

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6505

**Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens
zum Test neuer Transfektionslipide
und Untersuchungen zum Mechanismus der Lipofektion**

Anne Regelin

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2000

**Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens
zum Test neuer Transfektionslipide
und Untersuchungen zum Mechanismus der Lipofektion**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe
genehmigte
DISSERTATION

von
Anne Regelin
aus Karlsruhe
2000

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2000

Referent: PD Dr. H. F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. H. Taraschewski

Zusammenfassung

Die Lipofektion, der durch Lipide vermittelte Übertrag genetischen Materials in Zellen (Transfektion), ist eine viel versprechende Technik für die somatische Gentherapie. Allerdings wurde bis heute noch kein ideales Transfektionslipid gefunden. Eine systematische Suche, ein *Screening*, nach neuen, effektiven und nicht toxischen Transfektionslipiden könnte dazu beitragen, ideale Lipide zu identifizieren und die Lipofektion noch weiter zu verbessern.

Um eine Vielzahl kationischer Lipide und Lipidmischungen hinsichtlich ihres Transfektionsverhaltens untersuchen und vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur automatisierten Lipofektion im Mikrotiter-Plattenformat entwickelt. Hierzu wurden die einzelnen Bereiche eines Lipofektionsexperiments – Herstellung von Liposomen, Bildung von Lipid/DNA-Komplexen, Transfektion sowie Assays zur Bestimmung der Transfektionseffizienz – speziell für das 96-Well-Format entwickelt. Jeder Teilschritt wurde separat optimiert und konnte anschließend erfolgreich auf einen zur Verfügung stehenden Pipettierroboter übertragen werden.

Mit Hilfe des automatisierten Lipofektionsverfahrens wurde das Transfektionsverhalten von 36 kationischen Lipid(mischung)en in einem Screening in 6 für gentherapeutische Fragestellungen interessanten Zelllinien verglichen. Für jede Zelllinie konnte je eine *Hitliste* der effizientesten Lipide bzw. -mischungen sowie der am wenigsten toxischen, effizienten Lipide erstellt werden. Das hier entwickelte Testverfahren erlaubte selbst für schwer transfizierbare Zellen, wie z. B. HUVEC, die Identifikation geeigneter Transfektionslipide. Aus der großen Menge an Daten wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Lipiden und ihrem Transfektionsverhalten (bzgl. Transfektionseffizienz, Zytotoxizität, Einfluss von Helferlipiden) abgeleitet. Zwischen den einzelnen Zellsystemen zeigten sich zelltypspezifische Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Lipide. Diese deuten auf unterschiedliche Lipoplexenaufnahmemechanismen hin.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Kinetik und der Mechanismus der Lipoplexaufnahme exemplarisch an COS-7-Zellen untersucht. Die Aufnahme von DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen verläuft nach einer langsamen, linearen Kinetik. Nur ein Teil der auf den Zellen anhaftenden Lipoplexe wird tatsächlich von diesen internalisiert. Durch Einsatz spezifischer Endozytoseinhibitoren konnte gezeigt werden, dass COS-7-Zellen Lipid/DNA-Komplexe hauptsächlich über einen ATP-abhängigen Endozytosemechanismus aufnehmen.

Das in dieser Arbeit entwickelte, automatisiert durchführbare Lipofektionsverfahren liefert die Voraussetzung für weitere Screeningexperimente. Aufgrund seiner Sensitivität können auch schwer zu transfizierende Zellen eingesetzt werden. Auf der Basis dieser Untersuchungen können weiterführende Studien in anderen Zellsystemen durchgeführt werden. Dadurch sollte es möglich sein, die zellulären Mechanismen noch besser zu verstehen und zur Optimierung der Lipofektion einzusetzen.

Abstract

Development of an automated screening method for identification of new transfection lipids and investigation on the mechanism of lipofection

Lipofection, i. e. the transfer of genetic material into cells (transfection) mediated by lipids, represents a promising method for somatic gene therapy. Until now, no ideal transfection lipid has been described. A systematical screening for finding new, effective, and non-toxic lipids may thus serve to identify ideal transfection lipids and, hence, to optimize lipofection.

For investigation and comparison of the transfection properties of a large number of cationic lipids (including combinations of lipids), an automated method for lipofection in microtiter plates has been developed. Accordingly, all parts of a lipofection experiment – preparation of liposomes, formation of DNA/lipid-complexes, cell transfection, as well as determination of lipofection efficiency – were specifically adapted to 96-well microtiter plates. All steps were optimized separately and then successfully transferred to a pipetting robot.

By means of the automated lipofection method, the transfection behaviour of 36 cationic lipids and lipid combinations could be studied in a screening with six cell lines, resulting in *hit lists* of the most efficient lipids as well as of the least toxic, efficient lipids in each cell line. The automated lipofection method thus allowed identification of favorable, effective lipids even in cell lines like HUVEC which are difficult to transfect. The huge amount of screening data served to derive structure-activity relationships between the lipids and their transfection behaviour (concerning transfection efficiency, cytotoxicity, influence of helper lipids). Cell type-specific differences were observed between the different cell lines probably indicating differences in lipoplex uptake.

To confirm this hypothesis, the kinetics as well as the mechanism of lipoplex uptake into COS-7 cells (as an exemplary cell line) were studied. DOTAP/pCMXluc-lipoplexes were shown to be internalized slowly (by first order kinetics). The cells internalized only a part of the lipoplexes adhering to the cell surface. Using specific inhibitors of endocytosis, COS-7 cells were shown to endocytose DNA/lipid-complexes predominantly by an ATP-dependent mechanism.

The automated lipofection method my thesis describes represents a solid basis for further screening experiments. Due to its high sensitivity, it even allows the use of cells which are difficult to transfect. Based on these results, future studies using other cell systems ought to further clarify the cellular mechanisms of lipofection to be used for further cell-specific optimization of the lipofection method.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungen und Akronyme	1
1 Einleitung	3
1.1 Gentransfer und somatische Gentherapie	3
1.1.1 Methoden des Gentransfers	3
1.1.2 Virusvermittelter Gentransfer kontra Lipofektion	4
1.2 Lipofektion	5
1.2.1 Prinzipien der Lipofektion mittels kationischer Lipide	5
1.2.2 Stand der Forschung	7
1.2.2.1 <i>Transfektionsreagenzien</i>	7
1.2.2.2 <i>Lipoplexmorphologie</i>	8
1.2.2.3 <i>Transfektionsmechanismus</i>	9
1.2.2.4 <i>Zellsysteme</i>	10
1.2.2.5 <i>Reportergene</i>	11
1.2.3 Lipofektion in einem Modellsystem	12
1.2.3.1 <i>Screeninggedanke</i>	12
1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Lipide/Transfektionsreagenzien	14
2.1.2 Plasmide und zugehörige Substanzen	14
2.1.2.1 <i>Plasmide</i>	14
2.1.2.2 <i>Substanzen für die Plasmidreinigung</i>	15
2.1.2.3 <i>Substanzen für die Gelelektrophorese</i>	15
2.1.3. Assays und zugehörige Puffer	15
2.1.3.1 <i>Assays und zugehörige Reagenzien</i>	15
2.1.3.2 <i>Puffer</i>	15
2.1.4 In der Zellkultur eingesetzte Substanzen	16
2.1.5 Sonstige Chemikalien	16

2.2 Methoden	17
2.2.1 Kultivierung der Zellen	17
2.2.2 Plasmidreinigung	18
2.2.3 Liposomenherstellung	19
2.2.3.1 Manuelle Methode	19
2.2.3.2 Automatisierte Methode	19
2.2.3.3 Größenbestimmung von Liposomen	20
2.2.4 Herstellung der Lipoplexe und Transfektion	20
2.2.4.1 Protokoll für die manuelle Lipoplexbildung und Transfektion	20
2.2.4.2 Protokoll für die automatisierte Lipoplexbildung und Transfektion	21
2.2.4.3 Transfektion bei simultaner Variation von Lipid- und DNA-Menge	24
2.2.4.4 Anwendung des automatisierten Transfektionsverfahrens auf ein Screeningexperiment	25
2.2.5 Post-Transfektionsassays	27
2.2.5.1 Bestimmung der Luciferaseaktivität und des Proteingehalts der transfizierten Zellen in manueller Durchführung	28
2.2.5.2 Automatisiertes Verfahren für 96-Well-Platten	29
2.2.6 Weitere Nachweisverfahren	31
2.2.6.1 Zytotoxizitätsbestimmungen	31
2.2.6.2 X-Gal-Färbung	32
2.2.6.3 Hemmung der Endozytose	32
2.2.6.4 Fluoreszenzmikroskopie	33
2.2.6.5 Fluorometrische Messungen	34
3 Ergebnisse und Diskussion	35
3.1 Entwicklung eines automatisierten Verfahrens zur Lipofektion kationischer Lipide und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im 96-Well-Platten-Format	35
3.1.1 Liposomendarstellung	37
3.1.2 Lipoplexbildung	45
3.1.2.1 Aspekte der Automatisierung	45
3.1.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen	49
3.1.3 Transfektion	64
3.1.3.1 Aspekte der Automatisierung	64
3.1.3.2 Untersuchung und Optimierung der Zellkultivierungsbedingungen	66
3.1.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz	78
3.1.4.1 Automatisierungsaspekte bei der Probenvorbereitung	79
3.1.4.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels des BCA-Assays	83
3.1.4.3 Bestimmung der Luciferaseaktivität	88
3.1.4.4 Ermittlung der Transfektionseffizienz	95

3.2. Systematische Evaluation der Transfektionseigenschaften (Screening) von Lipiden und Lipidmischungen	99
3.2.1 MEXF462NL	103
3.2.2 HT-29	105
3.2.4 RXF944L	108
3.2.4 16HBE-140 ⁺	110
3.2.5 HUVEC	112
3.2.6 COS-7	114
3.2.7 Zusammenfassung und Diskussion der Screeningergebnisse	117
3.2.7.1 Welche/s Lipid/-mischung ist für die Transfektion einer bestimmten Zell(lini)e optimal?	118
3.2.7.2 Gibt es zwischen den Lipiden Unterschiede im Transfektionsverhalten?	118
3.2.7.3 In welchem Zusammenhang stehen Transfektionseffizienz und Zytotoxizität?	119
3.2.7.4 Welcher Einfluss geht von den Helferlipiden DOPE und Cholesterol aus?	119
3.2.7.5 Treten zelllinienspezifische Unterschiede auf?	120
3.3 Mechanistische Aspekte der Lipofektion	123
3.3.1 Kinetik der Lipoplexaufnahme	123
3.3.2 Einfluss der Endozytose auf die Lipofektion von COS-7-Zellen	129
4 Literatur	135

Abkürzungen und Akronyme

A. d.	bidestilliertes Wasser (Millipore)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Zelllinienbank)
β-Gal	b-Galaktosidase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
CHCl ₃	Chloroform
CHOL	Cholesterol
CMV	Cytomegalovirus
DC-CHOL	3β-[N-(N',N'- Dimethylaminoethyl)carbamoyl]- cholesterol
DHPE	1,2- Di hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- p hosphatidylethanolamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMRIE	N-(1,2-Dimyristoyloxypropyl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium-bromid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>deoxyribonuclease</i>
DOGS	Di octadecylamidoglycylspermin
DOPE	1,2- Di oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3- p hosphatidylethanolamin
DORI	N-(1,2-Dioleoyloxypropyl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium-bromid
DOTAP	Di oleoyltrimethylammoniumpropan (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat)
DOSPA	2,3- Di oleoyloxy-N-[2-(spermincarboxamido)-ethyl]-N,N-dimethyl-1- p ropan-ammonium-trifluoracetat
DOSPER	1,3- Di oleoyloxy-2-(6-carboxy- spermyl)-propylamid
DPH	1,6- Di phenylhexa-1,3,5-trien
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendinitrilotetraessigsäure)
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	2-[4-(2- H ydroxyethyl)-1- p iperazinyl]-ethansulfonsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

LV	L adungsverhältnis
MeOH	Methanol
MEQH	<i>minimum essential quantum of horseriding per week</i>
min	M inute(n)
MLV	<i>multilamellar vesicle</i>
MTP	(96-Well-)Mikrotiterplatte
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,-diphenyltetrazolium-bromid
PE	P hosphatidylethanolamin
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
rlu	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	R ous- S arkom- V irus
RT	R aumtemperatur
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TAE	T ris- A acetat- E DTA
v/v	Volumenverhältnis
WST-1	4-[3-(-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat
w/w	Gewichtsverhältnis
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Gentransfer und somatische Gentherapie

Im Erbgut aller Organismen treten bedingt durch Zufall oder Umwelteinflüsse Veränderungen an der DNA auf, die in der Regel von der betroffenen Zelle repariert werden. Häufen sich solche Fehler und/oder werden nicht mehr oder nur unvollständig repariert, kann das, wenn wichtige Gene in der Zelle betroffen sind, gravierende Folgen haben. In einem mehrzelligen Organismus können so z. B. Tumoren und erbliche Gendefekte entstehen. Krebserkrankungen und genetisch vererbte Krankheiten beim Menschen sind daher das Ziel vielfältiger Forschungen zur Entstehung, Erkennung und Bekämpfung dieser Phänomene. Ein aktueller und zukunftssträchtiger Ansatz, der bereits in den 70er Jahren vorgeschlagen wurde [45], ist die Gentherapie, bei der versucht wird, die Symptome direkt an der Wurzel – den Genen – zu packen. In Deutschland¹ beschränkt sie sich auf die somatischen Zellen des Körpers, schließt also Eingriffe in die Keimbahn – und demzufolge eine Keimbahntherapie – aus. Bei der somatischen Gentherapie gibt es mehrere Ziele: Zum einen könnte ein defektes Gen durch ein intaktes ersetzt und so die Zelle wieder in die Lage versetzt werden, das normale Genprodukt zu exprimieren und in der Folge normal zu funktionieren. In anderen Fällen könnte beispielsweise eine Tumorzelle mit Hilfe eines speziellen Genprodukts zur Produktion von Zytostatika angeregt werden, ihre Empfindlichkeit für Zytostatika erhöht oder die Zelle für die Körperabwehr kenntlich gemacht werden. Eine weitere Strategie verfolgt die Therapie mit Antisense-DNA, die durch ihre Komplementarität zur mRNA überexprimierte oder mutierte Gene auf RNA-Ebene gezielt blockieren könnte [53]. Auch der Transfer von RNA-Ribozymen zum Abbau von mRNA verfolgt ein ähnliches Ziel [43].

1.1.1 Methoden des Gentransfers

Um ein „therapeutisches Gen“ bzw. DNA- oder RNA-Sequenzen in die betreffende Zelle zu transferieren, gibt es mehrere Möglichkeiten: Physikalischer Art sind Elektroporation [97, 136], Partikelbeschuss, Transfektion mit Hilfe von Glasperlen [98], und (Mikro)injektion. Gemeinsam ist diesen Verfahren, dass die DNA durch physikalische Einwirkung, wie Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektroporation), mechanisches Durchlöchern der Zellmembran sowie pflanzlicher Zellwände (Particle Gun) [52] oder mechanisches Einbringen (Mikroinjektion) [17, 111], in die Zelle transferiert wird.

Chemische Methoden sind DEAE-Dextran- und Kalziumphosphat-Fällung [35, 90, 140] und Transfektion [35, 37]. Mit ihrer Hilfe wird die DNA gefällt, kondensiert oder komplexiert, sodass sie von der Zelle aufgenommen werden kann. Unter diesen Methoden ist insbesondere

¹ § 5 ESchG BGBI I 1990, S. 2746-2748

die Transfektion, von der man in Analogie zur virusinduzierten Infektion beim Übertrag von fremdem Erbmateriale in eukaryontische Zellen spricht, von zunehmender Bedeutung. Der Gentransfer wird hierbei meist durch Lipide und/oder Proteine (bzw. Polypeptide) vermittelt. Als biologische Transfervehikel stehen außerdem verschiedene Virustypen (DNA- und RNA-Viren) zur Verfügung, die genetisches Material durch Infektion in die Zelle schleusen können. Neben der Übertragung nackter DNA sind der lipidvermittelte und der virale Gentransfer nahezu die einzigen Methoden, die es erlauben, nicht nur Einzelzellen, sondern auch Zellverbände (ex vivo und in vivo) zu transfizieren. Diese beiden Verfahren werden aufgrund ihrer Bedeutung im Folgenden kurz gegenübergestellt.

1.1.2 Virusvermittelter Gentransfer kontra Lipofektion

Obwohl der virusvermittelte Gentransfer zu den effizientesten Methoden zählt und auch schon in vivo sowie in zahlreichen klinischen Studien getestet wurde [19, 20], weist er einige Nachteile auf [zur Übersicht siehe 46]: Es besteht latent die Gefahr, dass die eingeführte DNA (z. B. via RNA über Retroviren) an einer ungünstigen Stelle ins Genom eingebaut wird und dadurch die Funktion anderer Gene beeinträchtigt werden könnte. Dies kann zum Tod der betroffenen Zelle führen, kann aber auch eine Mutation verursachen (Insertionsmutagenese). Außerdem lässt sich nicht ausschließen, dass sich (inaktivierte) Virusbestandteile verändern, beispielsweise durch Rekombination, und wieder als Virus aktiv werden. Ein weiterer Punkt ist die Gefahr von Immunreaktionen des Körpers gegen die Viren (v. a. Adenoviren) [28] oder deren Bestandteile, was eine Mehrfachapplikation erschweren würde. Darüber hinaus infizieren viele Viren nur sich teilende Zellen. Die Genexpression kann je nach Virustyp transient oder stabil sein. Allerdings ist der virale Gentransfer generell mit großem technischem Aufwand und großen Sicherheitsvorkehrungen verbunden.

Im Vergleich dazu ist die Lipofektion (d. h. die Transfektion² mit Hilfe von Lipiden [35, 37], zwar weniger effizient [2, 15, 104], weil in der Regel ein geringerer Prozentsatz an Zellen erfolgreich transfiziert wird. Obwohl in einigen Fällen über toxische Effekte der Lipide berichtet wird [120], hat sie einige entscheidende Vorteile: Die verwendeten Lipide sind – in Abhängigkeit von der Art der Applikation – häufig nicht immunogen [16], lösen also keine Immunantwort im Empfängerorganismus aus. Dadurch wären z. B. mehrere aufeinander folgende Behandlungen möglich [100]. Außerdem ist der technische Aufwand eines Lipofektions-experiments wesentlich geringer und mit weniger Sicherheitsvorkehrungen verbunden als bei virusvermittelter Transfektion. Sowohl transiente als auch stabile Transfektionen sind möglich.

² Im Folgenden wird in dieser Arbeit der Begriff *Transfektion* im Zusammenhang mit kationischen Lipiden synonym mit *Lipofektion* verwendet.

1.2 Lipofektion

1.2.1 Prinzipien der Lipofektion mittels kationischer Lipide

Besonders gut geeignet als Vehikel zum Transfer der negativ geladenen DNA durch die Zellmembran, deren äußere Oberfläche ebenfalls überwiegend negativ geladen ist, sind aufgrund ihrer Ladung kationische Lipide. Diese bestehen aus einem unpolaren lipophilen Schwanz aus Kohlenwasserstoffketten (z. B. aliphatische Fettsäurereste oder Ringsysteme von Cholesterolderivaten³), einem Lipidanker und der polaren positiven Kopfgruppe (schematisch dargestellt in Abb. 1.1).



Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines kationischen Lipids

Daneben werden neutrale oder amphiphile/zwitterionische Lipide wie Cholesterol oder DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) häufig als Additive, sogenannte Helferlipide, mit eingesetzt [36]. Diese sind oft natürliche Bestandteile von Membranen (Cholesterol, Lecithine, Sphingomyeline).

Durch ihre charakteristische Struktur sind die kationischen Lipide in der Lage, als Einzellipide oder/und in Mischungen mit Helferlipiden in wässrigem Milieu Liposomen zu bilden. Diese lassen sich beispielweise durch Extrusion (mehrfaches Passieren durch Filterporen definierter Größe) oder Ultraschall herstellen [101]. Die resultierenden sphärischen Gebilde bestehen aus einer oder mehreren membranartigen Lipiddoppelschichten (Abb. 1.2).

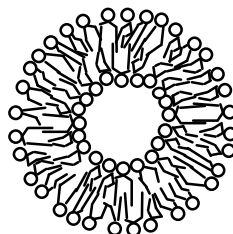


Abb. 1.2 Schematische Darstellung eines unilamellaren Liposoms im Querschnitt

Die polaren Kopfgruppen der Lipide sind durch Kreise dargestellt, die lipophilen Lipidanteile bzw. Schwänze durch je zwei Linien.

³ In dieser Arbeit wird für *Cholesterin* der in der chemischen Fachsprache gebräuchliche Terminus *Cholesterol* verwendet.

Man spricht in diesem Zusammenhang entsprechend von unilamellaren bzw. multilamellaren [116] Liposomen [167]. Die hydrophilen Köpfe ragen hierbei nach außen, während nach innen die lipophilen Schwänze der beiden Teilschichten aneinander grenzen. Im Innenraum des Liposoms befindet sich wieder wässriges Milieu mit den polaren Kopfgruppen.

Die auf der Oberfläche des kationischen Liposoms befindlichen positiv geladenen Kopfgruppen können mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Backbones interagieren. Das führt zur Bildung von DNA-Lipid-Komplexen, sogenannten Lipoplexen [35, 37]. Auf diesen beruht das Prinzip der Lipofektion (siehe Abb. 1.3).

In dieser Verpackungsform kann die DNA von der Zielzelle aufgenommen werden. Sie muss allerdings in der Zelle freigesetzt werden und – ohne vorher abgebaut zu werden – in den Kern gelangen, damit Genexpression stattfinden kann. Erst wenn im Zytoplasma das gewünschte Genprodukt bzw. Zielprotein gebildet wurde, kann die Lipofektion, also der lipidvermittelte Gentransfer, als gelungen betrachtet werden.

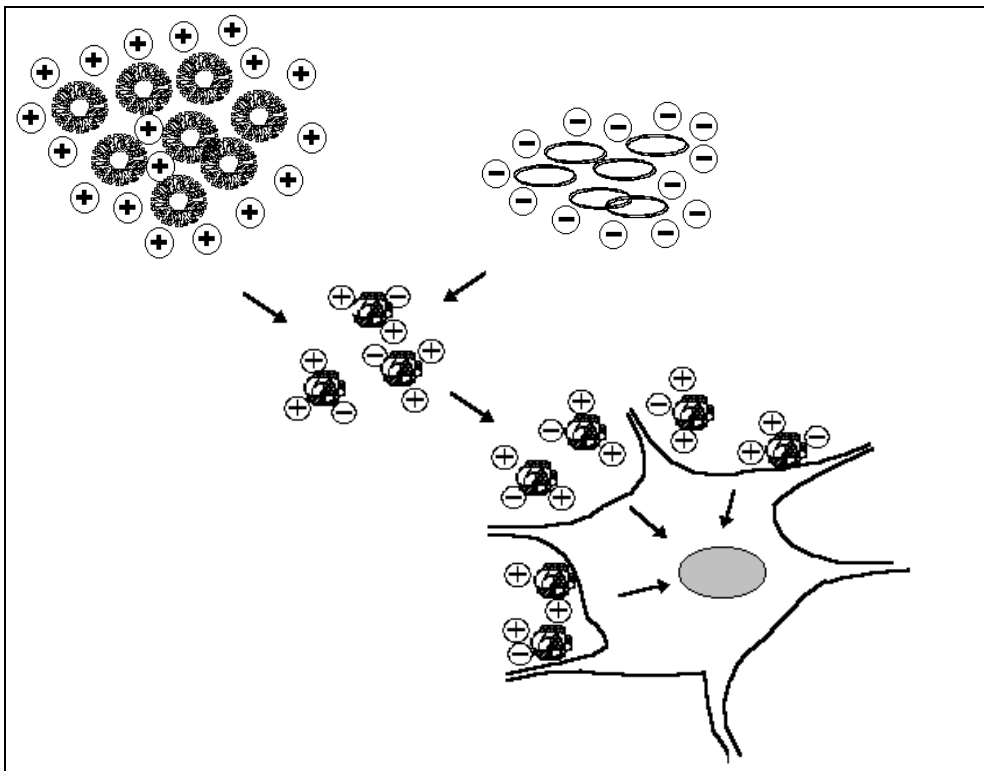


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Lipofektion mit Hilfe kationischer Lipide

Die positiv geladenen Liposomen und die negativ geladene DNA (hier der Einfachheit halber als ringförmige Plasmide dargestellt) bilden zusammen Lipoplexe (die Ladungen stehen stellvertretend für Lipid- und DNA-Anteile in einem bestimmten Ladungs- bzw. Molverhältnis). Die Lipoplexe können von der Zelle aufgenommen werden; der genaue Mechanismus steht noch zur Diskussion. Erst wenn die Transfer-DNA in den Zellkern (graue Ellipse) gelangt und Genexpression stattfindet, ist das Transfektionsziel erreicht.

1.2.2 Stand der Forschung

1.2.2.1 Transfektionsreagenzien

Im Bereich der Transfektion mit kationischen Lipiden ist inzwischen eine Vielzahl von Substanzen getestet worden. Monokationische Lipide als Einzelkomponenten oder in Kombination mit Helferlipiden sind die Lipide der „ersten Generation“, die in weiten Teilen bereits als kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien bekannt sind. Dazu zählen beispielsweise DOTMA [35], DORI [36], DOTAP [82, 130], DMRIE (in Kombination mit Cholesterol [36]) und DC-CHOL/DOPE [49].

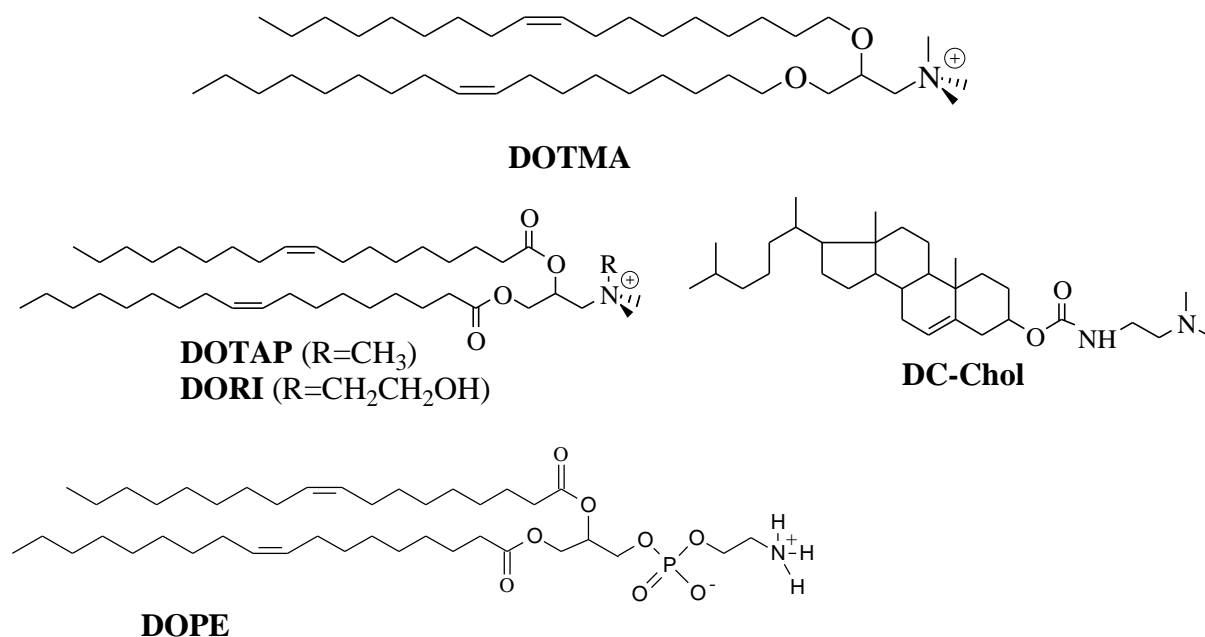


Abb. 1.4 Strukturformeln einiger gebräuchlicher kationischer Transfektionslipide sowie des Helferlipids DOPE

Die „zweite Generation“ sind die polykationischen Lipide, Lipopolyamine bzw. Lipospermine, die in der Regel meist zwei bis fünf positive Ladungen tragen (oligokationisch wäre daher die exaktere Bezeichnung). Sie basieren auf natürlichen DNA-kondensierenden Stoffen wie Spermin, das im Zellkern von Eukaryonten vorkommt, und dessen Vorstufe Spermidin. Bekannt sind hier Reagenzien wie DOSPER (Roche), Transfectam[®] (Promega) und Lipofectamine (Life Technologies) [5, 13, 25, 94].

Darüber hinaus finden vermehrt Mischungen von Lipiden [56], Lipiden mit Helferlipiden [33, 36] oder/und stabilisierenden, sogenannten Stealth-Komponenten (z. B. Polyethylenglykolen) [151] Anwendung. Auch (Prä)kondensation der DNA durch Peptide [1, 70, 109, 123, 126] und Polypeptide wie (Lipo-)Polylysin [144, 168], Polyethylenimin [5, 11, 141] oder Protamin [128, 160], Transferrin [109, 162] sowie Histonproteine [48, 123] wird oft mit Lipofektion kombiniert. Abweichend von den klassischen Lipiden werden inzwischen häufiger neuartige chemische Strukturen für die Komplexierung der DNA zur Transfektion eingesetzt, darunter

die Dendrimere (Superfect (Qiagen) [76, 141]), möglicherweise die Reagenzien der „dritten Generation“.

1.2.2.2 Lipoplexmorphologie

Die Kombination der Transfektionslipide mit den zu transferierenden genetischen Sequenzen (in den meisten Fällen DNA) führt zu den sogenannten Lipoplexen [35, 37], deren Morphologie mehrfach untersucht worden ist. Dabei wurden verschiedenste Typen von Lipoplexen beobachtet, die durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden (s. u.):

Typische Strukturen, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, oftmals mit Hilfe der Gefrier-Bruch-Technik, *in vitro* nachgewiesen wurden, sind „Spaghetti-meatball“-Komplexe [132, 133], bei denen kugelförmige Lipid-DNA-Aggregate von fadenförmigen Strukturen umgeben sind. Bei letzteren könnte es sich nach neuester Interpretation um einen röhrenförmig von einer Lipidschicht ummantelten DNA-Faden handeln [24]. Neben dieser nukleosomenartigen Lipoplexmorphologie [159] aus kugeligen, kondensierten Komponenten (durch Lipide induziert kondensierte DNA) und fadenförmigen Strukturen [50, 161] wurden auch multilamellare Komplexe [4, 59, 138] entdeckt. Des Weiteren wurden honigwabenartige Komplexe aus zylindrischen, DNA enthaltenden Lipidröhren [78, 132] sowie glockenförmige, eingestülpte Hohlkugel-Strukturen [135] gefunden. In einer *In-vivo*-Studie wurden sogar Lipoplexe als „Map-pins“ (also stecknadelförmige Strukturen) charakterisiert [133].

Einen Eindruck von der Heterogenität der Lipoplexmorphologie vermittelt eine weitere elektronenmikroskopische Untersuchung, in der drei verschiedene Lipoplexstrukturen für eine Lipid/DNA-Kombination auftraten [8]. Andere Untersuchungsmethoden, die häufig angewandt werden, sind z. B. *Scanning Force Microscopy* [29] und Fluoreszenzmikroskopie [61, 159]. Sie konnten zeigen, dass Form und Grad der DNA-Kompaktierung zu „Kondensationskernen“ oder Schleifenstrukturen nicht nur unter dem Einfluss der Lipid- bzw. Polymermenge relativ zur DNA-Menge stehen, sondern auch von der Struktur des verwendeten Lipids bzw. Polymers abhängen [29, 50]. Sie untermauern damit die elektronenmikroskopischen Daten [50, 156]. Daneben erklären Lichtstreuungsexperimente und physikalische Berechnungen zur Struktur und Stabilität von Lipoplexen das Auftreten multilamellarer „Sandwiches“ aus Lipiddoppelschichten mit dazwischen liegenden DNA-Schichten [24, 79, 114] (Abb. 1.5) wie auch das Vorkommen der honigwabenartigen Komplexe [73, 99].

Aus der Vielfalt der Daten geht hervor, dass es **den** Lipoplex an sich nicht gibt. Vielmehr bestimmen Mengen- bzw. Ladungsverhältnis und Struktur von Lipid und DNA [21, 156], Herstellungsart und Milieu [67, 71] die Größe und Gestalt des resultierenden Komplexes. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Lipoplexstruktur und Transfektionsaktivität [8, 50] wird kontrovers diskutiert [131, 156]. Dagegen gibt es zahlreiche Studien, in denen eine Korrelation zwischen biophysikalischen Parametern des Lipoplexes wie Zetapotential [8], Lipid/DNA-Ladungsverhältnis [36], Lipoplexgröße [117, 129, 164, 166] und Transfektionseffizienz nachgewiesen werden konnte.

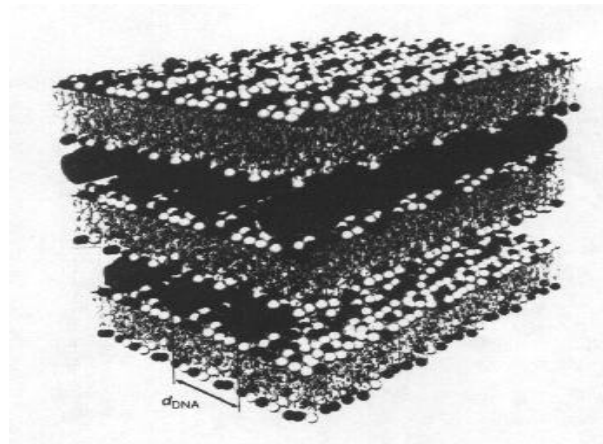


Abb. 1.5 Modell eines multilamellaren Lipoplexes [114]

Alternierende Lipiddoppelschichten und DNA-Moleküle führen zu einer sandwichartigen Lipoplexmorphologie.

1.2.2.3 Transfektionsmechanismus

Einer der primären Faktoren für eine erfolgreiche Lipofektion ist die Aufnahme der komplexierten Transfer-DNA in die Zielzelle. Lange ging die Diskussion um das Thema, über welchen Mechanismus die Lipoplexe in die Zellen aufgenommen werden, um Fusion mit der Zytoplasmamembran [35, 50] kontra Endozytose [36, 47, 110, 161, 168]. Der Fusionstheorie stehen zunehmend Transfektionsdaten gegenüber, die gegen einen Zusammenhang zwischen Lipoplexassoziation mit der Zellmembran und Transfektionseffizienz sprechen [60, 110, 131, 145]. Allein die Fusion von Liposomen mit Zellen [83] führt nicht zwingend zur Fusion von Lipoplexen mit der Zytoplasmamembran, der die Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle folgt [109, 110]. Vor allem elektronenmikroskopische Aufnahmen Gold-markierter Liposomen und Lipoplexe in endozytotischen Kompartimenten sprechen für einen rezeptorvermittelten Endozytosemechanismus [161, 47]. Allerdings scheinen Zelltyp, -differenzierung(sgrad) [60] und -position im Gewebe den Aufnahmemechanismus, rezeptorvermittelte Endozytose versus Phago- bzw. Pinozytose, zu beeinflussen [96]. Obwohl viele Studien einen endozytotischen Aufnahmemechanismus der Lipoplexe favorisieren, schließen sie aufgrund der teilweise uneinheitlichen Daten Fusionsprozesse nicht (mehr) kategorisch aus [47, 109, 110, 131, 168]. Besonders die anschließenden intrazellulären Vorgänge wie Verschmelzung mit der Endosomenmembran werden oft in Zusammenhang mit Fusion diskutiert [47, 131, 153, 155]. Dem Helferlipid DOPE wird hierbei aufgrund seiner strukturbedingten Fähigkeit, hexagonale H_{II} -Phasen auszubilden und Lipiddoppelschichten zu destabilisieren [91], auch eine Rolle bei der Destabilisierung der Endosomenmembran zugeschrieben [32, 36, 108, 168]. Die mit der Endosomenauflösung [108, 146] verknüpfte DNA-Freisetzung aus dem Lipoplex bildet wiederum die Basis für die nächste und möglicherweise größere Hürde: den Weg bzw. die Aufnahme der intakten Ziel-DNA in den Zellkern [14, 30, 47, 68, 80, 102, 161]. Es wird diskutiert, ob eine Zellteilung für den Eintritt von Plasmid-DNA in den Kern erforderlich ist [34, 111, 166]. In direktem Zusammenhang dazu steht auch die Zellzyklusphase: Wie mehrfach gezeigt wurde, erzielen in der Mitose befindliche Zellen höhere Transfektionseffizienzen als

Zellen in der G1- oder gar G0-Phase [34, 102, 152]. Dies wirkt sich dementsprechend auf die Transfizierbarkeit verschiedener Zelltypen aus in Abhängigkeit von deren Teilungsrate und Differenzierungsgrad.

