelzellen (HUVEC) gezeigt werden. Das Protein war nach Stimulation von Endothelzellen im *Westernblot* detektierbar. Die Ergebnisse der VCAM-1 Expression stimmten überein mit den Ergebnissen die 1995 in Experimenten mit primären LPS- und TNFα-stimulierten Endothelzellen durchgeführt wurden, sowie mit den Ergebnissen die 1990 an hypercholesterinergen und hyperlipidemisch Kaninchenmodellen gewonnen wurden ^[174,175]. Für positiv geladene Liposomenformulierungen aus DOTMA / DOPE (Dioleyloxypropyltrimetylammoniumchlorid / Dioleylphosphatidylethanolamin) ist beschrieben worden, dass sie mit der induzierbaren Expression von VCAM-1 interferieren, wie an HPAEC (*human pulmonary artery endothelial cells*) gezeigt werden konnte ^[176].

Das Expressionsmuster von VCAM-1 zeigte, das dieses Molekül eine wichtige Funktion in der Pathophysiologie der akuten und chronischen Endzündungsreaktionen übernimmt und des weiteren an der Adhesion von mononukleären Leukozyten an diversen extravaskulären Stellen, wie z.B. lymphoide dendritische Zellen und Gewebemakrophagen beteiligt ist ^[177]. Nach der Bindung des Liganden wird es in aktivierten HUVEC innerhalb von 11 min. internalisiert ^[178].

Die verwendeten Polyplexe, mit gekoppelten *targeting*-Peptiden, konnten Plasmid-DNS in Abhängigkeit steigender N/P-Werte vollständig komplexieren (siehe Abbildung 31). Die negativen Ladungen der Phosphatgruppen aus dem DNS-Rückgrad wurden bei einem N/P-Wert von 12 soweit abgeschirmt, dass eine Migration im elektrischen Feld der Elektrophorese nicht feststellbar war, d.h. mindestens 90 % der negativen Ladungen war abgeschirmt ^[179,180]. Vergleichbare Ergebnisse bei der Komplexierung von Plasmid-DNS konnten 1997 für PEI gezeigt werden, das für ein Hepatozyten*targeting* mit Galaktose modifiziert worden war ^[108].

Eine mögliche Toxizitätssteigerung der Polyplexe durch die Kopplung von Peptiden, bzw. Verbindungsmolekülen gegenüber unbehandelten PEI konnte nicht gezeigt werden (vergleiche Abbildung 33). Eine Steigerung des Transfektionsergebnisses in stimulierten gegenüber unstimulierten HUVEC konnte durch die Polyplexe mit gekoppelten *targeting*-Peptiden (PEI-3 P2) erreicht werden (vergleiche Abbildung 34).

Mögliche Ursachen in der unterschiedlichen Stimulierbarkeit der HUVEC und damit auch der Transfizierbarkeit durch Polyplexe mit *targeting* Peptiden könnten sich aus der Biodiversität primärer Zellen ergeben, da humanes Serumalbumin einen Einfluss auf die Expression von endothelialen Zelladhäsionsmolekülen ausübt ^[181]. Auch kann sich durch die Stimulation die Transfizierbarkeit von Zellen ändern, indem die Endozytoserate abnimmt, was für pulmonale Zellen nach *in vivo* Transfektion mit linearem PEI gezeigt werden konnte ^[182]. Des weiteren ist von der Herkunft der Zellen nur der Entnahmezeitpunkt der Nabelschnur vermerkt, die folgenden Transport- und Lagerbedingungen, mit Einflüssen auf die Zellen sind nicht reproduzierbar. Eventuelle patophysiologische Veränderungen bei

der Spenderin z.B. Entzündungen oder eine Ischämie waren nicht bekannt. Somit waren die Anfangsbedingungen der Primärzellkultivierung nicht für alle Zellen gleich und eine Homogenität in der Population ausgeschlossen. Das Anlegen von Mischkulturen aus mehreren unterschiedlichen HUVEC-Präparationen war nur bedingt möglich, da sich das Expressionsniveau von VCAM-1 mit zunehmender Passagenzahl reduziert und die Zelle den genetischen Charakter einer Primärzelle verliert ^[136].

Die Komplexbildung erfolgte durch eine multivalente elektrostatische Interaktion, die bei der Formierung des Vektor/DNS-Komplexes im Reaktionsgefäß eine heterogene Population von Polyplexen in Abhängigkeit der Konzentration beider Reaktanten herstellte. Somit könnte die Anzahl der gekoppelten Peptide einen Einfluß auf die Transfizierbarkeit der Zellen gehabt haben. Zum einen könnten zu viele Rezeptor-Liganden-Interaktionen durch Aggregation der Polyplexe zu gößeren Strukturen stattfinden, so dass eine Endozytose dieses Aggregates auf Grund seiner Ausdehnung nicht mehr möglich ist. Zum anderen könnte sich eine zu geringe Anzahl an Interaktionen zwischen Rezeptor und Liganden nachteilig auf die Transfektionseffizienz auswirken, da keine Endozytose induziert wird. Analoges gilt wenn die Peptide durch die DNS, auf Grund eines zu kurzen *spacers*, verdeckt würden und nicht mit VCAM-1 interagieren können.

Ein weiterer Unterschied der Bindung *in vitro* im Gegensatz zu dem isolierten Rezeptor könnte durch die Beeinflussung von der Ionenstärke des umgebenden Mediums, der effektiv bindenden Peptidkonzentration und der sterischen Erreichbarkeit des Rezeptors im zellulären Umfeld entstanden sein.

5.3. Optimierung der Vektorhalbwertzeit in vivo durch Lipidmodifikationen in Liposomen

Die Liposomenhalbwertzeit *in vitro* und *in vivo* konnte durch die Verwendung von N-acylierten Phosphatidylethanolamin in der Liposomenhülle, im Gegensatz zu unmodifizierten Lipiden, verlängert werden. Nach Bolusinjektion der Liposomen aus N-acylierten PE-Derivaten in die Schwanzvene von Ratten konnte keine Aufnahme von Carboxyfluorescein aus den Liposomen in die untersuchten Organe, bis 24 Stunden nach der Injektion, nachgewiesen werden.

Die Liposomengrößen wurden bei 18 unterschiedlichen dualen und trimeren Lipidkompositionen untersucht, die durch die REV-Methode (8 Lipidkompositionen) oder durch die Ultraschall-Methode (10 Lipidkompositionen) hergestellt worden waren (vergleiche Abbildung 38) ^[185,186].

Die Variationsbreite der Liposomengrößen war bei den Vesikeln, die durch die REV-Methode hergestellt worden waren um 528 nm größer als bei den Vesikeln, die mittels Ultraschall hergestellt worden waren, was zum einen an der Verwendung von dualen und trimeren Lipidkompositionen und zum andern an der schlechten Reproduzierbarkeit der Bedingungen z.B. Phasenübergangstemperatur oder PE-Anteil für alle 8 gewählten Lipidformulierungen lag.

In dieser Arbeit konnte keine Größenzunahme der Liposomen durch die Erhöhung des Cholesteringehaltes in der Liposomenhülle gemessen werden. Das Ausbleiben der Größenzunahme trat sowohl bei den dualen als auch bei den trimeren Lipidzusammensetzungen auf. Dieses Ergebnis stand im Wiederspruch zu Arbeiten aus anderen Arbeitsgruppen, die bei der Verwendung von einem Cholesterinanteil bis 40 mol % in der Liposomenhülle eine Größenzunahme der Vesikel bis zu einem Faktor von 10 gemessen hatten ^[187,188]. Das Ausbleiben der Größenzunahme kann durch eine Zunahme der Laminarität erklärt werden, da die sich die beschriebene Größenzunahme nur auf reine unilamellare Vesikel beschränkt.

Bei der Liposomenpräparation mittels Ultraschall konnte eine Abhängigkeit von dem Cholesteringehalt in der Liposomenmembran und einer Größenzunahme gezeigt werden. Die einzige Ausnahme stellt in dieser Reihe die Liposomenpräparation aus PC/C/NMPE (4:3:2) dar, die einen 34 nm kleineren Durchmesser aufwiesen als die Liposomen aus PC/C/NMPE (16:3:1). Ein Einfluss der Länge von den N-Acylketten auf die Liposomengröße konnte nicht ermittelt werden, was ein Indiz für die Interkalation der gekoppelten Fettsäure mit der Liposomenmembran ist, die ab einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen auftritt ^[189]. Die Kette taucht dabei, je nach Anzahl der Kohlenstoffatome, unterschiedlich tief in die Liposomenmembran ein, wobei die Länge des äußeren Teils der Kette stets konstant bleibt.

Der Cholesterinanteil in einer Membran ist auch für deren Fluidität verantwortlich, da durch die planare Struktur des Cholesterinmoleküls die Anordnung der Acylketten von den Lipiden unterbrochen wird und eine stärkere Rotation der einzelnen Acylketten erlaubt ^[190-192].

Synergistisch zu der Größenzunahme verhält sich der Anteil des eingebauten PE, da PE ein Lipid ist das spontan keine planare Lipiddoppelschichten bildet sondern die Tendenz hat hexagonale Lipidstrukturen (H_{II}-Phase) zu bilden ^[193,194].

Die Halbwertzeiten der Liposomen wurden in NCS als Leckausstrom von CF gemessen. Bei den dualen Lipidkompositionen nimmt die Länge der Liposomenhalbwertzeit mit steigendem C-Anteil von PC/C (18:1) nach PC/C (4:3) zu (vergleiche Abbildung 40). Das Lipidverhältnis PC/C (2:1) bildet trotz geringerem C-Anteil Liposomen die eine noch längere Halbwertzeit haben, was auf eine optimierte Zusammensetzung des Mischungsverhältnis von PC und C hinweist ^[195,196].

Da die längste Halbwertzeit von >120 Stunden bei Liposomen mit dem größten Durchmesser (Z_{Ave}) von 780 nm gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, das nur eine geringe Komplementsystemaktivität im Serum vorhanden war. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass sich die lysosomale Aktivität des Komplementsystems verstärkt gegen größere Liposomen (>200 nm) richtet. Ein protektiver C-Anteil in der Liposomenmembran ist nur in dem Größenbereich von 100 bis 200 nm für die Stabilität von entscheidender Bedeutung ^[197,198].

Die Verwendung von N-acylierten PE-Derivaten zeigte eine direkte Abhängigkeit von der Länge der gekoppelten Acylketten zu der Länge der Halbwertzeit *in vivo* bei dem Molverhältnis (4:3:2) ^[199].

Als Grund für diese Unterschiede können die Zusammensetzungen der verwendeten Seren sein, da die zitierte Arbeitsgruppe humanes Serum verwendete, in dieser Arbeit wurde bovines Serum verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Seren zeigt speziesspezifische Unterschiede in der Komplementsystemaktivität wie in einem Vergleich von Seren ermittelt werden konnte ^[200]. Neben der Lipidzusammensetzung ist die Geometrie der Oberfläche von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Komplementsystems. So konnte 1996 gezeigt werden, dass die Komponenten des Komplementsystems erst ab einem Liposomendurchmesser von 200 nm auf der Oberfläche adsorbieren, da ab diesem Durchmesser eine hinreichend planare Ebene für den lytischen Komplex zur Verfügung steht ^[201].

Wie zu erwarten war, reduzierte sich die Länge der Halbwertzeiten *in vivo* im Gegensatz zu den Halbwertzeiten *in vitro*, da die Liposomen mit einem intakten Immunsystem und mit der Gesamtheit der Serumproteine interagieren.

Die maximale Halbwertzeit *in vivo* wurde bei Liposomen mit dem geringsten Durchmesser von 147 nm aus PC/C/PE-PEG (16:3:1) mit 43 Minuten erreicht. Anzumerken ist bei den Liposomenhalbwertzeiten dass sich die Eliminierung aus dem Blutstrom von Spezies zu Spezies unterscheidet. Die Verwendung von PE-PEG in Liposomen bewirkt bei Mäusen eine stärkere Verlängerung der Halbwertzeit als bei Ratten ^[202]. Diese Halbwertzeiten liegen unter den Werten die mit *Stealth*TM-Liposomen, mit Durchmessern zwischen 50 und 100 nm, *in vivo* erreicht werden konnte ^[203,204]. Ein nicht signifikanter Trend (R² = 0,2449) legte die Vermutung nahe, dass die Stabilität der Liposomen *in vivo* mit abnehmenden Liposomendurchmesser zunahm ^[205].

Einen Einfluss auf die Verweildauer der intakten Liposomen ist für den Anteil an Cholesterin beschrieben. So wird durch einen hohen Anteil an Cholesterin in den Liposomen das Komplementsystem stärker durch die Hydroxylgruppe des Cholesterin aktiviert als durch Liposomen mit geringeren Anteil an Cholesterin ^[206]. Diese Theorie konnte bestätigt werden, da auch bei den durchgeführten Experimenten die Liposomen aus dem Molverhältnis (16:3:1) mit einem geringern C-Anteil eine längere Halbwertzeit besitzen als die Liposomen aus dem Molverhältnis (4:3:2) mit hohem C-Anteil.