1.2.2.4 Zellsysteme

Vor dem Hintergrund einer (somatischen) Gentherapie sind gentherapeutisch interessante Zellen die Zielobjekte der Lipofektion (s. u.). Demgegenüber erfordert die Etablierung neuer Transfektionslipide und Transfervektoren⁴ (DNA/RNA) (siehe Kapitel 1.2.2.5) zunächst die Verwendung leicht transfizierbarer Zellsysteme. Deshalb wurden und werden vielfach etablierte Zelllinien in Transfektionsexperimenten eingesetzt.

Ein typisches Beispiel hierfür ist die COS-7-Zelllinie, eine der am häufigsten transfizierten adherenten Zelllinien, die vergleichsweise hohe Transfektionseffizienzen erbringt [35, 36]. Es handelt sich dabei um eine Nierenzelllinie der afrikanischen Grünen Meerkatze, die aus der Zelllinie CV-1 durch Transfektion mit Sequenzen des Simian Virus 40 hervorgegangen ist und das SV40-T-Antigen exprimiert [51]. Die Zellen können dadurch Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung tragen, unabhängig von der zelleigenen DNA replizieren. Ähnliche, oft benutzte Systeme sind tierische Fibroblasten- oder fibroblastenähnliche Zelllinien wie CHO [11], NIH 3T3 [11, 138] etc.

Daneben werden häufig humane Tumorzelllinien zum Vergleich der Transfektionseigenschaften verschiedener Lipid-DNA-Systeme eingesetzt: Zu diesen zählen Zelllinien wie HeLa [11, 138], MCF-7 [57] und Hep G2 [11, 138]. Auch Suspensionszellen wie (Tumor)zellen der Immunabwehr werden für Transfektionen eingesetzt, beispielsweise die Zelllinien Jurkat [57], THP-1 [68, 110] und MOLT-3 [138].

Primäre Zellen, wie die humanen Nabelschnurendothelzellen HUVEC [138], humane hämatopoietische Zellen [75] sowie primäre Fibroblasten [162] und Myoblasten [60, 144, 145], sind ein weiteres Target, u. a. weil sie nicht durch Transformation immortalisiert sind. Sie kommen daher einem anderen Zielobjekt der Gentherapie sehr nahe, somatischen, nicht entarteten Zellen in sich entwickelndem Gewebe. Zur Untersuchung gentherapeutischer Ansätze in puncto Zystischer Fibrose werden vielfach Lungenepithelzellen [96] sowie die CFT1-Zelllinie [149] in der Transfektion verwendet.

Als Weiterführung in Richtung In-vivo-Experimente [69, 133, 136] kann man die Transfektion von organotypischen Explantaten ex vivo sehen [72]. Targets von In-vivo-Transfektionsstudien sind beispielsweise respiratorische Epithelien [42, 55, 66, 149], murine Tumoren [106] und eine intravenöse/systemische Applikation [63, 83, 84, 92, 135].

Ebenso erweitern klinische Studien das Wissen über Wirkungsweise und Effektivität des lipidvermittelten Gentransfers im Hinblick auf eine somatische Gentherapie [15, 16, 44, 104, 147, 169].

⁴ Als *Vektoren* werden in dieser Arbeit ausschließlich DNA-Sequenzen, z. B. Reporterplasmide, bezeichnet.

1.2.2.5 Reportergene

Die Entwicklung beschränkt sich nicht nur auf die Ebene der Zellsysteme und der Transfektionslipide und -reagenzien; auch die transferierten genetischen Sequenzen sind Gegenstand der Forschung.

Vielfach werden mittels der Lipofektion sogenannte Reportergene übertragen, deren Genprodukte aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften, z. B. spezifischen Enzymreaktionen oder Fluoreszenz, in den Zellen nachgewiesen werden können. Die Reportergene sind in speziell konstruierte Plasmidvektoren eingebaut, welche in Bakterien vermehrt werden können. Zu den „klassischen“ Reportergenen gehören u. a. das LacZ-Gen (s. u.), das CAT-Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase [54] sowie Luciferase-Gene [148] und Gene für das grün fluoreszierende Protein GFP [23, 112]. Da für jedes der genannten Reportergene sowohl Plasmidvektoren als auch entsprechende Nachweisassays kommerziell erhältlich sind, ist der Erfolg des Gentransfers, Transfektionseffizienz bzw. -rate, schnell und in großem Maßstab kolorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch zu bestimmen [12].

Eine der am genauesten zu quantifizierenden Enzymreaktionen ist die Reaktion des Luciferaseproteins (das bekannteste stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) mit seinem Substrat D-Luciferin (Abb. 1.5). Dabei wird in Anwesenheit von ATP (unter Katalyse von Mg^{2+}) und Sauerstoff Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert.

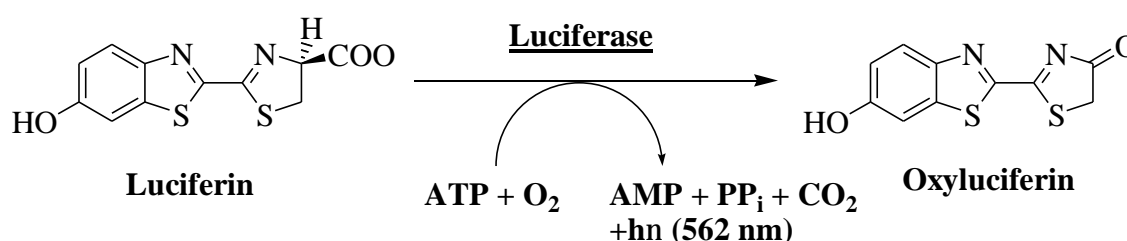


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Reaktion der Luciferase mit dem Substrat D-Luciferin

Bei dieser Reaktion entsteht sowohl CO_2 als auch Licht. Durch Messung der emittierten Lichtquanten kann die Luciferaseaktivität bestimmt werden. Diese Methode ist so sensitiv, dass sich bereits wenige Pikogramm Enzym nachweisen lassen. Ein Nachteil besteht darin, dass die Zahl der Zellen, die die Enzymreaktion zeigen, nicht quantifizierbar ist.

Hierzu muss auf ein anderes Reporterprotein wie die β -Galaktosidase zurückgegriffen werden [zur Übersicht siehe 12]. Deren Sequenz wird von dem bakteriellen LacZ-Gen codiert. Bei der enzymatischen Reaktion macht man sich die Fähigkeit des Enzyms zunutze, den Zucker Galaktose abzuspalten, um aus dem Substrat (z. B. X-Gal) ein farbiges Endprodukt zu erhalten. Letzteres erlaubt das einfache Auszählen der Transfektionsrate, d. h. den Prozentsatz gefärbter Zellen, unter dem Lichtmikroskop [88].

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen hat sich ein weiteres Reporterprotein als praktisch erwiesen: Das grün fluoreszierende Protein (GFP), das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt [23], zeigt direkt, in welchen Zellen es erfolgreich exprimiert wurde, ohne de-

ren Wachstum oder Vitalität zu beeinflussen. Daher ist es ideal, um beispielsweise den Zeitablauf zwischen Transfektion und Genexpression zu verfolgen.

Neben den Reportergenen sind zunehmend (Antisense-)Oligonucleotide [21, 75, 165], RNAs [43, 67] sowie PNAs (peptide nucleic acids) [163, 166] in Gebrauch. Nicht nur die Verpackungsform, sondern auch der Inhalt, die zu transferierende Information, ist Gegenstand der Forschungsansätze. Spezifische Gene wie Interferon- γ [106] und CFTR [2, 15, 100, 124] wurden bereits in Transfektionsexperimenten eingesetzt.

1.2.3 Lipofektion in einem Modellsystem

Trotz der Vielzahl der Studien über die Lipofektion, die nach den unterschiedlichsten Ansätzen durchgeführt wurden (oftmals mit divergierenden Resultaten), sind weite Teilbereiche immer noch unverstanden. Um die Lipofektion weiter zu erforschen und zu verbessern, ist ein systematisches Vorgehen erforderlich, mit dem es möglich ist, die verschiedenen beteiligten Faktoren separat zu beleuchten.

Wenn man ein konstantes Transfektionssystem verwendet, anhand dessen sich der Gentransfer leicht quantifizieren lässt, können Änderungen einzelner Versuchsparameter indirekt über den Transfektionserfolg erfasst und beurteilt werden. Ein solches, gut charakterisiertes System kann auf einer etablierten, einfach zu kultivierenden Zelllinie basieren. Verwendet man als Transfer-Vektor ein Plasmid mit einem Reportergen, welches in den (eukaryontischen) Zielzellen exprimiert wird, so sind zwei Ziele erfüllt: Man erhält zum ersten einen leicht zu beschaffenden, weil in Bakterien klonierbaren Vektor. Zum zweiten kann durch Wahl eines geeigneten Reportergens das Genprodukt leicht anhand seiner spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion oder direkt in der Zielzelle detektiert werden (s. Kap. 1.2.2.5). Der variable Parameter bei der Optimierung der durch kationische Lipide vermittelten Transfektion kann dabei sowohl in der gezielten Variation verschiedener Lipidstrukturen als auch in der Liposomen- und Lipoplexzusammensetzung liegen. Dies schließt nicht aus, dass andere Parameter wie die Zelllinie oder das Reportergen sukzessive verändert werden können, um das Wirkungsspektrum der Lipide zu testen.

Letztlich soll es möglich sein, mit einem derartigen Transfektionssystem Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den kationischen Lipiden und ihrer Fähigkeit, eukaryontische Zellen zu transfizieren, aufzudecken.

1.2.3.1 Screeninggedanke

Um möglichst viele und vielseitige Daten über die lipidvermittelte Transfektion zu erhalten, ist es sinnvoll, eine große Zahl von Lipiden zu testen und in ihrer Wirksamkeit miteinander zu vergleichen. Voraussetzung für ein solches systematisches *Lipidscreening* ist ein funktionierendes Testsystem (s. o.). Anhand ausgewählter Parameter werden die Lipide mit der höchsten Transfektionseffizienz ausfindig gemacht. „*Hits*“ können in weiterführenden Experimen-

ten genauer untersucht werden, um Aufschlüsse über zugrunde liegende Prinzipien der Transfektion zu gewinnen.

Da die Durchführung eines Screenings mit hohem Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist, bietet sich eine Automatisierung des Verfahrens an. Diese hat einen weiteren Vorteil: hohe Reproduzierbarkeit. Manuelles Pipettieren ist bedingt durch die (Steuerung der) Motorik des Körpers immer mit einem gewissen mechanischen Fehler verbunden, selbst wenn die Experimente subjektiv gleich durchgeführt werden. Durch den Übertrag auf einen Pipettierroboter wird dieser mechanische Fehler minimiert, da sämtliche Pipettiervorgänge gleichmäßig und mit hoher Präzision ablaufen.

1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens zum Test neuer kationischer Transfektionslipide. Hierzu sollte ein Modellsystem etabliert werden, mit dem Lipofektionen adhärenter Zellen im 96-Well-Plattenformat durchgeführt werden können.

Dieses System sollte auf einen zur Verfügung stehenden Pipettierroboter (*Genesis RSP 150*, Tecan, Crailsheim) (Abb. 1.6) übertragen werden. Mittels des automatisierten Transfektionsverfahrens sollte in einem Screening das Transfektionsverhalten verschiedener kationischer Lipide, Lipidmischungen sowie kommerziell erhältlicher Transfektionsreagenzien in mehreren Zelllinien verglichen werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen sollten Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Lipiden und ihrem Transfektionsverhalten abgeleitet werden.

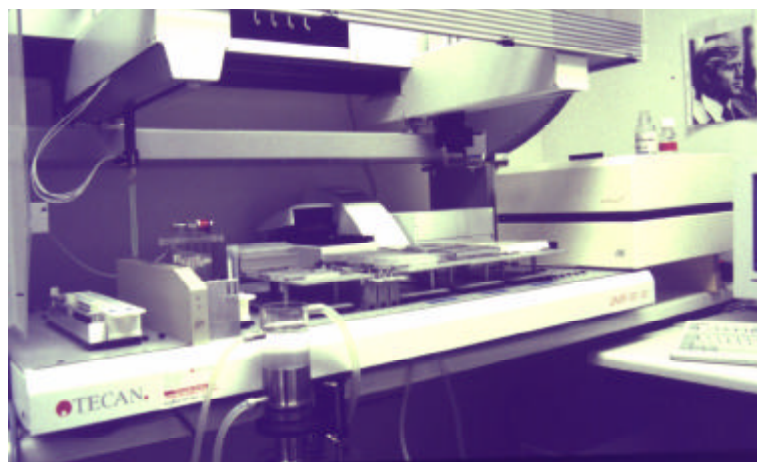


Abb. 1.6 Darstellung des in dieser Arbeit zur automatisierten Lipofektion eingesetzten Pipettierroboter-Systems (*Genesis RSP 150*, Tecan, Crailsheim)

Mit Hilfe der automatisierten Transfektion sowie fluoreszenzmikroskopischer Methoden sollten verschiedene Aspekte zum Mechanismus der Lipofektion näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Lipide/Transfektionsreagenzien

Die Reinheit der verwendeten Chemikalien wurde vom Hersteller garantiert bzw. für im Labor synthetisierte Substanzen dünnschichtchromatographisch überprüft.

CACNMe ₃ , CACxEt	[38]
CACxy (x = 3-6, y = 2-3)	[38]
CC2NMe ₃ , CC24Et, CC243	[38]
Cholesterol	(Merck)
CS243, CS343	[38]
DC-CHOL	(zur Verfügung gestellt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe)
DMGAcNMe ₃ , DMGAc4Et	[38]
DMGAc43	[38]
DMRIE	(zur Verfügung gestellt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe)
DOPE	(Sigma)
DOTAP	
als Festsubstanz	(zur Verfügung gestellt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe [95])
liposomal	(Roche)
DOSPER	(Roche)
FuGENE™6	(Roche)
Lipofectamine	(Life Technologies, Karlsruhe)
Lissamine™-rhodamine B-DHPE	(Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
Transfectam®	(Promega, Mannheim)

2.1.2 Plasmide und zugehörige Substanzen

2.1.2.1 Plasmide

pCMXluc	zur Verfügung gestellt von Dr. R. Schüle, Uniklinik Freiburg
pCMXβ-Gal	zur Verfügung gestellt von Dr. R. Schüle
pGL2c	zur Verfügung gestellt von Dr. M. Mundt, Uniklinik Freiburg
pRSVluci	zur Verfügung gestellt von Dr. B. Buchberger, Roche, Penzberg
pEGFP-C3	zur Verfügung gestellt von PD Dr. A. Burger, Oncotest, Freiburg

2.1.2.2 Substanzen für die Plasmidreinigung

Ampicillin	(Sigma) Stammlösung: 1 % in A. d.
Einfriermedium	LB-Medium/Glycerin 1:1 (v/v)
LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (Life Technologies)
Plasmid Maxi Kit	(Qiagen, Hilden)

2.1.2.3 Substanzen für die Gelelektrophorese

Agarose	(SeaKem® GTG®, FMC, Rockland, ME, USA)
DNA-Längenstandard	λ -Phagen-DNA (Hind III-restringiert) (Roche)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)
Loading Buffer (5 ×):	0,25 % Bromphenolblau (Sigma), 40 % Glycerol (Merck)
TAE	Arbeitslösung: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (beide Merck)

2.1.3. Assays und zugehörige Puffer**2.1.3.1 Assays und zugehörige Reagenzien**

β -Gal-Staining Set	(Roche, Mannheim)
BCA-Reagenzien A und B	(Pierce, Rockford, IL, USA)
BSA	Fraktion V (Sigma)
MTT	„Cell Proliferation Kit I“ (Roche)
WST-1	„Cell Proliferation Reagent“ (Roche)

2.1.3.2 Puffer

Eisenpuffer (β -Gal-Assay):	2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O, 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] in PBS, pH 7,4 (alle Sustanzen: Merck)
Fixativ für β -Gal-Assay:	2 % Formaldehyd (Merck), 0,2 % Glutaraldehyd (Sigma) in PBS
HBS:	20 mM HEPES (Merck), 130 mM NaCl (Merck), pH 7,4
Luciferin-Substratlösung:	25 mM Glycylglycin (Fluka), 5 mM ATP (Roche), 0,2 mM D-Luciferin (Serva, Heidelberg)
Lysepuffer „A“ [154]:	25 mM Glycylglycin (Fluka), 5 % Glycerol (Merck), 8 mM MgSO ₄ (Merck), 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM DTT, pH 7,8
Lysepuffer „B“:	Reporter Gene Assay Lysis Buffer 1 × (5 × Stammlsg., Roche)
Lysepuffer „C“ [3]:	0,1 mM K ₃ PO ₄ (Merck), 1 % Triton X-100 (Roth), 1 mM DTT (Fluka), 2 mM EDTA (Merck), pH 7,8
Lysepuffer „D“ [36]:	0,1 % Triton X-100 (Fluka), 250 mM Tris (Merck), pH 8,0
Lysepuffer/NaCl:	62,5 % (v/v) Lysepuffer „B“, 37,5 % (v/v) 0,9 % NaCl
X-Gal-Lösung:	20 mg/ml (Roche) in DMSO (Sigma)

2.1.4 In der Zellkultur eingesetzte Substanzen

Antimycin A	(Sigma)
Cytochalasin B	(Sigma)
DMEM/Ham's F12 1:1	(Life Technologies)
EMEM	(BioWhittaker, Verviers, Belgien)
Endothelial Cell Growth Medium	(PromoCell, Heidelberg)
FCS	(BioWhittaker)
Gentamicin	10 mg/ml (Sigma)
NaN ₃	(Merck)
PBS-Puffer	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O, 1,9 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl (alle Merck), pH 7,4
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (BioWhittaker)
RPMI-1640	(Life Technologies)
Trypanblau	0,04 % (Sigma)
Trypsin-Versene	500 mg/l Trypsin (1:250), 200 mg/l EDTA (BioWhittaker)

2.1.5 Sonstige Chemikalien

CHCl ₃ /MeOH	2:1 (v/v) (Merck, Darmstadt)
DPH	(Fluka, Deisenhofen)
Tetrahydrofuran	getrocknet (Merck)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden in 250 ml-Kulturflaschen (Greiner) im Brutschrank (Heraeus 600) bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Kulturmedien für die verschiedenen Zelllinien waren wie folgt zusammengesetzt (Tab. 2.1):

Zelllinie	Medium	Zusätze	Aussaat in 96-Well (Anzahl)
COS-7 Niere, Afrikan. Grüne Meerkatze	EMEM	10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin	5000 od. 10000
MEXF462NL ² Melanom, human	RPMI-1640	10 % FCS, 0,5 % Gentamicin	10000
RXF944L ² Nierenkarzinom, human	RPMI-1640	10 % FCS, 0,5 % Gentamicin	10000
HT-29 ² Colonkarzinom, human	RPMI-1640	10 % FCS, 0,5 % Gentamicin	10000
16HBE-140- [77] ³ Bronchioepithelzelllinie, human	DMEM/Ham's F12 1:1	10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin; in spezieller Beschichtung [77]	9000
HUVEC ⁴ primäre Nabelschnurendothelzellen, human	Endothelial Cell Growth Medium	5 % FCS (2 % schon im Medium enthalten) kollagenbeschichtete Kulturflaschen (Falcon)	5000; max. bis zur 9. Passage

Tab. 2.1 Kulturmedien und Zusätze für die in dieser Arbeit verwendeten Zell(lini)en

¹ ATCC CRL-1651

² Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Fa. Oncotest, Freiburg, zur Verfügung gestellt.

³ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dipl. Biol. A. Knorre, Universitätsklinik Freiburg.

⁴ Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. B. Barleon, Klini für Tumorbiologie, zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden nach Standardmethoden kultiviert [65] und in der Regel je einmal pro Woche unter sterilen Bedingungen in neue Flaschen passagiert sowie einmal pro Woche mit frischem Medium versetzt [89]. Verwendete Puffer und Medien wurden hierzu jeweils auf 37 °C temperiert. Für die Zellpassage der adhärennten Zellen wurde das verbrauchte Medium (d. h. der Überstand über dem Zellmonolayer in der Kulturflasche) abgesaugt, die Zellen ein- bis zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1-2 ml pro Flasche Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Nach 1- bis 5-minütiger Inkubation bei 37 °C und mikroskopischer Kontrolle im Auflichtmikroskop (Olympus CK2) wurden die abgelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen und in ein 50 ml-Polypropylenröhrchen (Greiner) überführt. Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm (258 × g) pelletiert und das Pellet in 3 bis 5 ml Medium resuspendiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen 1:25 bis 1:30 verdünnt in neue Flaschen mit je 10-12 ml frischem Medium gegeben. Alle verwendeten

Zelllinien wurden routinemäßig auf Anwesenheit von Mykoplasmen untersucht und gegebenenfalls entseucht [89].

Für die Transfektionsexperimente wurde die Zahl resuspendierter Zellen pro ml mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer [89] oder eines Zellzählgerätes (CASY 1, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Je nach Zelllinie wurden anschließend 5000 oder 10000 Zellen in 200 µl Medium pro Kavität (im folgenden als „Well“ bezeichnet) in 96-Well-Zellkultur-Platten (Greiner) ausgesät (Tab. 2.1). (Ausnahme: HUVEC-Zellen wurden in kollagenbeschichteten 96-Well-Platten (Falcon) kultiviert). Für 6-Well-Platten (Greiner) oder 3,5 cm-Schalen (Greiner) wurden 150000 bis 200000 Zellen in 2 ml Medium verwendet. Zur Bestimmung einer geeigneten Zellzahl pro Well bei verschiedenen Zelllinien wurden jeweils verschiedene Zellzahlen (z. B. 2500, 5000, 10000) auf einer 96-Well-Platte ausgesät. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils 5000 COS-7-Zellen pro Well verwendet. Die Zellen wurden ca. 24 h nach dem Aussähen bei einer Konfluenz zwischen 30 % und 50 % transfiziert.

2.2.2 Plasmidreinigung

Für die meisten Transfektionsexperimente wurde das Plasmid pCMXluc als Gentransfervektor verwendet. Das Plasmid wurde aus transformierten *E. coli* mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurden je 50 µl des Bakterienvorrats, der in -80 °C aufbewahrt wurde, aufgetaut, in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium und 150 µl Ampicillin (1%ige Stammlösung) gegeben und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

Das weitere Vorgehen zur Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisung des Kit-Herstellers (Qiagen). Die mit Hilfe des Kits isolierte und gereinigte DNA (Pellet) wurde in autoklaviertem A. d. über Nacht bei 4 °C gelöst und die Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt [119]. Hierzu wurde die Absorption bei 260 und 280 nm in einem Photometer (Beckmann DU 640 Spektrophotometer) gemessen. Der Quotient A280/A260 lag in allen Fällen zwischen 1,6 und 2. Die DNA-Konzentration pro ml wurde aus dem A260-Wert durch Multiplikation mit dem Faktor 50 berechnet. Zusätzlich wurde das Plasmid auf einem Agarose-Gel in einer Gelelektrophorese überprüft [119]. Das Gel aus 1%iger Agarose in TAE-Puffer (w/v) wurde mit 3 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 50 ml Gel gefärbt und in eine Gelkammer gegossen. Pro Spur wurden ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit A. d. ad 10 µl und 2,5 µl Loading-Buffer aufgetragen. Als DNA-Längenstandard wurde statt der Plasmid-DNA 1 µg λ-Phagen-DNA (Hind III-restringiert) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 45 min bei 90 V durchgeführt und das Gel anschließend auf einem Transilluminator betrachtet. Die DNA wurde in 50 µl-Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) in einer Konzentration von 1 mg/ml bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3 Liposomenherstellung

2.2.3.1 Manuelle Methode

Zur Herstellung von Liposomen wurden die verwendeten Lipide in autoklavierte Reagenzgläser (100 × 16 mm, Assistent) eingewogen und in ca. 1 ml CHCl₃/MeOH (2:1; v/v) gelöst. Wurden Helferlipide eingesetzt, wurden diese entweder direkt in das Reagenzglas mit dem betreffenden Lipid eingewogen oder aus einer Stammlösung (z. B. 2,58 mM in CHCl₃/MeOH (2:1; v/v)) zugesetzt und das betreffende Lipid darin gelöst. Rhodamin-markierte Liposomen (zur Fluoreszenzmikroskopie, siehe Kapitel 2.2.6.4) wurden entsprechend durch Zugabe von 1 mol-% LissamineTM-Rhodamin B in CHCl₃/MeOH (2:1) unter Lichtschutz in die Lipidlösung hergestellt. Das Lösungsmittel wurde in einer Abdampfapparatur (Vapotherm, TCS-Probenaufbereitungssystem, Labor-Technik Barley, Bielefeld) mit Hilfe eines N₂-Gasstroms entfernt und so ein Lipidfilm an der Reagenzglaswand hergestellt. Der fertige Lipidfilm wurde mit sterilem HBS-Puffer versetzt, sodass das kationische Lipid in einer Endkonzentration von 1,29 mM vorlag. In einzelnen Fällen wurden mehrfach kationische Lipide in anderen Molaritäten verwendet (z. B. 0,645 mM bei zweifach kationischen oder 0,43 mM bei dreifach kationischen Lipiden, Kapitel 3.1.1). Das Reagenzglas wurde mit Parafilm® (Greenwich, CT, USA) verschlossen und die Lipide ca. 20 min bei RT in dem Puffer rehydratisiert. Zur Herstellung einer Liposomendispersion wurde das Reagenzglas für zwei Minuten in ein auf 30 °C temperiertes Ultraschall-Wasserbad (Sonopuls GM 200, Bandelin, Berlin) bei kontinuierlichem Beschallungsmodus (100 % Pulsdauer) und 40 % Gesamtleistung gehalten. Für anfängliche Optimierungen wurden sowohl andere Beschallungsmodi (Dauer, Beschallungsmodus, Pulsdauer) als auch -temperaturen eingesetzt (siehe 3.1.1). Die Liposomendispersion wurde unmittelbar nach Herstellung zur Bildung von Lipoplexen sowie zur Größenbestimmung der Liposomen weiterverwendet.

2.2.3.2 Automatisierte Methode

Das automatisierte Verfahren wurde mit Hilfe des Pipettierroboters *Genesis* RSP 150 (Tecan, Crailsheim), dem sämtliche hier angegebenen Arbeitsschritte übertragen wurden, durchgeführt.

Die in CHCl₃/MeOH (2:1; v/v) gelösten Lipide (1,29 mM, Ausnahmen s. o.) wurden in braunen Gläschen mit Septum in ein spezielles Gestell (*Rack*) des *Genesis* gestellt. Je 1 ml der Liposomenlösung wurde in autoklavierte Reagenzgläser pipettiert. Hierbei wurde der Pipettiermodus der Nadeln so eingestellt, dass sie ein Septum durchstechen konnten. Wenn Helferlipide verwendet wurden (z. B. DOPE in 2,58 mM Lösung), erfolgte die Zugabe eines entsprechenden Volumens (z. B. 0,5 ml DOPE bei einer 1:1 Mischung) in das Reagenzglas mit dem betreffenden Lipid. Das Lösungsmittel wurde durch einen (von der Firma Tecan) speziell konstruierten Abblaskamm, durch den N₂-Gas direkt in die Reagenzgläser mit den gelösten Lipiden geleitet wurde, entfernt. Durch Zugriff des Robotergreifarms wurde ein Quetschventil

in dem Kamm geöffnet und der Stickstoff in die Abblasnadeln geleitet. Die Abblasdauer wurde auf 1 h eingestellt. Anschließend wurde je 1 ml sterilen HBS-Puffers zugesetzt (Endkonzentration 1,29 mM, Ausnahmen s. 2.2.3.1) hydratisiert. Zur Liposomenherstellung wurden die Reagenzgläser einzeln von dem Greifarm zum Ultraschallbad transportiert und für zwei Minuten in das Ultraschallbad gehalten (s. 2.2.3.1). Durch die Abwärtsbewegung des Greifarms wurde ein Kontaktschalter betätigt, der den Ultraschall während dieses Zeitintervalls auslöste. Nach der Beschallung wurden die Reagenzgläser mit der Liposomendispersion, die zur Lipoplexbildung weiterverwendet wurde, jeweils in das Ausgangsrack zurücktransportiert.

2.2.3.3 Größenbestimmung von Liposomen

Die Größenverteilung der Liposomen wurde in einem Nicomp Submicron Particle Sizer, Autodilute Model 370 (Nicomp, Sta. Barbara, CA, USA) bestimmt und diente zugleich der Dokumentation der Liposomenstabilität [171]. Die Liposomendispersion wurde in Borosilikat-Gläschen (6 × 50 mm, Kimble, IL, USA) pipettiert und gegebenenfalls mit HBS-Puffer verdünnt, um eine Soll-Intensität von 200-300 kHz zu erreichen. Die Größenverteilung der Liposomen wurde während 15 min bei RT in der Einstellung „Vesikel“ und „Anzahl“ (der Vesikel) verfolgt. Die Zahl der Vesikel wurde (gerätintern) entweder mit einer Gauß-Verteilung ($\chi^2 < 3$) berechnet oder mit einer sogenannten Nicomp-Verteilung ($\chi^2 > 3$).

2.2.4 Herstellung der Lipoplexe und Transfektion

2.2.4.1 Protokoll für die manuelle Lipoplexbildung und Transfektion

Im 6-Well: Etwa 1 h vor Zugabe der Lipoplexe auf die Zellen wurde 1 ml des Zellkulturmediums aus den betreffenden Wells abgenommen. Der Lipoplexansatz für 6-Wells wurde gemäß der Produktinformation für DOTAP (Roche) durchgeführt: Pro Well wurden 2,5 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit HBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl verdünnt. Je 15 µl der Liposomendispersion (1,29 mM) wurden ad 50 µl in HBS verdünnt. Die DNA-Lösung wurde bei RT zu der Liposomendispersion pipettiert und vorsichtig gemischt. Für Mehrfachansätze wurden die Mengen an DNA, Liposomen und Puffer entsprechend vervielfacht.

Nach 15- bzw. 60-minütiger Inkubation bei RT (Kapitel 3.1.2.2) wurde der Lipoplexansatz vorsichtig gemischt und je 75 µl eines Lipoplexansatzes in das betreffende Well pipettiert. Nach 4-6 h erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das „Transfektionsmedium“ vollständig abgenommen und durch 2 ml vorgewärmtes Medium ersetzt wurde.

Im 96-Well: Der Ansatz entspricht im Wesentlichen dem 6-Well-Ansatz mit auf 1/20 reduzierten Volumina.

Circa 1 h vor Zugabe der Lipoplexe auf die Zellen wurden 100 µl Medium vorsichtig aus jedem Well entfernt. Wurden Experimente mit serumfreiem Medium durchgeführt, so wurde das

Medium komplett abgenommen und durch 100 µl serumfreies Medium ersetzt. Wenn nicht anders angegeben (Kapitel 3.1.2.2), wurden Liposomen und DNA jeweils in HBS verdünnt. Zur Herstellung der Lipoplexe wurden in der Regel 0,125 µg Plasmid-DNA pro 96-Well verwendet. Das Plasmid (1 mg/ml) wurde 1:240 in HBS-Puffer verdünnt. Die Transfektionen wurden generell in Mehrfachbestimmungen aus einem Komplexierungsansatz durchgeführt, in der Regel in Achtfachbestimmung, d. h. je 8 Wells einer 96-Well-Platte wurden mit Lipoplexen aus ein und demselben Komplexierungsansatz transfiziert. Für Standard-Ansätze mit DOTAP im Ladungsverhältnis (LV) 2,5 (Lipid/DNA) wurden 7,5 µl der Liposomendispersion und 592,5 µl HBS in ein 15 ml-Polypropylen-Röhrchen (Greiner) oder ein 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert. Zur Lipoplexbildung wurden anschließend 300 µl DNA-HBS-Lösung zu 600 µl verdünnter Liposomendispersion gegeben und vorsichtig gemischt. (Das Volumenverhältnis der Liposomendispersion zur DNA-HBS-Lösung betrug stets 2:1 analog zum Protokoll DOTAP (Roche)). Die Komplexierungszeit betrug in der Regel 15 min, im modifizierten Protokoll (siehe Kapitel 3.1.2.2) 60 min. Nach vorsichtigem Mischen wurden je 90 µl des Lipoplexansatzes in ein 96-Well pipettiert. In der Regel wurden die Zellen anschließend 2 min bei 1200 rpm ($258 \times g$) zentrifugiert. Die Inkubationszeit der Lipoplexe auf den Zellen betrug 4 h (mit Ausnahme spezieller Experimente); für anfängliche Versuche wurde 6 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das „Transfektionsmedium“ vollständig abgenommen und durch 200 µl vorgewärmtes Medium ersetzt wurde. Auch im Falle von serumfreiem Transfektionsmedium wurden die Zellen nach dem Mediumwechsel wieder in serumhaltigem Medium kultiviert.

2.2.4.2 Protokoll für die automatisierte Lipoplexbildung und Transfektion

Die Vorbereitung der Zellkulturplatten war nicht in den automatisierten Ablauf eingebunden und erfolgte wie unter 2.2.4.1 dargestellt.

(1) Für anfängliche Studien der Lipoplexbildung im *Genesis* wurden 4 Ladungsverhältnisse pro Lipid verwendet. Aus robotertechnischen Gründen wurde die frisch beschallte Liposomendispersion 1:10 mit HBS verdünnt und in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert (Endkonzentration 0,129 mM). Ladungsverhältnisse und Volumina für die Lipoplexbildung wurden, wie in Tab. 2.2 angegeben, verwendet.

Ladungsverhältnis (LV)	1,6	2,1	2,7	3,2	DOTAP-Standard (2,7)
Gesamtvolumen des Komplezierungsansatzes (μl)	450	450	450	450	900
Bestandteile	Anteil am Komplezierungsansatz (μl)				
Liposomendispersion 0,129 mM ¹	24	32	40	48	520
HBS	276	268	260	252	80
DNA-Lösung (1 mg/ml; 1:240 verdünnt in HBS)	150	150	150	150	300
	Übertrag der Lipoplexdispersion aus dem Komplezierungsansatz in 96-Well (Anzahl \times μl)				
Lipoplexdispersion in MTP ²	3 \times 90	3 \times 90	3 \times 90	3 \times 90	4 \times 90
Lipoplexdispersion in MTP ³	3 \times 45	3 \times 45	3 \times 45	3 \times 45	4 \times 90
HBS in MTP vorgelegt ³	3 \times 45	3 \times 45	3 \times 45	3 \times 45	

Tab. 2.2 Zusammensetzung der Komplezierungsansätze für die Transfektion einer 96-Well-Platte

¹Die Molaritätsangabe bezieht sich auf monokationische Lipide.

²In jeweils eine Hälfte der 96-Well-Platte (MTP) sowie für den DOTAP-Standard wurden 90 μl der Lipoplexdispersion pro Well pipettiert.

³In der zweiten Hälfte der Platte wurde die halbe Lipoplexmenge pro Well zugegeben und das fehlende Volumen durch HBS ausgeglichen.

Für jeden Lipoplextyp und Ladungsverhältnis wurden je drei 96-Well transfiziert (siehe Abb. 3.1 zum Plattenlayout).

Um die Transfektionseffizienz anhand der Luciferaseaktivität zu bestimmen, wurde stets das Plasmid pCMXluc (Stammlösung 1 mg/ml) eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde jeweils zu der Liposomendispersion in ein 1,4 ml-„Deep-Well“-Röhrchen in einer 96-Well „Deep-Well“-Platte (*Micronics*) pipettiert und der Ansatz vorsichtig gemischt. Nach 15 min Komplexierung bei RT wurde die Lipoplexdispersion erneut gemischt und dreimal je 90 μl bzw. 45 μl aus jedem Ansatz im Multipipetting in ein 96-Well der Zellkulturplatte gegeben. Zum Volumenausgleich wurden bei halbem Lipoplexvolumen (45 μl) vor Zugabe des Lipoplexdispersion je 45 μl HBS in die entsprechenden Wells vorgelegt (zum Plattenlayout siehe Abb. 3.1).