Die Organverteilung von Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz, nach Schwanzveneninjektion, in der Ratte wurde für die Liposomen aus PC/C/NPPE in den Molverhältnissen (4:3:2) und (16:3:1) untersucht.
Die Liposomen mit der Lipidzusammensetzung von (16:3:1) wiesen längere Halbwertzeiten in dem Größenbereich von 150 – 200 nm Durchmesser auf als die Liposomen, die in dem selben Größenbereich lagen und die Lipidzusammensetzung von (4:3:2) hatten. In der Literatur ist der Größenbereich von 150 – 200 nm Durchmesser für eine lange Zirkulationsdauer der Liposomen im Blutkreislauf beschrieben und durch den geringeren Anteil an PE-Derivaten kommt es nicht zu einer Aufnahme der Liposomen in Leber und Milz^[207]. Das Herz zeigte keine vermehrte Aufnahme der Liposomen aus dem Blutstrom. Somit konnte eine Aufnahme in das Myokard oder eine Degradierung der Liposomen durch eine Phosphodiesterase vom Phospholipase D-Typ wie sie im Rattenherz beschrieben wurde, ausgeschlossen werden ^[208]. Als mögliche Ursache für die Stabilität ist die Rigidität der Liposomenoberfläche zu sehen, da die N-Acyl-Derivate nur einen minimalen Teil der Kette auf der Oberfläche präsentieren (s.o.) und somit das Substrat für die Phosphodiesterase nicht frei zugänglich war. Die Aufnahme in die Lungen ist von der Ladung und der Größe der Liposomen abhängig. Für Liposomen mit 800 nm Durchmesser, die eine negative Oberflächenladung, durch den Einbau von Phosphatidylserin in der Liposomenhülle, aufweisen, konnte eine Aufnahme in die Lunge nachgewiesen werden ^[209]. Da die verwendeten Liposomen aus PC/C/NPPE keine Ladung auf ihrer Oberfläche tragen und ihre Größe zwischen 207 nm (Molverhältnis 16:3:1) und 208 nm (Molverhältnis 4:3:2) liegt, konnte keine Organaufnahme in die Lunge durch Bindung der Liposomen an die Endothelzellen oder durch Mikroembolie der Lungenkapillaren festgestellt werden.

Eine Aufnahme der Liposomen in die Leberparenchymzellen war auf Grund der Liposomendurchmesser (>150 nm) kaum zu erwarten, da das fenestrierte Endothel in der Leber nur eine durchschnittliche Größe von 100 nm aufweist ^[210]. Die hauptsächlichste Aufnahme von Liposomen erfolgte in der Leber durch die Kupffer-Zellen wie 1996 gezeigt werden konnte ^[211].

Bei den zwei untersuchten Lipidzusammensetzungen konnte keine Akkumulation in der Milz beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten in der Literatur überein, die nur bei PE als Liposomenhauptbestandteil eine Akkumulation in der Milz beobachten ^[212,213].

In der Niere konnte keine Akkumulation des CF aus den Liposomen festgestellt werden, was in keinem Wiederspruch zu der physiologischen Aufgabe der Niere als Ausscheidungsorgan und des wasserlöslichen Markers CF steht.

5.4. Alternativen

Eine Möglichkeit das Sindbis Expressionssystem sicherer zu gestalten und die Möglichkeit von Rekombinationen zu verringern ist die Verwendung von zwei Helfervektoren die jeweils für die Kapsidproteine und die Glykoproteine kodieren und nur eine minimale Proteinausstattung verwenden in denen alle Bereiche mit homologen Sequenzen deletiert sind ^[157]. Bei der Wahl der verwendeten Sequenzen sollten RSEs (*repeat sequence elements*) und das 3' CSE (*conserved sequence element*) deletiert werden, da sie wichtig für die virale RNS-Polymerase bei der Wahl des *templates* sind ^[154]. Des weiteren kann durch die Verwendung von chimären Kapsiden die Verpackung der genomischen RNS modifiziert werden in dem virusfremde Verpackungssignalsequenzen Verwendung finden oder die Verwendung von Verpackungszelllinien ^[158]. Bei weiteren Arbeiten mit modifizierten, nicht zytotoxischen, Expressionssystemen sollten immer Langzeituntersuchungen der NO-Expressionskinetik im Falle der miNOS, oder einem ähnlich gut geeigneten Reportergen, mit geringen Titer und MOI erfolgen, um erneut auftretende Rekombinationen direkt detektieren zu können ^[159,160].

Bei der Verwendung von nicht-viralen Vektoren könnte eine weitere Effizienzsteigerung erreicht werden, indem die Aggregation von Polyplexen verringert wird. Um die Aggregation des PEI in den Polyplexe zu verringern sind von anderen Arbeitsgruppen die Polyplexe in Liposomen eingebaut worden, was zu einer signifikanten Abnahme der Aggregation und der Toxizität sowie zu einer Verdopplung in der Transfektionseffizienz führte ^[183].

Alternativ zu dem hier verwendeten verzweigten 25 kDa PEI könnte eine Steigerung in der Transfektionseffizienz durch ein PEI-Derivat erreicht werden, das über ein geringeres Molekulargewicht von 12 kDa, sowie eine gerinere Größenverteilung verfügt und anteilig mehr primäre Aminogruppen auf der Moleküloberfläche enthält, die für ein *targeting* verwendet werden könnten. Es konnten bereits höhere eukaryotische Zellen mit dem PEI-Derivat bei geringer Zytotoxizität über einen weiten Konzentrationsbereich transfiziert werden ^[184]. Da PEI mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Isoformen (verzweigt, linear) sich in Bezug auf die Transfektionseffizienz und Toxizität *in vivo* unterscheidet, sollten parallele Studien mit beiden PEI-Isoformen durchgeführt werden ^[56].

Eine weitgehend automatisierte Polyplexherstellung würde eine gleichbleibende Produktqualität der Polyplexe, die nur geringe Abweichungen in der Interassay- und Intraassayvarianz aufweisen, gewährleisten.

In Bezug auf das Peptid mediierte *targeting* könnte eine effektivere Kopplung von Peptiden erreicht werden indem durch andere Linkermoleküle die Art der kovalenten Bindung beeinflusst und eine mögliche Autoreduktion verhindert wird. Eine Linker- und Peptidkopplung unter Argonatmosphäre schafft eine reaktionsträge Umgebung, in der eine Autoreduktion oder Autooxidation von Kopplungsprodukten verhindert wird. Die *spacer*-Länge des Vektors, die das *targeting*-Peptid von dem PEI-Grundgerüst trennt kann durch längere Kohlenstoffketten auf 0,16 nm vergrößert werden und so eine bessere Zugangsmöglichkeit der Peptide zu den VCAM-1-Molekülen auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen bewirken. Die kultivierten HUVEC sollten mit der geringst mögliche Passagenzahl stimuliert werden, um die stärkste Stimulationswirkung der VCAM-1-Expression in Dauer und Konzentration zu erhalten. Durch die Verwendung von besser charakterisierten primären Zellen ist eine mögliche Änderung der Transfektionsergebnisse genauer zu diskutieren und es besteht die Möglichkeit Fehlerquellen im Vorfeld der Versuche auszuschließen.

Bei dem Einsatz von neutralen Liposomen mit N-acylierten PE-Derivaten könnte als Alternative zu den bisher eingesetzten N-gekoppelten Acylketten die Verwendung von ungesättigten Fettsäuren zur N-Ayclierung eine Zunahme in der Stabilität bewirken, da die Bildung von Schleifen auf der Liposomenhülle ein weniger flexibles, sterisches Hindernis darstellen und eine Rigiditätszunahme der Liposomenmembran bewirken.

Eine weitere Stabilitätszunahme könnte durch eine Dotierung der Liposomenmembran mit einer Lipidkombination aus N-Acyl-PE-Derivaten und PEG-PE-Derivaten erfolgen. Die Anfälligkeit von PEG-PE-Derivaten zur Akkumulation in der Milz muss hierbei berücksichtigt werden um durch entsprechende Lipidformulierungen Mikroembolien zu verhindern.

Als Testsystem für die Liposomenhalbwertzeit bietet sich im Hinblick auf eine gentherapeutische Nutzung humanes Plasma an. Die Verwendung von humanem Plasma ohne eine vorherige Komplementsysteminaktivierung bietet für die Entwicklung stabiler und lange zirkulierenden Liposomen den Vorteil auf die physiologischen Besonderheiten des Menschen in geeigneter Weise Rücksicht zu nehmen. Hierbei spielt die Herkunft des humanen Plasmas eine besondere Rolle, da die Stabilität der Liposomen in dem gewählten Plasma unterschiedlicher Rassen, Gesundheitszustände, Alter, Geschlecht und Gewicht verschieden ist und Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

Eine mögliche Organaufnahme der Liposomen sowie ein Lipidaustausch mit Serumproteinen könnte durch eine radioaktive Markierung der Lipide die an der Liposomenbildung beteiligt sind untersucht werden. Somit könnte eine Sensitivitätssteigerung gegenüber der Fluoreszenzmessung erreicht werden, die durch Trübung unterschiedlicher Gewebeaufschlüsse zu falschen Ergebnissen führt.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Allgemeine Materialien

Enzyme, Nukleosidtriphosphate sowie biologische Feinchemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Gibco-BRL, Pharmacia, Qiagen und Invitrogen bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Lipide wurden von Avanti Polar Lipids und von Sigma-Aldrich bezogen. Die Verbrauchschemikalien und der allgemeine Laborbedarf waren Produkte der Firmen Bio-Rad, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.

Die relevanten Materialien werden bei den Experimenten nebst der Methode erwähnt.

6.1.1. Vektoren und Oligonukleotide

Vektoren:	Hersteller:
pSinRep5:	Invitrogen NV Leek, NL
pSinRep5-lacZ:	Invitrogen NV Leek, NL
DH-(BB)-5'SIN:	Invitrogen NV Leek, NL
pCMV-Luzi:	Invitrogen NV Leek, NL
miNOS:	Dr. Axel Gödecke, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Düsseldorf
pAH9:	Dr. Andreas Herrmann und Dr. Angela Heischmann, Cardion AG, Erkrath

Oligonukleotide für PCR-Analysen:

2nsp4-sense:	7151-7180 nt im WT-Sindbisvirusgenom	
	5'-GTT CAT TGG CGA CGA CAA CAT CAT ACA TGG-3'	
2capsid-anti:	7830-7801 nt im WT-Sindbisvirusgenom	
	5'-GTT GAG GTC TAG TTG CCT GTC CAA TGA CTA-3'	

Fragmentgröße: 650 bp

nsp4-sense:	7052-7071 nt im WT-Sindbisvirusgenom	
	5'-ATC CGG AAT GTT CCT CAC AC-3'	
capsid-anti:	7902-7885 nt im WT-Sindbisvirusgenom	
	5'-TTG GTT TCT TCG GCT TCG-3'	

Fragmentgröße: 833 bp

6.1.2. Peptide

VCAM-1 bindende Peptide:

Peptid Nr. 1:	C-ADPRLLWQRLTR
Peptid Nr. 2:	C-VPQWPRRRTYLK
Peptid Nr. 3:	C-GHRWKNIFYIKNENKLPTGG
Peptid Nr. 4:	C-YRLAIRLNERRENLRIALRY
Peptid Nr. 5:	C-VNAFAWRRRWRG

Kontroll-Peptid:

Peptid Nr. 6: C-PGDATAEGVPDS

6.1.3. Antikörper

Polyklonaler anti-VCAM-1 (CD106) Antikörper von R&D Systems No. 809-VR. Die Größe des detektierten VCAM-1 liegt bei ca. 74 kDa, nach Glykosylierung bei ca. 90-110 kDa. Peroxidase-gekoppelte Anti-Ziege-Antikörper IgG (H + L) von Jackson Immune Research. Muriner anti-IgG₁ Antikörper mit R-Phycoerythrin gekoppelt von BD Pharmingen No. 555749. Muriner anti-CD106 Antikörper mit R-Phycoerythrin gekoppelt von BD Pharmingen No. 555647.

6.2. Allgemeine Methoden

Die Methoden, die nicht näher beschrieben wurden, sind in den angegebenen Referenzen, Herstellerprotokollen, in Sambrook et al. oder Current Protocols in Molecular Biology beschrieben [214,215].

6.2.1. Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNS

Mini-Präparation

Plasmid-DNS aus Bakterienkolonien wurde in Minipräparationen nach dem Verfahren von Birnboim präpariert ^[216,217].

Maxi-Präparation

Die Plasmid-DNS des Vektors pAH9 wurde von der Firma Qiagen, Hilden, unter GLP-Bedingungen präpariert.

6.2.1.2. Präparation von Gesamt RNS aus BHK21-Zellen

Verwendet wurden die Baby Hamster Kidney (BHK21)-Zellen nachdem sie zu 100 % Konfluenz in einer 150 mm Zellkulturschale gewachsen waren. Die Gesamt-RNS der Zellen wurde nach der AGPC (acid guanidinium-phenol-chloroform) Methode von Chomcynski und Sacchi isoliert ^[217].

6.2.1.3. Denaturierende Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung der isolierten bzw. in vitro transkribierten RNS erfolgte mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose, 0,5x 4-Morpholin-propansulfonsäure (MOPS), 6,5% Formaldehyd und 5 µl/100 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml)). Die Proben wurden vor dem Auftragen 10 min bei 60°C in dem gleichen Volumen Denaturierungspuffer (2,5x MOPS, 9 % Formaldehyd, 0,25 % Bromphenolblau und 50 % Formamids) denaturiert sofort auf Eis überführt und dort für 5 min. inkubiert.

6.2.1.4. Isolierung von DNS aus Agarosegelen

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus TAE-Agarosegelen erfolgte mittels QIAEX II ™, nach Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden).

6.2.1.5. Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmid-DNS

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden schützt einen geschnittenen Vektor bei nachfolgender Ligation mit inserts vor einer Selbstligation. Der 20 μ l-Reaktionsansatz bestand aus 1 μ g Plasmid-DNS, 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer, Roche, und 2 μ l alkalischer Phosphatase (1 U/ μ l). Die Inkubation wurde 1 h bei 37°C durchgeführt. Inaktiviert wurde die Phosphatase durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

6.2.1.6. Klonierung von miNOS in pSinRep5

Die cDNS der murinen induzierbaren NO-Synthase wurde mit dem Restriktionsenzym Xbal aus dem

pBluescriptkonstrukt von Dr. A. Gödecke herausgeschnitten. Das 3,6 kb Fragment wurde nach der Reinigung aus dem TAE-Gel isoliert und in die mit Xbal geschnittene multiple cloning site des pSinRep5-Vektors hinter den subgenomischen Promotor (P_{SG}) einkloniert. Der so entstandene Vektor pSinRep5miNOS hat eine Größe von 13.551 bp.

Zusätzlich enthält der Vektor einen SP6-Promotor, der die Transkription der viralen Nicht-Strukturproteine 1-4 initiiert. Eine Ampizillinresistenz und ein ColE1-origin dienen der bakteriellen Vermehrung des Plasmides. Die 3'-Restriktionsstelle, Xhol, dient der Generierung eines 3'-Endes für die in vitro-Transkription.



<u>Abbildung 58:</u> Plasmidkarte des Expressionsvektors pSinRep5miNOS mit 13.551 bp. Das Gen für die miNOS (schwarzer Pfeil) ist hinter den sub- genomischen Promotor (P_{SG}) mit Xba I einkloniert.

6.2.1.6.1. pSinRep5lacZ

Der Vektor pSinRep5lacZ hat eine Größe von 13104 bp. Er ist Bestandteil des Sindbis Expressions Kits und dient als Kontrolle für die Arbeiten (in vitro-Transkription und Infektion) mit dem kit. Das lacZ-Gen ist in dem Expressionsvektor pSinRep5 hinter den subgenomischen Promotor kloniert.

6.2.1.6.2. DH-(BB)-5'SIN

Der Helfervektor DH-(BB)-5'SIN ist ebenfalls ein Bestandteil des Sindbis Expressions Kits. Er enthält hinter dem subgenomischen Promotor die Gene für die Struktur- proteine 1-5. Die Größe des Vektors beträgt 6729 bp. Die Nichtstruktur- proteine sind deletiert. Ein Fragment von 6913 bp ist aus dem kodierenden Bereich mit den Restriktionsenzymen BspMI (421 nt) und BamHI (7334 nt) aus dem Wildtypvirusgenom heraus geschnitten worden ^[35].



<u>Abbildung 59:</u> Plasmidkarte des Helfervektors DH-(BB)-5'SIN mit 6.729 bp. Die Strukturproteine 1-5 sind hinter den subgenomischen Promotor kloniert.

6.2.1.7. In vitro Transkription

1 µg Xhol-linearisierter Plasmid-DNS , von pSinRep5-miNOS, pSinRep5-lacZ und DH-(BB)-5'Sin wurden mit Hilfe des Kits InvitroScript[™] CAP SP6 nach Herstellerprotokoll transkribiert. Mit einem denaturierenden Agarosegel erfolgte die Qualitätskontrolle der transkribierten RNS (s.o.).

6.2.1.8. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

Im ersten Schritt der RT-PCR wurde die Gesamt-RNS in cDNS umgeschrieben. Der Ansatz der reversen Transkriptasereaktion enthielt:

0,5 µl	RNS	(1µg)
4,0 µl	MgCl ₂	(25 mM)
1,0 µl	RNAsin	(50 U/µl)
2,0 µl	Primer 2capsid-anti	(10 pmol/µl)
2,0 µl	DTT	(0,1 M)
4,0 µl	5x first strand buffer	
1,0 µl	Gesamt RNS	(2 µg/µl)
1,0 µl	AMV-Reverse Transkriptase	(≥ 20U/µI)
ad 20,0 µl	Wasser	

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot des RT-Ansatzes wurde für die PCR mit den Oligonukleotiden nsp-sense und capsid-anti eingesetzt. Für die PCR wurde ein Perkin Elmer Cetus DNA Thermocycler benutzt.

Der PCR-Ansatz enthielt:

0,5 µl	RT-Ansatz	
1,0 µl	5 Primer nsp4-sense	(10 pmol/µl)
1,0 µl	3 Primer capsid-anti	(10 pmol/µl)
4,0 µl	MgCl ₂	(25 mM)
10,0 µl	10x PCR-Puffer	(100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl)
1,0 µl	dNTP´s	(10 mM)
1,0 µl	Taq-DNS-Polymerase	(1U)
ad 100,0 µl	Wasser	

Der Ansatz wurde mit zwei Tropfen leichtem Mineralöl von Sigma überschichtet, um Verdampfung des Wassers zu vermeiden.

Programm der PCR-Reaktionszyklen:

1x 3 min. 94°C;
30x 1 min. 94°C, 1 min. 66°C, 1 min. 30 sek. 72°C;
1x 7 min. 72°C

Je 30 µl des Ansatzes wurden auf einem 1 % (w/v) TBE-Agarosegel aufgetrennt.

6.2.1.9. Kontrolle der miNOS Position in Sindbisvirionen nach Rekombination

Das miNOS-Segment konnte durch das Rekombinationsereignis vor oder hinter die viralen Gene für die Strukturproteine gelangen. 2 x 10⁶ BHK21-Zellen wurden 6 Stunden anwachsen gelassen und 4 Stunden mit 1 ml Stammlösung rekombinanter Sindbisvirionen transduziert (s.o). Die Gesamt-RNS wurde 24 Stunden nach der Infektion präpariert (s.o.). In dem Ansatz der folgenden in vitro Transkription befand sich:

1 µl	RNase-Inhibitor	(50 U)
4 µl	5x Puffer (Roche)	
2 µl	Dithiothreitol (DTT)	(100 mM)
4 µl	MgCl ₂	(25 mM)
2 µl	dNTP´s	(10 mM)
1 µl	AMV Reverse Transkriptase	(20 U)
2 µl	primer 2capsid-anti	(20 pmol)
ad 20 µl	Wasser	

Nachfolgend wurde der Ansatz 10 min. bei R.T. , 60 min. bei 42°C, 5 min. bei 98°C und 5 min. auf Eis inkubiert. In der anschließenden PCR wurden die Komponenten wie folgt eingesetzt:

0,5 µl	Rev.Tras. Ansatz	
1,0 µl	primer nsp4-sense	(10 pmol)
1,0 µl	primer capsid-anti	(10 pmol)
1,0 µl	dNTP's	(10 mM)
4,0 µl	MgCl ₂	(25 mM)
10,0 µl	10x Puffer ohne MgCl ₂	
81,5 µl	Wasser	
1,0 µl	TaqPolymerase (Roche)	(1 U)

Mit primern, die in der Sequenz der Nicht-Strukturproteine und in der Sequenz der Strukturproteine des Wildtyp-Sindbisvirus homolog binden, wurden je nach Position der miNOS ein Fragment von 650 bp bzw. 4,2 kb erwartet.

PCR-Programm:

1x	3 min. 94°C
30x	1 min. 94°C, 1 min. 66°C, 1,5 min. 72°C
1x	7 min. 72°C

Das amplifizierte Fragment wurde nach der PCR mit Isopropanol gefällt und in Wasser aufgenommen. Um die Identität des Fragmentes zu überprüfen, wurde es mit dem Restriktionsenzym BamH I geschnitten. Im Anschluß wurden die Fragmente der BamHI- Spaltung elektrophoretisch in einem TBE-Agarosegel aufgetrennt.

6.2.2. Proteinschemische Methoden

6.2.2.1. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt ^[219]. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-brilliant-blue R250 von Serva angefärbt.

6.2.2.2. Western-Blot VCAM-1

Das Gesamtprotein aus stimulierten und unstimulierten HUVECs wurde mittels SDS-PAGE (12 %-iges Gel) aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine 45 min. mit 200 mA in einer semi-dry Blotkammer (Biometra) auf eine Immobilon-P Nitrozellulose-Membran (Millipore) transferiert. Die Membran wurde 1 Stunde mit Magermilch (5 % w/v) geblockt. Bei 4°C wurde ü.N. der erste Antikörper in Magermilchsuspension (3 % w/v) in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Der zweite Antikörper mit gekoppelter Peroxidase, ebenfalls in Magermilchsuspension (3 % w/v), wurde 2 Stunden bei R.T. in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert. Die Position von VCAM-1 auf der Membran wurde durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht (Lumi-Light Western Blotting Kit von Boehringer Mannheim), die nach 10 minütiger Exposition einen Kodak XAR5-Röntgenfilm an der betreffenden Stelle belichtete.

6.2.2.3. Extraktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen

Zur Extraktion der Zellen wurde das Medium der Zellen abgesogen und die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit hypertonem Reporter-Lysispuffer von Protagene überschichtet und 1 Stunde bei –20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Schalen stark geschüttelt, die Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand für weitere Experimente verwendet.

6.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay wurde nach dem Herstellerprotokoll der Firma Pierce mit den Überständen der Zell-Lysate durchgeführt.

6.2.2.5. Kopplung von SPDP an PEI (25 kDa (v))

An die primären Aminogruppen von 108 nmol Polyethylenimin (PEI) (25 kDa (v)), in 200 μ I 10 mM Na₂HPO₄ pH-Wert = 8,0 aufgenommen, wurde 800 nmol SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat), in 400 μ I Ethanol 99 % (v/v) gelöst, mit Hilfe eines Thermomixer comfort (Eppendorf) in 2 h bei 25°C und 500 rpm gekoppelt. 2-Pyridyldithiopropionat koppelt kovalent an eine Aminfunktion und als Abgangsgruppe fungiert NHS (N-hydroxy-succinimid). Die Abgangsgruppe und nicht gekoppeltes SPDP wurden durch 6 Passagen mit einem RCYM-10 Centricon von Millipore abgetrennt bei denen die Lösung jeweils von 2 ml auf unter 200 μ I eingeengt wurde. Die verwendete Membran aus regenerierter Zellulose hatte eine Molekulargewichtsausschlussgröße (MWCO) von 10.000 Dalton. Gleichzeitig erfolgte eine Umpufferung auf 10 mM Na₂HPO₄ pH-Wert = 7,0.

Der Nachweis der Kopplung erfolgte durch die Reduktion eines 10 μ I Aliquots von gekoppeltem 2-Pyridyldithiopropionat mit 10 μ I Dithiotreitol (DTT, 1M) und nachfolgender photometrischer Bestimmung des abgespaltenen 2-Pyridylthiols bei der OD₃₄₃.

Die Menge an PEI wurde mit dem Ninhydrin-Test bei OD₅₇₀ bestimmt. Der Quotient aus der Anzahl gekoppelter 2-Pyridyldithiopropionatmoleküle und der Menge an PEI gibt an, wie viele Moleküle 2-Pyridyldithiopropionat an ein Molekül PEI gekoppelt sind.

6.2.2.6. Ninhydrin-Test

Freie primäre Aminogruppen im PEI wurden mit dem Ninhydrin-(Kaiser)-Test nachgewiesen. Ein Aliquot von 50 µl wurde mit 75 µl Puffer A (76 g Phenol gelöst in 24 g Ethanol), 100 µl Puffer B (1,3 mg KCN gelöst in 2 ml Wasser) und 75 µl Puffer C (2,5 g Ninhydrin gelöst in 50 ml Ethanol) versetzt und 5 min. unter Schütteln mit 500 rpm bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 850 µl Ethanol (99,8 % v/v) versetzt, um die Reaktion abzustoppen. Die OD₅₇₀ wurde bestimmt und der Anteil an freien primären Aminogruppen ermittelt indem die Werte mit einer parallel aufgenommenen PEI-Standardkurve verglichen wurden.

6.2.2.7.-Thiopyridol-Test

Der Anteil von gekoppeltem SPDP wurde mit dem 2-Thiopyridol-Test ermittelt. Ein 10 μ l-Aliquot wurde mit 10 μ l DTT (1 M) 1 Stunde bei R.T. inkubiert. Nach Zugabe von 980 μ l Wasser wurde die OD₃₄₃ bestimmt und mit der eines unbehandelten Aliquots verglichen. Aus der Differenz und dem molekularen Extinktionsquotienten von SPDP (8080 g*mol^{-1*}cm⁻¹) ließ sich die Menge des reagierten SPDPs bestimmen.