(2) Für das zweite Protokoll der automatisierten Lipoplexbildung wurden 8 verschiedene Ladungsverhältnisse (kationisches Lipid/anionische DNA) pro Lipid eingesetzt. Die Volumina wurden so berechnet, dass pro LV je drei Wells transfiziert werden konnten; aus robotertechnischen Gründen (10 % Überschussvolumen in den Nadeln) wurde ein etwas größeres Volumen (Ansatz für 4 Wells) verwendet und die Liposomendispersion bei monokationischen Lipiden 1:10 vorverdünnt (Endkonzentration 0,129 mM). Für den DOTAP-Standard wurde lediglich das LV 2,5 in Achtfachbestimmung verwendet (Ansatz erfolgte im Überschuss für 10 Wells). Folgende Volumina wurden eingesetzt (Tab. 2.3):

Ladungsverhältnis (LV)	0,5	1	1,5	2,5	3,5	5	7,5	10	DO-TAP-Standard LV 2,5
Gesamtvolumen des Komplexierungsansatzes (µl)	360	360	360	360	360	360	360	360	900
Bestandteile	Anteil am Komplexierungsansatz (µl)								
Liposomendispersion 0,129 mM*	6	12	18	30	42	60	90	120	525
HBS	234	228	222	210	198	180	150	120	75
DNA-Lösung (1 mg/ml; 1:240 verdünnt in HBS)	120	120	120	120	120	120	120	120	300
	Übertrag der Lipoplexdispersion aus dem Komplexierungsansatz in 96-Wells (Anzahl × µl)								
Lipoplexdispersion in 96-Wells	3 × 90	3 × 90	3 × 90	3 × 90	3 × 90	3 × 90	3 × 90	3 × 90	8 × 90

Tab. 2.3 Komplexierungsansätze für ein Lipid in 8 Ladungsverhältnissen sowie den DOTAP-Standard zur Belegung einer 96-Well-Platte

Auf die Zielplatte wurden pro 96-Well je 90 µl der Lipoplexdispersion zugegeben, für jedes Ladungsverhältnis erfolgte die Zugabe in Dreifachbestimmung.

*Die Angabe bezieht sich auf ein monokationisches Lipid.

Die Ansätze wurden in eine *Deep-Well*-Platte pipettiert, vorsichtig gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Die Zugabe der Lipoplexdispersion auf die Zielplatte erfolgte in Dreifachbestimmung, für den DOTAP-Standard in Achtfachbestimmung. Das Plattenlayout war analog zu dem in Abb. 3.31 dargestellten.

(3) Im Hinblick auf die Testung zweifach und dreifach positiv geladener Lipide wurde das Protokoll (2) durch Verwendung von Ladungsverhältnissen in gleichmäßigen Abständen von LV 1-15 modifiziert. Dadurch ergab sich für die Zeilen 1 bis 3 in Tab. 2.3 einige Änderungen (Tab. 2.4).

Um für verschiedene Lipide gleiche Ladungsverhältnisse zu erhalten, wurden die Liposomendispersionen zweifach oder dreifach positiv geladener Lipide entsprechend stärker vorverdünnt (1:20 bzw. 1:30) als die monokationischer Lipide (Vorverdünnung 1:10), was zu Liposomendispersionen von 0,065 mM bzw. 0,043 mM führte (siehe * in Tab. 2.4). Alternativ wurde, wenn die Konzentration der Liposomendispersion für mehrfach kationische Lipide auf 0,65 bzw. 0,43 mM herabgesetzt wurde (siehe Liposomenherstellung), die 1:10-Verdünnung beibehalten (siehe 3.1.1).

Ladungsverhältnis	1	3	5	7	9	11	13	15	DOTAP-Standard LV 2,5
Bestandteile	Anteil am Komplezierungsansatz (µl)								
Liposomendispersion 0,129 mM*	12	36	60	84	108	132	156	180	525
HBS	228	204	180	156	132	108	84	60	75

Tab. 2.4 Ergänzung von Tab. 2.3 für Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse von 1 bis 15

*Die Molaritätsangabe bezieht sich auf monokationische Lipide; für di- und trikationische Lipide wurden Liposomendispersionen der Konzentration 0,65 mM bzw. 0,43 mM verwendet (siehe Text).

Die Komplexbildungszeit betrug 1 h und wurde so eingestellt, dass das Zeitintervall zwischen vollendeter Lipoplexbildung für die jeweilige Zielplatte und Zugabe der Lipoplexe auf die entsprechende Zellkulturplatte je 1 h betrug. Der Lipoplexdispersionen wurden nach wie vor in Dreifachbestimmung pro Lipid und Ladungsverhältnis bzw. in Achtfachbestimmung für den DOTAP-Standard auf die Zielplatte pipettiert.

Nach der Zugabe der Lipoplexe wurden die Zellen in den Kulturplatten 2 min bei $258 \times g$ (1200 rpm) zentrifugiert und anschließend bis zum Mediumwechsel 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Mediumwechsel wurde die Inkubation für weitere 42 h fortgesetzt.

2.2.4.3 Transfektion bei simultaner Variation von Lipid- und DNA-Menge

Für einzelne Versuche (Kapitel 3.1.2.2) wurde neben der Lipidmenge auch die DNA-Menge variiert. Hierzu wurde das zu testende Lipid auf drei Zielplatten insgesamt neunmal verwendet (entsprechend wie 3×3 Lipide auf drei Platten) und für jeden Ansatz eine DNA-Lösung spezifischer Konzentration eingesetzt. Die DNA-Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen mit folgenden Volumina angesetzt (Tab. 2.5).

DNA-Menge pro Well der Zielplatte (µg)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0
DNA (1 mg/ml) (µl)	80	40	20	10	5	2,5	12,5*	6,25*	0
HBS (µl)	1120	1160	1180	1190	1195	1197,5	1187,5	1194	1200
Verdünnung	1:15	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	-

Tab. 2.5 Ansatz der DNA-Lösungen zur Lipofektion bei simultaner Variation von DNA- und Lipidmenge

Die angegebenen DNA-Mengen sind jeweils für die Zugabe von 120 µl in 8 *Deep-Well*s (d. h. für 8 Lipidkonzentrationen) berechnet. *Für Volumina kleiner als 2 µl wurde aus robotertechnischen Gründen eine DNA-Stammlösung von 0,1 mg/ml verwendet.

Die in Tab. 2.5 angegebenen Volumina beinhalten Reservevolumina zur Pipettierung im *Genesis*. Pro Lipidkonzentration (entsprechend den für 8 Ladungsverhältnisse eingesetzten Lipidmengen) wurden je 120 µl der jeweiligen DNA-Verdünnung zu der Liposomendispersion

im *Deep-Well* pipettiert. Anstelle der üblicherweise verwendeten DNA-Lösung (1:240 verdünnt) wurden die DNA-Lösungen in 15 ml-Polypropylenröhrchen (Greiner) jeweils vor der DNA-Zugabe in die entsprechenden *Deep-Wells* auf dem zugehörigen Rack im *Genesis* positioniert. Das weitere Procedere verlief gemäß dem in Kapitel 2.2.4.2 dargestellten Verfahren.

2.2.4.4 Anwendung des automatisierten Transfektionsverfahrens auf ein Screeningexperiment

In diesem Experiment (Kapitel 3.2) wurden 36 kationische Lipide bzw. kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien in dem automatisierten Verfahren (siehe unter 2.2.5.2) eingesetzt.

Verwendetes Zellmaterial

Die Testlipide bzw. -reagenzien wurden jeweils in insgesamt sechs Transfektionsblöcken auf sechs Zelllinien getestet: HUVEC, MEXF462NL, RXF944L, HT-29, 16HBE-140⁺ und COS-7. Die Kultivierung und Vorbehandlung der Zellen für die Transfektion wurde, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, durchgeführt.

Einwaage/Ansatz der Lipide bzw. Transfektionsreagenzien

Bei der Einwaage der in der Arbeitsgruppe synthetisierten Lipide wurde die Anzahl der Aminofunktionen in der Kopfgruppe (von eins bis drei) berücksichtigt und entsprechend unterschiedlich konzentrierte Lipidlösungen in CHCl₃/MeOH (2:1; v/v) hergestellt (siehe unter 2.2.3.1). Alle Ansätze beinhalteten einen zehnfachen Ansatz (Tab. 2.6), sodass die Lipidlösung auf insgesamt zehn Reagenzgläser verteilt werden konnte. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurden die Reagenzgläser jeweils mit *Parafilm*[®] verschlossen und bei -20 °C aufbewahrt. Durch Zugabe eines genau berechneten Volumens von HBS-Puffer unmittelbar vor Herstellung der Liposomen im jeweiligen Experiment wurden folgende Endkonzentrationen erzielt: für monokationische Lipide 1,29 mM, für Lipide mit zwei Aminofunktionen 0,65 mM und für Lipide mit drei Aminofunktionen 0,43 mM. Unter dieser Voraussetzung konnten alle Lipide dem gleichen Vorverdünnungsschritt (1:10) im automatisierten Verfahren unterworfen werden (2.2.4.2). Von den Helferlipiden wurden jeweils separate Stammlösungen in Stammlösungen in CHCl₃/MeOH (2:1; v/v) hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurde gegebenenfalls DOPE jeweils in äquimolarem Verhältnis zugegeben (lediglich DC-CHOL:DOPE wurde im Verhältnis 3:2 kombiniert), Cholesterol (CHOL) im Molverhältnis 2:1 (kationisches Lipid:CHOL) (Tab. 2.6).

Tab. 2.6 zeigt die Einwaagen und Lösungsmittel- sowie HBS-Volumina für die einzelnen Lipide.

kation. Lipid	Mol- masse	10facher Ansatz					Aliquot		
		Einwaage (mg)	(μ mol)	Helferlipid	(μ mol)	(ml)	Restvol. LM (ml)	HBS (ml)	Endkonz. (mM)
DOPE	744,00	59,08	79,41	Stamml.	8,6 mM		9,234		
DOPE	744,00	58,44	78,55	Stamml.	8,6 mM		9,134		
CHOL	387,67	8,42	21,72	Stamml.	4,3 mM		5,151		
DOTAP	774,21	10,14	13,10				5,000	1,015	1,29
DOTAP		10,36	13,38	DOPE	13,38	1,556	3,444	1,037	1,29
DC-CHOL	500,81	7,00	13,98	DOPE 2/3	9,318	1,084	3,916	1,084	1,29
DMRIE	638,88	8,67	13,57				5,000	1,052	1,29
DMRIE		8,72	13,65	CHOL	13,65	3,174	1,826	1,058	1,29
CACNMe ₃	597,89	7,81	13,06	DOPE	13,06	1,519	3,481	1,013	1,29
CC2NMe ₃	627,92	8,11	12,92	DOPE	12,92	1,502	3,498	1,001	1,29
DMGAcNMe ₃	696,08	9,78	14,05				5,000	1,089	1,29
DMGAcNMe ₃		9,08	13,04	DOPE	13,04	1,517	3,483	1,011	1,29
DMGAcNMe ₃		9,34	13,42	CHOL	6,71	1,560	3,440	1,040	1,29
CAC3Et	648,97	4,40	6,78	DOPE	6,78	0,788	4,212	1,051	0,65
CAC4Et	662,99	4,64	7,00	DOPE	7,00	0,814	4,186	1,085	0,65
CAC5Et	677,02	4,67	6,90	DOPE	6,90	0,802	4,198	1,069	0,65
CAC6Et	691,05	4,66	6,74	DOPE	6,74	0,784	4,216	1,045	0,65
CC24Et	772,95	5,37	6,95	DOPE	6,95	0,808	4,192	1,077	0,65
DMGAc4Et	733,13	4,79	6,53				5,000	1,013	0,65
DMGAc4Et		4,95	6,75	DOPE	6,75	0,785	4,215	1,047	0,65
DMGAc4Et		4,88	6,66	CHOL	3,33	0,774	4,226	1,032	0,65
CAC32	724,03	3,35	4,63	DOPE	4,63	0,538	4,462	1,076	0,43
CAC33	738,06	3,71	5,03	DOPE	5,03	0,584	4,416	1,169	0,43
CAC42	738,06	3,44	4,66	DOPE	4,66	0,542	4,458	1,084	0,43
CAC43	752,09	3,26	4,33	DOPE	4,33	0,504	4,496	1,008	0,43
CAC52	752,09	3,44	4,57	DOPE	4,57	0,532	4,468	1,064	0,43
CAC53	766,12	3,30	4,31	DOPE	4,31	0,501	4,499	1,002	0,43
CAC62	766,12	3,49	4,56	DOPE	4,56	0,530	4,470	1,059	0,43
CAC63	780,14	3,57	4,58	DOPE	4,58	0,532	4,468	1,064	0,43
CC243	782,11	3,60	4,60	DOPE	4,60	0,535	4,465	1,070	0,43
CS343	852,21	3,71	4,35	DOPE	4,35	0,506	4,494	1,012	0,43
CS243	838,18	3,96	4,72	DOPE	4,72	0,549	4,451	1,099	0,43
DMGAc43	808,19	3,88	4,80				5,000	1,116	0,43
DMGAc43		3,63	4,49	DOPE	4,49	0,522	4,478	1,045	0,43
DMGAc43		3,87	4,79	CHOL	2,39	0,557	4,443	1,114	0,43

Tab. 2.6 Einwaagen und Konzentrationen der im Screeningexperiment eingesetzten kationischen Lipide
 Endkonz. = Endkonzentration des kationischen Lipids in HBS-Puffer im Transfektionsexperiment; LM = Lösungsmittel; Stamml. = Stammlösung

Im Fall der kommerziell erhältlichen Lipide bzw. Transfektionsreagenzien, die Substanzen bereits in wässriger oder alkoholischer Lösung vorlagen, wurde wie folgt verfahren: Anhand der jeweiligen Produktbeschreibungen, deren Mengenangaben sich in der Regel auf 6-Wellen bezogen, wurden die Mengenangaben für 96-Wellen entsprechend auf 1/20 reduziert. Um den kationischen Lipiden entsprechende N/P-Verhältnisse bei einer DNA-Menge von 0,125 μ g pro 96-Well im Screening zu erhalten, wurde die Zahl der Aminofunktionen berücksichtigt und das Lipid gegebenenfalls mit HBS verdünnt. Das Transfektionsreagenz FuGENE™6 wurde in einer 1:1-Verdünnung verwendet. In allen Fällen umfassten die lt. Transfektionsprotokoll eingesetzten Lipidmengen den vom Hersteller empfohlenen Bereich (entsprechend um den

Faktor 20 reduziert). Die Reagenzien wurden, wie in Tab. 2.7 angegeben, verdünnt und in 15 ml-Röhrchen im Roboter positioniert. Die automatisierte Transfektion sowie die Post-Transfektionsassays wurden gemäß den Angaben in den Kapiteln 2.2.4.2 bzw. 2.2.5.2 durchgeführt.

kommerzielles Lipid/Reagenz	Mol-masse	Konz.	(mM)	Helfer-lipid	(μ mol)	Verd. (mM)	inges. Vol. (μ l)	HBS (μ l)
DOSPER	1089	1 mg/ml	0,92			0,323	59,2	140,8
FuGENE™6	n. b.	1 ml	n. b.			1:1	100,0	100,0
Transfectam® =DOGS [3]	1263	1 mg/400 μ l	1,98			0,323	32,6	167,4
Lipofectamine =DOSPA/DOPE	1236 (DOSPA)	2 mg/ml 3:1	1,21	DOPE	1:3; w/w	0,258 DOSPA	42,5	157,5
DOTAP-Std.	774	1 mg/ml	1,29			1,29	500,0	0

Tab. 2.7 Ansätze für kommerziell erhältliche Transfektionslipide bzw. -reagenzien im Transfektionslipidscreening

inges. Vol. = eingesetztes Volumen; n. b. = nicht bekannt; Verd. = Verdünnung

Berechnung der relativen Zytotoxizität

Um die zytotoxische Wirkung der einzelnen Lipide bzw. Lipoplexe auf die Zelllinien zu beurteilen, wurde jeweils der bei maximaler Transfektionseffizienz gemessene mittlere Proteingehalt ($p(i)$) mit dem Proteingehalt des DOTAP-Standards (k) (k ist das arithmetische Mittel aus $n = 96$ Wells für insgesamt zwölf 96-Well-Platten pro Zelllinie und sk die zugehörige Standardabweichung) verglichen.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Werte in folgende Kategorien eingeteilt: „++“ ($p(i) > k + 2 sk$, d. h. größer als der Mittelwert des Standards (k) plus zweifache Standardabweichung (sk)), „+“ ($k + 2 sk \geq p(i) > k + sk$); „+/-“ ($k + sk \geq p(i) \geq k - sk$); „-“ ($k - sk > p(i) \geq k - 2 sk$); „--“ ($p(i) < k - 2 sk$) (Tab. 3.16 b-3.21 b). Die Berechnungen wurden in *Excel*® durchgeführt und die Werte anschließend auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet.

2.2.5 Post-Transfektionsassays

Zum Nachweis des Luciferase-Reportergens in den transfizierten Zellen wurde das Genprodukt, die Luciferase, mit Hilfe eines luminometrischen Assays bestimmt. Durch Zugabe des Substrats konnte die Aktivität des Luciferaseenzym bezogen auf einen Referenzwert (hier: der Proteingehalt der Zellen) gemessen werden. Vor der Durchführung der Assays wurden die Zellen jedes Wells mikroskopisch auf Zustand und Konfluenz (als Anzeichen auftretender Zytotoxizität der Lipoplexe) sowie auf mögliche Kontamination überprüft. Die im Folgenden geschilderten Methoden wurden ausschließlich zur Behandlung adhärenter bzw. in Monolayern wachsender Zellen entwickelt.

2.2.5.1 Bestimmung der Luciferaseaktivität und des Proteingehalts der transfizierten Zellen in manueller Durchführung

Waschen und Lyse der Zellen

Im 6-Well: Zunächst wurde das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen ein- bis zweimal mit PBS oder 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Lysepuffer (wenn nicht anders angegeben: Lysepuffer „B“, 1× konzentriert) in jedes Well gegeben und 15 min bei RT inkubiert. 300 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung wurden zugegeben und die lysierten Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgelöst und homogenisiert. Die Lysate wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) aufgenommen und in der Tischzentrifuge (Biofuge 13; Heraeus) bei maximaler Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Je 20 µl des Lysats aus einem Well der ursprünglichen Zellkulturplatte wurden in ein bis drei 96-Wells einer Mikrotiterplatte und einer weißen 96-Well-Platte (Costar, Corning, Cambridge, MA, USA) überführt und der Protein- und der Luciferaseassay, wie unten beschrieben, durchgeführt.

Im 96-Well: Wie auch im 6-Well wurde zuerst der Medium-Überstand über dem Zellrasen entfernt und der Monolayer vorsichtig ein- bis zweimal mit PBS oder 0,9 %iger NaCl-Lösung überschichtet. Anschließend wurden je 50 µl Lysepuffer in jedes Well pipettiert, die Zellen 15 min bei RT lysiert und mit Hilfe einer Pipette homogenisiert. Für Experimente, in denen Lysate aus mehreren Wells vereinigt wurden, wurde das Zelllysat direkt in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Wenn analog zum automatisierten Ablauf verfahren wurde, wurden zunächst 30 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung pro Well zugegeben und die Zelllysate erst dann in neue Gefäße überführt, in der Tischzentrifuge 1 min zentrifugiert und auf Eis gestellt. Für Protein- und Luciferaseassay wurden aus dem Überstand je 20 µl in die entsprechenden Mikrotiterplatten pipettiert.

Bestimmung des Proteingehalts

Für den Proteinstandard wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml, gelöst in Lysepuffer/NaCl) verwendet, die fünfmal seriell 1:1 in Lysepuffer/NaCl verdünnt wurde (s. 2.2.5.2). Pro 96-Well-Testplatte wurden 6 Standards unterschiedlicher Konzentration in Doppelbestimmung ($2 \times 20 \mu\text{l}$) in die Platte pipettiert. Als Reagenzienleerwert ($2 \times 20 \mu\text{l}$) diente die Lysepuffer/NaCl-Lösung. Jeder Probe und jedem Standard wurden 200 µl BCA-Reagenz (Assay Reagenz A und B im Volumenverhältnis 50:1) zugesetzt, die Platten mit dem Deckel verschlossen und 30 min bei 37 °C im Dunkeln aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbung photometrisch bei 550 nm/Referenzwellenlänge 620 nm in einem Mikrotiter-Plattenreader (*Spectra*, Tecan) bestimmt.

Luciferaseassay

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde in einem LUMIstar (BMG, Offenburg) durchgeführt (siehe unter 2.2.5.2), in dem 20 µl des Lysats mit 80 µl Substratlösung versetzt wurden. Das bei der Enzym-Substrat-Reaktion freigesetzte Licht (in rlu = relative light units = relative Lichteinheiten) diente als Maß für die Aktivität des Luciferaseproteins. Die Auswertung der Daten erfolgte wie unter 2.2.5.2 beschrieben.

2.2.5.2 Automatisiertes Verfahren für 96-Well-Platten

Zur automatisierten Lipofektion und Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde ein Pipettierroboter (*Genesis* RSP 150, Tecan, Crailsheim) mit folgender Software eingesetzt: *Schedis*^â Version 1.36 (Labosoft, Frauenfeld, Schweiz).

Maximal drei Mikrotiterplatten (à 96 Wells) konnten pro Durchlauf abgearbeitet werden. Die in den folgenden Kapiteln eingehaltene Reihenfolge der Assays entsprach der für den automatisierten Ablauf entwickelten chronologischen Abfolge.

Protein-Standardkurve

Zunächst wurden sechs BSA-Standards zur Erstellung einer Kalibrationskurve für den Proteintest hergestellt. Als Ausgangsstandard wurde eine 1 mg/ml-BSA-Lösung in Lysepuffer/NaCl in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß verwendet. 600 µl wurden in ein leeres Reaktionsgefäß pipettiert (= Standard 1) und anschließend fünf Verdünnungsschritte durchgeführt. Hierzu wurden 300 µl des Puffers (in einem 100 ml-Trog) und 300 µl des Standards in eine Roboternadel aufgenommen und in das nächstfolgende leere 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert (= Standard 2). Nach einem zweifachen Mischschritt wurde der Verdünnungsvorgang analog viermal wiederholt, sodass insgesamt sechs Standards mit folgenden Konzentrationen zur Verfügung standen: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,313 mg/ml.

Waschen der Zellen

Während der Herstellung der Proteinstandards wurde bereits die erste Zellkulturplatte gewaschen. Die Deckel der 96-Well-Platten wurden generell vor Teststart entfernt. Per Greifarm wurde jeweils eine Platte von ihrer Ausgangsposition auf dem Plattenträger im *Genesis* auf den Plattenwisher (*Columbus*, Tecan) transportiert, anschließend spaltenweise das Medium aus den Wells gesaugt und sofort tropfenweise 200 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung zugesetzt. Nach Durchlauf der gesamten Platte (mit Ausnahme der Spalten 11 und 12) wurde die NaCl-Lösung in einem zweiten Zyklus wieder spaltenweise abgesaugt und die Platte danach auf den Plattenträger zurückgetragen.

Lyse der Zellen

Unmittelbar nach dem Waschen des Monolayers wurden je 50 µl Lysepuffer „B“ in jedes Well pipettiert, gefolgt von einer 25-minütigen Inkubation bei RT. In einem zweiten Schritt

wurde durch Zugabe von je 30 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung, kombiniert mit einem Mischschritt, das Volumen des Zelllysats auf 80 µl erhöht und gleichzeitig die lysierten Zellen vom Plattenboden gelöst.

Übertrag des Zelllysats auf 96-Well-Platten für Protein- und Luciferaseassay

Für die Bestimmung des Zellproteins und der Luciferaseaktivität wurden aus dem Zelllysats eines Wells je 20 µl in eine weitere 96-Well-Platte bzw. in eine weiße 96-Well-Platte (Costar, Corning, Cambridge, MA, USA) pipettiert. Lediglich für einen Vergleichsversuch wurden auch weiße 96-Well-Platten anderer Hersteller verwendet: Dynatech (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA), Optiplat (Canberra-Packard, Dreieich), Greiner (Frickhausen). Als Reagenzienleerwert diente in beiden Fällen 20 µl Lysepuffer/NaCl in Doppelbestimmung. Die weiße Testplatte wurde bis zum Beginn des Luciferaseassays wieder mit einem Deckel versehen, der Proteintest unmittelbar fortgesetzt.

BCA-Assay

Um die Menge des zellulären Proteins zu bestimmen, wurde ein speziell modifizierter BCA-Assay verwendet. Die Standardkurve wurde mit BSA in Lysepuffer/NaCl in 6 Konzentrationen als Proteinstandard erstellt (2.2.5.2). 20 µl jedes Standards wurden für eine Doppelbestimmung in zwei Wells der 96-Well-Platte pipettiert (in Spalte 11 und 12 der Testplatte). In jedes Well der Testplatte wurde im Multipipetting 200 µl Färbereagenz (Reagenz A: Reagenz B im Volumenverhältnis 50:1) auf die 20 µl Zelllysats bzw. Standard gegeben. Die Platte wurde anschließend mit einem mit Aluminiumfolie beschichteten blickdichten Deckel versehen und 2 h bei RT inkubiert. Zur photometrischen Messung der Farbreaktion wurde die Platte (ohne Deckel) in einen Mikrotiter-Plattenreader (*Spectra*, Tecan) transportiert, 5 s mit mittlerer Intensität geschüttelt und anschließend Proben wie Standards bei 550 nm/Referenzfilter 620 nm gemessen.

Luciferase-Reporterassay

Die Platten wurden hierzu jeweils entdeckelt und einzeln in das Luminometer (LUMIstar, BMG, Offenburg) transportiert. Vor Beginn der Messungen wurden der Injektionsschlauch und die Pumpe erst mehrmals mit A. d. gespült, leergepumpt und anschließend mit Substratlösung gespült („Prime“). Die Messung erfolgte in einem einzigen Durchlauf (*Fast Kinetics*), bei dem jedes Well einzeln angesteuert wurde. Je 80 µl einer Luciferin-Substratlösung wurden innerhalb des Gerätes in jedes Well pipettiert und die Messung sofort gestartet. Sie erfolgte separat für jede Kavität über eine Dauer von 10 s, eingeteilt in 50 Messintervalle (à 0,2 s). Die Substrattemperatur wurde für alle Messungen eines Tages konstant gehalten und betrug in der Regel 24 ± 1 °C.

Vor jeder neuen Messung wurde der Injektor mit der Substratlösung gespült. Das Plattenlayout wurde entsprechend der Plattenbelegung (Tab. 3.31) mit Proben und Leerwerten angelegt.

Auswertung

Die Daten der luminometrischen Messung wurden mit *Excel*[®] (Version 5.0) mit Hilfe der *LUMIstar Windows-PC-Software*[®] (Version 3.0, BMG) ausgewertet. Hierbei wurden die Messintervalle 1-3 außer Acht gelassen (Einspritzvorgang, noch keine reellen Daten) und nur die Intervalle 4-50 integriert.

Die Daten aus der Proteinbestimmung wurden mit der Auswertesoftware *easyWIN fitting*[®] (Version 3.0 a, Tecan) ermittelt. Verwendet wurden korrigierte Rohwerte, d. h. abzüglich der Extinktion des Reagenzienleerwertes als Background. Mit Hilfe der Proteinstandardwerte wurde eine Kalibrationskurve als Regressionsgerade erstellt, anhand der die Proteinmenge pro 20 µl-Ansatz aus jedem Well berechnet wurde (Kapitel 3.1.4.2).

Als Maß der Transfektionseffizienz (in rlu/µg Protein) wurde der Quotient aus um den Leerwert korrigierter Luciferaseaktivität (in rlu = relative Lichteinheiten) und Proteinmenge (in µg) pro Ansatz bestimmt. Für alle Mehrfachbestimmungen wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung σ (STABWN in *Excel*[®]) und der Variationskoeffizient (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert in % des Mittelwertes) berechnet.

Grafiken wurden in *Microcal Origin*[®] 3.5 und in *Excel*[®] 5.0 erstellt.

2.2.6 Weitere Nachweisverfahren

2.2.6.1 Zytotoxizitätsbestimmungen

WST-1-Assay

Zur Untersuchung einer möglichen zytotoxischen Wirkung der Lipoplexe auf die transfizierten Zellen wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet (WST-1). Dieser Test basiert auf der intrazellulären Reduktion von Tetrazoliumsalzen wie WST-1 in den dunkelroten Farbstoff Formazan [6, 64]. Diese Farbreaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen vermittelt; die Farbstoffmenge kann daher direkt mit der Zahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen korreliert werden. Zytotoxische Wirkung lässt sich somit durch verminderte Zellproliferation nachweisen.

Durchführung: Pro Well wurden 200 µl WST-1-Reagenz auf 2 ml Medium (im 6-Well) bzw. 20 µl Reagenz auf 200 µl Medium (im 96-Well) gegeben und die Platten 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für den Reagenzienleerwert wurde 1 ml des Kulturmediums in einem 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 100 µl Reagenz versetzt und gleichermaßen inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl aus jedem Well in eine Mikrotiterplatte überführt. Der Leerwert wurde in Doppelbestimmung (in zwei Wells) aufgetragen. Die Messung erfolgte nach 1 min Schütteln mit mittlerer Intensität bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im MTP-Photometer *Spectra* (Tecan).

Die Zellen konnten anschließend nach gründlicher Entfernung des gefärbten Mediums durch mehrmaliges Waschen mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Überstand für Protein- und Luciferasebestimmung weiterverwendet werden.

MTT-Assay

Zum Vergleich mehrerer Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde der MTT-Test eingesetzt. 46 h nach der Lipoplexzugabe wurden pro 96-Well 20 μ l MTT-Reagenz zugegeben und die Zellen für weitere 4h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Solubilisierungspuffer zugesetzt und die Zellen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion der Farblösung in einem Mikrotiterplatten-Photometer (*Spectra*, Tecan) nach 1-minütigem Schütteln bei 550 nm gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm).

2.2.6.2 X-Gal-Färbung

Um die Zahl transfizierter Zellen bzw. die Transfektionsrate zu bestimmen, wurde ein β -Galaktosidase-Reportergen für die Transfektion verwendet [12]. Das auf dem Reporterplasmid pCMX β -Gal liegende Bakteriengen lacZ codiert das β -Galaktosidase-Protein. Dieses Enzym reagiert mit dem Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), so dass bei Zugabe eines speziellen Eisenpuffers eine Blaufärbung der transfizierten Zellen hervorgerufen wird [88].

Der Nachweis der Enzym-Substrat-Reaktion wurde in einer X-Gal-Färbung, abgewandelt nach [56, 76], oder mit einem kommerziellen X-Gal-Staining Set (Roche) durchgeführt.

Im 6-Well: Zuerst wurden die Zellen ein- bis zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml frisch angesetztem Fixativ versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbelösung wurde unmittelbar vor Gebrauch aus X-Gal-Lösung und Eisenpuffer im Volumenverhältnis 1:19 angesetzt. Je 1 ml der Färbelösung wurde in jedes Well gegeben und die Platte ca. 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Grad der Färbung wurde im Auflichtmikroskop kontrolliert und die Färbedauer dementsprechend angepasst. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS überschichtet, die Platten zudeckelt, mit *Parafilm*[®] verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt. Um die Transfektionsrate zu ermitteln, wurde die Zahl blau gefärbter Zellen im Auflichtmikroskop bestimmt und auf die Zahl der Zellen pro Well bezogen.

Im 96-Well: Die X-Gal-Färbung im 96-Well wurde analog zum Assay im 6-Well durchgeführt mit folgenden Unterschieden: Es wurden jeweils 100 μ l Fixativ und 100 μ l Färbereagenz pro Well eingesetzt.

2.2.6.3 Hemmung der Endozytose

Zur Hemmung der Endozytose in Transfektionsexperimenten zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen wie folgt behandelt (Tab. 2.8):

	4 °C-Behandlung	Antimycin A	Cytochalasin B	NaN ₃
Stammlösung		2 mg/ml in EtOH	2 mg/ml in EtOH	100 mM in A. d.
Endkonzentration		1 µg/ml	5 µg/ml	5 mM
Inkubations- temperatur	4 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Vorbehandlungsdauer vor Transfektion	1 h	1 h	1 h	1 h
Inkubationsdauer wäh- rend Transfektion	4 h	4 h	4 h	4 h

Tab. 2.8 Behandlung der Zellen in Experimenten zur Hemmung der Endozytose

Nach der entsprechenden Vorbehandlung vor Zugabe der Lipoplexe sowie nach Ablauf der Inkubationsdauer von 4 h wurde die Zellmorphologie im Auflichtmikroskop kontrolliert. Im Anschluss an die 4-stündige Inkubation während der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen anschließend bei 37 °C weiterinkubiert oder für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixiert. Die Kontrollzellen wurden, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, transfiziert.

2.2.6.4 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden je 150000 Zellen (COS-7 und MEXF642NL) ca. 24 h vor der Transfektion in 3,5 cm-Schalen (Greiner) ausgesät und, wie oben angegeben (2.2.4.1), mit Lipoplexen aus pCMXluc und Rhodamin-markierten DOTAP-Liposomen (zur Herstellung s. Kapitel 2.2.3.1) transfiziert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,05 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Die Schalen wurden maximal 1 h bei 4 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Mikroskopieren wurde der Puffer bis auf ca. 100 µl abgesaugt und vorsichtig ein Deckglas (20 mm × 20 mm, Assistent) aufgelegt. Zur Trypanblau-Färbung der Lipoplexe wurden die Zellen nach der Fixierung mit 500 µl Trypanblau/PBS (4%; v/v) 10 min bei 4°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen und eingedeckelt. Die Präparate wurden direkt nach der Herstellung in einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BHS-RFCA, Bandpassfilter 545 nm (rot) und 490 nm (grün)) untersucht und fotografiert (Kamera: Olympus SC35 (Typ 12), Dia-Film: Kodak Elite CHROME 400). Weitere Bilder von in Chamberslides transfizierten COS-7-Zellen (Aussaat 200000 Zellen/Well in 1,5 ml EMEM, Transfektion für 6-Well-Platten, wie unter 2.2.4.1 beschrieben) wurden mit freundlicher Genehmigung am Forschungszentrum Karlsruhe (Institut für Toxikologie und Genetik, PD Dr. H. Krug) an einem Axiovert S 100-Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und ausgewertet (Software: *Openlab, Im-provision*⁰).

2.2.6.5 Fluorometrische Messungen

Zu fluorometrischen Messungen (Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2) wurden DOTAP-Liposomen (1,29 mM in HBS) direkt nach der Beschallung mit 2 mol-% DPH in Tetrahydrofuran unter Lichtabschluss über Nacht bei RT inkubiert. Die markierten Liposomen (aus einer Liposomendispersion) wurden in drei Aliquots wie separate Ansätze (für eine Zielplatte) behandelt und im automatisierten Transfektionsablauf folgenden Schritten unterworfen: 1:10-Verdünnung der Liposomendispersion, Komplexierungsansätze in *Deep- Wells*. Zur Untersuchung von Liposomen wurde statt DNA-Lösung HBS-Puffer zugegeben. Die Liposomen resp. Lipoplexe wurden anschließend in weiße 96-Well-Platten (Corning, Costar) übertragen (Pipettierassay und -modus wie für Lipoplextransfer auf Zellkulturplatten). Die Messung der DPH-Fluoreszenz erfolgte in einem Lumineszenz Spektrometer (LS50B, Perkin Elmer, Überlingen) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und Emissionswellenlänge von 430 nm (Emissionsfilter 390 nm). Die Schlitzbreite betrug in beiden Fällen 5 nm. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms *FL Winlab*[®] (Version 2.01, Perkin Elmer) ausgewertet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung eines automatisierten Verfahrens zur Lipofektion kationischer Lipide und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im 96-Well-Platten-Format

Vorbemerkung zur Vorgehensweise

Ein Lipofektionsexperiment besteht aus vier aufeinander folgenden Teilbereichen:

1. der Herstellung von Liposomen aus kationischen Lipiden bzw. Lipidmischungen,
2. der Bildung von Lipoplexen aus den Liposomen in Kombination mit DNA,
3. der eigentlichen Transfektion der Zellen,
4. der Bestimmung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der Post-Transfektionsassays.

Üblicherweise werden Lipofektionsexperimente in 6-Well-Platten von Hand durchgeführt; jedoch sind alle Bereiche eines solchen Experiments mit erheblichem Pipettieraufwand verbunden. Um einen höheren Durchsatz zu erzielen, sollte in dieser Arbeit ein Verfahren zur Durchführung von Lipofektionsexperimenten in 96-Well-Platten entwickelt werden und auf einen Pipettierroboter übertragen, d. h. automatisiert werden.

Zunächst wurden die Post-Transfektionsassays zur Bestimmung der Transfektionseffizienz entwickelt und automatisiert, um ein funktionierendes Nachweissystem zur Verfügung zu haben, anhand dessen sich der „Erfolg“ des Gentransfers messen ließ. Im Anschluss daran wurden die übrigen Bereiche eines Lipofektionsexperiments optimiert und automatisiert.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgte die Darstellung der Entwicklung und Automatisierung der einzelnen Teilbereiche eines Lipofektionsexperiments entsprechend ihrer Reihenfolge im Experiment.