6.2.2.8. Kopplung von Peptiden an derivatisiertes PEI

Die Peptide wurden in einem zehnfachen molaren Überschuss zu gekoppeltem 2-Pyridyldithiopropionat eingewogen und in 10 mM Na₂HPO₄, pH-Wert = 7,0 gelöst. In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden die Peptide ü.N. bei R.T. mit PEI-SPDP gekoppelt. Die ungekoppelten Peptide wurden durch 5 Centricon-Passagen (MWCO 10.000) abgetrennt und das Kopplungsprodukt sterilfiltriert. Die PEI-Menge wurde erneut mit dem Ninhydrin-Test bei der OD₅₇₀, und der Anteil an gekoppelten Peptiden wurde indirekt über die OD₃₄₃ bestimmt. Ein Aliquot von 10 µl wurde mit 10 µl DTT (1M) umgesetzt und das freigesetzte 2-Pyridylthiol photometrisch bestimmt. Die Differenz der noch freien Gruppen zu den anfangs eingesetzten Gruppen entspricht der Anzahl der gekoppelten Peptide. Die Umrechnung von Peptiden pro Molekül PEI erfolgt nach dem oben genannten Schema.

6.2.3. Lipidchemische Methoden

6.2.3.1. Synthese von N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivaten

Die Synthese erfolgte unter Sauerstoffausschluss und unter wasserfreien Bedingungen. In jeder Synthese wurden 100 mg Phosphatidylethanolamin (PE) in 3 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und in einen Rundkolben vorgelegt. Jeweils 1,4 mmol der Fettsäurechloride Myristoylchlorid (C₁₄-Kette), Palmitoylchlorid (C₁₆-Kette), Stearoylchlorid (C₁₈-Kette) und Behenoylchlorid (C₂₂-Kette) wurden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst und in einen Tropftrichter überführt. Die gelösten Fettsäurechloride wurden langsam zu dem gelösten PE getropft und ü. N. bei R.T. unter einer Argonatmosphäre gerührt.

6.2.3.2. Reinigung der N-acylierten Phosphatidylethanolaminderivaten

In einem 250 ml-Schütteltrichter wurden 20 ml Chloroform/Methanol (1:1 v/v) vorgelegt, das Reaktionsgemisch mit dem Kopplungsprodukt (ca. 5 ml) wurde zugeführt und gemischt. Anschließend wurden 75 ml Wasser zugegeben, gemischt und der pH-Wert mit 5 ml Salzsäure (5M) auf 4,0 eingestellt. Nach der Phasentrennung wurde 10 ml Methanol zugegeben, bis die wässrige Phase klar wurde. Die wässrige Phase wurde entfernt, zu der organischen Phase wurden anschließend 15 ml Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gegeben und geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zugabe von Wasser und Methanol (s.o). Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser ausgeschüttelt, um das gelöste Pyridin auszuwaschen. Nach 3 Waschschritten wurden 40 g wasserfreies Natriumcarbonat zu der abgetrennten milchig trüben organischen Phase gegeben und geschüttelt bis diese klar wurde, das Natriumcarbonat wurde abfiltriert und der Na₂CO₃-Rückstand im Filter mit Chloroform gewaschen. Im Rotationsverdampfer wurde die organische Phase vollständig abgezogen und die Endprodukte unter Argonatmosphäre bei –20°C gelagert.

6.2.3.3. Liposomenpräparation durch Reversed phase evaporation

Nach dieser Methode wurden alle Liposomen ohne N-acylierte PE-Derivate hergestellt. Für die Liposomenpräparation wurde jeweils 50 mg Gesamtlipid eingesetzt. Die Lipide wurden in Chloroform gelöst und in ein Schliffröhrchen mit Rundboden überführt. Das Chloroform wurde mit Pressluft abgeblasen. Im Anschluss wurde das Lipidgemisch mit 1 ml Diethylether gewaschen, der Diethylether wurde in einem Rotationsverdampfer, Rotavapor R-124 (Büchl) bei R.T. abgesogen. Nachdem das gewaschene Lipidgemisch in 5 ml Diethylether vollständig gelöst war, wurden 2,5 ml PBS zu dem Lipidgemisch gegeben und beide Phasen zu einer homogenen Emulsion vermischt. Der Diethylether wurde bei R.T. im Rotationsverdampfer bei höchster Umdrehungszahl abgezogen. Die wässrige Phase wurde 3 mal 1 min. kräftig geschüttelt, nachdem der Diethylether abgezogen war. Eventuell vorhandene Spuren von Diethylether wurden durch nochmaliges Abziehen im Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Die entstandenen Liposomen wurden erneut 1 min. kräftig geschüttelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

6.2.3.4. Liposomenpräparation durch Lipidfilm Rehydrieren und Ultraschall

Nach dieser Methode wurden die Liposomen hergestellt, die N-acylierte PE-Derivate enthielten. Der Lipidfilm wurde aus 25 mg Gesamtlipid hergestellt. Das Lipidgemisch wurde in 0,2 ml Methanol und 3,2 ml Chloroform gelöst. Bei 60°C wurde das Lösungsmittelgemisch innerhalb von 40 min. mit dem Rotationsverdampfer abgezogen. Spuren des Lösungsmittelgemisches wurden durch eine einstündige Lyophilisation entfernt. Zu dem Lipidfilm wurde 1,25 ml CF-Lösung (s.u.) (60°C vorgewärmt) gegeben und anschließend 15 min. kräftig geschüttelt. Nach 10 min. Inkubation bei 60°C wurde erneut 15 min. kräftig geschüttelt. Im Anschluss folgten 5 min. permanente und 15 min. gepulste Ultraschall-Behandlung mit einem Sonopuls GM70 mit SH70G Ultraschallsonde von Bandelin. Durch 7 min. Sedimentation bei 13.000 rpm und 4°C entstand die liposomenhaltige mittlere Phase, die abgenommen und über eine Sephadex G50 DNA-grade Säule von freiem CF gereinigt wurde.

6.2.3.5. Beladen von Liposomen mit Carboxyfluorescein und Fluoreszenzmessung

Die Liposomen wurden mit 100 mM 5(6)Carboxyfluorescein (CF) beladen. In dieser Konzentration tritt der Selbstquenching-Effekt auf. Die 100 mM CF-Lösung wurde durch Lösen von 94,82 mg CF in 2,5 ml Tris (10 mM pH 10,5) hergestellt und als wässrige Phase zu den Lipidgemischen gegeben. Die Fluoreszenzmessung des CF erfolgte mit einem Spektrofluorometer vom Typ RF 540 (Shimadzu) mit $\lambda_{ex.}$ = 492 nm und $\lambda_{em.}$ = 520 nm.

6.2.3.6. Reinigen der Liposomen von nicht eingeschlossenem CF

Durch Größenausschluß-Gelchromatographie mit einer Sephadex G50 DNA-grade gepackten Glassäule von 28 cm Länge und 1 cm Durchmesser wurden die CF-Liposomen von dem freien CF abgetrennt. Vor der Trennung wurde die Säule äquilibriert mit einem Puffer aus 10 mM Tris und 140 mM NaCl pH-Wert = 7,0.

6.2.3.7. Interaktion von freiem CF mit der Liposomenhülle von Liposomen

Die Einwirkung von freiem CF auf die Ermittlung des Beladungsgrades von Liposomen wurde an Liposomen aus PC/C (9:1) untersucht. Diese wurden aus 50 mg Gesamtlipid in 2,5 ml PBS nach der reversed phase evaporation-Methode hergestellt. Zu den Liposomen wurde CF in einer Konzentration von 4,5 µM gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min. bei R.T. wurden die Liposomen von dem freien CF über eine Sephadex G50 DNA-grade Säule abgetrennt und Fraktionen von 1 ml aufgefangen. In den Fraktionen wurde die Fluoreszenzintensität gemessen.

6.2.3.8. Größenbestimmung von Liposomen

Die Größenverteilung der Liposomenpräparation wurde durch Photonen-korrelationsspektrokopie mit einem Zetasizer 1000 (Malvern) bei einer Wellenlänge von 633 nm ermittelt. Die Geräteeinstellung war der automatische Analysemodus bei manueller Blendenwahl. Gemessen wurde der gemittelte Teilchendurchmesser [Z_{Ave}] und die Polydispersität in einem Probenvolumen von 1 ml.

6.2.4. Methoden der Zellkultur

6.2.4.1. Bakterienkultivierung

Escherichia coli: Stamm: DH5α Stamm: XL-1-blue, Stratagene, Heidelberg

6.2.4.1.1. Herstellung von kompetenten Zellen

Eine Kultur von DH5 α -Zellen oder XL-1-blue-Zellen wurde ü.N. bei 37°C unter Schütteln in 3 ml LB-Medium wachsen gelassen. 1 ml der Übernachtkultur wurde in 100 ml frisches LB-Medium gegeben. Die Bakterien wurden vermehrt (ca. 3 h) bis die OD₆₀₀ zwischen 0,5 - 0,6 lag, so dass sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Weiteres Wachstum wurde gestoppt, indem die Kultur 30 min. bei 4°C inkubiert wurde. Die Zellen wurden 5 min. mit 5.000 rpm bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 15 ml TFB I resuspendiert, 30 min bei 4°C inkubiert und erneut sedimentiert (s.o.). Das Sediment wurde in 2 ml TFB II resuspendiert und erneut 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden in 100 μ l Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

TFB I:	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	КАс	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)

Alle Komponenten des TFB I-Puffers wurden bis auf MnCl₂ zusammengeben und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Danach wurde MnCl₂ zugegeben und der finale pH-Wert auf 5,0 eingestellt.

TFB II:	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15% (v/v)

Der pH-Wert des TFB II-Puffers wurde auf 7,0 eingestellt. Die Änderungen der pH-Werte wurden mit einem pH-Meter pH 526 MultiCal von WTW überwacht.

6.2.4.1.2. Transformation von kompetenten Zellen

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde mit 1-2 µl (ca. 80 ng) Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 30 sek. langen Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen für weitere 2 min. auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurde im Anschluss 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) gegeben und die Zellen bei 37°C, 1 h inkubiert. Nachfolgend wurden die

Zellen in zwei unterschiedlichen Verdünnungen auf ampicillinhaltige Agarplatten (100 µg/ml) gegeben und ü.N. bei 37°C inkubiert.

6.2.4.2. Zellkultur eukaryontischer Zellen

Die Inkubation der eukaryontischen Zellen erfolgte in einem humidifizierten Inkubator von WTB Binder bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 %, 37°C und 5 % CO₂.

6.2.4.2.1. HUVEC-Präparation

Die Präparation von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) erfolgte aus Nabelschnüren, die nicht älter als 12 Stunden waren. In die Vene wurde über eine Knopfkanüle sterils, auf 37°C erwärmtes 1x PBS gespült, um Blutreste und Thromben zu entfernen. Nach der Reinigung des Venenlumens wurde 1 mg/ml Kollagenase II von Sigma, in PBS gelöst, eingefüllt, die beiden Venenenden verschlossen und 10 min in 37°C warmen 1x PBS inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur leicht mit Daumen und Zeigefinger massiert um die HUVEC aus dem Gewebeverband zu lösen. Die Zellen wurden mit der Kollagenase aus dem Venenlumen gespült und auf gelatinisierte 150 mm Zellkulturschalen mit 20 ml Medium ausplattiert. Das Medium (Dulbecco M199 mit 20 % FCS, 1 % Penizillin (10.000 U/ml) /Streptomyzin (10 mg/ml), 10 mg/ml Heparin und 50 µg/ml ECGS (endothelial cell growth supplement) von Sigma) wurde am nächsten Tag, gewechselt um noch vorhandene Erythrozyten und abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen mehrerer Präparationen vereinigt und erneut auf 150 mm Schalen im Verhältnis 3:1 ausplattiert. Die Zellen der Passage eins wurden mit Trypsin von der Schale gelöst und in Aliquots von 4 x 10⁶ Zellen pro 1,8 ml Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.2.4.2.2. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA (Gibco BRL) von den Schalen abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zu den Zellen wurde das gleiche Volumen Medium (s.o.) gegeben um das Trypsin zu inaktivieren. Anschließend wurden bei 200 g die Zellen in einer Eppendorfzentrifuge 5810R mit einem A-4-62 Rotor sedimentiert und 1 x mit 45 ml PBS gewaschen. Aufgenommen wurden die Zellen in 1 ml Aliquots mit Einfriermedium (DMEM, 20 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO) und ü.N. bei –70°C gelagert.

Danach wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.2.4.2.3. Elektroporation von BHK21 Zellen

10⁷ BHK21-Zellen (80 % konfluent gewachsene 150 mm Schale) wurden mit 3 ml 0,05 % Trypsin (200 μ g/ml) in PBS/EDTA abgelöst und mit 5 ml Medium versetzt. Die Zellen wurden 5 min mit 200 x g sedimentiert, anschließend wurde das Zellpellet 2 mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Zellsediment in 400 μ l PBS (4°C) aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette (BioRad) mit 0,2 cm Elektrodenabstand überführt und auf Eis gestellt. Jeweils 10 μ g in vitro transkribierte RNS mit 5'-CAP-Struktur von Helferplasmid (DH-(BB)-5'SIN) und Expressionsplasmid (pSinRep5-miNOS) wurden im Verhältnis (1:1 w/w) zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 2 mal mit einem BioRad Gene Pulser elektroporiert (Kapazität: 25 μ F, Spannung: 1,5 kV, Widerstand: ∞ Ω , Zeitkonstante: 0,7). Nach einer weiteren 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen auf eine 150 mm Schale mit 10 ml Medium (DMEM mit 10 % FCS) überführt.

6.2.4.2.4. Nitrit-Messung im Mediumüberstand

Das gebildete NO lässt sich wegen der geringen Halbwertzeit nur indirekt über das stabilere Umwandlungsprodukt Nitrit quantifizieren. Das Nitrit wurde in der Griess-Reaktion umgesetzt und spektrophotometrisch quantifiziert. 500 μ l Mediumüberstand wurden mit dem gleichen Volumen Griess-Reagenz (2 % Sulfanylamid, 0,2 % Naphtylethylendiamin in 2,5 %-iger H₃PO₄) versetzt und 15 min bei R.T. inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde die Extinktion bei λ = 540 nm gemessen. Quantifiziert wurde der Nitritgehalt durch die Normierung mit einer parallel aufgenommenen Eichgerade (0-100 μ M Nitrit).

6.2.4.2.5. Ernte und Kryokonservierung der Sindbis-Pseudovirionen

36 h nach der Elektroporation wurde der Mediumüberstand von den Zellen entnommen und darin enthaltene abgelöste Zellen sowie Zelltrümmer durch 10 min Zentrifugation bei 2000 x g (4°C) sedimentiert. 0,5 ml Aliquots des Überstandes mit den darin enthaltenen Sindbis-Pseudovirionen wurden in Einfrierröhrchen (Nunc) überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Pseudovirionen bei –80°C gelagert.

6.2.4.2.6. Titerbestimmmung bei lacZ-Pseudovirionen

Die Titerbestimmung erfolgte mit Pseudovirionen, die das lacZ-Gen exprimieren. Dazu wurden jeweils 3 x 10⁵ BHK21-Zellen in 35 mm Schalen ausgesät und 6 h bis zu einer Konfluenz von 80 % wachsen entfernt und die Zellen PBS gelassen. Das Medium wurde mit gewaschen. Die Pseudovirionenstammlösung wurde jeweils unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 eingesetzt. Die Pseudovirionen wurden 3 h bei 37°C inkubiert, wobei 100 µl Pseudovirionen bzw. deren Verdünnungen in einem totalen Volumen von 400 µl (DMEM + 1 % FCS) eingesetzt wurden. Die Schalen wurden alle 10 min leicht geschwenkt, um eine vollständige Benetzung sämtlicher Zellen zu gewährleisten.

Nach der Inkubation wurde das Volumen mit DMEM +1 % FCS auf 2 ml aufgefüllt und die Zellen für 36 h bei 37°C, 5 % CO₂ in einem Zellbrutschrank gebracht. Im Anschluß wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und 10 min bei 4°C mit 2% p-Formaldehyd / 0,2 % Glutaraldehyd fixiert. Die Zellen wurden erneut 2 mal mit PBS gewaschen und mit 495 μ l Färbelösung und 5 μ l X-Gal versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen ü.N. bei 4°C gelagert, um die Färbung durch die β -Galactosidase zu intensivieren. Die Zellen wurden fotografiert. Durch Auszählen der gefärbten Zellen ließ sich der Titer bestimmen.

Färbelösung:MgCl22 mMFerrocyanid5 mMFerricyanid5 mM

In PBS lösen und bei 4°C lagern.

X-Gal: Stammlösung:2 % (w/v) in N-N-Dimethyl-formamid lösen und bei –20°C lagern.

Verdünnung von 0,02 % (v/v) zum Färben einsetzen

6.2.4.2.7. Titerbestimmung bei miNOS-Pseudovirionen

Um den Titer der miNOS-Pseudovirionen bestimmen zu können, mußte nach der Infektion von BHK21-Zellen ein diaphorase staining durchgeführt werden. Mit dieser Färbung werden die positiv transfizierten Zellen braun angefärbt.

Die verwendete Zellzahl, die Art der Verdünnung, die Infektionsdauer und die Fixierungsdauer entsprachen denen bei der lacZ-Pseudovirionen Titerbestimmung. Die Zellen wurden gewaschen, mit

500 µl Färbelösung überschichtet und anschließend bei 37°C inkubiert. Alle 2 min wurde die Zunahme der Färbungsintensität visuell geprüft. Nachdem die infizierten Zellen eine dunkelbraune Färbung, zeigten wurde die Färbelösung abgesogen und die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden fotografiert und der Titer im Anschluß durch Auszählen der positiv gefärbten Zellen bestimmt.

Färbelösung:

489 μl PBS
10 μl Triton X-100 (15 % (v/v))
1 μl NBT (10 mg/ml)
0,5 mg NADPH

6.2.4.2.8. Induktion von VCAM-1 auf der Zelloberfläche von HUVEC Die Expression von VCAM-1 auf der Zelloberfläche wurde durch folgende Mediumzusätze induziert:

TNFα	(0,17 ng/ml)
Interleukin 1ß	(0,07 ng/ml)
Interferon γ	(20,0 ng/ml)
Lipopolysaccharide	(10,0 ng/ml) aus E. coli (Serotyp: 0111:B4)

Die Induktion erfolgte über 16 Stunden in 1 ml Medium pro Loch auf einer 12-Loch-Platte.

6.2.4.2.9. FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse der Viabilität von HUVEC wurden 1 x 10⁶ Zellen in 500 μ I PBS aufgenommen und mit 1 μ I Propidiumiodid (30 μ g/ml) (Oncogene Research Products), gelöst in PBS, versetzt und anschließend mit einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson analysiert.

Für die FACS-Analyse der VCAM-1 Expression von stimulierten HUVEC wurden 1 x 10⁶ Zellen in 500 μ l PCS aufgenommen und bei 4°C mit 20 μ l Isotypenkontrolle (IgG₁) bzw. VCAM-1 Antikörper für 45 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend zum analysieren erneut in 500 μ l PBS aufgenommen. Für die Analyse wurde ein FACSCalibur der Firma Becton Dickinson verwendet. Ausgewertet wurden die Daten mit der Software CellQuest.

6.2.4.2.10. HUVEC Transfektion mit PEI 25 kDa (v)

Die HUVEC Transfektionen wurden in Zwölflochplatten durchgeführt, in denen die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 bis 80 % gewachsen waren. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit 37°C warmen M199 (Dulbecco) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die PEI/DNS-Komplexe in 500 µl M199 zu den Zellen gegeben und für das vorgesehene Zeitintervall bei 37°C, 5 % CO₂, 98 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Transfektion wurde die Transfektionslösung abgenommen und durch HUVEC-Medium (s.o.) ersetzt. Die Analyse der Expression des transfizierten Reportergens erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion.

6.2.4.2.11. Herstellung der PEI/DNS-Komplexe für die Transfektion

Die Komplexe aus PEI und DNS wurden mit unterschiedlichen N/P-Werten hergestellt. Als Grundlage zur Berechnung der N-Werte wurden 1 µl PEI (0,1 M) 100 nmol Stickstoff bzw. positiven Ladungen gleichgesetzt, für die Berechnung der P-Werte wurden 1 µg DNS als 3 nmol Phosphat bzw. negative Ladungen gewertet.

Die beiden Komponenten PEI und DNS wurden getrennt in jeweils der Hälfte des benötigten Transfektionsvolumens in M199 unter sterilen Bedingungen angesetzt. Die Menge an PEI richtete sich immer nach der Vorgabe der Menge DNS in µg um das N/P-Verhältnis zu waren. Nach der Zugabe von PEI zur DNS wurde sofort 10 Sekunden mit einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries) gemischt, anschließend erfolgte zur Komplexbildung eine 30 Minuten dauernde Inkubation bei R.T.. Nach der Inkubation wurden die Komplexe ohne weitere Behandlung für Transfektionsexperimente eingesetzt.

6.2.4.2.12. Transfektionsanalyse durch Luziferase vermittelte Chemolumineszenz

Die exprimierte Luziferase wurde indirekt über die von ihr erzeugte Chemolumineszenz quantifiziert, wobei die Proteinmenge anhand einer parallel aufgenommenen Standardreihe ermittelt wurde. Aliquots von 20 µl wurden aus den 500 µl-Überständen der Zell-Lysate abgenommen und mit 100 µl Luziferase Substrat in Assay Puffer von Promega in eine schwarze 96-Loch-Platte (Opti-Plate HTRF-96 von Packard) überführt. Unmittelbar nach der Zugabe des Substrates wurde die Chemolumineszenz in einen LumiCount[™] von Packard detektiert. Mit Hilfe der Software I-Smart (Packard) wurde aus den Rohdaten die entsprechende Proteinmenge an Luziferase errechnet.

6.2.5. Methoden der Tierversuche

6.2.5.1. Schwanzvenen-Injektion

Die CF-Liposomen wurden als Bolus in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert. Zur Vorbereitung der Injektion wurde das Blut in der Schwanzvene durch Abdrücken mit Daumen und Zeigefinger gestaut und das Gefäß gedehnt. Mit einer feinen Kanüle (0,40 x 20 / 27G x 3/4) wurde percutan in die Vene gestochen und einige µl Blut aspiriert. Der Blutfluss durch die Schwanzvene wurde freigegeben und gleichzeitig der Bolus an CF-Liposomen langsam injiziert. Nach Entfernen der Kanüle aus der Vene wurde die Wunde noch einige Zeit zugedrückt um einen schnelleren Wundverschluss zu gewährleisten.

6.2.5.2. Organentnahme

Die Organe wurden zu den indizierten Zeitpunkten entnommen. Zu diesem Zweck wurden die Ratten mit einer Überdosis an Ether narkotisiert und getötet. Durch einen longitudinalen ventralen Schnitt wurde der Bauchraum eröffnet, mit einer Kanüle (0,90 x 40 /20G x 1 ½) wurden aus der Vena cava caudalis vier bis fünf Milliliter Blut abgezogen. Danach wurden das Herz, die Lungen, die Leber, die Nieren und die Milz entnommen. Die Organe wurden nach der Entnahme sofort in eisgekühltes PBS (pH 7,5) überführt und dort bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

6.2.5.3. CF-Bestimmung im Blutplasma

Um den freien CF-Anteil und den liposomal eingeschlossen CF-Anteil im Plasma zu bestimmen, wurde das entnommene Blut 10 min. bei 4°C und 600 x g⁻¹ zentrifugiert. Das Plasma im Überstand wurde abgenommen, 2 ml des Überstandes wurden in Küvetten überführt und der freie CF-Anteil photometrisch bestimmt. Nach Zugabe von 200 µl SDS (10% w/v) wurde der liposomal eingeschlossene CF-Anteil nach der Zerstörung der liposomalen Strukturen photometrisch bestimmt. Um den Selbstquenching-Effekt des CF zu verhindern wurden die Proben z.T. mit PBS verdünnt.

6.2.5.4. CF-Bestimmung in Organen

Die entnommenen Organe wurden von Bindegewebsresten gesäubert und zweimal mit frischem eiskalten PBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Nach der Reinigung wurden sie in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und diese bis auf 5 ml mit eiskaltem PBS aufgefüllt. Eine Ausnahme bildete die Leber, bei der auf 20 ml aufgefüllt wurde. Mit einem Euro Turrax T20b (IKA Labortechnik) wurden die Organe 1 min. bei 27.000 rpm homogenisiert. Die Organhomogenisate wurden in Zentrifugengefäße überführt und in einer Sorvall Ultra Pro 80 Zentrifuge mit TH-641 Rotor 25 min. mit 30.000 rpm bei 4°C sedimentiert. Mit 2 ml des Überstandes wurde in einer Küvette der CF-Anteil photometrisch bestimmt.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
ВНК	baby hamster kidney (Babyhamster Nierenzellen)
bp	Basenpaar
С	Cholesterin
О°	Grad Celsius
CD	cluster of differenciation (Differenzierungsmerkmal)
CF	Carboxyfluorescein
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EP	Endprodukt
FACS	fluorescent activated cell sorting (Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
x g	Gravitationsbeschleunigung
h	Stunde
HDL	high density lipoprotein (Lipoprotein mit hoher Dichte)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
ICAM	intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
i.E.	infektiöse Einheiten
IFγ	Interferon gamma
IL1β	Interleukin 1 beta
k	Kilo
kb	Kiolbasen
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharide
М	molar
min	Minute
miNOS	murine induzierbare NO-Synthase
MOI	multiplicity of infection (Infektionsmultiplikator)
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxy-propansulfonsäure
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
MWCO	molecular weight cut off (Molekulargewichtsausschlussgröße)
N-acyl-PE	N-acylphosphatidylethanolamin
NBPE	N-Behenoylphosphatidylethanolamin
NCS	new born calf serum (Serum aus neugeborenen Kälbern)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
n	Anzahl

nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMPE	N-Myristoylphosphatidylethanolamin
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NPPE	N-Palmitoylphosphatidylethanolamin
NSPE	N-Stearoylphosphatidylethanolamin
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
р	Passagenzahl
PAEC	pig aortic endothelial cells (Schweineaorten Endothelzellen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PDP	2-Pyridyldithiopropionat
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PVSMC	pig vascular smooth muscle cells (vaskuläre glatte Muskelzellen aus Schwein)
REV	reversed-phase-evaporation (Reverse Phasenevaporation)
RES	retikuloendotheliales System
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R.T.	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction (reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion)
SDS	sodium-dodecylsulfat (Natrimlaurylsulfat)
sek	Sekunde
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmaresonanz)
τνγα	Tumornekrosefaktor alpha
2-TP	2-Thiopyridol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	unit (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-galaktopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