Vorstellung des 96-Well-Plattenlayouts zum Screening von Transfektionslipiden

Zur automatisierten Lipofektion im 96-Well-Plattenformat wurde im Hinblick auf das Screening von Transfektionslipiden ein spezielles Plattenlayout entworfen. Bei der Erstellung des Layouts waren folgende Aspekte/Vorüberlegungen zu berücksichtigen:

Zum Ersten stand nicht gesamte Anzahl von Wells einer 96-Well-Platte zum Test von Transfektionslipiden zur Verfügung, da zur Erstellung einer Standardkurve im Proteinassay (3.1.4.2) Kavitäten freigehalten werden mussten. Hierzu wurden zwei Spalten für die Standards und Reagenzienleerwerte benötigt. Von den verbliebenen 80 Wells wurden weitere 8 Kavitäten für einen Lipidstandard bzw. Kontrolllipid abgezogen.

Zum Zweiten war bei der Belegung der restlichen 72 Kavitäten zu beachten, dass für eine statistisch abgesicherte Auswertung mindestens drei Wiederholungsexperimente für jede „Pro-

be“, d. h. jeden Lipoplexansatz, durchgeführt werden sollten. Durch die Dreifachbestimmungen reduzierte sich die Probenzahl auf 24 mögliche Lipoplexansätze.

Zum Dritten war es erforderlich, zur Festlegung der 24 Ansätze einen Schwerpunkt festzulegen. Sollte das Screening auf möglichst hohen Durchsatz abzielen, d. h. auf möglichst viele verschiedene Lipoplexansätze für eine große Zahl von Lipiden pro 96-Well-Platte, oder auf eine genauere Charakterisierung einzelner Lipide auf Kosten des Lipiddurchsatzes?

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Aufdeckung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen im lipidvermittelten Gentransfer. Diese erfordert eine genaue Untersuchung des Transfektionsverhaltens der zu testenden Lipide. Wie vielfach in der Literatur beschrieben wurde, eignet sich hierfür der Einsatz von Lipoplexen verschiedener Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse [36, 156, 157]. Diese können zu beträchtlichen Unterschieden in der Effizienz des Gentransfers führen, beanspruchen jedoch eine größere Anzahl von Wells auf der Testplatte. Da ein Pipettierroboter für die Lipofektionsexperimente eingesetzt werden sollte, ließ sich ein hoher Lipiddurchsatz problemlos durch eine Erhöhung des Plattendurchsatzes erzielen. Dies ermöglichte die Untersuchung verschiedener Ladungsverhältnisse auf Kosten der Zahl der getesteten Lipide pro Platte.

Zur Charakterisierung der Testlipide wurden 8 Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse untersucht. Aus den hier angestellten Vorüberlegungen resultiert folgendes Plattenlayout mit drei Testlipiden pro 96-Well-Platte (Abb. 3.1).

	Lipid 1			Lipid 2			Lipid 3			DO-TAP-Standard	Wells nicht belegt (frei für Standards im Proteinassay)	
LV a	1.1	1.2	1.3	9.1	9.2	9.3	17.1	17.2	17.3	S1		
LV b	2.1	2.2	2.3	10.1	10.2	10.3	18.1	18.2	18.3	S2		
LV c	3.1	3.2	3.3	11.1	11.2	11.3	19.1	19.2	19.3	S3		
LV d	4.1	4.2	4.3	12.1	12.2	12.3	20.1	20.2	20.3	S4		
LV e	5.1	5.2	5.3	13.1	13.2	13.3	21.1	21.2	21.3	S5		
LV f	6.1	6.2	6.3	14.1	14.2	14.3	22.1	22.2	22.3	S6		
LV g	7.1	7.2	7.3	15.1	15.2	15.3	23.1	23.2	23.3	S7		
LV h	8.1	8.2	8.3	16.1	16.2	16.3	24.1	24.2	24.3	S8		

Abb. 3.1 Layout einer 96-Well-Platte für das Screening von Transfektionslipiden

Maximal drei Lipide (oder -mischungen mit anderen Lipiden oder Helferlipiden) pro Platte (stark umrandet) können getestet werden. Zusätzlich wird ein Standard (DOTAP) zur Kontrolle eingesetzt. Pro Testlipid werden acht Ladungsverhältnisse (LV) in Dreifachbestimmung verwendet, für den DOTAP-Standard ein Ladungsverhältnis (2,5) in Achtfachbestimmung. Die DNA-Menge ist für Proben wie Standards konstant. Durch Verringerung der Lipideinwaage oder Vorverdünnung der Liposomendispersion besteht die Möglichkeit, das Ladungsverhältnis zu variieren.

Auf diesem Plattenlayout basierten alle automatisierten Lipofektions- und Screeningexperimente in dieser Arbeit. Jedoch betrafen viele Fragestellungen bereits bei der Entwicklung und Optimierung des automatisierten Lipofektionsverfahrens das gewählte Plattenlayout. Bei diesen handelte es sich um einzelne Aspekte aus drei der vier Teilabschnitte eines Lipofektions-experiments (Lipoplexbildung, Transfektion und Post-Transfektionsassays zur Bestimmung der Transfektionseffizienz), auf die in den entsprechenden Kapiteln näher eingegangen wird:

- ◆ Volumen des Komplexierungsansatzes (3.1.2.1)
- ◆ DNA- und Lipidmenge pro Well (3.1.2.2)
- ◆ Plattenzentrifugation nach der Lipoplexzugabe (3.1.3.1)
- ◆ Plattenformate bei der Zellkultivierung (3.1.3.2)
- ◆ Wachstumsverhalten der Zellen und Optimierung der Zellzahl im 96-Well (3.1.3.2)
- ◆ Optimierung des Wasch- und Lyseschritts vor den Post-Transfektionsassays (3.1.4.1)
- ◆ Probenvolumen im Proteinassay (3.1.4.2)
- ◆ Plattentypen zur Bestimmung der Luciferaseaktivität (3.1.4.3)
- ◆ Abhängigkeit der Luciferaseaktivität vom Assayvolumen (3.1.4.3)

3.1.2 Liposomendarstellung

Der erste Schritt bei der Darstellung der Liposomen nach dem „klassischen“, in der Literatur beschriebenen Verfahren ist die Herstellung eines Lipidfilms [101]. Hierzu werden zunächst die in Lösungsmittel gelösten Lipide in Glaskolben gegeben und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer unter langsamem Einengen vollständig entfernt, sodass an der Wandung des Kolbens ein dünner Lipidfilm entsteht. Durch Zugabe von Puffer werden die Lipide rehydratisiert und der Film dabei von der Kolbenwand abgelöst. Es entstehen sogenannte MLV, multilamellare große Vesikel. Durch Beschallung der MLV-Dispersion in einem Wasserbad wird eine Liposomendispersion aus SUV, kleinen unilamellaren Vesikeln, hergestellt.

Im Hinblick auf die Automatisierbarkeit der Liposomendarstellung wurde diese Methodik modifiziert (Abb. 3.2) und folgende Parameter optimiert: Herstellung eines Lipidfilms, Glasgefäße zur Filmbildung sowie Beschallungsparameter.

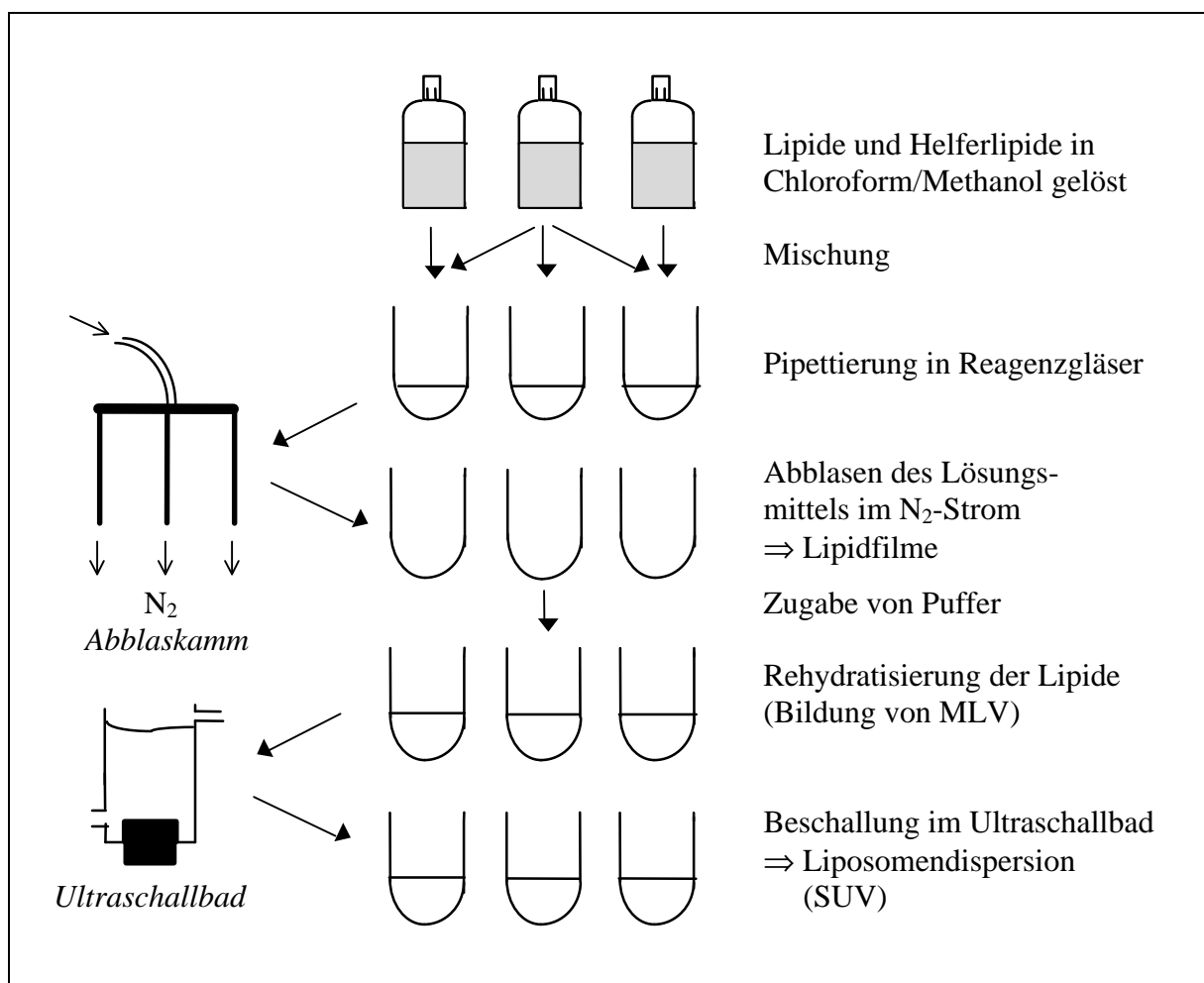


Abb. 3.2 Schema der automatisierten Liposomendarstellung im Pipettierroboter

Verwendete Reaktionsgefäße und Geräte sind stark vereinfacht dargestellt. In den Pipettierroboter integrierte Geräte sind durch Kursivschrift gekennzeichnet. Die Liposomendarstellung ist in folgende größere Teilabschnitte untergliedert: Herstellung von Lipidfilmen, Bildung von Liposomendispersionen (SUV)

Herstellung eines Lipidfilms

Die Lipide wurden in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1; v/v) gelöst. Dieses eignet sich aufgrund seiner Zusammensetzung aus polaren (Chloroform) und unpolaren (Methanol) Bestandteilen gut zur Lösung von Lipiden, die unpolare wie auch polare Bereiche enthalten. Trotz des hohen Dampfdrucks des Chloroform-Methanol-Gemischs konnte die Lipidlösung ohne Probleme von den teflonbeschichteten Pipettiernadeln des Pipettierroboters (*Genesis*) aufgenommen und abgegeben werden.

Die gelösten Lipide wurden in Rollrandgläsern, die mit Teflonsepten verschlossen waren, in den Roboter gestellt. Ein spezieller Pipettiermodus ermöglichte das Durchstechen der Septen mit den Pipettiernadeln. Die Lipidlösungen wurden in entsprechenden Volumina in Glasgefäße überführt (siehe folgendes Kapitel) und dort gegebenenfalls kombiniert. Das Lösungsmittel wurde mittels eines Stickstoffstroms (N_2 , Abb. 3.3), der in die Gefäße geleitet wurde, entfernt.

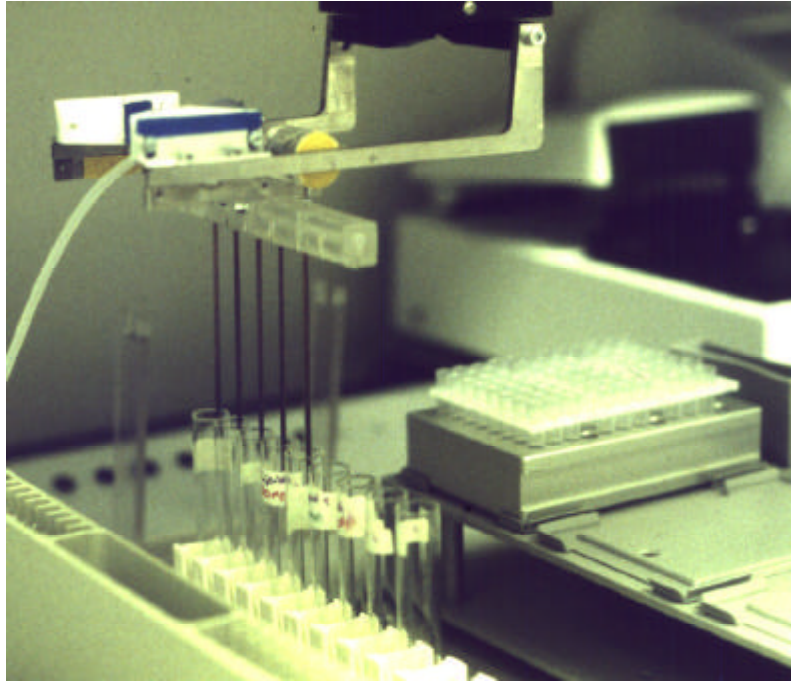


Abb. 3.3 Automatisiertes Abblasen der Lösungsmittel im Pipettierroboter

Zur Entfernung des Lösungsmittels (Chloroform/Methanol) wird mit Hilfe eines speziell konstruierten Abblaskamms Stickstoff in die Reagenzgläser mit der Lipidlösung geleitet. Der Abblaskamm wird vom Greifarm des Pipettierroboters gehalten und über den Proben positioniert. Durch den Zugriff des Greifers wird das im Kamm befindliche Stickstoffventil geöffnet.

Dieser Vorgang wurde mit Hilfe einer speziell konstruierten Abdampfapparatur (*Abblaskamm*, Abb. 3.2) bewerkstelligt, die vom Greifarm des Roboters über die Gefäße mit der Lipidlösung gehalten wurde (Abb. 3.3). Durch Zugriff des Greifarms wurde das Stickstoffventil in dem Kamm geöffnet und erst nach Ablegen des Kamms (nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels) wieder geschlossen. Der Gasfluss konnte über ein Reduzierventil eingestellt werden.

Das Chloroform/Methanol-Gemisch ist giftig. Alternative, weniger giftige Lösungsmittel wie Ethanol oder Isopropanol wurden untersucht, zeigten jedoch weniger gute Lösungs- und Abdampfeigenschaften und waren für die Herstellung eines Lipidfilms nicht geeignet.

Wahl geeigneter Glasgefäße zur Liposomendarstellung

Für die automatisierte Liposomendarstellung wurde der Lipidfilm statt in Kolben in Reagenzgläsern hergestellt, die von dem Greifarm des Roboters (nach Einbau einer speziellen Halterung) erfasst und transportiert werden konnten (Abb. 3.4). Hierzu wurden zwei Typen verglichen: kommerziell erhältliche 100 × 16 mm starkwandige Reagenzgläser (Typ 1) (Assistent) sowie speziell angefertigte 100 × 7 mm Reagenzgläser (Typ 2) (Zitt-Thoma, Freiburg). In beiden Reagenzglasstypen ließen sich Lipidfilme herstellen. Um die Tauglichkeit beider Glasstypen bezüglich der Liposomendarstellung zu vergleichen, wurden jeweils DOTAP- und DC-CHOL/DOPE-Liposomen durch Filmbildung, Rehydratisierung und Ultraschall hergestellt (siehe unter 2.2.3.1) und die Größenverteilung der Liposomen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS oder QELS = *quasi elastic light scattering*) bestimmt

(2.2.3.3). Zusätzlich wurden Liposomen nach der klassischen Methode im Kolben (25 ml) dargestellt. Bei dieser Methode wurden kleine Glasperlen in den Kolben gegeben, um eine gute Ablösung des Films von der Kolbenwand sowie eine homogene Liposomendispersion zu erhalten.

DOTAP-Liposomen

Die Größenverteilung der in Reagenzgläsern (Typ 1) hergestellten DOTAP-Liposomen entsprach der der im Kolben hergestellten Liposomen: In beiden Fällen lag der Hauptteil der Liposomen (87-99 %) im Bereich um 50 nm (Tab. 3.1). Zusätzlich ließ sich jeweils eine zweite, wesentlich kleinere Größenpopulation (relative Häufigkeiten zwischen 1 % und 13 %) erkennen, die einen Bereich zwischen 100 nm und 300 nm umfasste.

DOTAP-Liposomen-Präparationen	Peak 1			Peak 2		
	Wertebereich (nm)	Mittelwert (nm)	relative Häufigkeit (%)	Wertebereich (nm)	Mittelwert (nm)	relative Häufigkeit (%)
Kolben (n = 4)	37-65	49	91-98	114-302	190	2-9
Reagenzglas ¹ (n = 3)	43-56	49	87-99	145-216	180	1-13
Reagenzglas ² (n = 3)	79-142	109	88-95	333-829	554	5-12

Tab. 3.1 Bestimmung der Größenverteilung von DOTAP-Liposomen aus drei verschiedenen Präparationen mittels Photonenkorrelationspektroskopie (siehe Kapitel 2.2.3.3)

Zur Darstellung von DOTAP-Liposomen (2.2.3.1) wurden entweder 25 ml-Glaskolben oder Reagenzgläser (¹ Typ 1: 100 × 16 mm; ² Typ 2: 100 × 7 mm) verwendet. Nur Verteilungen mit jeweils zwei Größenpopulationen (Peaks) nach 15 min Messdauer wurden in die Auswertung einbezogen. Für jede Population sind der kleinste und größte Messwert sowie der Mittelwert dargestellt und die Spanne der jeweiligen prozentualen Häufigkeiten. Alle Werte sind gerundet. In Einzelfällen traten im Laufe der Messung sporadisch Aggregate (zwischen 500 nm und 1000 nm) auf, die jedoch nicht als dritter Peak registriert wurden.

Demgegenüber zeigten Liposomen, die in den Reagenzgläsern (Typ 2) hergestellt worden waren, eine etwas heterogenere Größenverteilung: Die Hauptpopulation (Peak 1) lag im Mittel bei über 100 nm, Peak 2 bei über 500 nm. Insgesamt lagen Minima und Maxima dieser Liposomenpräparation weiter auseinander als in den anderen beiden Präparationen. Besonders Peak 2 (333-829 nm) lässt darauf schließen, dass die größeren MLV nicht vollständig durch die Ultraschallung in die SUV überführt wurden.

DC-CHOL/DOPE-Liposomen

Bei der Herstellung von DC-CHOL/DOPE-Liposomen zeigte die PCS-Messung ähnliche Größenverteilungen für die im Reagenzglas (Typ 1) gegenüber den im Reagenzglas (Typ 2) hergestellten Liposomen: Der Hauptanteil (bis zu 97 %) lag um 60 nm sowie eine kleinere Population von Liposomen (max. 33 %) im Bereich um 200 nm (Tab. 3.2).

Allerdings waren in Reagenzgläsern (Typ 2) in allen drei Fällen größere Partikel zu sehen (Peak 3), während diese in Reagenzgläsern (Typ 1) nur in einem von fünf Fällen und mit sehr geringer Häufigkeit (< 1 % aller Partikel) erfasst wurden. Bei den nach der klassischen Methode im Kolben dargestellten Liposomen wurden keine größeren Partikel nachgewiesen. Das

hier beobachtete scheinbare Auftreten von zwei Liposomenpopulationen unter 100 nm in zwei von vier Fällen (Peak 1 und 2, Tab. 3.2) kann durch gerätebedingte Unterschiede in der Verrechnung von Signalen erklärt werden. Fasste man in diesen Fällen Peak 1 und Peak 2 zusammen, ergäbe sich eine dem Peak 1 der beiden anderen Herstellungsmethoden entsprechende Größenverteilung.

DC-CHOL/ DOPE- Liposomen- Präparation	Peak 1			Peak 2			Peak 3		
	Werte- bereich (nm)	Mittel- wert (nm)	relative Häufig- keit (%)	Werte- bereich (nm)	Mittel- wert (nm)	relative Häufig- keit (%)	Werte- bereich (nm)	Mittel- wert (nm)	relative Häufig- keit (%)
Kolben (n = 4)	22-57	37	86-90	84-95 (n = 2)	90	10-13	190-365	268	< 1-14
Reagenzglas ¹ (n = 5)	45-84	60	81-90	157-294	221	10-19	905 (n = 1)		< 1
Reagenzglas ² (n = 3)	43-74	61	66-97	201-226 (n = 2)	214	15-33	626-1459	1150	< 1-3

Tab. 3.2 Bestimmung der Größenverteilung von DC-CHOL/DOPE-Liposomen aus drei verschiedenen Präparationen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (siehe unter 2.2.3.3)

DC-CHOL/DOPE-Liposomen wurden, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, in 25 ml-Kolben, 100 × 16 mm-Reagenzgläsern¹ oder 100 × 7 mm-Reagenzgläsern² hergestellt. Dargestellt sind die Größenverteilungen nach 15 min Messzeit. Für jede Population sind der kleinste und größte Messwert angegeben sowie der Mittelwert und die zugehörige Spanne der prozentualen Häufigkeiten. Alle Werte sind gerundet und beziehen sich auf die jeweils angegebene Anzahl ausgewerteter Messungen (n).

Die Homogenität der nach der klassischen Methode hergestellten Liposomendispersion könnte durch eine bessere Ablösung des Lipidfilms aufgrund der größeren Glasoberfläche des Kolbens sowie durch die Wirkung der Glasperlen bedingt sein. Im Gegensatz dazu war für die Liposomendarstellung in den beiden Reagenzglasstypen die Ultraschallung (s. im Folgenden) entscheidend für die Ablösung des Lipidfilms. Insgesamt führte die Liposomendarstellung in den Gläsern schmalen Durchmessers (Reagenzgläser von Typ 2) häufiger zur Bildung größerer Aggregate als in den Reagenzgläsern größeren Durchmessers (Typ 1). Dies könnte auf eine günstigere Geometrie der Reagenzgläser des Typs 1 zurückzuführen sein, durch die bei der Ultraschallung mehr Energie in die Liposomendispersion weitergeleitet wurde. Aus diesem Grund wurden für sämtliche Experimente 100 × 16 mm-Reagenzgläser (Typ 1) zur Liposomendarstellung eingesetzt.

Beschallungsparameter

Nach Zugabe von HBS-Puffer durch den Pipettierroboter wurden die Lipide 20 min bei RT rehydratisiert. Zur anschließenden Beschallung wurden die Gläser einzeln von dem Greifarm des Roboters gegriffen und in das Ultraschallbad transportiert (Abb. 3.4). Beim Herunterfahren des Greifarms auf die Höhe des Ultraschallbades wurde ein Schalter betätigt, durch den das Ultraschallgerät eingeschaltet wurde. Die Wassertemperatur während der Beschallung betrug konstant 30 °C. Bei dieser Temperatur konnten aus den in dieser Arbeit verwendeten Lipid(mischung)en stets stabile und einheitliche Liposomen gebildet werden.

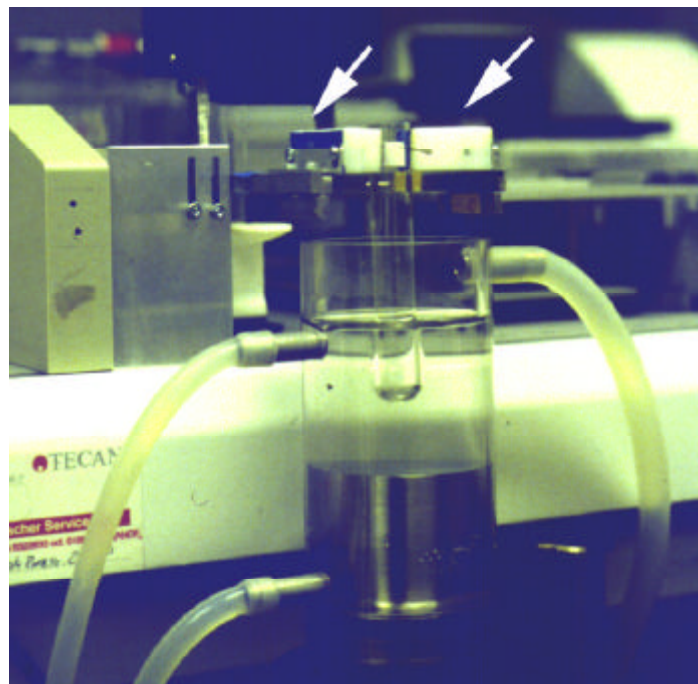


Abb. 3.4 Automatisierte Beschallung der MLV-Dispersion zur Bildung von SUV

Das Reagenzglas, das die Dispersion aus multilamellaren Liposomen enthält, wird mit Hilfe einer speziellen Haltevorrichtung von dem Greifarm des Roboters gegriffen (durch Pfeile gekennzeichnet). Bei der Positionierung des Reagenzglases in dem Ultraschallbad wird das Ultraschallgerät automatisch eingeschaltet und beim Rücktransport des Reagenzglases aus dem Ultraschallbad wieder ausgeschaltet. Die Beschallung erfolgt für 2 min in kontinuierlichem Beschallungsmodus bei einer Wassertemperatur von 30 °C.

Neben der Dauer der Ultraschallung ist die Beschallungsart (kontinuierliche Beschallung oder Beschallung in einzelnen Pulsen) ein weiterer Parameter, der entscheidend für die Bildung einer homogenen Liposomendispersion sein könnte. Prinzipiell waren zwei verschiedene Beschallungsmodi möglich: kontinuierliche Beschallung bei 100 % Pulsdauer und Beschallung im Pulsmodus mit variierbarer Pulsdauer (10 %, 20 %, ... 90 % der maximalen Pulsdauer von 1 s).

In einem Reihenversuch wurden rehydratisierte DOTAP-Lipidfilme in Reagenzgläsern für 1, 2, 3, 5, 8 bzw. 10 min in kontinuierlichem Beschallungsmodus (100 % Pulsdauer) oder für jeweils 1, 2, 3, 5, 8, 10 oder 15 min im Pulsmodus bei 50 % der maximalen Pulsdauer beschallt.

Die resultierenden Liposomendispersionen zeigten unabhängig vom Beschallungsmodus nahezu übereinstimmende Größenverteilungen in der PCS-Messung: In allen Fällen ($n = 22$) wurden zwei bis drei Liposomenpopulationen beobachtet, die über die Messdauer von 15 min weitgehend konstant blieben. 81-100 % der Liposomen zeigten jeweils eine Größe zwischen 21 nm und 105 nm. Bei einer Beschallungsdauer von 10 min bei kontinuierlichem Beschallungsmodus wurden außerdem die Reagenzgläser stark beansprucht, sodass es gelegentlich zu Glasbruch kam.

Da die Liposomen letztlich in der Transfektion eingesetzt werden, wurden sechs der oben beschriebenen Liposomenpräparationen für die Transfektion von COS-7-Zellen verwendet (Tab. 3.3).

Beschallungsdauer	1 min	2 min	3 min	5 min	8 min	2 min
Pulsdauer (Anteil der max. Dauer von 1 s)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	50 %
Transfektionseffizienz (rlu/ μ g Protein)	18660 \pm 5337	14438 \pm 2849	14896 \pm 2756	21177 \pm 9138	16297 \pm 2131	20932 \pm 5085

Tab. 3.3 Einfluss der Beschallungsparameter von DOTAP-Liposomen auf die DOTAP-vermittelte Transfektion von COS-7-Zellen mit pCMXluc

Für jede Liposomenpräparation sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der Transfektionseffizienzen aus 8 Wells dargestellt.

Wie aufgrund der homogenen Größenverteilung erwartet wurde, ergaben sich trotz unterschiedlicher Beschallungsmodi bei der Liposomenherstellung ähnliche Transfektionseffizienzen, die zwischen 14000 rlu/ μ g und 21000 rlu/ μ g lagen. Die Transfektion ist demnach wenig anfällig für Änderungen der Beschallungsparameter bei der Liposomenherstellung.

Aus den Daten über die Größenverteilung der Liposomen und die Transfektionseffizienzen der zugehörigen Lipoplexe konnte keine ideale Beschallungsdauer ermittelt werden, sondern sämtliche Beschallungszeiten von 1-10 min bei 100 % oder 50 % Beschallungsintensität erbrachten ähnliche Resultate. Für das Screening von Transfektionslipiden sollte die Beschallungszeit möglichst kurz sein, um möglichst viele Lipide in Folge in einem Experiment zu testen. Daher wurde für alle weiteren Experimente eine Beschallungsdauer von 2 min bei kontinuierlichem Beschallungsmodus und 30 °C Wasser(bad)temperatur gewählt.

Herstellung einheitlicher Verdünnungen für Lipide unterschiedlicher Valenz

Aufgrund der Eigenschaften der Roboter-Software konnten alle Liposomendispersionen in einem Testlauf (max. 9 pro Lauf) nur in einer und derselben Vorverdünnung (z. B. 1:10) angesetzt werden (s. unter 3.1.2.1). Wurden Lipide unterschiedlicher Valenz in einem einzigen Robotertestlauf eingesetzt, musste die Lipidmenge dementsprechend bereits vor der Liposomenherstellung – durch die Einwaage – nivelliert werden, um gleiche Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse zu erhalten.

Hierzu wurden Liposomendispersionen von 0,645 mM und 1,935 mM des trikationischen Lipids CAc42 (und DOPE im gleichen Molverhältnis) durch unterschiedliche Einwaage hergestellt. Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Konzentrationen die Liposomenherstellung beeinflussen, wurden die Lipoplexe zur Transfektion von COS-7-Zellen eingesetzt. Die beiden Liposomendispersionen wurden im automatisierten Transfektionsablauf (mit jeweils acht Lipid/DNA-Ladungsverhältnissen pro Lipid) gleich behandelt, sodass im ersten Fall letztlich Lipoplexe in (rechnerischen) Ladungsverhältnis von 0,75 bis 15 (s. Tab. 2.3) und im zweiten Fall von 2,25 bis 45 transfiziert wurden.

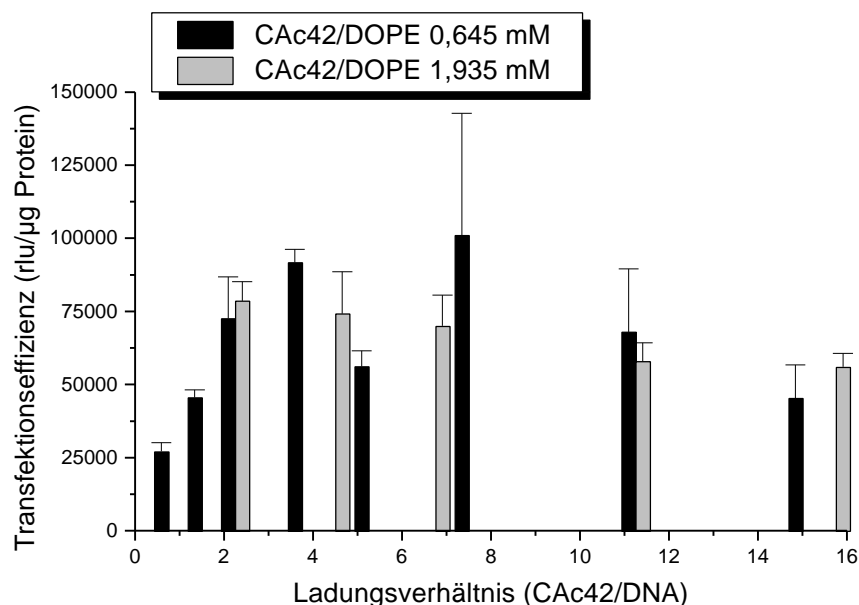


Abb. 3.5 Verwendung von Liposomendispersionen unterschiedlicher Molarität im Transfektionsexperiment

CAC42/DOPE-Liposomen (0,645 mM und 1,935 mM) wurden in demselben Transfektionstestlauf für die Transfektion von COS-7-Zellen mit pCMXluc eingesetzt. Dargestellt sind die resultierenden Transfektionseffizienzen für beide Präparationen für Ladungsverhältnisse zwischen 0,75 und 15,75 als Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei 96-Well.

Im Bereich der überlappenden Ladungsverhältnisse (0,75 bis 15,75) führten beide Liposomenpräparationen unabhängig von ihrer jeweiligen Konzentration zu übereinstimmenden Transfektionseffizienzen (Abb. 3.5). Damit war die Voraussetzung für eine einheitliche Vorverdünnung von Liposomendispersionen im automatisierten Transfektionsablauf bei Lipiden unterschiedlicher Valenz gegeben. Dies schließt jedoch nicht aus, dass bei größeren Konzentrationsunterschieden bzw. stärker verdünnter Liposomendispersion als in dieser Arbeit benötigt (maximal Faktor 3) die Stabilität der Liposomen beeinträchtigt sein könnte.

Wie in einer Studie gezeigt wurde, existiert für DOTAP-enthaltende Liposomen eine kritische Konzentration bei 70 μM , deren Unterschreitung durch Verdünnung zu Instabilität der Liposomen führt [170, 172]. Diese kritische Konzentration ist vom verwendeten kationischen Lipid abhängig, wirkt sich aber bei entsprechenden Lipid/DNA-Molverhältnissen auch auf die (In)stabilität der Lipoplexe aus [171]. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten kationischen Lipiden wurde eine derart niedrige Konzentration der Liposomendispersion nicht erreicht, sondern eine etwa zehnmal höhere. Bei auftretender Liposomeninstabilität eines unbekanntes zu screenenden Lipids sollte jedoch neben strukturellen Ursachen auch der Faktor der Konzentration in Erwägung gezogen werden.

3.1.2 Lipoplexbildung

Die Formierung von Lipoplexen aus Lipid (in liposomaler Form) und DNA in verschiedenen Ladungsverhältnissen (Abb. 3.6) ist einer der wichtigsten und komplexesten Schritte im gesamten Transfektionsexperiment. Zum einen müssen beim Übertrag dieses Teilbereichs von der manuellen auf die Pipettierung im Roboter zahlreiche Parameter verändert werden, z. B. vorverdünnte Liposomendispersionen und kleinere Lipoplexansätze in einer *Deep-Well*-Platte hergestellt werden. Außerdem muss gewährleistet sein, dass der Roboter die jeweils benötigten Volumina an Liposomendispersion und DNA-Lösung korrekt pipettiert. Zum anderen ist es erforderlich, DNA- und Lipidmengen für das 96-Well festzulegen sowie den zur Komplexbildung verwendeten Puffer und die Komplexbildungsdauer zu optimieren.