8. LITERATURVERZEICHNIS

[1]	M. Patterson. Gene therapy; Precision and control Nature Reviews Genetics (2001) 2 , 9
[2]	Self-assembling complexes for gene delivery: From laboratory to clinical trial. A.V. Kabanov, P.L. Felgner and L.W. Seymour eds. 1998 John Wiley and Sons Ltd.
[3]	G. Romano, P. Micheli, C. Pacilio and A. Giordano. Latest development in gene transfer technology: achievments, perspectives and controversies over therapeutic applications. Stem Cells (2000) 18 , 19-39.
[4]	R.M. Blaese, K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerci, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA [.] SCID: initial trial results after 4 years. Science (1995) 270 , 475-480.
[5]	M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J-L. Casanova, P. Bousso, F. Le Deist, A. Fischer. Gene therapy of human serve combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science (2000) 288 , 669-672.
[6]	N. Somia and I.M. Verma. Gene therapy: Trials and tribulations. Nature Reviews Genetics (2000) 1, 91-99.
[7]	H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr, and D. Escande. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. J. Biol. Chem. (1998) 273 , 7507-7511.
[8]	E.G. Nabel, G. Plautz, F.M. Boyce, J.C. Stanley and G.J. Nabel. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. Science (1989) 244 , 1342-1344.
[9]	T.O'Brian. Adenoviral vectors and gene transfer to the blood vessel wall. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2000) 20 , 1414-1416.
[10]	M. Salter, R.G. Knowles and S. Moncada. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. FEBS Lett. (1991) 291 (1), 145-149.
[11]	U. Förstermann, I. Gath, P. Schwarz, E.I. Closs and H. Kleinert. Isoforms of nitric oxide synthase: Properties, cellular distribution and expressional control. Biochem Pharmacol. (1995) 50 (9), 1321-1332.
[12]	U. Förstermann, H.H.H.W. Schmidt, J.S. Pollock, H. Sheng, J.A. Mitchell, T.D. Warner, M. Nakane and F. Murad. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. Biochem Pharmacol. (1991) 42 , 1849-1857.
[13]	R.M.J. Palmer, D.S. Ashton and S.Moncada. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature (1988) 333 , 664-666.
[14]	M.A. Marletta, P.S. Yoon, R. Iyengar, C.D. Leaf and J.S. Wishnok. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry (1988) 27 (24), 8706-8711.
[15]	P. Klatt, K. Schmidt, E.R. Werner and B. Mayer. Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN and tetrahydrobiopterin. Methods Enzymol. (1996) 268 , 358-365.
[16]	R.F. Furchtgott and J.V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of artrial smooth muscle by acetylcholine. Nature (1980) 288 , 373-376.
[17]	L.J. Iganrro, G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84 , 9265-9269.
[18]	R.M. Palmer, A.G. Ferrige and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature (1987) 327 , 524-526.

[19]	A. Mountain. Gene therapy: the first decade. Trends. Biotechnol. (2000) 18 , 119-128.
[20]	P.D. Robbins and S.C. Ghivizzani. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol. Ther. (1998) 80 (1),35-47.
[21]	N. Chirmule, K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian and J. Wilson. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. Gene Ther. (1999) 6 (9), 1574-1583.
[22]	R.M. Taylor, H.S. Hurlbut, T.H. Work, J.R. Kingston and T.E. Frothingham. Sindbis virus: a newly recognized arthropod-transmitted virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. (1995) 4, 844-862.
[23]	E.G. Strauss and J.H. Strauss. Structure and Replication of the Alphavirus Genome. S. Schlesinger and M.J. Schlesinger, eds. The Togaviridae and Flaviviridae. New York: Plenum Press (1996) 35-82.
[24]	J.H. Strauss and E.G. Strauss. Evolution of RNA Viruses. Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42 , 657-683.
[25]	M. Ding and M.J. Schlessinger. Evidence that Sindbis virus nsP2 is an autoprotease which processes the virus non-structural polyprotein. Virology (1989) 280-284.
[26]	W.R. Hardy and J.H. Strauss. Processing the non-structural polyproteins of Sindbis virus: non-structural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. J. Virol. (1989) 63 , 4653-4664.
[27]	E.G. Strauss, R.J. De Groot, R. Levinson and J.H. Strauss. Identification of the activ site residiues in the nsP2 proteinases of Sindbis virus. Virology (1992) 191 , 932-940.
[28]	HK. Choi, L. Tong, W. Minor, P. Dumas, U. Boege, M.G. Rossmann and G. Wengler. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin like protease and the organization of the virion. Nature (1991) 354 , 37-43.
[29]	A.M. Paredes, M.N. Simon and D.T. Brown. The mass of the Sindbis virus nucleocapsid suggests it has T=4 icosahedral symmetry. Virology (1992) 187 , 329-332.
[30]	R.P. Anthony and D.T. Brown. Protein-protein interactions in an alphavirus membrane J. Virol. (1991) 65 , 1187-1194.
[31]	P.C. Tucker and D.E. Griffin. Mechanism of altered Sindbis virus neurovirulence associated with a single-amino-acid change in the E2 glycoprotein. J. Virol. (1991) 65 , 1551-1557.
[32]	R.J. Schoepp and R.E. Johnston. Directed mutagenesis of a Sindbis virus pathogenesis site. Virology (1993) 193 , 149-159.
[33]	K-S. Wang, A.L. Schmaljohn, R.J. Kuhn and J.H. Strauss. Antiidiotypic antibodies as probes for the Sindbis virus receptor. Virology (1991) 181 , 694-702.
[34]	J. Lenard. Lipids of alphaviruses. R.W. Schlesinger, eds. The Togaviruses. New York: Academic Press, (1980) 335-341.
[35]	O. Renkonen, L. Käariäinen, K. Simons and C.G. Gahmberg. The lipid composition of Semliki Forest virus and of plasma membranes of the host cells. Virology (1971) 46 , 318-326.
[36]	P.J. Bredenbeek, I. Frolov, C.M. Rice and S. Schlesinger. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. J. Virol. (1993), 67 (11), 6439-6446.
[37]	C. Xiong, R. Levis, P. Shen, S. Schlesinger, C.M. Rice and H.V. Huang. Sindbis virus: An efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. Science (1989) 243 , 1188-1191.

D.A. Dätwyler, H.M. Eppenberger, D. Koller, J.E. Bailey and J.P. Magyar. [38] Efficient gene delivery into adult cardiomyocytes by recombinant Sindbis virus. J. Mol. Med. (1999) 77, 859-864 [39] H. Herweijer, J.S. Latendresse, P. Williams, G. Zhang, I. Danko, S. Schlesinger and J.A. Wolff. A Plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. Hum. Gen. Ther. (1995) **6**, 1161-1167. [40] F.W. Johanning, R.M. Conry, A.F. LoBuglio, M. Wright, L.A. Sumerel, M.J. Pike and D.T. Curiel. A Sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression in vivo. Nucl. Acid. Res. (1995) 23 (9), 1495-1501. [41] T.W. Dubensky jr., D.A. Driver, J.M. Polo, B.A. Belli, E.M. Latham, C.E. Ibanez, S.Chada, D. Brumm, T.A. Banks, S.J. Mento, D.J. Jolly and S.M.W. Chang Sindbis virus DNA-based expression vectors: Utility for in vitro and in vivo gene expression. J. Virol. (1996) 70, 508-519. [42] H.V. Huang. Sindbis virus vectors for expression in animal cells Curr. Opin. Biotechnol. (1996) 7(5), 531-535. K. Ohno, K. Sawai, Y. Iijima, B. Levin and D. Meruelo. [43] Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. Nat. Biotech. (1997) 15, 763-767. K.J. Hwang. [44] Liposome pharmacokinetics. M.J. Ostro ed. (1987) Liposomes: From biophsics to therapeutics 109-156 New York: Decker. A. Turner, C. Kirby, J. Senior and G. Gregriadis. [45] Fate of cholesterol-rich liposomes after subcutaneous injection into rats. Biochim. Biophys. Acta (1983) 760, 119-125. [46] K.L. Brigham, B. Meyrick, B. Christian, M. Magnuson, G. King and L. Berry. In vivo transfection of murine lungs with a funktioning prokaryotic gene using a liposomes vehicle. Am. J. Med. Sci. (1989) 298, 278-281. [47] R.M. Fielding and R.M. Abra. Factors affecting the release rate of terbuline from liposome formulations after intratracheal instillation in the guinea pig. Pharm. Res. (1992) 9, 220-223. [48] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger and M.J. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid J. Bio. Chem. (1995) 270, 18997-19007. [49] P. Machy and L.D. Lesermann. Small liposomes are better than large liposomes for specific drug delivery in vitro. Biochim. Biophys. Acta (1983) 730 (2) 313-320. X. Zhou and L. Huang. [50] DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysin: Characterization and mechanism of action. Biochim. Biophys. Acta (1994) 1189, 195-203. [51] D.C. Litzinger and L. Huang. Phosphatidylethanolamine liposomes: Drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. Biochim. Biophys. Acta (1992) 1113, 201-227. O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Bemeneix and J.P. Behr. [52] A verstile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethlenimine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 7297-7301. M.R. Capecchi. [53] High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell (1980) 22, 479-488. [54] A.D. Dean Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. Exp. Cell Res. (1997) 230, 293-302. P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner and G. Wu. [55] Nomenclature for synthetic gene delivery systems. Hum. Gene Ther. (1997) 8, 511-512. [56] A.P. Rolland. From genes to medicines: recent advances in nonviral gene delivery. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1998) 15, 143-198.

[57]	S. Li and L. Huang. Nonviral gene therapy: promises and challenges. Gene Ther. (2000) 7 , 31-34.
[58]	N.S. Templeton and D.D. Lasic. New directions in liposome gene delivery. Mol. Biotechnol. (1999) 11 , 175-180.
[59]	A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. (1965) 13 , 238-252.
[60]	A.D. Bangham, M.W. Hill and N.G. Miller. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. E.D. Korn ed., Methods of Membrane Biology (1974) Vol.1 Plenum Press, Oxford, 1-68.
[61]	D. Dimitriadis. Entrapment of plasmid DNA in liposomes. Nucleic. Acids Res. (1979) 6 , 2697-2705.
[62]	P. Fraley and D. Papahadjopoulos. Liposomes: The development of a new carrier systhem for introducing nucleic acids into plant and animal cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1982) 96 , 171-187.
[63]	J. Senior, J.A. Waters, G. Gregoriadis. Antibody-coated liposomes. The role of non-specific antibody adsorption. FEBS Lett. (1986) 196 , 54-58.
[64]	K.W. Walton, T.J. Almond, M. Robinson, D.L. Scott. An experimental model for the study of the opsonic activity of fibronectin in the clearance of intravascular complexes. Br. J. Exp. Pathol. (1984) 65 , 191-200.
[65]	T. Kinoshita. Biology of complement: The overture. Immunol. Today (1991) 291-301.
[66]	J.H. Senior. Fate and behavior of liposomes in vivo: A review of controlling factors. CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carriers Syst. (1987) 3 , 123-193.
[67]	R.E. Pagano and J.N. Weinstein. Interaktions of liposomes with mammalian cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. (1978) 7 , 435-468.
[68]	T. Allen. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. Adv. Drug Deliv. Rev. (1994) 13 , 285-309.
[69]	D.H. Naper. Polymeric stabilization of colloidal dispersions. Academic Press, New York (1983).
[70]	L.A. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Tochilin and L. Huang. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. FEBS Lett. (1990) 268 , 235-237.
[71]	S.L. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. DeGennes. Proteinsurface interactions in the presence of polyethylene oxid. J. Colloid Interface Sci. (1991) 142 , 149-166.
[72]	S. Moghimi, L. Illum, S. Davis, V. Kolb-Bachofen. Coating particles with a block copolymer (poloxamine 908) supresses opsonization but permits the activity oy dysopsonins in the serum. Biochim Biophys. Acta (1993) 1179 , 157-165.
[73]	M.C. Woodle, D.D. Lasic. Sterically stabilized liposomes. Biochim. Biophys. Acta (1992) 1113 , 171-199.
[74]	V.P. Torchilin and M.I. Papisov. Why do PEG-coated liposomes circulate long? J. Liposome Res. (1994) 4 , 725-739.
[75]	A.A. Bogdanov Jr., R. Weissleder, H.W. Frank, A.V. Bogdanova, N. Nossiff, B.K. Schaeffer, E. Tsai, M.I. Papisov and T.J. Brady. A new macromolecule as a contrast agent for MR angiography: Preparation, properties, and animal studies. Radiology (1993) 187 , 701-706.