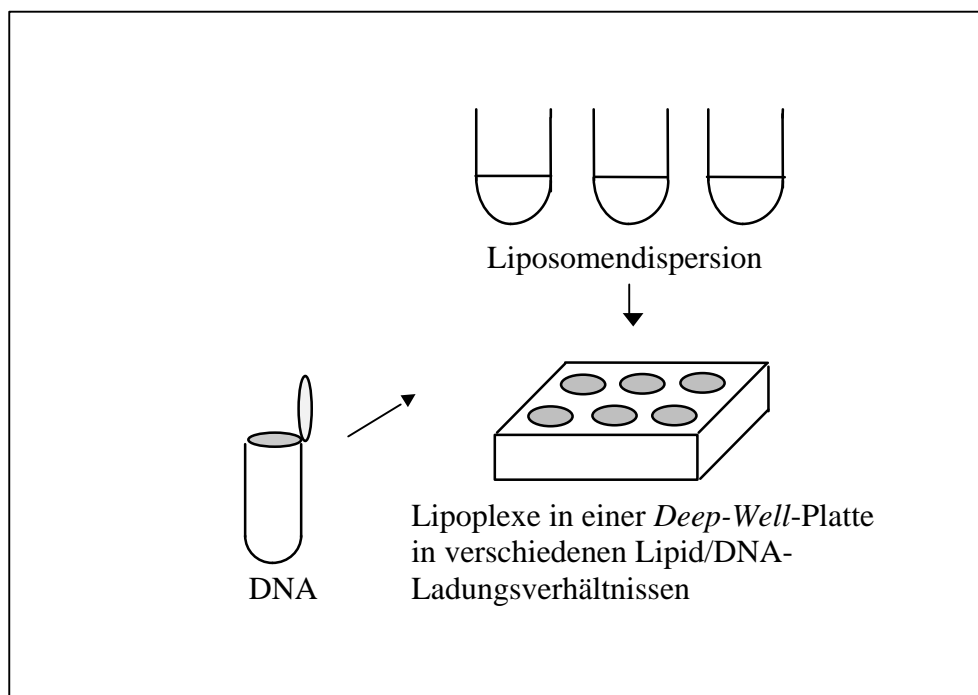


Abb. 3.6 Schema der automatisierten Lipoplexbildung

3.1.2.1 Aspekte der Automatisierung

Vorverdünnung der Liposomendispersion

Um aus einer Liposomendispersion Lipoplexe mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen herzustellen, wurden verschiedene Volumina der Liposomendispersion eingesetzt (die später mit einer konstanten DNA-Menge komplexiert wurden). Am Beispiel des monokationischen Lipids DOTAP erläutert, wurden für einen Triplett-Ansatz (d. h. drei zu transfizierende Wells plus Überschussvolumen) im LV 1 bei einer DNA-Menge von 125 ng pro Well 1,2 µl der 1,29 mM Liposomendispersion benötigt (Tab. 2.3 und 2.4 [jeweils bezogen auf 0.129 mM]). Da derart kleine Volumina nicht mehr exakt von dem Roboters pipettiert werden können, wurde die Liposomendispersion in einem Zwischenschritt vorverdünnt. Für monokationische

Lipide wurde eine 1:10-Verdünnung verwendet, für di- oder trikationische (bei gleicher Molarität der verwendeten Liposomendispersion) eine 1:20- bzw. 1:30-Verdünnung, sodass in jedem Fall Volumina über 10 µl zu pipettieren waren.

Lipoplexbildung in Abhängigkeit vom Volumen des Komplexierungsansatzes

Im Zuge der Automatisierung des Transfektionsablaufs wurde das Volumen der Lipoplexansätze verringert: Für die manuelle Lipoplexbildung (siehe unter 2.2.4.1) wurden meist 900 µl-Ansätze (für 10 Wells mit je 90 µl pro 96-Well) verwendet (tatsächlich pipettiert wurden hieraus 8 Wells; die Restmenge diente als Sicherheits- bzw. Überschussvolumen). Um einen höheren Durchsatz im automatisierten Screening zu erzielen, sollten die Komplexierungsansätze für Dreifachbestimmungen auf ein Volumen entsprechend einem 360 µl-Ansatz (4 Wells, davon 1 Well als Sicherheitsvolumen) verringert werden. Hat nun ein verändertes Gesamtvolumen bei jeweils gleicher Konzentration an Liposomen und DNA Einfluss auf die Transfektionseffizienz?

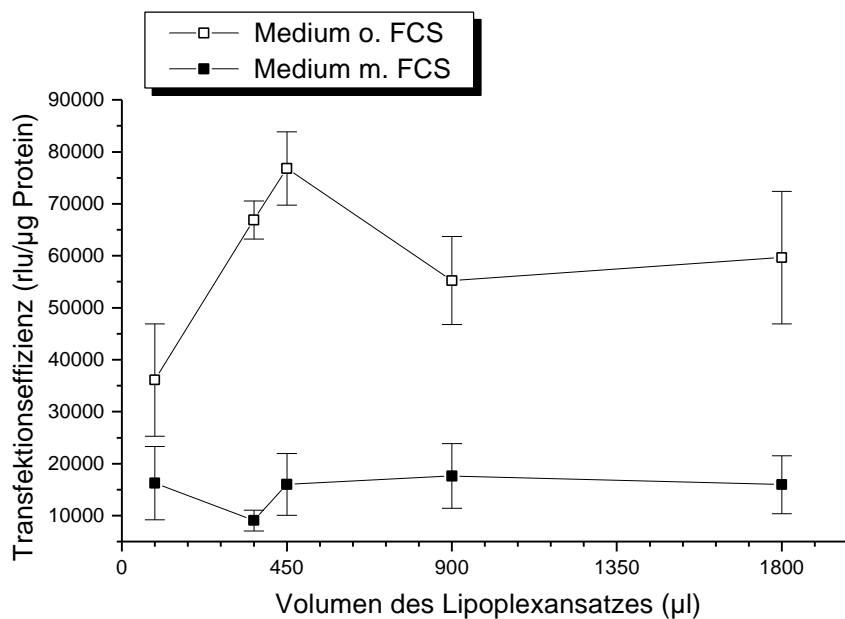


Abb. 3.7 Einfluss des Volumens der Lipoplexansätze auf die Transfektionseffizienz

COS-7-Zellen in zwei 96-Well-Platten (mit 5 % bzw. ohne Serum (FCS) im Kulturmedium) wurden mit separat angesetzten DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen (für 1, 4, 5, 10 bzw. 20 Wells mit je 90 µl pro Well) transfiziert. Für die verschiedenen Ansätze wurde jeweils folgende Anzahl von Wells transfiziert und ausgewertet: 90 µl-Ansatz: n = 3 × 1 Well; 360 µl-Ansatz: n = 3 × 3 Wells; 450 µl-Ansatz: n = 3 × 4 Wells; 900 µl-Ansatz: n = 2 × 8 Wells; 1800 µl-Ansatz: n = 1 × 16 Wells. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils ermittelten Transfektionseffizienzen. Zur Veranschaulichung wurden die einzelnen Punkte aus jedem Experiment miteinander verbunden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Komplexierungsansätze von 90 µl, 360 µl, 450 µl, 900 µl bzw. 1800 µl hergestellt und in Transfektionsexperimenten eingesetzt. Die Lipofektion

wurde hierzu mit COS-7-Zellen, die in serumhaltigem Medium oder in serumfreiem Medium kultiviert wurden, durchgeführt.

Wie Abb. 3.7 zeigt, bestand bei der Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium kein Unterschied zwischen den Transfektionseffizienzen der Lipoplexansätze unterschiedlichen Volumens. Bei der Transfektion in serumfreiem Kulturmedium waren die Transfektionseffizienzen insgesamt etwa um den Faktor zwei bis vier höher und in sich weniger konstant. Die Transfektionseffizienz für das Ansatzvolumen von 90 μ l war hier etwa halb so hoch wie für das Komplexierungsvolumen von 360 μ l. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen könnten diese Unterschiede in den Transfektionseffizienzen jedoch zufallsbedingt sein. Ein spezifischer Einfluss des serumhaltigen Kulturmediums auf die Komplexierungsansätze konnte – abgesehen von der generellen Reduzierung der Transfektionseffizienz im Verhältnis zur Effizienz unter serumfreien Bedingungen – nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind einerseits die Voraussetzung für die Umstellung der Transfektion vom „Handbetrieb“ auf die automatisierte Durchführung (Kapitel 2.2.4.2), andererseits für (manuell pipettierte) Experimente mit größeren Lipoplexansätzen, die oft für den Vergleich verschiedener Parameter erforderlich waren.

Eine Alternative zur bisherigen Methode der Lipoplexdarstellung in Mehrfachansätzen wäre beispielsweise das „1 Lipoplexansatz – 1 transfiziertes Well“-Prinzip: Jedes transfizierte Well einer 96-Well-Platte entspräche einem individuellen Lipoplexansatz und Transfektionsexperiment. Der Nachteil dieses Vorgehens bestände darin, dass die automatisierte Lipoplexpipettierung für einen derartigen Ansatz sowohl mehr Zeit als auch Platz (für die einzelnen Reaktionsgefäße) und dementsprechend höheren Koordinationsaufwand beanspruchen würde. Nach den Ergebnissen aus Abb. 3.7 lassen sich mit einem 360 μ l-Ansatz für 3 zu transfizierende Wells gleichwertige Resultate erzielen, die aber mit weniger Aufwand für ein automatisiertes Screening verbunden sind.

Automatisierte Lipoplexbildung in einer *Deep-Well*-Platte

Hauptunterschiede zwischen manueller und automatisierter Lipoplexbildung sind neben dem Einsatz eines Pipettierroboters die verwendeten Reaktionsgefäße sowie der Ort der Durchführung. Während sämtliche Schritte des Transfektionsablaufs gewöhnlich unter (semi)sterilen Bedingungen (z. B. in einer Sicherheitswerkbank Klasse II) pipettiert werden, findet die Pipettierung im Roboter in normaler Raumluft statt. Statt autoklavierter 1,5 ml- oder 2 ml-Reaktionsgefäße wurden autoklavierte *Micronics*-Röhrchen aus Polypropylen (max. 1,4 ml) in einer *Deep-Well*-Platte mit 96 Kavitäten verwendet (siehe unter 2.2.4.2). Da grundsätzlich autoklavierte Gefäße und Puffer eingesetzt wurden und das Kulturmedium der transfizierten Zellen 1 % Antibiotika enthielt, traten keine Kontaminationen durch die Transfektion auf. Die Lipoplexbildung konnte daher unter diesen Bedingungen problemlos auf den Pipettierroboter übertragen werden.

Überprüfung der Pipettiergenauigkeit des Roboters bei der Lipoplexbildung

Das exakte Pipettieren korrekter Volumina an Liposomendispersion bei der Herstellung der Lipoplexe war die Grundvoraussetzung für eine automatisierte Durchführung der Lipoplexbildung. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst mehrere automatisierte Schritte aneinander gereiht („1:10-Verdünnung“ der Liposomendispersion; „Lipoplexbildung“, aufgeteilt in Liposomen- und DNA-Zugabe (statt DNA wurde HBS-Puffer pipettiert) Abb. 3.8).

Hierzu wurden Liposomen eingesetzt, die mit dem lipophilen Fluorophor DPH (1,6-Diphenylhexa-1,3,5-trien) markiert waren (siehe Kapitel 2.2.6.5), das sich in Lipidmembranen einlagert, sodass anhand der gemessenen DPH-Fluoreszenz auf die Menge pipettierten Lipids rückgeschlossen werden konnte. Die zur Lipoplexbildung (für eine *Deep-Well*-Platte) verwendeten Volumina pro Well (360 μ l) waren zu groß, um sie in die Wells einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten 96-Well-MTP zu pipettieren. Daher wurden jeweils 90 μ l der Liposomendispersion pro Ladungsverhältnis mit Hilfe eines weiteren automatisierten Pipettierschrittes („Lipoplexübertrag“) (Abb. 3.8) auf eine weiße Messplatte übertragen (anstelle der sonst verwendeten Zellkulturplatte). Die anschließend gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 3.8 dargestellt.

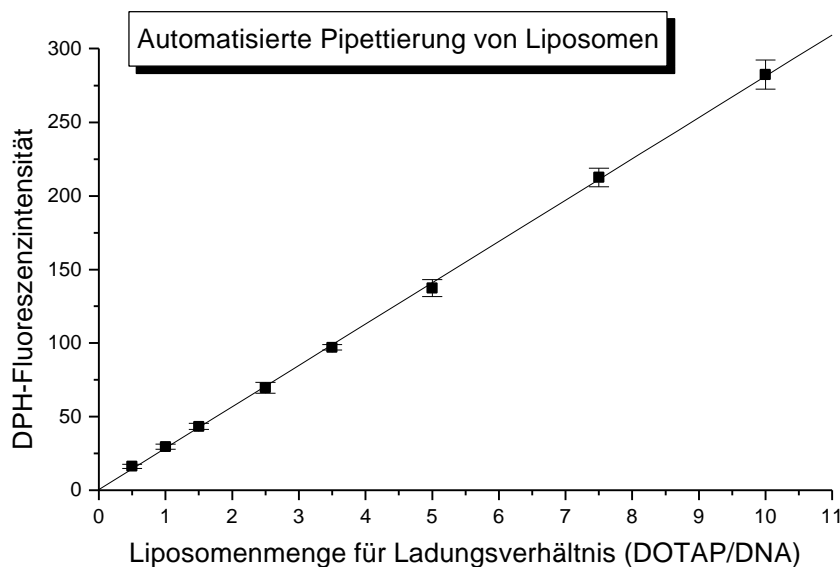


Abb. 3.8 Bestimmung der Pipettiergenauigkeit des Genesis bei der Lipoplexbildung

DPH-markierten DOTAP-Liposomen (2 Mol-% DPH) wurde nach den automatisierten Pipettierschritten „1:10-Verdünnung der Liposomendispersion“ und „Lipoplexbildung“ (Zugabe von HBS-Puffer statt DNA) in eine weiße 96-Well-Messplatte übertragen (2.2.6.5) und die DPH-Fluoreszenzintensität bestimmt. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 9 Wells (3 Ansätze mit jeweils 3 Wells auf der Testplatte) dar. Die abgebildete Regressionsgerade wurde nachträglich eingefügt.

Für die unterschiedlichen, ansteigenden Volumina der Liposomendispersion (für acht verschiedene Ladungsverhältnisse) wurden ansteigende Fluoreszenzintensitäten detektiert (Abb. 3.8). Da die einzelnen DPH-Fluoreszenzintensitäten durch eine Regressionsgerade beschrieben werden konnten, bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der pipettierten

Liposomenmenge (mit jeweils 2 Mol-% DPH pro Lipidanteil) und der gemessenen Fluoreszenzintensität des DPH-Labels. Somit kann von korrektem automatisiertem Pipettieren der zugehörigen Liposomenvolumina für die Lipoplexbildung und auch von einer korrekten Ausführung der vorausgehenden Pipettierschritte ausgegangen werden.

3.1.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen

Wahl geeigneter Lipid- und DNA-Mengen für Lipofektionen im 96-Well-Format

Lipofektionen werden vielfach in 6-Well-Platten durchgeführt; hier liegen die meisten Erfahrungen vor. 6- und 96-Well unterscheiden sich etwa um den Faktor 30 in der Bodenfläche. Da so auch die Zahl eingesäter Zellen pro 96-Well je nach Zelllinie etwa um den Faktor 20 bis 30 geringer ist als im 6-Well, bietet sich für DNA- und Lipidmenge im 96-Well entsprechend 1/20 bis 1/30 der für 6-Wells verwendeten Mengen an. Im Fall der Lipofektion von DOTAP hieße das – in Abänderung des Transfektionsprotokolls für DOTAP (Roche) – statt 2,5 µg DNA pro 6-Well etwa 0,125-0,08 µg DNA pro 96-Well. Bei Einhaltung des Ladungsverhältnisses 2,5 sind dementsprechend rund 0,75 µl bzw. 0,50 µl einer 1,29 mM (1 mg/ml) DOTAP-Liposomendispersion erforderlich.

Wie aus einem Optimierungsschema hervorgeht [150], zeigte das monokationische, DOTAP-ähnliche Lipid DMRIE (pur oder kombiniert mit verschiedenen Molanteilen des Helferlipids DOPE) in verschiedenen Zelllinien, u. a. auch COS-7, gute bis mittlere Reporterogenaktivitäten bei 0,125 µg DNA pro 96-Well. Die zugehörige Menge kationischen Lipids betrug hierbei 0,67 µg, sodass die DOTAP/DNA-Menge in etwa der in der vorliegenden Arbeit gewählten gleichkommt. Da diese DNA-Menge von 0,125 µg mit der theoretisch hergeleiteten (0,08-0,125 µg) gut übereinstimmt, wurden für die weiteren Transfektionen 0,125 µg pro 96-Well verwendet.

Zur Untersuchung des Transfektionsverhaltens der kationischen Lipide wurden gemäß dem 96-Well-Plattenlayout (Abb. 3.1) Lipoplexe in 8 Lipid/DNA-Ladungsverhältnissen zur Transfektion eingesetzt. Bei einer konstanten DNA-Menge von 0,125 µg pCMXluc pro 96-Well wurden entsprechend 8 verschiedene Liposomenmengen zur Lipoplexbildung benötigt.

Zur Transfektion von COS-7-Zellen mit dem monokationischen Lipid DOTAP wurden Lipoplexe in Ladungsverhältnissen von 0,5 bis 7,5 verwendet. Aus den resultierenden Transfektionseffizienzen ließ sich ein Profil erkennen, das die höchste Transfektionseffizienz (circa 35000 rlu/µg) beim Ladungsverhältnis 2,5 zeigte, was für DOTAP charakteristisch ist (Abb. 3.9).

Als Beispiel für ein mehrfach kationisches Lipid wurde CAc43 in äquimolarer Mischung mit dem Helferlipid DOPE verwendet. Dieses Lipid trägt in der Kopfgruppe drei Aminofunktionen und unterscheidet sich durch seinen lipophilen Cholesterolanker deutlich von DOTAP, das zwei aliphatische Ölsäureketten trägt. Im Lipofektionsexperiment mit COS-7-Zellen wurden die Ladungsverhältnisse 1-15 untersucht.

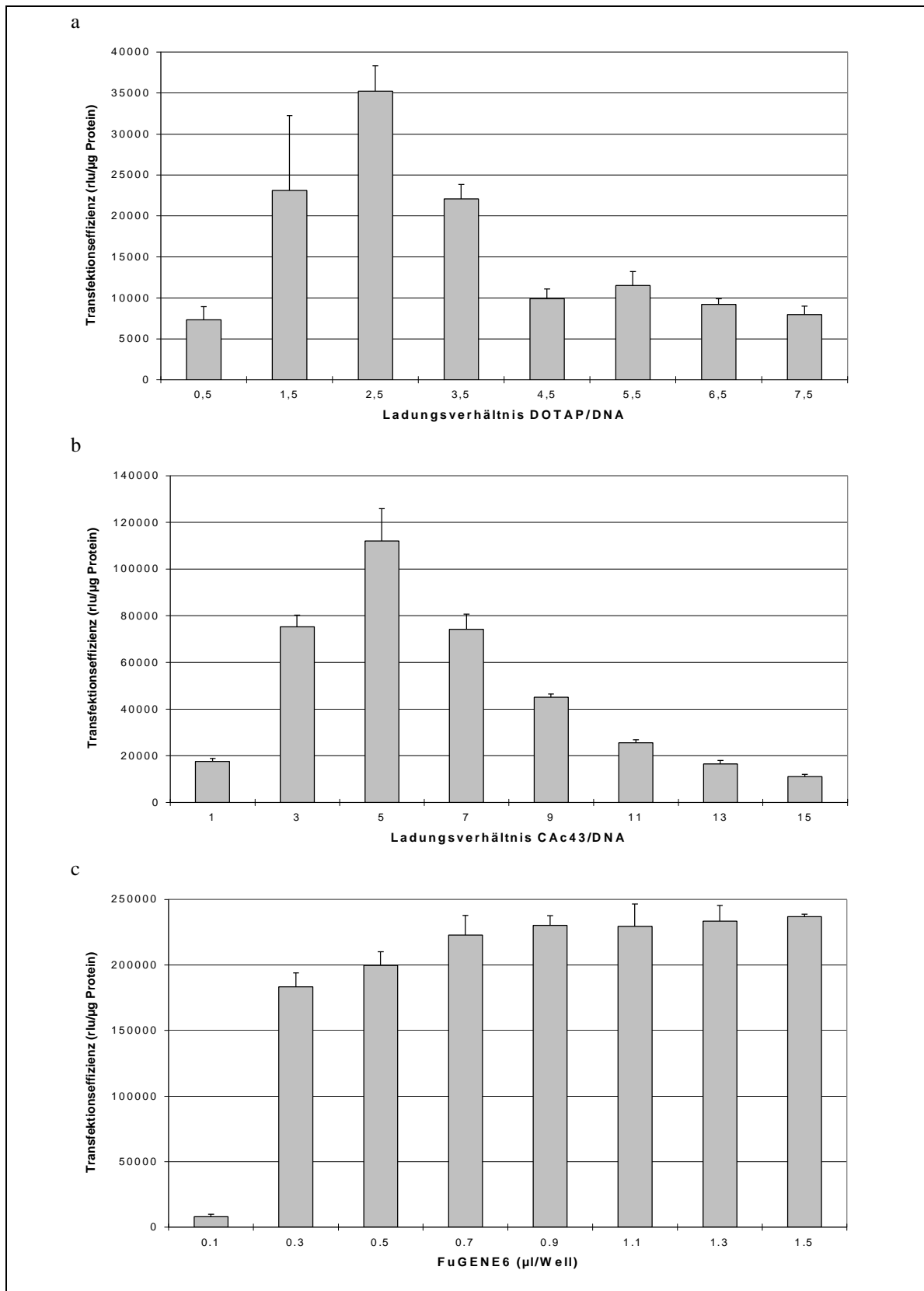


Abb. 3.9 Transfektionsprofile für die Lipofektion in 96-Well für 8 Lipid/DNA-(Ladungs)verhältnisse COS-7-Zellen in einer 96-Well-Platte wurden mit Lipoplexen aus pCMXluc und (a) DOTAP, (b) CAC43/DOPE bzw. (c) FuGENE™6 in jeweils 8 Ladungsverhältnissen transfiziert (2.2.4.2). Die pCMXluc-Menge betrug jeweils 0,125 µ/Well. Zur Berechnung der dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) wurden jeweils die Transfektionseffizienzen aus drei Wells ausgewertet.

Auch dieses Lipid zeigte ein charakteristisches Transfektionsprofil, dessen max. Transfektionseffizienz bei einem Ladungsverhältnis von 7 lag. Die erreichte maximale Transfektionseffizienz lag etwa um den Faktor 3 über der von DOTAP (Abb. 3.9 b).

Anhand eines analogen Transfektionsexperiments mit dem käuflichen Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 wurde exemplarisch das Transfektionsverhalten einer Lipidmischung unbekannter Zusammensetzung charakterisiert. FuGENE™ 6 ist ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz, das neben Lipiden auch andere Komponenten enthält (FuGENE™ 6-Produktinformation, Roche; da keine Daten über die Molarität zur Verfügung standen, wurde die eingesetzte Reagenzmenge in $\mu\text{l}/\text{Well}$ angegeben). Im Gegensatz zu den beiden anderen Lipiden bzw. -mischungen war kein deutliches Maximum der Transfektionseffizienz bei einem bestimmten Ladungsverhältnis (bzw. FuGENE™ 6/DNA-Mengenverhältnis) zu erkennen (Abb. 3.9 c). Während bei der geringsten Reagenzmenge ($0,1 \mu\text{l}$ pro 96-Well) eine sehr geringe Transfektionseffizienz zu beobachten war, wurden für Reagenzmengen von $0,3\text{-}0,9 \mu\text{l}$ allmählich ansteigende Transfektionseffizienzen von $200000 \text{ rlu}/\mu\text{g}$ und höher erzielt; größere Reagenzmengen führten zu keiner weiteren Zunahme der Transfektionseffizienzen.

Wie aus dieser Untersuchung hervorgeht, war die gewählte DNA-Menge sowie die Lipidmengen für die jeweils untersuchten Ladungsverhältnisse dazu geeignet, das Transfektionsverhalten der drei unterschiedlichen Lipid(mischung)en durch Transfektionsprofile zu charakterisieren.

Erstellung eines detaillierten Transfektionseffizienz/Zytotoxizitäts-Profiles zur Optimierung der Lipid- und DNA-Mengen

Zur genaueren Einordnung der aus den gewählten Lipid- und DNA-Mengen erhaltenen Transfektionseffizienzen und zur Untersuchung möglicher lipid- oder/und DNA-abhängiger toxischer Effekte wurde ein detaillierteres Transfektionsprofil für DOTAP, CAc43/DOPE und FuGENE™ 6 erstellt, bei dem sowohl die Lipid- als auch die DNA-Menge variiert wurde.

Während die Lipidmengen hierbei jeweils den Mengen entsprachen, die zur Untersuchung der 8 Ladungsverhältnisse in den oben dargestellten Experimenten eingesetzt worden waren (Abb. 3.9 a-c), wurden statt $0,125 \mu\text{g}$ 8 verschiedene DNA-Mengen verwendet. Aus der Kombination der einzelnen Lipid- und DNA-Mengen resultierte eine 8×8 -Matrix.

Nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen konnte ein zweidimensionales Transfektionsprofil sowie ein entsprechendes Toxizitätsprofil (aus den jeweils gemessenen Proteinmengen) erstellt werden (Abb. 10 a, b). Die Transfektionseffizienzen und Proteinmengen wurden jeweils als prozentualer Anteil der maximal erreichten Messwerte ausgedrückt.

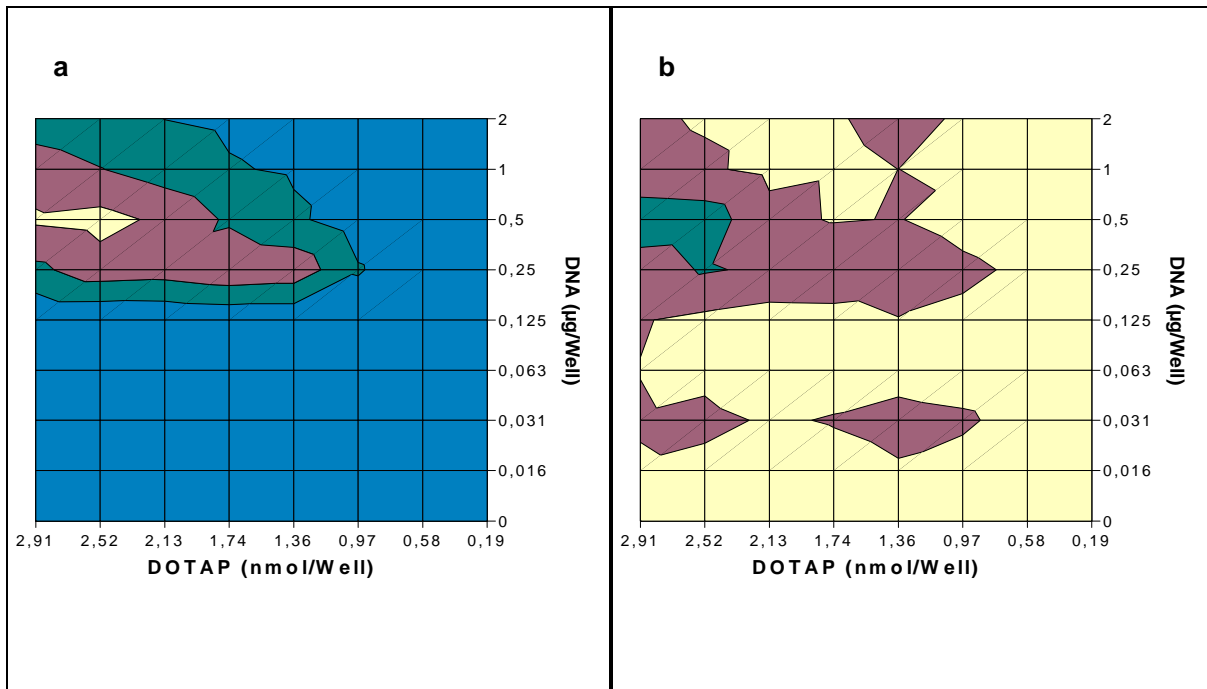


Abb. 3.10 Transfektionseffizienz (a) und Proteingehalt (b) nach DOTAP-vermitteltem Gentransfer in Abhängigkeit von der Lipid- und DNA-Menge pro Well

COS-7-Zellen in 96-Wellen wurden mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert (2.2.4.2). Die jeweils pro Well eingesetzten Lipid- und DNA-Mengen (in nmol DOTAP bzw. µg pCMXluc) sind an der y- bzw. x-Achse angegeben. Für jede Lipid/DNA-Kombination wurden die Mittelwerte aus drei Wells berechnet. Zum leichteren Vergleich mit Profilen von Lipiden unterschiedlicher Valenz und unterschiedlichen Molekulargewichts (Abb. 3.11) wurde die Lipidmenge in nmol angegeben. Die Transfektionseffizienzen (a) und Proteinnengen (b) wurden in vier farblich unterschiedlich gekennzeichnete Bereiche untergliedert, die 100-75 % (gelb), 75-50 % (rot), 50-25 % (grün) bzw. < 25 % (blau) der maximalen Transfektionseffizienz bzw. des maximalen Proteingehalts, die in diesem Experiment erreicht wurden, betragen.

Hier zeigte sich ein kleiner Bereich maximaler Transfektionseffizienzen bei 2,52 bzw. 2,91 nmol DOTAP/Well und einer DNA-Menge von 0,5 µg/Well. Dieser war von einem Bereich etwas geringerer Transfektionseffizienzen (50-75 % der maximalen Effizienz) umgeben, der eine größere Zahl von Lipid/DNA-Mengenverhältnissen umfasste ($\geq 1,36$ nmol DOTAP/Well bei 0,25-1 µg DNA/Well). Bei Lipid/DNA-Kombinationen, die direkt an den nächsthöheren Effizienzbereich (50-75 %) angrenzten, wurden 25-50 % der maximalen Transfektionseffizienz erreicht. Die überwiegende Zahl der getesteten Lipid/DNA-Mengenverhältnisse ($\leq 0,125$ µg DNA/Well bzw. $\leq 0,97$ nmol/Well) führte zu geringen Transfektionseffizienzen (< 25 % des Maximums). Aus dem Vergleich der beiden „Transfektionsprofile“ von DOTAP in Abb. 3.9 a und 3.10 a geht hervor, dass bei 0,125 µg die maximale Transfektionseffizienz nicht erreicht wurde, obwohl bei dieser DNA-Menge ein charakteristisches Profil zu erkennen war.

Wie beim Vergleich des Toxizitätsprofils mit dem Transfektionsprofil auffiel, deckten sich die Bereiche mit mittlerem bis geringem Proteingehalt (25-50 % des maximalen Proteingehalts, Abb. 3.10 b) etwa mit den Bereichen, in denen hohe Transfektionseffizienzen (≥ 50 % der maximalen Transfektionseffizienz) auftraten (Abb. 3.10 a). Demzufolge schien eine zu sehr hoher Genexpression führende Lipofektion mit einer deutlichen Reduktion des Protein-

gehalts, also mit Zytotoxizität verbunden zu sein. Die überwiegende Zahl der Lipid/DNA-Kombination führte auch bei Transfektionseffizienz von 50-75 % des Maximums lediglich zu moderatem Proteinverlust (Proteinmengen 50-75 %), also sehr geringer Toxizität.

Diese Beobachtung wurde durch eine Untersuchung, in der die Zytotoxizität verschiedener Lipide in CHO-Zellen (Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters) verglichen wurde, bestätigt [107]. Hier wurde eine relativ geringe zytotoxische Wirkung von DOTAP-Liposomen bis zu einer Konzentration von 80 μM festgestellt (zum Vergleich: die höchste DOTAP-Konzentration im obigen Experiment betrug weniger als 15 μM).

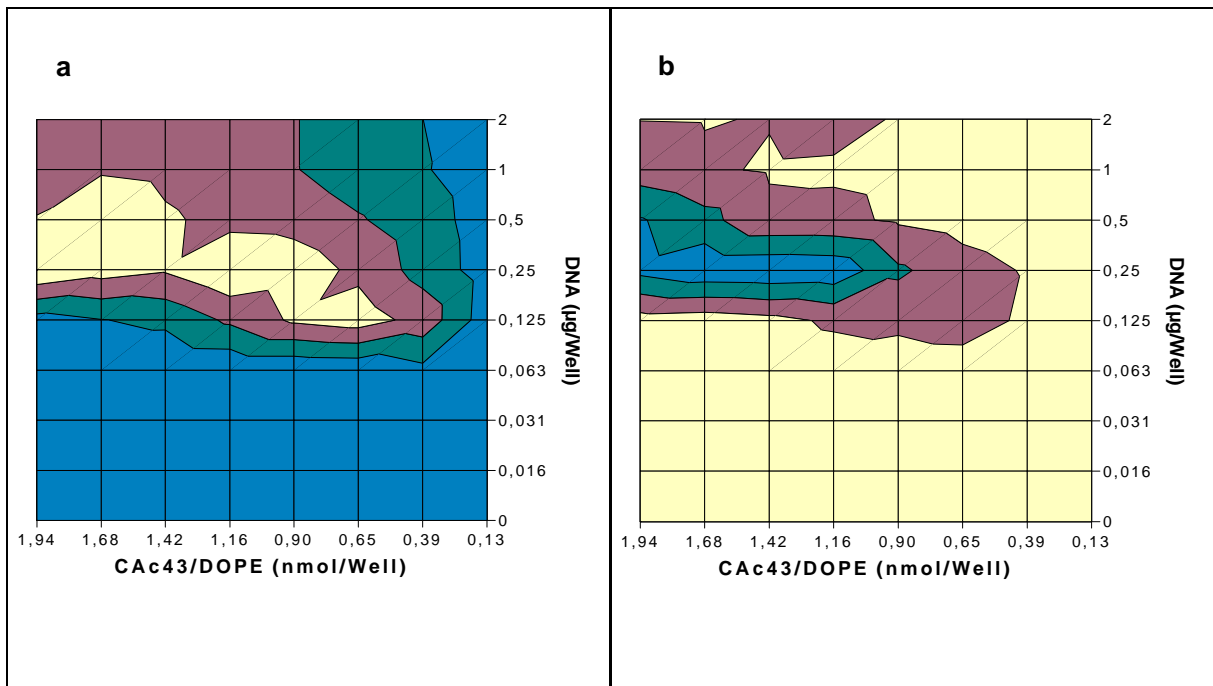


Abb. 3.11 Transfektionseffizienz (a) und Proteingehalt (b) nach CAc43/DOPE-vermitteltem Gentransfer in Abhängigkeit von der Lipid- und DNA-Menge

COS-7-Zellen in 96-Wellen wurden mit CAc43/DOPE/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert (2.2.4.2). Die jeweils pro Well eingesetzten Lipid- und DNA-Mengen (in nmol CAc43 bzw. μg pCMXluc) sind an der y- bzw. x-Achse angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Wells. Die Transfektionseffizienzen (a) und Proteinmengen (b) wurden in vier Bereiche untergliedert, 100-75 % (gelb), 75-50 % (rot), 50-25 % (grün), <math>< 25\%</math> (blau) der maximalen Transfektionseffizienz bzw. des maximalen Proteingehalts, die in diesem Experiment erreicht wurden.

In dem analogen Experiment mit dem trikationischen Lipid CAc43 kombiniert mit DOPE waren im Vergleich zur DOTAP-vermittelten Transfektion größere Bereiche mit sehr hohen (75-100 %) und hohen (50-75 %) Transfektionseffizienzen zu erkennen (Abb. 3.11 a). Beide zusammen erstreckten sich über fast alle eingesetzten Lipidmengen (die insgesamt etwas geringer waren als in der DOTAP-Matrix) und traten bei DNA-Mengen von 0,125 $\mu\text{g}/\text{Well}$ oder höher auf. Im Vergleich mit Abb. 3.10 a kann davon ausgegangen werden, dass die dort erzielte maximale Transfektionseffizienz bei 0,125 μg DNA/Well mit der in diesem Experiment erreichten in etwa übereinstimmte.

Der Bereich der höchsten Transfektionseffizienzen deckte sich mit teilweise sehr niedrigen Proteingehalten (weniger als 25 % des Maximums) (Abb. 3.11 b). Bei Transfektionseffizien-

zen von 50-75 % des Maximums war die Proteinmenge mit 50-75 % meist weniger stark reduziert. Der wesentlich größere Bereich hoher und sogar sehr hoher Zytotoxizität (bei geringeren Lipidmengen) im Vergleich zur DOTAP-vermittelten Lipofektion lässt auf eine generell stärkere zytotoxische Wirkung der CAC43/DOPE enthaltenden Lipoplexe schließen, die aber höhere Transfektionseffizienzen erzielten. Hier könnte sich die unterschiedliche Struktur der beiden kationischen Lipide auswirken. Möglicherweise könnte die verglichen mit DOTAP dreifache Zahl von Aminofunktionen pro Mol CAC43 einen negativen (toxischen) Einfluss auf die Zellen ausüben, was sich jedoch anhand dieser Untersuchung nicht beweisen lässt.