- [76] P.R. Cullis, A. Chonn and S.C. Semple. Interaktion of liposomes and lipid based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. Adv. Drug Deliv. Rev. (1998) 32, 3-17.
- [77] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman and A. Minsky. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. Biochemistry (1993) 32, 7143-7151.
- [78] F. Liu, H. Qi, L. Huang and D. Liu. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. Gene Ther. (1997) 4, 517-523.
- [79] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.S. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold and H. Danielsen. Lipofection: A highly efficient lipid-mediated DNA transfektion procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 7413-7417.
- [80] Study ID Numbers 199/13941; UAB-6097; UAB-F930923001 NLM Identifier NCT00004471
- [81] E. Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug and M.L. Birnstiel. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. Pros. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 3410-3414.
- [82] O. Boussif, M.A. Zanta and J.P. Behr. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. Gene Ther. (1996) 3(12), 1074-1080.
- [83] E. Wagner.
 Effects of membrane-active agents in gene delivery.
 J. Contr. Rel. (1998) 53, 155-158.
- [84] P. Erbacher, T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J.L. Coll, J.P. Behr and J.S. Remy. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). J. Gene Med. (1999) 1(3), 210-222.
- J.P. Leonetti, G. Degols and B. Lebleu.
 Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine)conjugates: Mechanism of celluptake.
 Bioconjugate Chem. (1990) 1, 149-153.
- [86] F. Labat-Moleur, AmM. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Fürstenberger, F. Oberling, E. Brambilla and J.P. Behr. An elektron mikroskopy study into themechanism of gene transfer with lipopolyamines. Gene Ther. (1996) 3, 1010-1017.
- [87] B. Abdallah. A. Hassan, D. Goula, C. Benoist, J.P. Behr and B.A. Demeneix. A poerfull nonviral vector for in vivo gene transfer in the adult mammalian brain: polyethylenimine. Human Gene Ther. (1996) 7, 1947-1954.
- [88] R.C. Lambert, Y. Maulet, J.-L. Dupont, S. Mykita, P. Craig, S. Volsen and A. Feltz.
 Polyethylenimine-mediated DNA transfection of peripheral and central neurons in primary culture : probing Ca²⁺ channel structure and function with antisense oligonucleotides.
 Mol. Cell. Neurosci. (1996) 7, 239-246.
- [89] S.-M. Zou, P. Erbacher, J.S. Remy and J.P. Behr. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. J. Gene Med. (2000) 2, 128-134.
- [90] J. Suh, H.J. Paik, and B.K. Hwang. Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH's. Bioorg: Chem. (1994) 22, 318-327.
- [91] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J.P. Behr A novel, versatile vektor for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethyleneimine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 7297-7301.
- S.-M. Zou, P. Erbacher, J.S. Remy and J.P. Behr.
 Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse.
 J. Gene Med. (2000) 2, 128-134.
- [93] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zachello and M. Scarpa. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. Gene Ther. (1997) 4, 1100-1106.
- [94] P. Fender, R.W.H. Ruigrok, E. Gout, B. Sebastion and J. Chroboczek. Adenovirus dodecahedron, a new vectorfor human gene transfer. Nature Biotech (1997) 15, 52-56.

- [95] D.V. Faller and D. Baltimore.
 Liposome encapsulation of retrovirus allows efficient superinfektion of resistant cell lines.
 J. Virol. (1984) 49, 269-272.
- T. Wilson, D. Papahadjopoulos and R. Taber.
 Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vesicles: antibody resistance and infectivity in virus-resistant cells.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977) 74, 3471-3475.
- [97] E. Kondorosi, and E. Duda.
 Infection of cells with Sindbis virus nucleocapsids entrapped into liposomes.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. (1982) 107, 367-373.
- [98] L.A. Couture, C.A. Mullen and R.A. Morgan. Retroviral vectors containing chimeric promotor / enhancer elements exhibit cell-type-specific gene expression. Human Gene Ther. (1994) 5, 667-677.
- [99] C.E. Seidman, E.V. Schmidt, J. G. Seidman. Cis-Dominance of rat atrial natriuretic factor gene regulatory sequences in transgenic mice. Can. J. Physiol. Pharmacol. (1991) 69, 1486-1492.
- [100] W.-M. Franz, D. Breves, K. Klingel, G. Brem, P.H. Hofschneider and R. Kandolf. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promotor and developmental regulation in transgenic mice. Circ. Res. (1993) 73, 629-638.
- [101] J.T. Douglas, B.E. Rogers, M.E. Rosenfeld, S.I. Michael, M. Feng and D.T. Curiel Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. Nat. Biotechnol. (1996) 14, 1574-1578.
- [102] V.S. Trubetskoy, V.P. Torchilin, S.J. Kennel and L. Huang. Use of N-terminal modified poly(L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. Bioconjug. Chem. (1992) 3, 323-327.
- [103] M. Buschle, M. Cotten, H. Kirlappos, K. Mechtler, G. Schaffner, W. Zauner, M. L. Birnstiel and E. Wagner. Receptor-mediated gene transfer into human T-lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T-cell receptor complex. Hum. Gene Ther. (1995) 6, 753-761.
- [104] R. Kircheis, A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger and E. Wagner. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. Gene Ther. (1997) 4, 409-418.
- [105] E. Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug and M.L. Birnstiel Transferin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 3410-3414.
- [106] R. Kircheis, S. Schüller, S. Brunner, M. Ogris, K.H. Heider, W. Zauner and E. Wagner. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. J. Gene Med. (1998) 1, 111-120.
- [107] G. Aswell and J. Harford. Carbohydrate-specific receptors of the liver. Ann. Rev. Biochem. (1982) 51, 531-542.
- [108] C.H. Wu and G.Y. Wu. Receptor-mediated delivery for foreign genes to hepatocytes. Adv. Drug Deliv. Rev. (1990) 29, 243-248.
- [109] M.A. Zanta, O. Boussif, A. Adib and J.P. Behr. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. Bioconjugate Chem. (1997) 8, 839-844.
- [110] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo and R.W. Hanson. Receptor-mediated gene transfer into macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 101-105.
- [111] R.O. Hynes Integrins: versality, modulation and signalling in cell adhesion. Cell (1992) **69**, 11-25.
- [112] S.L. Hart, R.P. Harbottle, R. Cooper, A. Miller, R. Williamson and C. Coutelle. Gene delivery and expression mediated by Integrin-binding peptid. Gene Ther. (1995) 2, 552-554.
- [113] P. Erbacher, J.S. Remy and J.P. Behr. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the Integrin-mediated endocytosis pathway. Gene Ther. (1999) 6, 138-145.

L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso and R. Lobb. [114] Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell (1989) 59(6), 1203-1211. [115] M.J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler and R.R. Lobb. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell (1990) 60(4), 577-584 [116] R. Pulido, M.J. Elices, M.R. Campanero, L. Osborn, S. Schiffer, A. Garcia-Padro, R.Lobb, M.E. Hemler and F. Sanchez-Madrid. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. Correlation with distinct alpha 4 epitopes. J Biol Chem (1991) 266(16),10241-10245. [117] R. Lobb and M.E. Hemler. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. J Clin Invest (1994) 94(5),1722-1728. R.R. Lobb and L. Osborn. [118] VCAM-1 T. Kreis and R. Vale, eds. Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins. Oxford University Press (1999) 326-328. [119] M.P. Bevilacqua. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu. Rev. Immunol. (1993) 11, 767-804. T.M. Carlos, B.R. Schwartz, N.L. Kovach, E. Yee, M. Rossa, L. Osborn, G. Chi-Rosso, B. Newman, R. Lobb, M. Rosso, et al. [120] Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. Blood (1990) 76(5), 965-970. G.E. Rice and M.P. Bevilaaqua. [121] An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. Science (1989) 246(4935), 1303-1306. [122] B. Masinovsky, D. Urdal and W.M. Gallatin. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1 J. Immunol. (1990) 145(9), 2886-2895. [123] M. Sata and K. Walsh. TNF regulation of Fas ligand expression on vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. Nature. Med. (1998) 4, 415-420. P. Libby and Z.S. Galis. [124] Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1995) 748, 158-168. T. Hunkapillar and L. Hood. [125] Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. Adv. Immunol. (1989) 44, 1-63 T. Polte, W. Newman and T.V. Gopal. [126] Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Nucleic Acids Res. (1990) 18(19), 5901. M.I. Cybulsky, J.W. Fries, A.J. Williams, P. Sultan, V.M. Davis, M.A. Gimbrone and T. Collins Jr. [127] Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. Am. J. Pathol. (1991) 138(4), 815-820. P. Moy, R. Lobb, R. Tizard, D. Olson and C. Hession. [128] Cloning of an inflammation-specific phosphatidyl inositol-linked form of murine vascular cell adhesion molecule-1. J. Biol. Chem. (1993) 268(12), 8835-8841. G.E. Rice, J.M. Munro, C. Corless and M.P. Bevilacqua. [129] Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues Am. J. Pathol. (1991) 138(2), 385-393. [130] M.I. Cybulsky and M.A. Gimbrone Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science (1991) 251(4995), 788-791. [131] G.C. Gurtner, V. Davis, H. Li, M.J. McCoy, A. Sharpe and M.I. Cybulsky. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. Genes Dev. (1995) 9(1), 1-14.

- [132] I. Frolov and S. Schlesinger.
 Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. J. Virol. (1994) 68, 1721-1727.
- C.R. Dick and G.E. Ham.
 Characterization of polyethylenimine.
 J. Macromol. Sci. Chem. (1970) A4, 1301-1314.
- [134] A. Herrmann, M. Piper and J.Schrader. Selection of cell-specific peptides in a rat carotid injury model using a random peptid-presenting bacterial library. Biochim. Biophys. Acta. (1999) 24905, 1-8.
- [135] C.L. Klein, F. Bittinger, H. Köhler, M. Wagner, M. Otto, I. Hermanns and C.J. Kirkpatrick. Comparative studies on vascular endothelium in vitro. Pathology (1995) 63, 83-92.
- [136] E.A. Lidigton, D.L. Moyes, A.M. McCormack and M.L. Rose. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. Transpl. Immunol. (1999) 7(4), 239-246.
- [137] C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S.B. Schiffer, D. Goff, P. Moy, G. Chi-Rosso, S. Luhowskyj, R. Lobb and L. Osborn. Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). J. Biol. Chem. (1991) 266(11), 6682-6685.
- J.C. Domingo, M. Mora and M.A.A. de Madariaga.
 Incorporation of N-acylethanolamine phospholipids into egg phosphatidylcholine vesicles: characterization and permeability properties of the binary systems.
 Biochim Biophys. Acta (1993) 1148, 308-316.
- [139] H.H.O. Schmid, P.C. Schmid and V. Natarajan. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. Prog. Lipid Res. (1990) 29, 1-43.
- [140] D. Lafrance, D. Marion and M. Pezolet. Study of the structure of N-acyldipalmitoylphosphatidylethanolamines in aqueous dispersion by infrared and Raman spectroscopies. Biochemistry (1990) 29 (19),4592-9.
- [141] S.H. Snyder. Nitric oxide : First new class of neurotransmitters. Science (1992) 257, 494-496.
- [142] N. Peunova and G. Enikolopov. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neural cells. Nature (1993) 364, 450-453.
- [143] G. Weiss, B. Goossen, W. Doppler, D. Fuchs, K. Pantopoulos, G. Werner-Felmayer and M.W. Hentze. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide / NO-synthase pathway. Embo J. (1993) 12, 3651-3657.
- [144] B. Brüne, S. Dimmeler, Y. Molina, L. Vedia and E.G. Lapetina. Nitric oxide: A signal for ADP-ribosylation of proteins. Life Sci. (1994) 54, 61-70.
- [145] A.M.Q. King Genetic recombination in positive strand RNA viruses E. Domingo, J.J. Holland, P. Ahlquist, Eds. RNA Genetics. Boca Raton: CRC Press, Inc. (1988) 150-185.
- [146] M.M.C. Lai RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiol. Rev. (1992) **56**, 61-79.
- [147] B.G. Weiss and S. Schlesinger. Recombination between Sindbis virus RNAs. J.Virol. (1991) 65, 4017-4025.
- [148] S. Schlesinger and B.G. Weiss Recombination between Sindbis virus RNAs. Arch. Virol. (Suppl.) (1994) 9, 213-220.
- [149] C.S. Hahn, S. Lustig, E.G. Strauss and J.H. Strauss. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5997-6001.
- [150] R. Raju, S.V. Subramaniam and M. Hajjou. Genesis of Sindbis virus by in vivo recombination of nonreplicative RNA precursors J. Virol. (1995) 69 (12), 7391-7401.