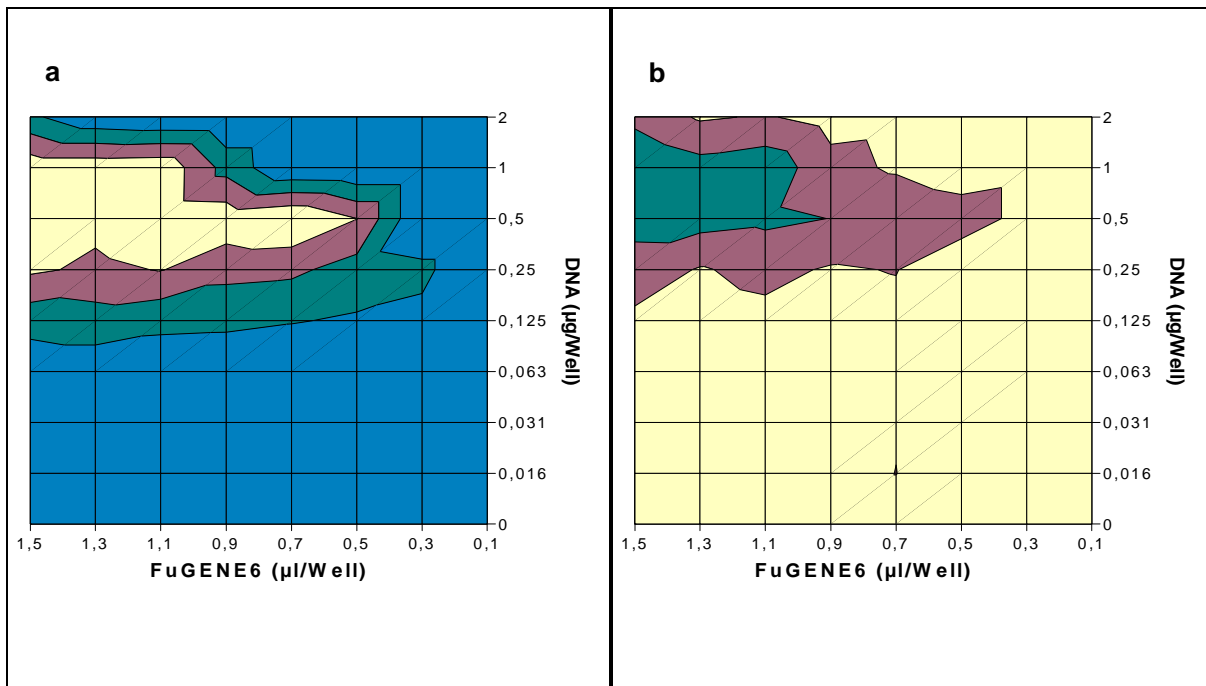


Abb. 3.12 Transfektionseffizienz (a) und Proteingehalt (b) nach FuGENETM6-vermitteltem Gentransfer in Abhängigkeit von der Lipid- und DNA-Menge

COS-7-Zellen in 96-Wellen wurden mit FuGENETM6/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert (2.2.4.2). Die jeweils pro Well eingesetzten Lipid- und DNA-Mengen (in µl FuGENETM6 bzw. µg pCMXluc) sind an der y- bzw. x-Achse angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Wells. Da bezüglich des Molekulargewichts von FuGENETM6 keine Daten zur Verfügung standen, wurde die Transfektionseffizienz auf das pro 96-Well eingesetzte Volumen bezogen. Die Transfektionseffizienzen (a) und Proteinmengen (b) wurden in vier Bereiche untergliedert, 100-75 % (gelb), 75-50 % (rot), 50-25 % (grün), < 25 % (blau) der maximalen Transfektionseffizienz bzw. des maximalen Proteingehalts, die in diesem Experiment erreicht wurden.

Im Vergleichsexperiment mit FuGENETM6 (Abb. 3.12) ähnelte das Transfektionsprofil prinzipiell den bereits mit DOTAP und CAC43/DOPE erhaltenen Profilen.

Entsprechend war der Bereich der höchsten Transfektionseffizienzen, die bei Einsatz von 0,5-1,5 µl Reagenz und DNA-Mengen zwischen 0,25 µg und 1 µg pro Well erzielt wurden, von einem Bereich mittlerer bis hoher Transfektionseffizienzen (50-75 %) umgeben, der bereits die DNA-Menge 0,25 µg/Well einschloss (Abb. 3.12).

Die FuGENETM6/DNA-Kombinationen, die zu den höchsten Transfektionseffizienzen führten, zeigten eine Reduktion des Proteingehalts auf 25-75 % des Maximalwertes (Abb. 3.12 b).

FuGENE™6 ist somit ein sehr effizientes Transfektionsreagenz, das sich zudem durch eine geringe zytotoxische Wirkung auszeichnet.

Im Vergleich der drei Profile scheint die größte Übereinstimmung im Transfektionseffizienz/Toxizitäts-Profil zwischen DOTAP und FuGENE™6 aufzutreten. Selbst im Bereich relativer maximaler Transfektionseffizienzen nahm der Proteingehalt in beiden Fällen nie so drastisch ab wie im Fall des Lipidsystems CAc43/DOPE. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass hier lediglich die relativen Transfektionseffizienzen bzw. Proteingehalte innerhalb des jeweiligen Lipidsystems verglichen wurden, da in den drei Fällen unterschiedlich hohe maximale Transfektionseffizienzen erzielt wurden (vgl. das vorige Kapitel). Die für ein Transfektionssystem relativ höchste Transfektionseffizienz muss demnach nicht zwingend von Zytotoxizität begleitet sein.

Ein ähnliches Messsystem basierend auf einem β -Galaktosidase-Reporterassay und einem Phosphataseassay zur Bestimmung der Zellvitalität [57] wurde für das monokationische Lipid DOTMA sowie für das mehrfach kationische Lipospermin DOCSPER (teilweise kombiniert mit DOPE) in mehreren Zelllinien erstellt [58]. Auch hier zeigten sich für jedes Lipid bzw. jede Lipidmischung charakteristische Reporteraktivität/Toxizitäts-Profile in Abhängigkeit vom Lipid/DNA-Verhältnis. In den meisten Fällen war hohe Reporteraktivität mit geringer Zellvitalität verbunden [57, 58], was die Resultate dieser Untersuchung (Abb. 3.10-3.12) stützt.

Während lipidspezifische Profile der Reporteraktivität durch simultane Variation von Lipid- und DNA-Menge häufig zur Optimierung der Transfektionsbedingungen und zum Vergleich von Lipiden eingesetzt wurden [36, 150], gibt die zusätzliche Betrachtung des Parameters Zytotoxizität Hinweise auf die Wirkungsweise der Lipide. Auch wenn nur ein Teilbereich der möglichen Lipid/DNA-Kombinationen in den hier vorgestellten Experimenten untersucht werden konnte, wurde deutlich, dass durch geeignete Kombination der Lipid/DNA-Mengen Transfektionseffizienz verbessert und Zytotoxizität vermindert werden kann. Als Konsequenz für ein Screening von Transfektionslipiden sollte berücksichtigt werden, dass unter Screeningbedingungen für einige Lipide nicht optimale Transfektionsbedingungen vorliegen können und somit die Skala der erreichbaren Transfektionseffizienzen nicht voll ausgeschöpft wird. Da ein solches Transfektionseffizienz/Toxizitäts-Profil zu aufwändig für ein Screening zahlreicher Lipide ist, sollte es für die Untersuchung einzelner viel versprechender Kandidaten vorbehalten bleiben.

Bezüglich der eingesetzten DNA- und Lipidmengen scheint die Kombination einer DNA-Menge von 0,125 μ g/Well mit 8 verschiedenen Lipidmengen zwar nicht immer zu maximalen Transfektionseffizienzen zu führen, hat aber den Vorteil, keine extreme Zytotoxizität auszulösen. Wie am Beispiel von DOTAP gezeigt, ist selbst bei submaximaler Transfektionseffizienz die Charakterisierung durch ein eindimensionales Transfektionsprofil bei dieser DNA-Menge möglich. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Experimente eine DNA-Menge von 0,125 μ g DNA pro Well eingesetzt.

Transfektion nicht komplexierter („nackter“) DNA

Um die Wirkung des durch Liposomen vermittelten Gentransfers genauer beurteilen zu können, wurde untersucht, ob bzw. in welchem Maße nicht komplexierte, „nackte“ DNA in der Lage ist, Zellen zu transfizieren.

Transfektionseffizienz	unbehandelte Zellen	pCMXluc	DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe
Mittelwert (rlu/ μ g Protein)	10	226	19229
Standardabweichung (rlu/ μ g Protein)	10	501	5970
VK (%)	99	222	31
Wertebereich (rlu/ μ g Protein)	0 bis 25	0 bis 1547	6358 bis 26858

Tab. 3.4 Vergleich der Transfektionseffizienz unbehandelter Zellen mit direktem und liposomenvermitteltem DNA-Transfer

COS-7-Zellen in 96-Wells wurden mit dem pCMXluc-Vektor oder mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert. Zur Bestimmung von mittlerer Transfektionseffizienz, Standardabweichung und Variationskoeffizient (VK) wurden je acht Wells sowie acht Wells mit unbehandelten Zellen ausgewertet.

Der Gentransfer nicht komplexierter DNA führte zu einer niedrigen, aber messbaren Transfektionseffizienz (Tab. 3.4). Auffällig war hier der hohe Variationskoeffizient (VK) von über 200 %, bedingt durch die große Streuung der Werte. Während in sieben von acht Wells Transfektionseffizienzen zwischen 0 rlu/ μ g Protein und 135 rlu/ μ g Protein gemessen wurden, betrug die Effizienz im achten Well 1547 rlu/ μ g Protein. Ein überhöhter Messwert aufgrund von Lichtstreuung aus einem benachbarten Well war in diesem Fall ausgeschlossen, da in vorgelagerten Wells nur Luciferaseaktivitäten knapp über 0 rlu gemessen wurden. Demzufolge war in dem betreffenden Well die Plasmid-DNA spontan in eine oder mehrere COS-7-Zellen aufgenommen worden, was durch den Nachweis der Luciferaseaktivität belegt wurde. Im Gegensatz dazu lag die gemessene Reporterogenaktivität bei unbehandelten Zellen im Bereich des Reagenzienleerwertes und umfasste lediglich einen engen Wertebereich. Auch in diesem Telexperiment ergab sich ein hoher VK (99 %), hier allerdings durch die extrem niedrigen Messwerte bedingt.

Beim lipidvermittelten Gentransfer war die Verteilung der Transfektionseffizienzen, die stets mehrere tausend rlu/ μ g Protein betrug, gleichförmiger, was zu einem wesentlich kleineren VK (31 %) führte und kann somit von spontanen Transfektionsereignissen durch nicht komplexierte DNA unterschieden werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden nach Inkubation nicht komplexierter DNA mit COS-1-Zellen gemacht: Zwar konnte eine sehr geringe Menge zellassoziierter DNA nachgewiesen werden, jedoch nahezu keine Reporterogenaktivität [33]. Zu einem gleichwertigen Ergebnis kam eine weitere Studie mit CHO-Zellen, in denen „nackte“ Plasmid-DNA keine Luciferaseaktivität hervorrief; demgegenüber wurde nach intratrachealer Injektion „nackter“ DNA in Mäuse zwar geringe, aber mit DC-CHOL/DNA-Lipoplexen vergleichbare Reporterogenaktivität nachgewiesen [3].

Da aus Transfektionsexperimenten mit nicht komplexierter DNA *in vitro* keine zusätzliche Information für das Screening zu gewinnen war, wurde bei der automatisierten Lipofektion auf den Gentransfer mit „nackter“ DNA (als eine Art „Leerwert“ für die Transfektionseffizienz) verzichtet.

Einfluss des Reporterplasmids auf die Transfektionseffizienz

Zur Optimierung des Screeningsystems gehört auch die Wahl eines geeigneten Reporterplasmids. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Plasmide, die ein Luciferase-Reportergen enthalten, zur DOTAP-vermittelten Transfektion von COS-7-Zellen eingesetzt und die resultierenden Transfektionseffizienzen verglichen (Abb. 3.13). Neben dem bisher verwendeten Vektor pCMXluc (aus zwei separat durchgeführten Plasmidreinigungen) handelte es sich um pGL2c und pRSV-Luci (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Mundt bzw. Dr. B. Buchberger).

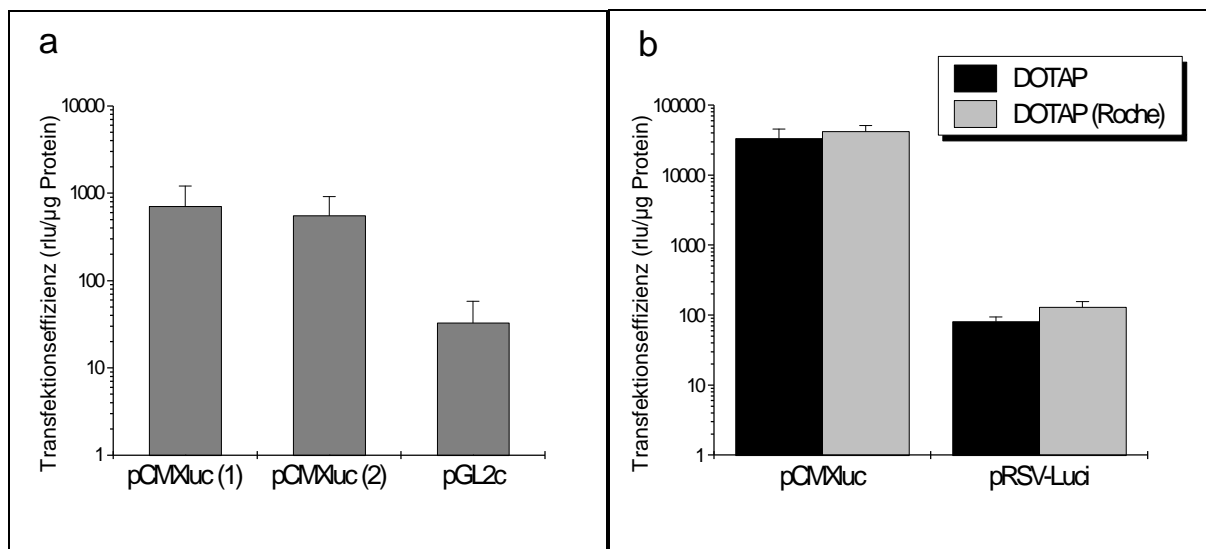


Abb. 3.13 Einfluss des verwendeten Plasmids auf die Transfektionseffizienz bei DOTAP-vermitteltem Gentransfer

Die Transfektionen wurden mit COS-7-Zellen in 96-Wellns durchgeführt. Zur Lipoplexbildung wurde je die gleiche DOTAP-Liposomendispersion verwendet und jeweils mit pCMXluc aus zwei verschiedenen Plasmidreinigungen ((1),(2)) bzw. dem Vektor pGL2c kombiniert (a). In Experiment (b) wurden zwei unterschiedliche DOTAP-Liposomen-Formulierungen eingesetzt und mit den Vektoren pCMXluc bzw. pRSV-Luci komplexiert. Das DOTAP/DNA-Ladungsverhältnis betrug in allen Fällen 2,5. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden je für acht 96-Wellns berechnet.

Zwischen den Transfektionseffizienzen für die verschiedenen DOTAP/DNA-Lipoplexe ergaben sich teils beträchtliche Unterschiede. Während durch den pGL2c-Vektor im Vergleich zu pCMXluc eine etwa um den Faktor 20 niedrigere Transfektionseffizienz erzielt wurde (Abb. 3.13 a), betrug die Differenz im Fall von pRSV-Luci mehr als zwei Zehnerpotenzen (Abb. 3.13 b). Wurde pCMXluc aus zwei verschiedenen Plasmidpräparationen eingesetzt, waren hingegen keine Unterschiede zu erkennen (Abb. 3.13 a). Ebenso führten unterschiedliche DOTAP-Formulierungen (selbst hergestellte Liposomen vs. kommerziell erhältliche liposo-

male Formulierung), die entweder mit pCMXluc oder pRSV-Luci komplexiert wurden, zu jeweils gleichen Transfektionseffizienzen (Abb. 3.13 b).

Für die Unterschiede zwischen den Transfektionseffizienzen könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein: Von geringerer Bedeutung war offensichtlich die Größe des Plasmidvektors. Diese lag für den pGL2c-Vektor bei etwa 6 kb (Promega), für den pRSV-Luci-Vektor bei rund 6,5 kb [148], während das CMXluc-Plasmid eine Größe von ca. 7,2 kb aufwies.

Das Reporterogen war in allen Fällen gleich (*Firefly Luciferase*). Daraus ergibt sich als Hauptunterschied die Promotor-Sequenz. Hier standen ein SV40-Promotor im Fall des pGL2c-Vektors und ein RSV-Promotor (aus der LTR-Sequenz des Rous-Sarkom-Virus [54]) einem CMV-Promotor gegenüber. Ob bzw. welcher zusätzliche Einfluss von den verschiedenen Enhancern, sofern vorhanden, ausging, ließ sich anhand der Experimente nicht beurteilen. Bezüglich der Promotoren gilt der CMV-Promotor als einer der stärksten zur Genexpression in Eukaryonten [9, 40], was die jeweils höchste Transfektionseffizienz für den pCMXluc-Vektor (Abb. 3.13 a und b) erklären könnte.

Die im Vergleich dazu wesentlich geringeren Transfektionseffizienzen der durch den RSV- bzw. den SV40-Promotor gesteuerten Luciferasegene könnten auf die schwächere Promotorwirkung zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird durch mehrere Untersuchungen zur Wirkung von Promotoren bei Gentransfervektoren gestützt. Beim Gentransfer mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren führte das den CMV-Promotor enthaltende Plasmid in drei verschiedenen Zelllinien stets zur höchsten Reporterogenaktivität (β -Galaktosidase) und Transfektionsrate im Vergleich von insgesamt vier Promotoren (CMV, CMV/ACT, MAD, SV40) [27]. In der DDAB- (N,N-Dimethyl-N,N-dioctadecyl-ammonium-bromid-) vermittelten Lipofektion von COS-7-Zellen führte die Verwendung eines Plasmids mit CMV-Promotor im Vergleich zu Vektoren mit SV40-Promotor bzw. β -Actin-Promotor zu etwa 2,5-mal bzw. 13-mal höherer β -Galaktosidaseaktivität [160]. Wie gezeigt werden konnte, ist die Transfektionseffizienz nach Lipofectamine-vermittelter Transfektion von C2C12-Zellen (Myoblasten) in vitro ebenfalls abhängig vom verwendeten Promotor: Ein β -Galaktosidase-Vektor mit CMV-Promotor erbrachte dreimal höhere Werte als mit RSV-LTR-Promotor bzw. viermal höhere als mit SV40-Promotor [113]. Der relative Unterschied in der Effizienz zwischen dem SV40- und dem RSV-Promotor war in dieser Studie wesentlich geringer als in den hier ermittelten Daten (Abb. 3.13). Dies könnte durch die verschiedenen Zelltypen, Nierenfibroblasten (COS-7) vs. Myoblasten, zu erklären sein (siehe im Folgenden).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wahl eines geeigneten Reporterplasmids (mit geeigneten Strukturelementen wie Promotor, Enhancer) ein entscheidender Faktor zur Optimierung des Gentransfers bzw. der Transfektionseffizienz ist. Da sich der pCMXluc-Vektor im Vergleich als sehr effizient erwies, wurden er für sämtliche Experimente in dieser Arbeit verwendet.

Komplexierungspuffer

Das Zusammenführen von Liposomen und DNA, d. h. die Bildung der Lipoplexe, wird meist in einem Puffersystem (z. B. HBS, pH 7,4) durchgeführt. Häufig sind kommerzielle Transfektionslipide oder -reagenzien bereits in wässriger (Puffer)lösung erhältlich – als Beispiel seien hier die liposomalen Transfektionsreagenzien DOTAP[®] und DOSPER[®] (Roche) in HBS-Puffer genannt. Daneben kommen auch alkoholische Lösungen wie FuGENE[™]6 (Roche) oder Transfectam[®] (Promega) vor. Die Hersteller empfehlen zur Lipoplexbildung HBS (Roche, im Fall von DOTAP[®] oder DOSPER[®]) oder serumfreies Kulturmedium (Life Technologies, für Lipofectamine[™] oder Promega für Transfectam[®]).

Um den Einfluss des Mediums bzw. Puffers, in dem die Lipoplexbildung stattfindet, auf die Transfektion zu untersuchen, wurden DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe in verschiedenen Puffern bzw. Salzlösungen (HBS, pH 7,4; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,9 % NaCl) sowie in serumfreiem Zellkulturmedium (EMEM, pH 7,4) hergestellt, zur Lipofektion von COS-7-Zellen eingesetzt und die Transfektionsergebnisse verglichen.

Bei beiden Ansätzen führte die Verwendung von HBS, NaCl sowie von EMEM zu jeweils ähnlichen Transfektionseffizienzen, während die mit Tris-HCl erzielte nur etwa ein Sechstel dieser Transfektionseffizienz betrug (Abb. 3.14). Da die Tris-gepufferte Salzlösung im pH-Wert mit HBS-Puffer und EMEM in etwa übereinstimmte, konnte der pH-Wert nicht für die verringerte Transfektionseffizienz verantwortlich sein. Dies zeigte sich auch an der isotonen Kochsalzlösung, deren pH-Wert als einziger im schwach sauren Bereich (pH 5-7) lag, was sich jedoch nicht negativ auf das Transfektionsergebnis auswirkte.

In einer Transfektionsstudie mit Transfectam[®] wurde ebenfalls keine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom pH-Wert des Puffers festgestellt [71]. Der Einfluss des pH-Wertes könnte möglicherweise wichtig für die Optimierung (innerhalb) eines verwendeten Puffersystems sein [67].

Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den Puffern betraf ihre Molarität. Diese war bei der isotonen Kochsalzlösung (150 mM) und dem HBS-Puffer (20 mM HEPES, 130 mM NaCl) annähernd gleich. Der Tris-Puffer hingegen wies bei einer Molarität von 10 mM eine um den Faktor 15 verminderte Ionenkonzentration auf, was möglicherweise der Grund für die niedrige Transfektionseffizienz war. Durch die niedrige Molarität des Puffers waren sowohl die kationischen Liposomen als auch das Polyanion DNA von weniger Ionen umgeben, was zu einer stärkeren Hydrathülle führt. Dies könnte die Annäherung der kationischen Lipide und der negativ geladenen DNA erschweren und die Stabilität der bereits gebildeten Lipoplexe herabsetzen.

Ein starker Einfluss des Komplexierungsmediums auf die Transfektionseffizienz wurde auch bei Transfektionen mit dem Lipospermin Transfectam[®] beobachtet [71]: Im Gegensatz zu den in Abb. 3.14 dargestellten Ergebnissen führte dort die Komplexierung in RPMI-Kulturmedium (oder in dessen Bestandteil Phosphatpuffer) bei niedrigen Ladungsverhältnissen (2 sowie 0,75) zu besseren Transfektionsresultaten als in 150 mM Kochsalzlösung.

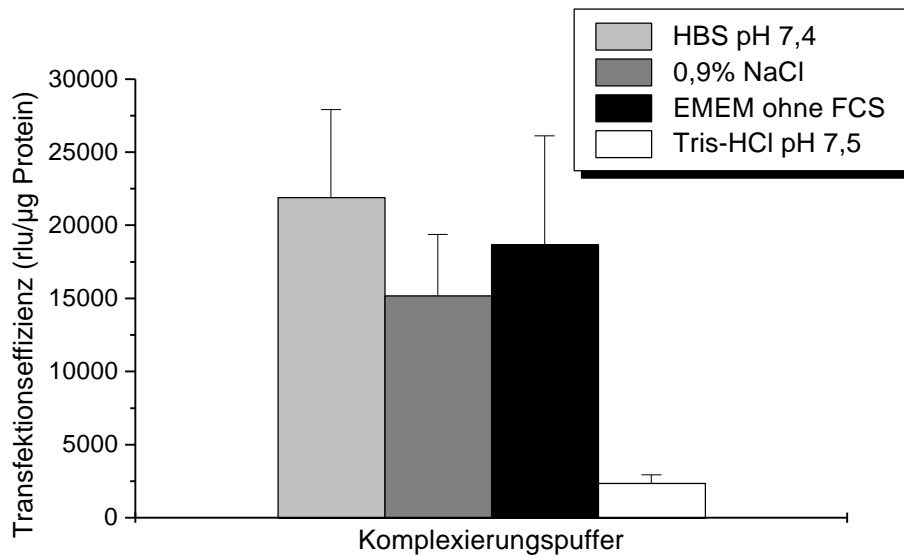


Abb. 3.14 Einfluss des Komplexbildungspuffers auf die Transfektionseffizienz

Plasmid-DNA (pCMXluc) und DOTAP-Liposomen wurden vor der Komplexbildung in dem jeweiligen Puffer/Medium vorverdünnt und zur Lipoplexbildung vereinigt (siehe unter 2.2.4.1). Die Lipoplexe wurden vor der Zugabe auf COS-7-Zellen 15 min bei RT inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 8 Wells einer 96-Well-Platte.

Dieser Unterschied kann durch die unterschiedliche Lipidstruktur von DOTAP und Transfectam[®] bedingt sein. DOTAP als monokationisches Lipid mit einem quartären Stickstoffatom kann pro Molekül mit weniger negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Backbones in Wechselwirkung treten als Transfectam[®] mit insgesamt vier (potenziell) positiv geladenen Aminogruppen. Daraus und aus dem verwendeten Ladungsverhältnis (d. h. letztlich der Zahl der Lipidmoleküle pro DNA-Molekül) können unterschiedliche Lipoplextypen resultieren [24]. Möglicherweise könnte eine verlängerte Inkubationsdauer zur Bildung der Lipoplexe (s. Kapitel 3.1.2.2) die Eigenschaften der in Tris-Puffer angesetzten Lipoplexe geringfügig verbessern.

Um Transfektionseffizienzen zu optimieren, sollte generell auch das Puffersystem zur Lipoplexbildung ins Auge gefasst werden, sowohl bezüglich der Zusammensetzung (Komponenten, Molaritäten bzw. Konzentrationen) als auch des pH-Werts. Für die Entwicklung und Durchführung eines Transfektionssystems sollte die Komplexbildung im gleichen, für DNA, Lipide bzw. Liposomen und Lipoplexe optimalen Puffersystem stattfinden. In allen folgenden Experimenten wurde die Bildung der Lipoplexe in HBS-Puffer durchgeführt, der die höchste Transfektionseffizienz erbrachte.

Optimierung der Lipoplexbildungsdauer

In den meisten Transfektionsprotokollen ist eine Komplexbildungsdauer, also Inkubationsdauer von Liposomen und DNA in Puffer vor Zugabe der Lipoplexe auf die Zellen, von etwa 10 bis 30 Minuten vorgesehen [DOTAP-Produktinformation (Roche), 11, 36, 57].

Zur Optimierung des Transfektionsablaufs wurde untersucht, wie sich eine Änderung dieses Intervalls auf die Transfektionseffizienz auswirkt und ob es hier lipidspezifische Unterschiede gibt. Dies wurde exemplarisch für Lipoplexe, die neben dem pCMXluc-Vektor das monokationische Lipid DOTAP oder das trikationische CAc43 (kombiniert mit dem Helferlipid DOPE) enthielten, überprüft. Hierzu wurden insgesamt zehn Komplexierungszeiten von 0 min (sofortige Zugabe auf die Zellen) bis 2 h getestet und die resultierenden Transfektionseffizienzen verglichen (Abb. 3.15).

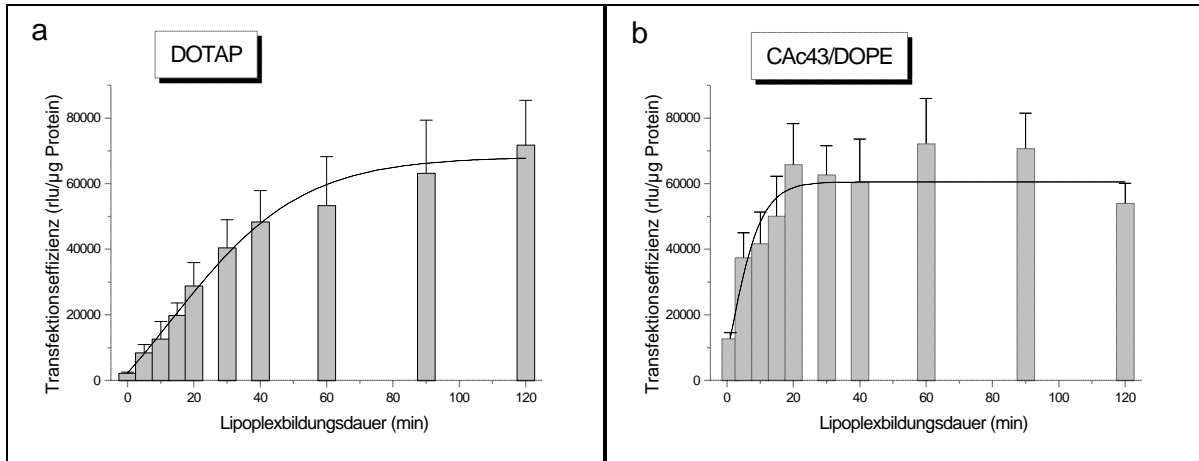


Abb. 3.15 Einfluss der Lipoplexbildungsdauer auf die Transfektionseffizienz

DOTAP/pCMXluc-Komplexe (a) und CAc43/DOPE/pCMXluc-Komplexe (b) wurden für jedes Lipid zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der zugehörigen Liposomendispersion und pCMXluc-Lösung bei RT angesetzt und nach den angegebenen Intervallen auf COS-7-Zellen gegeben. Die Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse betragen 2,5 (a) bzw. 5 (b). Die weitere Inkubationszeit der Lipoplexe auf den Zellen betrug einheitlich 4 h, das weitere Vorgehen war wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben. Für die grafischen Darstellungen wurden pro Zeitpunkt acht 96-Well ausgewertet und das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt. Die gestrichelten Linien zeigen jeweils die sigmoidale Näherungsfunktion.

Im Fall der DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe (LV 2,5) stiegen die Transfektionseffizienzen bei Komplexierungszeiten bis zu etwa 40 min gleichmäßig an (Abb. 3.15 a). Bei längerer Komplexierungsdauer erreichten die Transfektionseffizienzen ein Plateau. Die Transfektionseffizienzen in Abhängigkeit von der Komplexbildungsdauer konnten insgesamt als sigmoidale Kurve dargestellt werden (gestrichelte Linie). Im Fall der durch CAc43/DOPE vermittelten Transfektion, durchgeführt im LV 5, konnten die Transfektionseffizienzen gleichfalls als sigmoidale Kurve beschrieben werden (Abb. 3.15 b). Allerdings stiegen die Werte wesentlich rapider an, sodass bereits nach etwa 20 min Komplexierungsdauer ein Plateau erreicht wurde. Dieses blieb auch bei Komplexierungszeiten bis zu zwei Stunden auf konstanter Höhe.

Für beide Lipide zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Lipoplexbildungsdauer. Vergleicht man die Transfektionseffizienzen nach 15-minütiger Inkubation mit dem 60-Minuten-Wert, ergibt sich für DOTAP eine Steigerung etwa um den Faktor 3, während bei CAc43/DOPE das Plateau bereits nach 15 Minuten fast erreicht wurde. Um herauszufinden, ob der Unterschied im Kurvenverlauf zwischen a und b durch die verschiedenen Ladungsverhältnisse für die beiden Lipoplextypen (2,5 bzw. 5) beeinflusst worden war, wurde ein analoges Experiment mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen in den LV 2,5 und 5

durchgeführt. Wertet man die Transfektionseffizienzen für LV 2,5 bei 30 min bzw. LV 5 bei 90 min als Ausreißer, so ergeben sich in beiden Experimenten annähernd gleiche Transfektionseffizienzen für jeden Messpunkt (Abb. 3.15 c). Überträgt man die Ergebnisse auf die Transfektion mit der Lipidmischung CAc43/DOPE, sind die (im Vergleich zum DOTAP-System) schneller ansteigenden Werte in Abb. 3.15 b auf die Lipidkomponenten und nicht auf das unterschiedliche Ladungsverhältnis zurückzuführen.

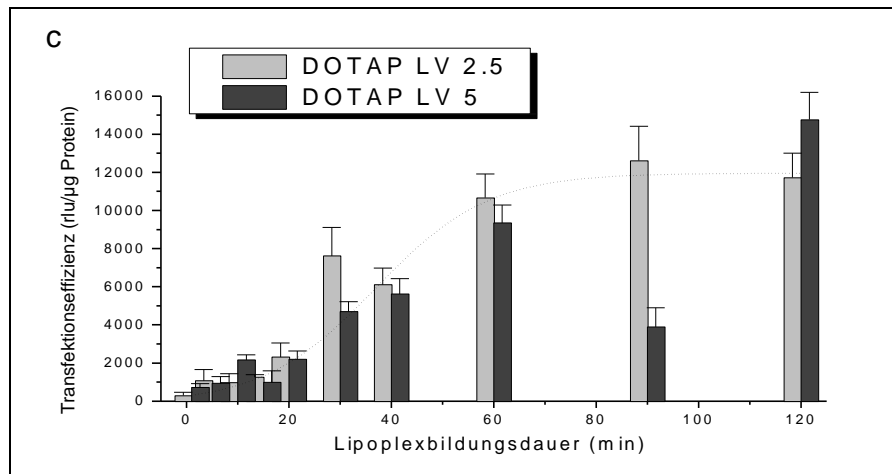


Abb. 3.15 c. Einfluss des Ladungsverhältnisses und der Lipoplexbildungsdauer auf die Transfektionseffizienz

COS-7-Zellen wurden, wie unter Abb. 3.15 beschrieben, mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen im LV 2,5 bzw. 5 nach der jeweiligen Komplexierungsdauer transfiziert. Zur Veranschaulichung wurde die sigmoidale Näherungsfunktion für LV 2,5 als gestrichelte Kurve eingefügt. Für jeden Messwert wurden arithmetisches Mittel und Standardabweichung aus vier 96-Wellen berechnet.

In einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde eine zeitabhängige Zunahme der Luciferaseaktivität von DOTAP oder DC-CHOL/DOPE enthaltenden Lipoplexen nachgewiesen [158]. Ähnlich wie bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren wurden dort die Lipoplexe in serumfreiem Medium (hier: HBS) inkubiert und erst unmittelbar vor der eigentlichen Transfektion mit Serum versetzt. Bei annähernd sigmoidalem Kurvenverlauf wurde ebenfalls eine charakteristische lipidabhängige „Reifungsgeschwindigkeit“ (s. u.) beobachtet. Während diese für monokationische Lipide wie DOTAP, DC-CHOL oder Lipofectin (DOTMA/DOPE) in Zeiträumen bis zu einer Stunde zu maximaler Luciferaseaktivität führte, war für das polyvalente Lipofectamine (DOSPA/DOPE 3:1; w/w) nur eine sehr geringe initiale Steigerung bei dann fast monotonem Kurvenverlauf erkennbar.

Mögliche Gründe für die höhere Transfektionseffizienz bei längerer „Reifungszeit“ könnten in einer Abnahme der Serumempfindlichkeit der Lipoplexe liegen [158]. Während der „Reifung“ könnte ein interner Umstrukturierungsprozess stattfinden. Durch zunehmenden Ladungsausgleich zwischen kationischem Lipid und anionischer DNA könnte es zu einer gleichmäßigeren Umhüllung der DNA durch die kationischen Lipide und letztlich zu einer stärkeren Kompaktierung der DNA im Lipoplex kommen. Untersuchungen zum Lipid-Mixing von DOTAP-Liposomen, d. h. Fusion der Liposomen mit Liposomen/Lipoplexen während

der Komplexbildung, deuten ebenfalls auf interne Strukturänderungen im Lipoplex hin: Auf die rasche Bildung eines primären Komplexes, der aus Liposomen, DNA und Lipoplexen bestehen könnte, könnte die Umorganisation in einen optimal ladungsausgeglichenen Lipoplex folgen. Bei zeitabhängiger Darstellung verläuft die Lipid-Mixing-Kurve für DOTAP-Liposomen mit DNA in den Ladungsverhältnissen 2,5 und 5 annähernd sigmoidal und erreicht nach etwa einer Stunde ein Plateau (S. Fankhaenel, unveröffentlichte Daten). Der Kurvenverlauf entspricht tendenziell der DOTAP-„Reifungskurve“, was auf einen dynamischen Prozess der Lipoplexformation und -stabilisierung schließen lässt, der sich in der Transfektionseffizienz widerspiegelt. Da in dem hier beschriebenen Experiment nur ein Rahmen bis zu zwei Stunden betrachtet wurde, ist – einem dynamischen Prozess entsprechend – nicht auszuschließen, dass die Transfektionseffizienzen nach einem längeren Inkubationszeitraum wieder geringer werden.

Die „Reifungskurve“ für die Lipofectamine-Komplexe (DOSPA/DOPE 3:1; w/w) [158] unterschied sich mit ihrem flachen Kurvenverlauf von der steiler ansteigenden „Reifungskurve“ der CAc43/DOPE-Lipoplexe (Abb. 3.15 b). Ein möglicher Grund hierfür könnte in der geringeren kationischen Ladung von CAc43 im Vergleich zu DOSPA liegen. Ein weiterer Aspekt ist der jeweils unterschiedliche Anteil des Helferlipids DOPE (in CAc43/DOPE in 50%igem molaren Anteil).

Bestätigt wird der Verlauf der „Reifungskurve“ von CAc43/DOPE durch eine Studie mit DOCSPER, einem mehrfach kationischen Lipospermin, nach Kombination mit DOPE (50 % w/w) bei einem ähnlichen Lipid/DNA-Mengenverhältnis. Bei einer Komplexierungsdauer bis zu 30 Minuten stieg die Reporterogenaktivität steil an und nahm mit zunehmender Komplexierungsdauer erst allmählich ab [57]. Wie in dieser Studie zudem gezeigt wurde, beeinflussen auch Lipid- und DNA-Menge die Reifung der Lipoplexe stark.

Obwohl die genauen Mechanismen nicht klar sind, verbessert eine Komplexbildungsdauer von 1 h die Transfektionseffizienz der DOTAP-vermittelten Lipofektion. Da sie für mehrfach positive Lipide, wie am Beispiel CAc43 gezeigt, keinen nachteiligen Effekt mit sich brachte, wurde die Komplexierungsdauer im Transfektionsprotokoll von 15 min auf 1 h heraufgesetzt.

3.1.3 Transfektion

Der Übertrag der bereits gebildeten Lipoplexe auf die Zellen (Abb. 3.16), der nur einen kleinen Schritt im automatisierten Transfektionsablauf darstellt, ist der erste Schritt zum eigentlichen Gentransfer in die Zielzellen, der Transfektion. Damit die Lipoplexe von den Zellen aufgenommen werden können, werden die Lipoplexe mit den Zellen inkubiert (und anschließend wieder entfernt). Um den Zellen genügend Zeit zu geben, das Reporterprotein zu produzieren, folgt eine weitere Inkubationszeit, bevor die Transfektionseffizienz bestimmt wird (Kapitel 3.1.3.2).

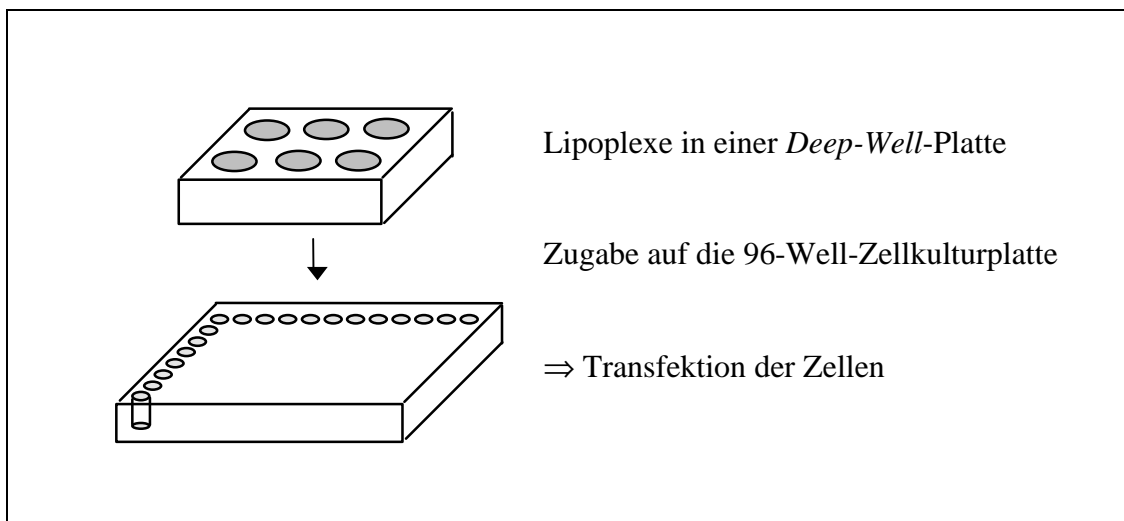


Abb. 3.16 Schema des automatisierten Lipoplexübertrags auf eine 96-Well-Zellkulturplatte)

3.1.3.1 Aspekte der Automatisierung

Überprüfung der Pipettiergenauigkeit des Roboters beim Lipoplexübertrag

Um das Transfektionsverhalten von Lipiden zu charakterisieren, werden Zellen mit Lipoplexen verschiedener Ladungsverhältnisse transfiziert [36, 157]. Hierbei ist es wichtig, dass korrekte Mengen beim automatisierten Lipoplexübertrag pipettiert werden.

Um dies zu überprüfen, wurden Lipoplexe in acht Ladungsverhältnissen aus pCMXluc und DPH-markierten DOTAP-Liposomen im automatisierten Verfahren hergestellt. Anstelle einer Zellkulturplatte wurden die Lipoplexe auf eine weiße 96-Well-Messplatte übertragen und die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Mit steigendem Ladungsverhältnis nahm die Fluoreszenzintensität linear zu, wie durch eine Regressionsgerade belegt werden konnte (Abb. 3.17). Die automatisierte Pipettierung der Lipoplexe auf die Zielplatte war somit gewährleistet.

Zwar erlauben die Daten keine Aussage über die Genauigkeit der DNA-Pipettierung (die aus den Ergebnissen der Zelltransfektion abgeleitet werden konnte, siehe Kapitel 3.1.2.2), zumindest auf der Lipidebene war der Übertrag korrekter Volumina bzw. Mengen gewährleistet.

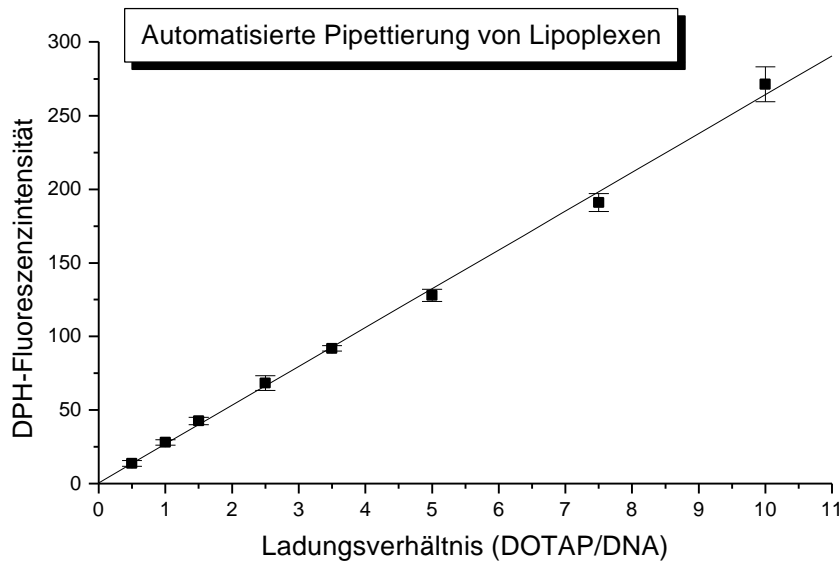


Abb. 3.17 Bestimmung der Pipettiergenauigkeit des *Genesis* beim Lipoplexübertrag

Die DPH-Fluoreszenzintensität von DPH-markierten DOTAP-Lipoplexen wurde nach mehreren automatisierten Pipettierschritten („1:10-Verdünnung der Liposomendispersion“, „Lipoplexbildung“, „Lipoplexübertrag“) gemessen, wie unter 2.2.6.5 angegeben. Zur Lipoplexbildung wurden (2 Mol-%) DPH-markierte DOTAP-Liposomen mit pCMXluc kombiniert und anschließend auf eine weiße 96-Well-Messplatte pipettiert. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 9 Wells (3 Ansätze mit jeweils 3 Wells auf der Testplatte) dar. Die abgebildete Gerade wurde durch lineare Regression berechnet und nachträglich eingefügt.

Zentrifugation der 96-Well-Platten nach der Lipoplexzugabe

Wenn in Schalen (z. B. mit 6 cm oder 3,5 cm Durchmesser) kultivierte Zellen transfiziert werden, schwenkt man diese Schalen nach Zugabe der Lipoplexe, um die Lipoplexe gleichmäßig im Medium und damit auf den Zellen zu verteilen. Da 96-Well eine relativ zum Volumen größere innere Oberfläche (Wände) als Kulturschalen haben, sind die Adhäsionskräfte auf die Flüssigkeits(ober)fläche auch wesentlich stärker. Um die Lipoplexe gleichmäßig über allen Zellen zu verteilen, reicht ein Schwenken der 96-Well-Platte wegen der Adhäsionskräfte nicht aus. Als alternatives Verfahren wurde ein Zentrifugationsschritt unmittelbar nach Lipoplexzugabe auf die Zellen untersucht.

Dazu wurden Lipoplexe aus insgesamt sechs identischen, aber separaten Ansätzen auf zwei 96-Well-Platten mit COS-7-Zellen verteilt. Eine der beiden Platten wurde direkt danach für 2 min bei 1200 rpm ($258 \times g$) zentrifugiert. Der Vergleich der resultierenden Transfektionseffizienzen erbrachte in vier von sechs Fällen übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 3.18). Lediglich bei zwei Lipoplexansätzen (4 und 5) war das Resultat auf der nicht zentrifugierten Platte signifikant schlechter als auf der zentrifugierten Platte. Möglicherweise bleibt es aufgrund der Zentrifugation weniger dem Zufall (bzw. der Brownschen Molekularbewegung und der Schwerkraft) überlassen, wann und auf welchen Zellen die Lipoplexe verteilt werden.

Im Gegensatz zu den hier ermittelten Ergebnissen wurde eine generelle Erhöhung der Transfektionseffizienz durch einen Zentrifugationsschritt nach der Zugabe von Polykation-DNA-

Komplexen (Transfectam[®] bzw. Polyethylenimin) beobachtet [11]: Es zeigte sich allerdings eine Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie – COS-7-Zellen wurden nicht untersucht – sowie der Art des Polymers. Ein weiterer Faktor, der für die Unterschiede zwischen beiden Untersuchungen (mit) verantwortlich sein könnte, ist das Plattenformat: Im Gegensatz zu den in Abb. 3.18 vorgestellten Experimenten wurden in der genannten Studie 12-Well-Platten verwendet. Jedoch führte die Zentrifugation in beiden Untersuchungen in keinem Fall zu schlechteren Transfektionsergebnissen oder zu Zellschäden [11]. Daher wurde der Zentrifugationsschritt nach der Lipoplexzugabe für sämtliche weitere Experimente übernommen.

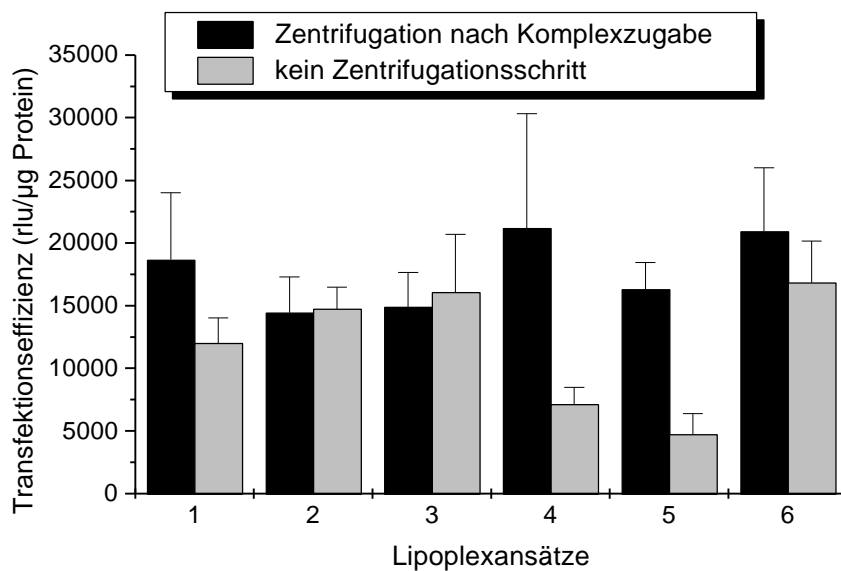


Abb. 3.18 Beeinflussung der Transfektionseffizienz durch einen Zentrifugationsschritt nach Lipoplexzugabe

Für jedes Experiment wurden COS-7-Zellen in zwei separaten 96-Well-Platten mit separat angesetzten DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert. Eine der beiden Platten wurde anschließend 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert (schwarze Säulen). Die Ansätze 1-6 wurden synchron transfiziert. Jede Säule stellt den Mittelwert (plus Standardabweichung) der Transfektionseffizienzen aus 8 Wells dar.

3.1.3.2 Untersuchung und Optimierung der Zellkultivierungsbedingungen

Plattenformate (6-Well vs. 96-Well)

Die in den hier entwickelten Transfektionsassays eingesetzten 96-Well-Zellkulturplatten erlauben Transfektionen lediglich auf relativ kleiner Fläche (ca. 0,32 cm²). Diese ist etwa um den Faktor 30 kleiner als die Fläche von 6-Well-Platten (ca. 9,6 cm²), die üblicherweise für Lipofektionsexperimente verwendet werden. Wirkt sich nun die unterschiedliche Kultivierungsfläche auf das Ergebnis der lipidvermittelten Transfektion aus?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden drei Transfektionslipide bzw. -reagenzien jeweils mit dem Reporterplasmid pCMXluc komplexiert und auf COS-7-Zellen in beiden Plattenformaten gegeben. Abb 3.19 zeigt die resultierenden Transfektionseffizienzen.

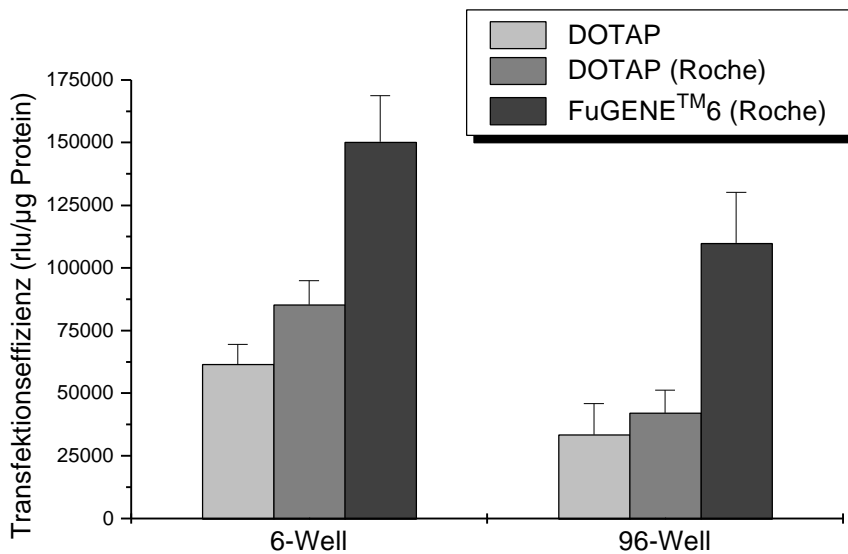


Abb. 3.19 Vergleich der Transfektion von COS-7-Zellen in 6-Well- und 96-Well-Platten

Die Transfektionen der DOTAP-Lipoplexe wurden, wie unter 2.2.4.1 angegeben, in den jeweiligen Plattenformaten durchgeführt. Zur Transfektion mit FuGENE™6 wurden je 3 µl pro 6-Well bzw. 0,2 µl pro 96-Well zur Komplettierung mit 0,125 µg pCMXluc eingesetzt. Für die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden je drei 6-Wells in Dreifachbestimmung (n = 9) bzw. je acht 96-Wells ausgewertet.

In beiden Plattenformaten wurde mit FuGENE™6 die höchste Transfektionseffizienz erzielt. In 6-Wells ergab sich folgendes Abstufungsprofil: Beide DOTAP-Formulierungen wiesen ähnliche Transfektionseffizienzen auf, etwa die Hälfte der durch FuGENE™6 erreichten Effizienz. Diese Abstufung war auch in 96-Wells erkennbar, allerdings bei etwa um 50 % niedrigeren absoluten Transfektionseffizienzen.

Die beobachteten Unterschiede zwischen beiden Plattenformaten könnten auf ein verändertes Wachstums- und demzufolge Transfektionsverhalten der Zellen zurückzuführen sein. Daher sollte ein direkter Vergleich zwischen Transfektionseffizienzen von Lipiden ausschließlich systemimmanent gezogen werden, also im Fall des Screenings auf das 96-Well-Format beschränkt bleiben. Wenn es dennoch erforderlich ist, Transfektionsergebnisse zu vergleichen, die in verschiedenen Plattenformaten ermittelt wurden, sollten diese lediglich als Tendenzen bzw. qualitativ bewertet werden (z. B. viel besser, etwa gleich, etc.).

Wachstumsverhalten von COS-7-Zellen und Optimierung der Zellzahl im 96-Well

Für eine erfolgreiche Transfektion ist es wichtig, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt des Experiments in der Proliferationsphase (mit exponentiellem Wachstum) befinden [34, 66, 102]. Deshalb wurde eine Wachstumskurve für COS-7-Zellen erstellt. Da sich Zahl der Zellen in einem 96-Well nicht mittels eines Zellzählgerätes bestimmen ließ, wurde ein größeres Plattenformat, das 24-Well-Format, mit je 60000 ausgesäten Zellen pro Kavität gewählt.

In Transfektionsexperimenten werden die Zellen gewöhnlich einen Tag nach der Aussaat (Tag 0, Abb. 3.20) transfiziert, wodurch keine initiale Lag-Phase im Wachstum berücksichtigt zu werden braucht. Zum Zeitpunkt der Transfektion (Tag 1) befanden sich die Zellen bereits am Beginn einer exponentiellen Wachstumsphase. Zwischen Tag 1 und Tag 3 stieg die Zellzahl etwa um den Faktor 2 (Abb. 3.20), was auf eine Verdopplungszeit von 48 Stunden unter diesen Bedingungen hindeutet.

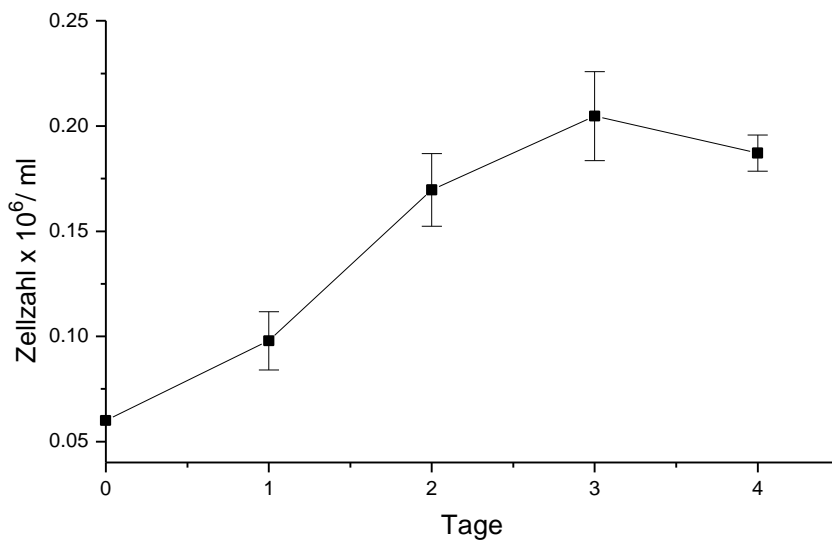


Abb. 3.20 Wachstumskurve von COS-7-Zellen in 24-Well

Je 60000 Zellen pro Well wurden in eine 24-Platte ausgesät (Tag 0). Für jeden weiteren Messpunkt wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgeräts (CASY 1, Schärfe) bestimmt (siehe unter 2.2.1). Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung für drei Wells. Anm.: Im verwendeten Zeichenprogramm wurden die Komata bei der Angabe der Ziffern an der y-Achse durch Punkte ersetzt (amerikanische Schreibweise).

Die Verdopplungsrate ihrerseits ist von der Konfluenz der Zellen abhängig. Je dichter die Zellen ausgesät sind, um so weniger Platz (und folglich um so kürzere Zeit) steht ihnen zur Teilung zur Verfügung. Um für die Lipofektion optimale Wachstumsbedingungen im 96-Well zu finden, wurde die Zahl eingesäter COS-7-Zellen pro Well in mehreren Parallelexperimenten variiert. In Abb. 3.21 sind die Transfektionseffizienzen für die DOTAP-vermittelte (3.21 a und b) sowie CAc43/DOPE-vermittelte (3.21 b) Transfektion mit dem Vektor pCMXluc dargestellt. In beiden Fällen wurden jeweils optimale Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse (2,5 für das monokationische DOTAP bzw. 5 für das trikationische CAc43, s. Kapitel 3.1.2.2) gewählt.

Trotz unterschiedlicher Ausgangszellzahlen von 5000, 7500 bzw. 10000 Zellen pro Well führten beide DOTAP/DNA-Lipoplexansätze im ersten Experiment jeweils zu annähernd konstanten Transfektionseffizienzen (Abb. 3.21 a). Im zweiten Experiment zeigte die DOTAP-vermittelte Transfektion ein ähnliches Bild mit fast identischen Effizienzen jeweils für

die Zellzahlen 2500, 5000 und 7500 (Abb. 3.21 b, schwarzer Balken). Lediglich bei 1250 ausgesäten Zellen pro Kavität ergab sich eine etwas geringere Transfektionseffizienz.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis führte auch die CAc43/DOPE-vermittelten Lipofektion mit nahezu übereinstimmenden Transfektionseffizienzen bei den Zellzahlen 2500, 5000 und 7500 und einer etwas geringeren Effizienz bei 1250 ausgesäten Zellen pro Well (Abb. 3.21 b, graue Balken). Der einzige Unterschied zu den Ergebnissen der Transfektionsexperimente mit DOTAP zeigte sich in generell etwas höheren Transfektionseffizienzen für die durch CAc43 vermittelte Lipofektion.

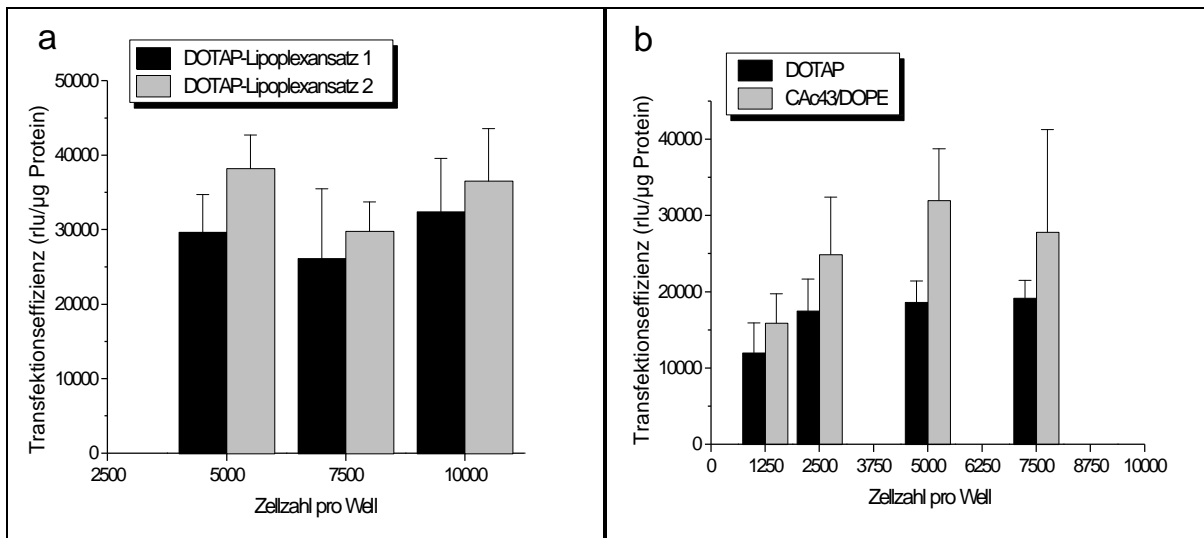


Abb. 3.21 Variation der Zellzahl bei der Transfektion von COS-7-Zellen im 96-Well-Format

Einen Tag nach der Aussaat der angegebenen Zellzahlen in 96-Well-Platten wurden COS-7-Zellen mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen in zwei separaten Komplexansätzen (a), sowie mit je einem Ansatz DOTAP/pCMXluc- bzw. CAc43/DOPE/pCMXluc-Lipoplexen (b) transfiziert. Für jeden Messwert wurden die mittleren Transfektionseffizienzen sowie die Standardabweichungen aus 8 Wells berechnet (Ausnahme: $n = 5$ für Lipoplexansatz 1 bei 7500 Zellen (a)).

Daraus lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen: COS-7-Zellen scheinen relativ robust gegenüber variabler Konfluenz bei der Transfektion zu sein. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass ab einer Zellzahl von 2500 ausgesäten Zellen eine für die Transfektion günstige Konfluenz und damit gute Wachstumsbedingungen vorlagen. Da transiente Transfektionen vielfach bei unterschiedlicher Konfluenz erfolgreich durchgeführt werden (ca. 100 % („gerade“) konfluente COS-7-Zellen [35], 80 % Konfluenz [158], 70 % konfluente COS-1- [33] oder 60-70 % konfluente COS-7-Zellen [11], 50-60 % konfluente COS-7-Zellen [56]), deutet dies auf einen breiten Toleranzbereich hin. Obwohl die Expression transfizierter Gene bei teilungsaktiven Zellen besser ist als bei nicht teilungsaktiven Zellen [34, 66, 102], scheint die durch die Aussaat erreichte unterschiedliche Konfluenz nicht in einem für die COS-7-Zellen kritischen Bereich zu liegen. Folglich führten die unterschiedlichen Konfluenzgrade am Transfektionstag (von etwa 30 % (2500 Zellen) bis etwa 70 % (10000 Zellen)) zu keinen nachteiligen Effekten auf das Transfektionsverhalten.

Durch die Berücksichtigung der Proteinmenge (als Referenzwert stellvertretend für die Zellzahl) in der Transfektionseffizienz (ausgedrückt als: rlu/ μ g Protein) wurden Schwankungen in der Zellzahl ab 2500 ausgesäten Zellen pro 96-Well nivelliert. Geringe Abweichungen der Zellzahl von Well zu Well, wie sie beispielsweise beim Aussäen von Zellen vorkommen oder ein toxischer Zellverlust werden somit ausgeglichen.

Was das Transfektionsergebnis für die niedrigste eingesetzte Zellzahl von 1250 anbelangt (Abb. 3.21 b), so könnte dieses auf einen suboptimalen Konfluenzbereich zurückzuführen sein, sodass die Zellen zu vereinzelt waren, um optimal zu wachsen und so eine gleichwertige Transfektionseffizienz pro Kavität zu erzielen.

Da mit 5000 ausgesäten Zellen pro 96-Well mit Spielraum sowohl nach oben wie nach unten gute Transfektionseffizienzen erzielt werden konnten, wurden alle weiteren Experimente mit dieser Zellzahl durchgeführt.

Einfluss verschiedener Zellchargen auf die Transfektion

Das Wachstumsverhalten kultivierter Zellen ist selbst unter gleichen Kultivierungsbedingungen (Plattenformat, Zellzahl, Medium etc.) nicht immer identisch. Selbst eine „robuste“ Zelllinie wie die COS-7 kann sich nach vielen Passagen verändern und sollte daher nicht „unendlich“ passagiert werden. Demzufolge nimmt man von Zeit zu Zeit neu aufgetaute Chargen in Kultur, die als eigenständige Zelllinien behandelt werden.

Um den Einfluss des Alters solcher Zellchargen auf die Transfektion zu untersuchen, wurden in einem Parallelexperiment drei verschiedene, separat kultivierte „COS-7-Chargen“ mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert. Die resultierenden Transfektionseffizienzen sind in Abb. 3.22 dargestellt. Es zeigte sich für alle Chargen ein ähnliches Profil in Abhängigkeit von dem DOTAP/DNA-Ladungsverhältnis. Die Transfektionseffizienzen stiegen für die Ladungsverhältnisse 0,5 bis 2,5 an und erreichten hier ein Maximum. Bei höheren Ladungsverhältnissen etwa bis LV 4,5 sanken die Transfektionseffizienzen und blieben dann weitgehend konstant. COS-7-Zellen nach 15-maligem Passagieren erbrachten die höchsten Absolutwerte, während die Zellen der Passagen 25 und 13 nur etwa 30-50 % dieser Effizienz erreichten, aber untereinander annähernd gleiche Werte lieferten.

Da keine von der Zahl der Passagen abhängige Änderung der Transfektionseffizienz erkennbar war, schien das relative „Alter“ (= Anzahl erfolgter Passagen) der Zellen in dem betrachteten Rahmen nicht für die unterschiedlichen absoluten Transfektionseffizienzen verantwortlich zu sein. Auch war die Kultivierungsdauer der Zellen nach dem Auftauen für die drei Chargen gleich und betrug bereits mehrere Wochen (d. h. kein „Auftauschock“). Eine mögliche Erklärung liefert die „Herkunft“ der einzelnen Chargen: Die Passagen 25 und 13 stammten aus derselben Zellcharge (B) und wurden lediglich nach einer unterschiedlichen Zahl von Passagen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen der Passage 15 entstammten einer anderen Ausgangscharge (A), die zu einem anderen Zeitpunkt kultiviert worden war. Dies könnte das übereinstimmende Transfektionsverhalten der beiden „näher verwandten“ Chargen plausibel machen.

Da die Transfektionsprofile (also die relative Höhe der Transfektionseffizienzen zueinander) in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis in den drei Fällen sehr ähnlich waren, scheint das Transfektionsverhalten unterschiedlicher Zellchargen – mit Ausnahme der absoluten Transfektionseffizienz – im Wesentlichen konstant zu bleiben. Als Fazit aus diesen Ergebnissen resultiert Folgendes: Ideal für den direkten Vergleich absoluter Transfektionseffizienzen ist die Durchführung von (Teil)experimenten mit einer identischen Zellcharge (gleicher Passage). Je enger die Zellpassagen beieinander liegen bzw. je näher verwandt die Zell(charg)en sind, umso eher könnten ähnliche Absolutwerte auftreten. Bei zeitlich weit auseinander liegenden Experimenten sowie bei Verwendung unterschiedlicher Chargen aufgetauter bzw. kultivierter Zellen sollten eher tendenzielle (Profil)unterschiede ausgewertet werden. Verwendet man in jedem Experiment einen Standard, so erlaubt dieser die Einschätzung der jeweils erzielten absoluten Transfektionseffizienzen. Hierzu wurde im Folgenden das Lipid DOTAP verwendet, da dessen Lipoplexe mit dem jeweils eingesetzten Reporterplasmid (in der Regel pCMXluc) im Ladungsverhältnis 2,5 stets die relativ höchste Transfektionseffizienz erzielen (Abb. 3.22).

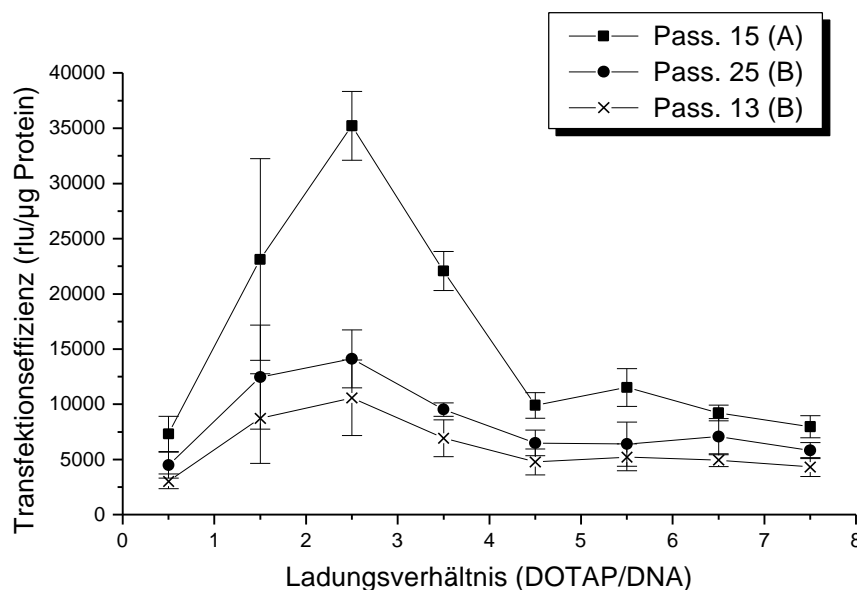


Abb. 3.22 Einfluss verschiedener COS-7-Chargen auf die Transfektion mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen
Für jedes Teilexperiment wurden COS-7-Zellen aus unterschiedlichen Passagen („Pass.“) verwendet. (A) und (B) stehen jeweils für die Herkunft der Zellen aus einer Ursprungscharge. Die Transfektion wurde wie unter 2.2.4.2 angegeben, automatisiert durchgeführt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus je drei 96-Wellen (mit Standardabweichung) dar. Um die Unterscheidung der einzelnen Experimente zu erleichtern, wurden die zugehörigen Werte jeweils miteinander verbunden.

Einfluss des Kulturmediums auf die Transfektionseffizienz

Ein Problem, das sich beim Vergleich von Transfektionsdaten aus unterschiedlichen Labors stellt, ist die Verwendung verschiedener Zellkulturmedien und Puffersysteme in den Experimenten. In vielen Transfektionsstudien richtet sich das Augenmerk lediglich auf Vorhandensein und Anteil von Serum im Transfektionsmedium oder auf das zur Lipoplexbildung verwendete Puffersystem [10, 22, 31, 62]. Jedoch ist die Kultivierung einer Zelllinie oft in ver-

schiedenen oder vergleichbaren Medien unterschiedlicher Hersteller möglich. Mit diesem Hintergedanken wurden COS-7-Zellen, die für alle Experimente standardmäßig in EMEM (BioWhittaker) kultiviert wurden (siehe Kapitel 2.2.1), stattdessen in EMEM eines anderen Herstellers (Life Technologies) sowie in DMEM (Roche) kultiviert. Während des gesamten Transfektionsexperiments – von der Zellaussaat bis zur Durchführung der Post-Transfektionsassays – wurde das jeweilige Medium beibehalten. Die Transfektion wurde mit Lipoplexen aus dem pCMXluc-Vektor und zwei Typen von DOTAP-Liposomen (die als Standard verwendeten sowie die liposomale Formulierung von Roche) und dem Transfektionsreagenz FuGENE™6 (Roche) unter gleichen Bedingungen durchgeführt (2.2.4.1).

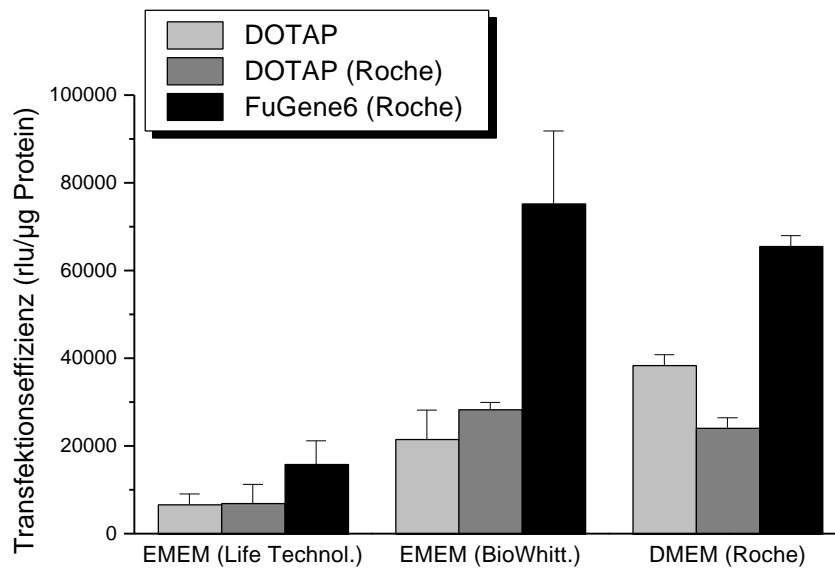


Abb. 3.23 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Effizienz der Transfektion von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden von der Aussaat, einen Tag vor der Transfektion, bis zur Durchführung der Post-Transfektionsassays in dem jeweils angegebenen Medium (EMEM (Life Technologies oder BioWhittaker) bzw. DMEM (Roche)) in 96-Well-Platten kultiviert. Die Zellen wurden mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen (aus DOTAP-Liposomen (2.2.3.1) und DOTAP liposomal (Roche)) bzw. FuGENE™6/pCMXluc-Lipoplexen (0,2 µl FuGENE™6/Well) transfiziert, wie unter 2.2.4.1 angegeben. Dargestellt sind die jeweils berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Transfektionseffizienzen aus vier Wells.