[151] M. Hajjou, K.R. Hill, S.V. Subramaniam, J.Y. Hu and R. Raju Nonhomologous RNA-RNA recombination events at the 3' nontranslated region of the Sindbis virus genome: hot spot and utilization of nonviral sequences J. Virol. (1996) 70 (8), 5153-5164. [152] S.S. Monroe and S. Schlesinger. RNAs from two independently isolated defective interfering particles of Sindbis virus contain a cellular tRNA sequence at their 5'ends. Proc. Natl. Acad. Sci USA (1983) 80, 3279-3283. K. Kirkegaard and D. Baltimore. [153] The mechanism of RNA rekombination in poliovirus. Cell (1986) 47, 921-928. [154] K.R. Hill, M. Hajjou, J.Y. Hu and R. Raju. RNA-RNA recombination in Sindbis virus: roles of the 3' conserved motif, poly(A) tail, and nonviral sequences of template RNAs in Polymerase recognition and template switching. J. Virol. (1997) 71 (4), 2693-2704. [155] J.J. Bujarski P.D. Nagy and S. Flasinski. Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. Adv. Virus. Res. (1994) 43, 275-302. [156] A. Herrmann, G. Müller, A. Gödecke and J. Schrader. Rekombination of nonreplicative RNA precursors of Sindbis virus in infected cells overex-pressing murine-inducible nitric oxide synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253, 524-531. [157] I. Frolov, E. Frolov and S. Schlesinger. Sindbis virus replicons and Sindbis virus: Assembly of chimeras and of particles deficient virus RNA. J. Virol. (1997) 71 (4), 2819-2829. [158] J. George and R. Raju. Alphavirus RNA genome repair and evolution: Molecular characterization of infectious Sindbis virus isolates lacking a known conserved motif at the 3' end of the genome. J. Virol. (2000) 74 (20), 9776-9785. [159] P. Olivo, I. Frolov and S. Schlesinger. A cell line that express a reporter gene in response to infection by Sindbis virus: a prototype for detection of positive strand RNA viruses. Virology (1994) 198, 381-384. E.V. Agapov, I. Frolov, B.D. Lindenbach, B.M. Pragai, S. Schlesinger and C.M. Rice. [160] Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (1998) 95 (22),12989-12994. I. Frolov, E.V. Agapov, T.A. Hoffman Jr., B.M. Pragai, M. Lippa, S. Schlesinger and C.M. Rice. [161] Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. J. Virol. (1999) 73 (5), 3854-3865. P. Bandyopadhyay, B.T. Kren, X. Ma and C.J. Steer. [162] Enhanced gene transfer into HuH-7 cells and primary rat hepatocytes using targeted liposomes and polyethylenimine. BioTechniques (1998) 25, 282-292. [163] D. Fischer, T. Bieber, H.-P. Elsässer and T. Kissel. Polyethylenimine: synthesis and in vitro cytotoxicity of a low molecular weight polycation for gene transfer. Eur. J. Cell Biol. (1998) 75 (Suppl. 48), 108. [164] C. Rudolph, J. Lausier, S. Naundorf, R.H. Müller and J. Rosenecker. In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. J. Gene Med. (2000) 2. 269-278. [165] M. Orgis, P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis and E. Wagner. The size of DNA transferin-PEIcomplexes is an important factor for gene expression in cultured cells. Gene Ther. (1998) 5, 1425-1433. [166] D. Goula, J.S. Remy, P. Erbacher, M. Wascowicz, G. Levi, B. Abdallah and B.A. Demeneix. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. Gene Ther. (1998) 5, 712-717. I.M. Helander, H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala and P. Koski. [167] Polyethylenimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. Microbiology (1997) 143, 3193-3199. [168] W.T. Godbey, M.A. Barry, P. Saggau, K.K. Wu and A. G. Mikos. Poly(ethylenimine)-mediated transfektion: A new paradigm for gene delivery Inc. J. Biomed. Mater Res. (2000) 51, 321-328.

W.T. Godbey, K.K. Wu and A.G. Mikos. [169] Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine) / DNA complexes for gene delivery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 5177-5181. [170] A.R. Klemm, D. Young and J.B. Lloyd. Effects of polyethyleneimine onendocytosis and lysosome stability. Biochem. Pharmacol. (1998) 56, 41-46. [171] M.J. Elices, L.Osborn, Y.Takada, C. Crouse, S. Luhowsky, M.E. Hemler and R.R. Lobb. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukozyte intergrin VLA-4 at a site distinkt from the VLA-4/fibronektin binding site. Cell (1990) 60, 577-584 [172] J. Carlson, H. Drevin and R. Axen. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunktional reagent. Biochem. J. (1978) 173, 723-737. R. Kircheis, A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger and E. Wagner. [173] Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. Gene Ther. (1997) 4, 409-418. [174] C.L. Klein, F. Bittinger, H. Köhler, M. Wagner, M. Otto, I. Hermanns and C.J. Kirkpatrick. Comparative studies on vascular endothelium in vitro. Pathology (1995) 63, 83-92. [175] M.I. Cybulsky and M.A. Gimbrone Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis Science (1991) 251, 788-791 [176] U. Maus, S. Rosseau, N. Mandrakas, R. Schlingensiepen, R. Maus, H. Muth, F. Grimminger, W. Seeger and J. Lohmeyer. Cationic lipids employed for antisense oilgodeoxynucleotide transport may inhibit vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells: a word of caution. Antisense Nuc.Acid Drug Dev. (1999) 9 (1), 71-80 [177] G.E. Rice, J.M. Munro, C. Corless and M.P. Bevilacqua. Vascular and nonvascular expression of INCAM-110 Am. J. Pathol. (1991) 138, 385-393. [178] I. Ricard, M.D. Payet and G. Dupuis. Condensation of chromatin: Role of multivalent cations. Eur. J. Immunol. (1998) 28 (5), 1708-1718. [179] D. Sen and D.M. Crothers. Condensation of chromatin: Role of multivalent cations. Biochem. (1986) 25, 1495-1503. [180] I.V. Smirnov, S.I. Dimitrov and V.L. Makarov. Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA. J. Biomol. Struc. Dyn. (1988) 5, 1149-1161. B. Nohe, H.J. Dieterich, M. Eichner and K. Unertl. [181] Certain batches of albumin solutions influence the expression of endothelial cell adhesion molecules. Intensive Care Med. (1999) 25 (12), 1381-1385 [182] D. Goula, N. Becker, G.F. Lemkine, P. Normandie, J. Rodrigues, S. Mantero, G. Levi and B.A. Demeneix. Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. Gene Ther. (2000) 7, 499-504. [183] P. Bandvopadhvav, B.T. Kren, X. Ma and C.J. Steer. Enhanced gene transfer into HuH-7 cells and primary rat hepatocytes using targeted liposomes and polyethylenimine. BioTechniques (1998) 25, 282-292. [184] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer and T. Kissel A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharma. Res. (1999) 16 (8), 1273-1279. [185] F. Szoka Jr. and D. Papahadjopoulos. Procedure for preparation of liposoemes with large internal aequeous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75 (9), 4194-4198. D. Papahadjopoulos and N. Miller. [186] Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. Biochim. Biophys. Acta. (1967) 135 (4), 624-638 T.S. Aurora, W. Li, H.Z. Cummins and T.H. Hains. [187] Preparation and characterization of monodisperse unilamellar phospholipid vesicles with selected diameters from 300 to 600 nm.

Biochim. Biophys. Acta. (1985) 820, 250-258.

[188]	V. Rhoden and S.M. Goldin. Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis. Biochem. (1979) 18(19),4173-4176.
[189]	D. Lafrance, D. Marion and M. Pezolet. Study of the structure of N-acyldipalmitoylphosphatidylethanolamines in aqueous dispersion by infrared and Raman spectroscopies. Biochemistry (1990) 29 (19),4592-9.
[190]	R.M. Epand and R. Bottega. Modulation of the phase transition behavior of phosphatidylethanolamine by cholesterol and oxysterols. Biochemistry (1987) 26 (7), 1820-1825.
[191]	K. Inoue. Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. Biochim. Biophys. Acta (1974) 339 , 390-402.
[192]	B.D. Ladbrooke, R.M. Williams and D. Chapman. Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. Biochim. Biophys. Acta (1968) 150 , 333-340.
[193]	D. Liu and L. Huang. Role of cholesterol in the stability of pH-sensitive, large unilamellar liposomes prepared by the detergent-dialysis method. Biochim. Biophys. Acta (1989) 981 , 254-260.
[194]	P.R. Cullis and B. De Kruijff. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta (1979) 559 , 339-420.
[195]	R.L. Juliano and D. Stamp. The effect of particle size and chage on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 63, 651-658.
[196]	G. Gregoriadis and J. Senior. The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. FEBS Lett. (1980) 119 , 43-46.
[197]	 Z.Y. Liu, R. Solow and V.W. Hu. Fluorescence analysis of size distribution and mode of dye release from carboxyfluorescein-loaded vesicles: application to the study of complement-membrane interactions. Biochim. Biophys. Acta (1988) 945, 253-262.
[198]	D.V. Devine, K. Wong, K. Serrano, A. Chonn, P.R. Cullis. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. Biochim. Biophys. Acta (1994) 1191 , 43-51.
[199]	M. Mercadal, J.C. Domingo, M. Bermudez, M. Mora and M.A. De Madariaga N-palmitoylphosphatidylethanolamine stabilizes liposomes in the presence of human serum: effect of lipidic composition and system characterization. Biochim. Biophys. Acta (1995) 1235 , 281-288.
[200]	T. M. Huong, H. Harashima and H. Kiwada. In vivo studies on the role of complement in the clearance of liposomes in rat and guinea pigs. Biol. Pharm. Bull. (1999) 22 (5), 515-520.
[201]	H. Harashima, T.M. Huong, T. Ishida, Y. Manabe, H. Matsuo and H. Kiwada. Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats. Pharm. Res. (1996) 11, 1704-1709.
[202]	D.Liu, Q. Hu and Y.K. Song. Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. Biochim. Biophys. Acta (1995) 1240 , 277-284.
[203]	D. Papahadjopoulos, T.M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S.K. Huang, K.D. Lee, M.C. Woodle, D.D. Lasic, C. Redemann and F.J. Martin. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (1991) 88 (24), 11460-11464.
[204]	A. Gabizon, R. Shiota, D. Papahadjopoulos. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. J. Natl. Cancer Inst. (1989) 81 (19),1484-1488.
[205]	T.M. Allen and C. Hansen. Pharmacogenetics of stelth versus conventional liposomes: effect of dose. Biochim. Biophys. Acta (1991) 1068 , 133-141.
[206]	T.M. Huong, H. Harashima and H. Kiwada. Complement dependent and independent liposome uptake by peritoneal macrophages: Cholesterol content dependency. Biol. Pharm, Bull. (1998) 21 (9), 969-973.
-------	---
[207]	D.C. Litzinger, A.M.J. Buiting, N. v. Rooijen and L. Huang. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. Biochim. Biophys. Acta (1994) 1190 , 99-107.
[208]	P.C. Schmidt, P.V. Reddy, V. Natarajan and H.H.O. Schnidt. Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. J. Biologic. Chem. (1983) 258 (15), 9302-9306.
[209]	R.M. Abra, C.A. Hunt and D.T. Lau. Liposome disposition in vivo VI: Delivery to the lung. J. Pharmaceut. Sci. (1984) 73 (2), 203-206.
[210]	E. Wisse. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. J. Ultrastruct. Res. (1970) 31 (1), 125-150.
[211]	Q. Hu and D. Liu. Co-existence of serum-dependent and serum-independent mechanisms for liposome clearance and involvement of non-Kupffer cells in liposome uptake by mouse liver. Biochim. Biophys. Acta (1996) 1284 , 153-161.
[212]	D.C. Litzinger and L. Huang. Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. Biochim. Biophys. Acta (1992) 1127 , 249254.
[213]	 A.L. Klibanov, K. Maruyama, A.M. Beckerleg, V.P. Torchilin and L. Huang. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. Biochim. Biophys. Acta (1991) 1062, 142-148.
[214]	J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Molecular cloning. A laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
[215]	F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl, Current Protocols in Molecular Biology New York: Wiley Press (1992).
[216]	H.C. Birnboim und J. Doly, A rapid alkaline extraction procedere for screening recombinant plasmid DNA. Nucl.Acids.Res. 7, (1979) 1513-23.
[217]	H.C. Birnboim, A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth.Enzym. 100 , (1983) 243-55.
[218]	P. Chomcynski und N.Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. Anal. Biochem. 162 , (1987) 156-59.
[219]	U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T-4. Nature 227 , (1971) 680-82.

LEBENSLAUF

Gregor Müller Linzer Str. 34 50939 Köln

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig Geburtsdatum: 16.12.1969 Geburtsort: Brühl / Rheinland

Bildungsweg:

1976 – 1980	Goethe Grundschule Köln-Rodenkirchen
1980 – 1987	Gymnasium Rodenkirchen
1987 – 1989	Friedrich Wilhelm Gymnasium Köln
5 / 1989	Allgemeine Hochschulreife
6 / 1989 – 8 / 1990	Wehrdienst
10 / 1990	Immatrikulation an der Universität zu Köln Studium der Chemie (Diplom)
10 / 1991	Studium der Biologie (Diplom)
9 / 1993	Diplom-Vorprüfung
9 / 1995	Diplom-Hauptprüfung
12 / 1995 – 9 / 1996	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln. Lehrstuhl: Prof. Dr. Dr. W. Stoffel <u>Thema:</u> <i>Molekulare und biochemische Untersuchung zur Protein-</i> <i>kinase C ζ in Wildtyp und saurer Sphingomyelinase defi-</i> <i>zienter Maus.</i>
10 / 1996	Ernennung zum Diplom-Biologen
10 / 1996 – 10 / 2001	Dissertation am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der medizi- nischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Lehrstuhl: Prof. Dr. J. Schrader <u>Thema:</u> Entwicklung von systemisch applizierbaren, endothel- spezifischen Gentransfervektoren.
Datum	

Datum: 11.12.2001 Unterschrift:

fliller

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich der Tabellen und Abkürzungen), die andere Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen worden sind, in jedem Einzelfall des Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von der unten angegebenen Teilpublikation noch nicht veröffentlicht ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. J. Schrader betreut worden.

Kuller

Gregor Müller Düsseldorf im Oktober 2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

A. Herrmann, G. Müller, A. Gödecke and J. Schrader.
 Rekombination of nonreplicative RNA precursors of Sindbis virus in infected cells overexpressing murine-inducible nitric oxide synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253, 524-531.