Wie aus Abb. 3.23 ersichtlich, waren die Transfektionseffizienzen für die drei Lipoplextypen bei Kultivierung der Zellen in EMEM (Life Technol.) wesentlich geringer als bei Kultivierung in EMEM (BioWhittaker). Davon abgesehen war die relative Abstufung der Transfektionseffizienzen zwischen den drei Lipoplextypen jedoch in beiden Fällen ähnlich: Beide DOTAP-Lipoplexe führten zu jeweils gleichen Transfektionseffizienzen, FuGENE™6 zu jeweils etwa um den Faktor 2 bis 3 höheren Werten. Bei Kultivierung der Zellen in DMEM war die Transfektionseffizienz der Kultivierung in EMEM (BioWhittaker) fast gleichwertig. Lediglich die DOTAP-Lipoplexe (aus selbst hergestellten Liposomen) zeigten bei DMEM-Kultivierung etwas höhere Transfektionseffizienz als die der käuflichen DOTAP-Liposomen-Formulierung.

Um herauszufinden, ob diese medienabhängigen Unterschiede in der Transfektionseffizienz durch direkte Interaktion der Lipoplexe mit den Mediumbestandteilen oder indirekt durch Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zellen verursacht wurden, wurde der Proteingehalt der Zellen nach der Transfektion als Hinweis auf die Zellproliferation gesondert betrachtet (Tab. 3.5).

Medium	EMEM (Life Technol.)			EMEM (BioWhitt.)			DMEM (Roche)		
Lipid	DOTAP	DOTAP (Roche)	FuGENE6 (Roche)	DOTAP	DOTAP (Roche)	FuGENE6 (Roche)	DOTAP	DOTAP (Roche)	FuGENE6 (Roche)
Protein- menge (μg)	4,82 $\pm 0,16$	4,50 $\pm 0,55$	4,56 $\pm 0,49$	5,17 $\pm 0,61$	5,04 $\pm 0,73$	5,67 $\pm 0,18$	7,82 $\pm 1,00$	8,47 $\pm 0,24$	7,84 $\pm 1,13$

Tab. 3.5 Abhängigkeit des Proteingehalts transfizierter COS-7-Zellen vom verwendeten Zellkulturmedium

Die dargestellten Werte stammen aus der Berechnung der Transfektionseffizienzen in Abb. 3.23 (Versuchsbeschreibung s. dort). Die Proteinmenge (in μg) wurde im Rahmen der Post-Transfektionsassays mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt und bezieht sich auf 20 μl Zelllysate (2.2.5.2). Jeweils angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Einzelwerten von je 4 96-Wellen.

Während die Proteinmengen nach Kultivierung in beiden EMEM-Medien sich nur geringfügig unterschieden, lag die Proteinmenge für die in DMEM kultivierten Zellen um den Faktor 1,5 darüber. Eine Beeinflussung des Proteingehalts innerhalb der jeweiligen Kultivierungssysteme durch die Verwendung der verschiedenen Lipoplexformulierungen war hingegen nicht erkennbar.

Demzufolge wurde das Wachstum der Zellen maßgeblich durch die Kultivierungsbedingungen beeinflusst. Dabei war der wichtigste Anhaltspunkt die Zusammensetzung der entsprechenden Medien (Anmerkung: Zusatz und Charge des fetalen Kälberserum waren in allen Fällen identisch). Selbst bei gleich benanntem Produkt bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung bei verschiedenen Herstellern. Da diese im Fall der beiden EMEM zu ähnlichen Proteingehalten – und daraus gefolgert zu ähnlichem Wachstumsverhalten – führten, ist es schwierig, die Unterschiede in den Transfektionsergebnissen diesbezüglich zu erklären. Im Fall des DMEM könnte das stärkere Zellwachstum neben anderen Mediumbestandteilen auf den 4,5fach höheren Glucoseanteil im Vergleich zu EMEM zurückzuführen sein (lt. Herstellerangaben enthält EMEM 1 g/l D-Glucose; DMEM 4,5 g/l). Da die Transfektionseffizienz nach DMEM-Kultivierung der EMEM-Kultivierung (BioWhittaker) entsprach, wurde demzufolge der höhere Proteingehalt durch in gleichem Maße höhere Luciferaseaktivität kompensiert.

Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen sollte für jede Zelllinie das optimale Medium verwendet werden, um gutes Zellwachstum und (möglicherweise davon unabhängig) optimale Transfektionseffizienzen zu erzielen. Deshalb sollte beispielsweise bei einem Produkt- oder Herstellerwechsel überprüft werden, welche Auswirkungen er auf Zellwachstum und Transfektionseffizienz hat. Bei Vergleichen der Daten aus Gentransferexperimenten müssen auch

Unterschiede im Kultivierungssystem betrachtet werden. Für alle Experimente mit COS-7-Zellen wurde weiterhin EMEM (BioWhittaker) verwendet.

Neben dem Zellkultivierungsmedium selbst spielt auch das fetale Kälberserum (FCS), das dem Medium in einem Anteil von 10 Vol.-% zugesetzt wird, eine wichtige Rolle bei der Transfektion [22]. Da verschiedene Serumchargen die Transfektionseffizienz unterschiedlich beeinflussen können [156], wurde stets dieselbe Charge FCS als Zusatz zum Kulturmedium verwendet. Der Einfluss serumhaltigen Mediums auf die Transfektionseffizienz wird im Einzelnen in den Kapiteln 3.1.2.1 und 3.3.2 behandelt.

Optimierung der Inkubationszeit der Lipoplexe auf den Zellen

Die Zugabe der Lipoplexe in die Wells der Zellkulturplatte ist der Startpunkt des eigentlichen Transfektionsvorgangs. In vielen Transfektionsprotokollen ist im Anschluss an die Lipoplexzugabe eine mehrstündige Inkubationszeit („Transfektionsdauer“) der Lipoplexe auf den Zellen vorgesehen, der ein Mediumwechsel folgt [133, 158]. Dieser Parameter („Transfektionsdauer“) wurde im Folgenden untersucht, um den Transfektionsablauf weiter zu optimieren. Hierzu wurden in zwei unabhängigen Parallelexperimenten COS-7-Zellen mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert und dabei die Inkubationsdauer der Lipoplexe von einer bis sechs bzw. acht Stunden variiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte bei allen Experimenten zum gleichen Zeitpunkt, entsprechend 38-45 h nach der Lipoplexzugabe (siehe unter 2.2.5.2). Zusätzlich wurden Zellen über die gesamten 46 h mit den Lipoplexen inkubiert (ohne Mediumwechsel).

Das Ergebnis der Experimente ist in Abb. 3.24 dargestellt: Obwohl sich die absolute Höhe der Transfektionseffizienzen in beiden Experimenten unterscheidet – die Transfektionseffizienzen in Experiment 1 sind fast durchgängig geringer als in Experiment 2 –, zeigen sich ähnliche Tendenzen. Bei einer einstündigen Lipoplexinkubation war die Transfektionseffizienz in Experiment 1 noch relativ gering, nach zwei Stunden bereits etwa doppelt so hoch. Dieser Wert blieb auch bei Verlängerung der Inkubationsdauer bis zu acht Stunden nahezu unverändert; lediglich die 4 h-Inkubation führte zu einem geringeren Wert. In Experiment 2 ergaben sich bei einer Verweildauer der Lipoplexe auf den Zellen von zwei bis sechs Stunden ebenfalls jeweils ähnliche Transfektionseffizienzen und ein insgesamt homogeneres Bild. Dementsprechend kann der niedrige Transfektionswert für den 4 h-Wert in Experiment 1 als Ausreißer gewertet werden. Bei 46 h Verweildauer der Lipoplexe auf den Zellen ohne Mediumwechsel nahm die Transfektionseffizienz hingegen geringfügig ab (Experiment 2).

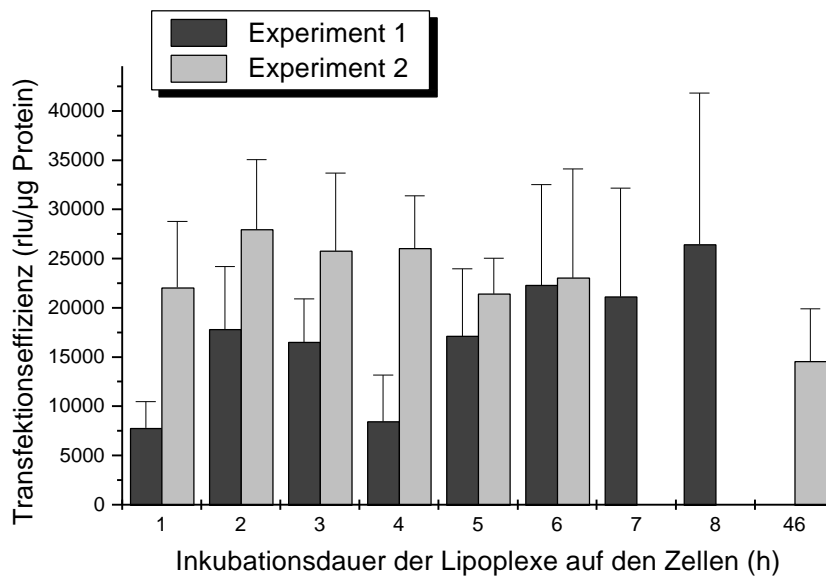


Abb. 3.24 Beeinflussung der Transfektionseffizienz durch die Inkubationsdauer der Lipoplexe auf den Zellen

In zwei separaten Experimenten wurden jeweils COS-7-Zellen in 96-Well-Platten mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert. Nach der jeweiligen Verweildauer der Lipoplexe auf den Zellen von 1 h bis 8 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen bei 37 °C weiter kultiviert (die gesamte Inkubation bis zur Auswertung betrug 46 h). Für den 46 h-Wert (ohne Mediumwechsel) wurden nach 6 h und 24 h jeweils 50 µl frisches Kulturmedium zugegeben. Jeder Balken repräsentiert Mittelwert (plus Standardabweichung) der Transfektionseffizienzen aus 8 Wells.

Eine mögliche Ursache für die Abnahme könnte in einer zytotoxischen Wirkung der Lipoplexe zu suchen sein, wurde jedoch nicht durch einen geringeren Proteingehalt bestätigt. Auch ein Nährstoffmangel der Zellen aufgrund des fehlenden Mediumwechsels ist nahezu auszuschließen, da während der 46-stündigen Inkubation zweimal je 50 µl frisches Kulturmedium zugesetzt wurde.

In einem vergleichbaren Transfektionsexperiment mit DOTMA und COS-7-Zellen wurde exemplarisch der Effekt der „Transfektionsdauer“ von einer halben bzw. drei Stunden mit anschließendem Mediumwechsel verglichen. Hier zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Reporterogenaktivität bei drei Stunden Inkubationsdauer im Vergleich zur kürzeren Verweildauer [35]. Analoge Experimente mit einer humanen Osteosarkom-Zelllinie, die mit Lipofectin-Lipoplexen transfiziert wurde, führten zu vergleichbaren Ergebnissen wie in Abb. 3.24: Nach einem raschen Anstieg der Transfektionseffizienz bei kurzen Inkubationszeiten wurde nach einer Inkubationsdauer von etwa zwei Stunden ein Plateau erreicht [67], was auf einen ähnlichen Lipofektionsmechanismus hindeutet wie in dem vorliegenden System.

Wie aus diesen Studien und den hier vorgestellten Daten hervorgeht, ist eine „Transfektionsdauer“ der Lipoplexe auf den Zellen von mindestens zwei Stunden sinnvoll. Ob danach ein Mediumwechsel durchgeführt wird oder die Lipoplexe auf den Zellen belassen werden, sollte von dem zu untersuchenden System aus Zell- und Lipoplextyp sowie der experimentellen

Durchführbarkeit abhängig gemacht werden. Da in diesem Fall keine Verbesserung der Transfektionseffizienz durch die 46 h-Inkubation der Zellen mit den Lipoplexen beobachtet wurde, wurde der bisher verwendete Transfektionsmodus mit einem Mediumwechsel nach 4 h bis auf weiteres beibehalten.

Kultivierungsdauer der Zellen zwischen Lipoplexzugabe und Post-Transfektionsassays

Wie aus vorausgehenden Untersuchungen bekannt [154], spielt auch die Kultivierungsdauer der Zellen nach der Lipoplexzugabe (incl. der Inkubationszeit der Lipoplexe auf den Zellen) eine wichtige Rolle. In vielen Transfektionsstudien wurde die Reporterogenaktivität der Zellen ein bis drei Tage nach der Lipoplexzugabe bestimmt (48 h [36]; 16-36/48 h [3, 161]; 26-27 h [11, 57]).

Um das in dieser Arbeit verwendete Transfektionssystem aus COS-7-Zellen und DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen diesbezüglich zu optimieren, wurden zwei verschiedene Kultivierungszeiten bei der Transfektion verglichen. In zwei getrennten Experimenten wurde die Transfektionseffizienz entweder nach 24 h oder nach 46 h Kultivierungsdauer bestimmt. Um einen weiteren Parameter zu testen, wurde in Teilerperiment 2 auf einen Mediumwechsel nach der Lipoplexzugabe verzichtet.

Gesamtkultivierungsdauer (h)	24	46
Experiment 1 (rlu/ μ g Protein)	158 \pm 85 (n = 16)	11595 \pm 3310 (n = 16)
Experiment 2 (rlu/ μ g Protein) (ohne Mediumwechsel)	317 \pm 245 (n = 8)	10918 \pm 5200 (n = 16)

Tab. 3.6 Beeinflussung der gemessenen Transfektionseffizienz durch die Kultivierungsdauer der transfizierten Zellen zwischen Lipoplexzugabe und Post-Transfektionsassays

Mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierte COS-7-Zellen wurden für insgesamt 24 h bzw. 46 h nach der Lipoplexzugabe kultiviert und anschließend die Transfektionseffizienz bestimmt. In jedem 24 h/46 h-Vergleichsexperiment wurde dieselbe Liposomendispersion zur Lipoplexbildung verwendet. In Experiment 1 wurde jeweils nach 6 h ein Mediumwechsel durchgeführt, in Experiment 2 ohne Unterbrechung kultiviert. Angegeben sind die Transfektionseffizienzen (in rlu/ μ g Protein) als Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils ausgewerteten 96-Wellen.

In beiden Experimenten führte die 46-stündige Kultivierung zu wesentlich (etwa 30- bis 70-mal) höheren Transfektionseffizienzen als die 24-stündige (Tab. 3.6). Da in Experiment 1 (mit Mediumwechsel) und Experiment 2 (ohne Mediumwechsel) jeweils ähnliche Transfektionseffizienzen beobachtet wurden, schien der Verzicht auf einen Mediumwechsel keinen negativen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu.

Der beträchtliche Unterschied zwischen den Transfektionseffizienzen nach 24 h und 46 h könnte auf intrazelluläre Prozesse zurückzuführen sein: Wie in mehreren Untersuchungen gezeigt wurde, ist die Effizienz der durch kationische Lipide vermittelten Transfektion von der Zellzyklusphase abhängig. Beispielsweise führte eine Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase nur zu sehr geringen Reporterogenaktivitäten nach DOTMA/DOPE-vermittelter Lipo-

fektion von NIH 3T3-Zellen [152]. In Epithelzellen des respiratorischen Traktes zeigte sich eine höhere Transgenexpression bei mitotischen Zellen und bei Zellen mit hoher Teilungsaktivität als bei nicht teilungsaktiven Zellen [34, 66]. Genauer spezifiziert wurde die betreffende Zellzyklusphase als der Übergang der G2/M-Phase in die G1-Phase; Lipofektionen, die unmittelbar vor oder in der Mitose durchgeführt wurden, resultierten in höheren Transfektionseffizienzen als bei Durchführung während anderer Zellzyklusstadien [102]. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang auch die Auflösung der Kernmembran während der Mitose eine Rolle. Dies könnte zu einer erleichterten (direkten) Aufnahme von Lipoplexen in die Tochterzellen führen, ohne dass sie die intakte Kernmembran passieren müssten.

Da die COS-7-Zellen im hier verwendeten Transfektionssystem den Zellzyklus asynchron durchlaufen, vergeht eine gewisse Zeitspanne, bis eine ausreichende Anzahl von Zellen das Mitosestadium erreicht hat. Wie mittels einer Wachstumskurve belegt werden konnte, verdoppeln COS-7-Zellen zwischen dem ersten Tag, an dem die Lipoplexzugabe erfolgt, und dem dritten Tag nach der Aussaat ihre Zellzahl (siehe hierzu Abb. 3.20). Statistisch gesehen sollten sich also 24 h nach der Lipoplexzugabe ungefähr 40-50 % der Zellen bereits geteilt haben. Gegenüber diesem Faktor von ca. 2 (bezogen auf die Zellzahl 24 h bzw. 48 h nach der Lipoplexzugabe) unterschieden sich die nach 24 h gemessenen Transfektionseffizienzen von den nach 46 h gemessenen aber etwa um den Faktor 50.

Ein wichtiger Grund für die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen könnte in der Synthesegeschwindigkeit des Reporterproteins liegen. Die Proteinsynthese sowie die Konzentration des Luciferase-Reporterproteins erreicht erst nach etwa einem Tag (nach Lipoplexzugabe) ein Plateau, wie an Hep G2-Zellen nachgewiesen wurde [139]. Nimmt man eine ähnliche Zeitdimension auch für COS-7-Zellen an, ist unter Abzug der Zeit, bis die Lipoplexe in die Zelle und die DNA in den Kern gelangen, ein 24 h-Intervall zu kurz, um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen.

Als Konsequenz aus diesem Experiment wurde die Transfektionseffizienz von COS-7-Zellen stets ca. 46 h nach der Transfektion bestimmt.

3.1.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zum Gentransfer wurde ein Plasmid mit einem Reporter gen verwendet, das das Enzym Luciferase codiert. Nach der Lipofektion der Zellen wurden die Aktivität der Luciferase und die Menge zellulären Proteins (bezogen auf das gleiche 96-Well) in zwei unabhängigen (Post-Transfektions)assays bestimmt. Aus beiden Werten wurde die Transfektionseffizienz berechnet (Luciferaseaktivität/Proteingehalt (*rlu/μg Protein*)). Zusätzlich konnte die zytotoxische Wirkung der Lipoplexe anhand des Proteingehalts beurteilt werden (siehe hierzu Kapitel 3.1.4.2). Für die Durchführung der beiden Assays wurden die Zellen zunächst gewaschen, dann lysiert und anschließend das Zellysate aufgeteilt und auf die jeweilige Testplatte übertragen. Der Proteingehalt wurde photometrisch mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt und die Luciferaseaktivität luminometrisch mit Hilfe eines Luciferase-Reporter genassays.

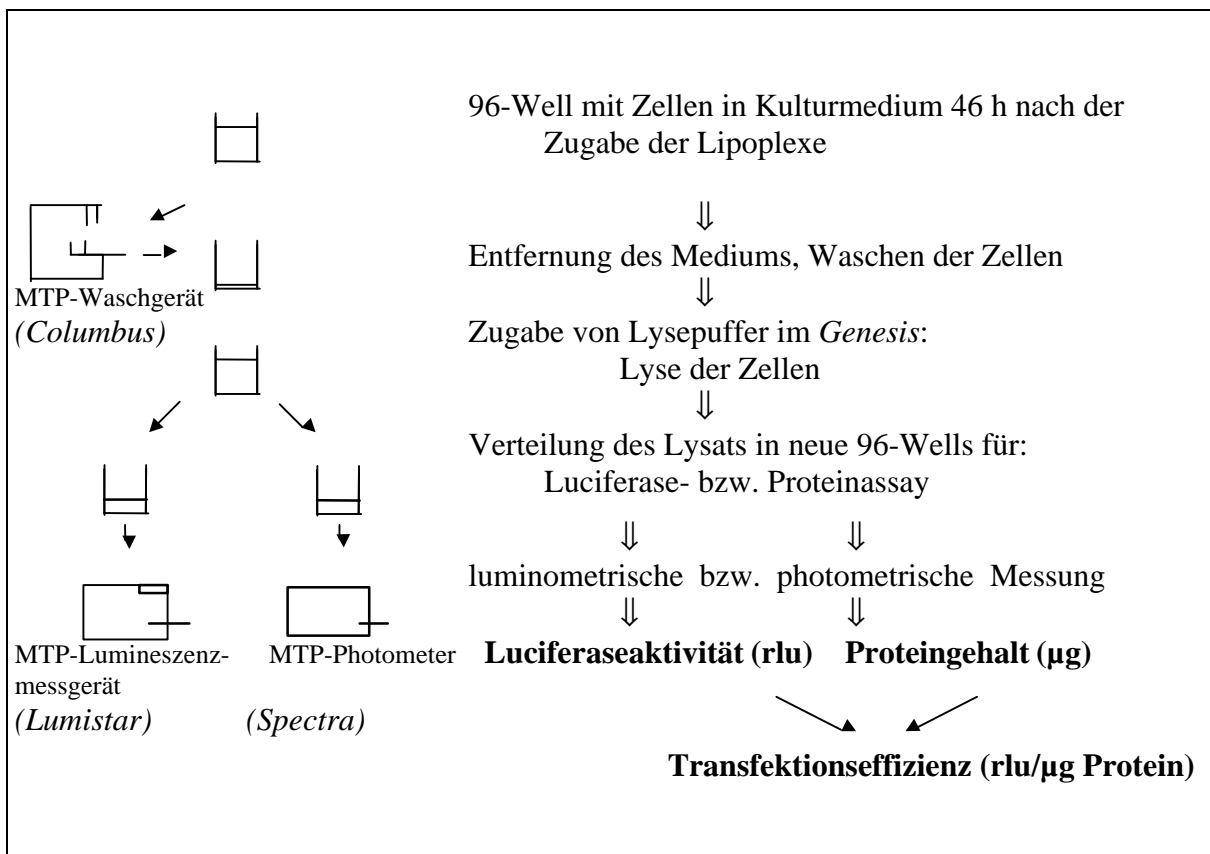


Abb. 3.25 Schematische Darstellung der Abfolge der Post-Transfektionsassays im 96-Well-Mikrotiter-Plattenformat

In den Pipettierroboter *Genesis* integrierte Komponenten sind durch Kursivschrift gekennzeichnet, Ergebnisse der Messungen durch Fettschrift.

Abb. 3.25 gibt einen Überblick über die gesamte Abfolge der Post-Transfektionsassays unter Einbeziehung des Pipettierroboters (*Genesis*) incl. seiner integrierten Waschstation (*Columbus*) und der Messgeräte (Luminometer: *Lumistar* und Photometer: *Spectra*).

Abb. 3.26 zeigt die Anordnung der Platten und Geräte in dem verwendeten Pipettierroboter.

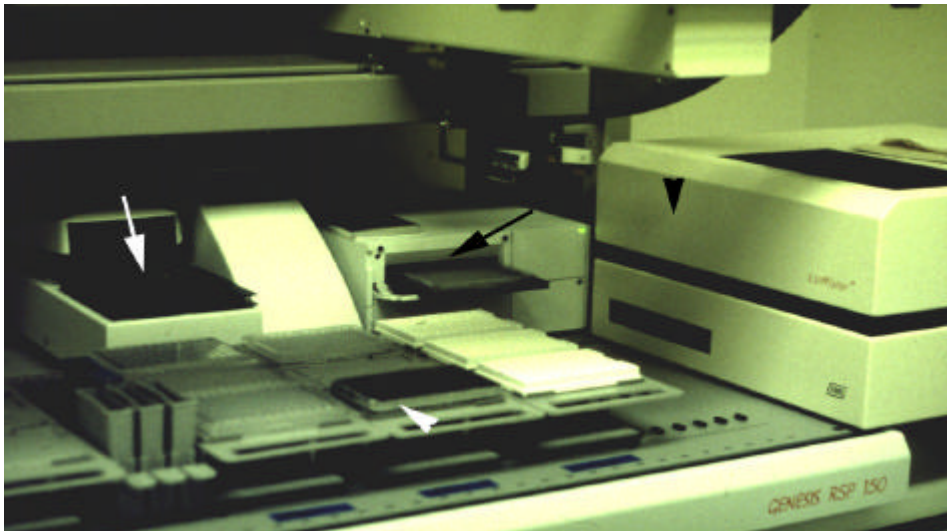


Abb. 3.26 Anordnung der Mikrotiterplatten und integrierten Geräte im Pipettierroboter

Einzelne Komponenten sind folgendermaßen gekennzeichnet: weißer Pfeil: MTP-Waschgerät; weiße Pfeilspitze: MTP-Träger mit Testplatten; schwarzer Pfeil: MTP-Photometer; schwarze Pfeilspitze: MTP-Luminometer.

3.1.4.1 Automatisierungsaspekte bei der Probenvorbereitung

Optimierung des Wasch- und Lyseschrittes

Das vorliegende Protokoll gilt für adhärente Zellen, die in Monolayern in 96-Well-Platten wachsen. Vor der Durchführung des Protein- und des Luciferaseassays mussten das Medium (das ebenfalls Protein enthält) von den Zellen entfernt und die Zellen mit Puffer gewaschen werden. Hierzu wurde bei manueller Durchführung PBS-Puffer verwendet. Für die (halb)automatische Durchführung im *Columbus*-MTP-Waschgerät wurde ein wesentlich größeres Puffervolumen benötigt und deshalb die einfacher herzustellende 0,9%ige (isotonische) Kochsalzlösung eingesetzt. Der Ablauf der einzelnen Schritte im *Columbus*-MTP-Waschgerät wurde wie folgt programmiert: Im ersten Zyklus (d. h. Durchlauf einer Platte) wurde das Medium spaltenweise von der Platte abgesaugt und sofort 200 µl NaCl-Lösung tropfenweise in die Wells gegeben, bevor die nächste Spalte angesteuert wurde. Im zweiten Zyklus wurde die NaCl-Lösung wieder abgesaugt. Die Position der Absaugnadeln und die Absauggeschwindigkeit wurden so gewählt, dass der Zellrasen durch den Waschschrift möglichst unbeschädigt blieb, was mehrfach mikroskopisch kontrolliert wurde.

Im Anschluss an den Waschschrift wurden die Zellen aufgeschlossen (lysiert). Die hierdurch erzielte Freisetzung des Zellinhalts ist eine wesentliche Voraussetzung für die nachfolgenden Post-Transfektionsassays (Protein- und Luciferaseassay). Im Gegensatz zu Petrischalen oder 6-Well-Platten können die Zellen in 96-Well-Platten nach der Lyse nicht mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch von der Bodenfläche abgelöst werden, sondern müssen allein durch die Lyse aufzuschließen sein. Bei der Festlegung des Lysepuffervolumens pro 96-Well mussten verschiedene Punkte in Betracht gezogen werden: Die Zellen sollten von einem ausreichenden Volumen bedeckt sein, um darin lysiert werden zu können. Außerdem sollte der Flüssigkeits-

spiegel im Well hoch genug sein, um von den Roboternadeln detektiert zu werden. Dennoch sollte das Volumen nicht zu groß sein, um eine ausreichende Proteinmenge in maximal 20 µl für den BCA-Protein-Assay zur Verfügung zu haben (siehe unter 3.1.4.2). Die Lyse wurde deshalb mit 50 µl Lysepuffer pro Kavität, wie auch in anderen Lyseprotokollen beschrieben [150] durchgeführt.

Zur Zellyse wurden vier verschiedene Puffersysteme bzw. Verfahren verglichen (Tab. 3.7):

Lysepuffer	beschriebene Bedingungen		Zusammensetzung
Name/Referenz	Temperatur	Lysedauer	Komponenten
„A“ [154]	RT	15 min	Glycylglycin, Glycerol, MgSO ₄ , EDTA, Triton X-100, DTT
„B“ (Roche)	RT	15 min	keine Angaben
„C“ [3]	auf Eis	15 min	K ₃ PO ₄ , Triton X-100, DTT, EDTA
„D“ [36]	-80 °C	> 2 h	Triton X-100, Tris

Tab. 3.7 Getestete Lysepuffer (zur genauen Zusammensetzung s. 2.1.3.2) und zugehörige Lysebedingungen

Die verschiedenen Lysebedingungen und -puffer wurden jeweils miteinander kombiniert, um die optimale Lysemethode, d. h. vollständige Lyse ohne mechanische Unterstützung, zu finden (Tab. 3.8). Die Experimente wurden mit COS-7-Zellen durchgeführt, die 46 h zuvor mit Lipoplexen aus DOTAP und dem Vektor pCMXluc transfiziert worden waren. Das Ergebnis der Lyse wurde sowohl lichtmikroskopisch (Ab-/Auflösung der Zellen) (Tab. 3.8) als auch durch Messung der Luciferaseaktivität (Freisetzung des Reporterproteins) (Tab. 3.9) bestimmt.

Lysepuffer	15 min/RT	15 min/0 °C	2 h/-80 °C
„A“	+	+	+/-
„B“	+++	++	++
„C“	++	++	++
„D“	++	+++	+++

Tab. 3.8 Effizienz der Zellyse in Abhängigkeit von der verwendeten Lysemethode

46 h nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit DOTAP wurden die Zellen (im MTP-Waschgerät) gewaschen und anschließend mit 50 µl Puffer/Well lysiert. Die Auswertung erfolgte nach mikroskopischer Kontrolle, ob der Zellrasen vollständig (+++), nahezu vollständig (++) oder weniger vollständig (+, +/-) vom Plattenboden abgelöst wurde.

In der mikroskopischen Auswertung zeigte Lysepuffer „B“ nach einer Lyse bei RT und „D“ bei 0 °C und -80 °C die beste Ablösung der Zellen (Tab. 3.8).

Wie sich aus Tab. 3.9 klar ergibt, führte Lysepuffer „B“ bei RT und 0 °C zu den höchsten Luciferaseaktivitäten. Erstaunlicherweise zeigte auch Puffer „D“, der nur aus zwei Komponen-

ten besteht (Tab. 3.7), durchgängig gute Resultate, und zwar unabhängig von der Lysetemperatur.

Lysepuffer	15 min/RT	15 min/0 °C	2 h/-80 °C
„A“	131 ± 93 (n = 14)	4775 ± 2010 (n = 12)	3224 ± 1317 (n = 15)
„B“	122830 ± 47960 (n = 16)	152085 ± 40694 (n = 12)	23565 ± 22762 (n = 15)
„C“	12205 ± 4910 (n = 16)	13979 ± 3663 (n = 14)	20415 ± 7916 (n = 16)
„D“	60910 ± 27615 (n = 16)	72106 ± 19198 (n = 13)	68441 ± 22342 (n = 16)

Tab. 3.9 Einfluss der Lysemethode auf die Luciferaseaktivität

Mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierte COS-7-Zellen in 96-Well-Platten wurden nach verschiedenen Methoden lysiert und die Luciferaseaktivitäten (in rlu) bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf die jeweils angegebene Zahl von Wells.

Der Vergleich der in Tab. 3.8 und 3.9 dargestellten Daten zeigt, dass sich eine effiziente Lyse primär durch ein vollständiges Ablösen des Zellrasens vom Plattenboden (Tab. 3.8) auszeichnet; dies ist die Voraussetzung für die Zugänglichkeit der Zellen und letztlich die Auflösung der Zellmembran und das Freisetzen des Zellinhalts. Entsprechend lässt sich die wesentlich geringere Luciferaseaktivität nach der Lyse mit Lysepuffer „A“ durch eine ungenügende Lyse der Zellen erklären. Im Fall des Puffers „C“ wurden die Zellen zwar besser vom Plattenboden abgelöst (Tab. 3.8); möglicherweise wurde dennoch der Zellinhalt nicht vollständig freigesetzt, was dann zu niedrigen Luciferaseaktivitäten führte. In den Fällen, in denen trotz guter Ablösung unterschiedliche Transfektionseffizienzen gemessen wurden, wäre ein störender Effekt durch einzelne oder mehrere Pufferkomponenten in Puffer „C“ denkbar.

Aus dem Blickwinkel der Luciferaseaktivität wurde das beste Lyseergebnis mit Lysepuffer „B“ bei 0 °C erzielt. Diese Methode wäre jedoch mit technischem Aufwand durch den Einbau eines gekühlten Plattenträgers in den Roboter verbunden. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Experimente der Puffer „B“ bei RT verwendet, der auch unter dieser Bedingung sowohl zu einer effizienten Lyse der Zellen als auch zu annähernd gleichwertigen Luciferaseaktivitäten führte.

Ist ein Zentrifugationsschritt nach der Lyse der Zellen erforderlich?

Bei der manuellen Abarbeitung der 96-Well-Platten wird nach dem Lyseschritt das Zelllysatz zentrifugiert, um Zelldebris abzutrennen (Kapitel 2.2.5.1). Für die Automatisierung der Abarbeitung wäre eine Zentrifugation der MTP an dieser Stelle ungünstig, weil sie mit einer Unterbrechung des automatisierten Ablaufs verbunden wäre. Deshalb wurde in mehreren parallel durchgeführten Transfektionsexperimenten untersucht, ob und wie das Weglassen des Zentrifugationsschrittes bei der automatisierten Durchführung der Post-Transfektionsassays die resultierenden Messwerte beeinflusste.

Wie aus Abb. 3.27 ersichtlich, führte das Weglassen des Zentrifugationsschrittes im Anschluss an die Lyse zu erhöhten Luciferaseaktivitäten (Abb. 3.27 a). Der Proteingehalt war hingegen (mit und ohne Zentrifugation) einheitlicher (Abb. 3.27 b). Lediglich bei einzelnen Proben (1-3, Abb. 3.27 b) wurde ein leicht reduzierter Proteingehalt bei den nicht zentrifugierten Platten gemessen.

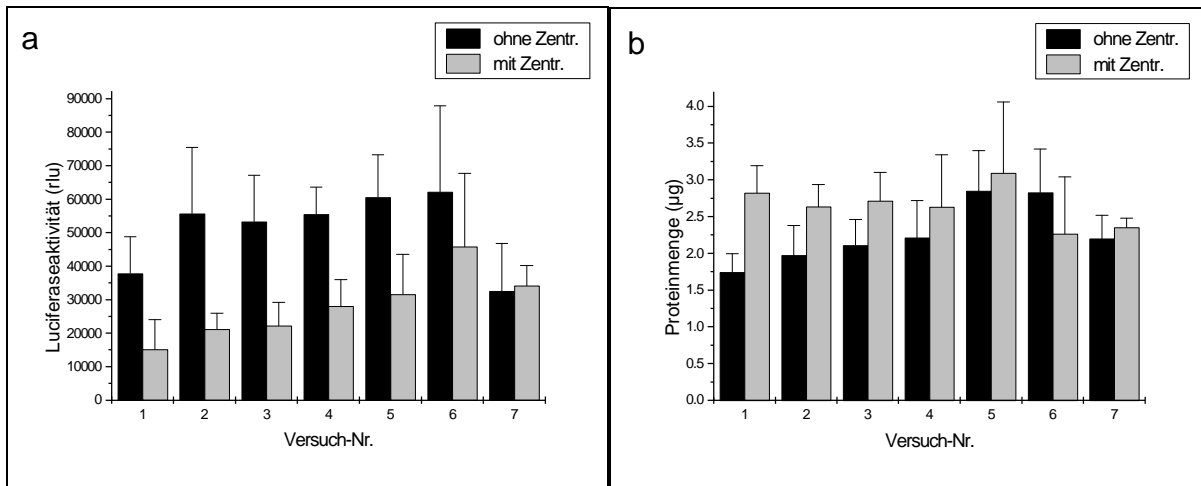


Abb. 3.27 Einfluss eines Zentrifugationsschrittes auf Luciferaseaktivität und Proteingehalt transfizierter COS-7-Zellen

COS-7-Zellen in zwei 96-Well-Platten wurden, wie unter 2.2.4.1 angegeben, in einem Doppelerperiment mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexten transfiziert. In den Post-Transfektionsassays wurden für jedes Experiment direkt (ohne Zentr.) oder nach einem Zentrifugationsschritt (mit Zentr.) die Luciferaseaktivität (a) und der Proteingehalt (b) aus dem Zelllysats bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 8 Wells.

Die beobachtete Tendenz könnte auf einen möglichen Verlust von Luciferaseprotein bedingt durch die Zentrifugation hinweisen. Dieser äußerte sich jedoch nicht in einer Verringerung der Menge zellulären Proteins (Abb. 3.27 b), was durch eine bezogen auf die Gesamtproteinmenge sehr geringe Menge an Luciferase(protein) zu erklären sein könnte.

Insgesamt schien sich das Verzicht auf den Zentrifugationsschritt eher positiv auf das Transfektionsergebnis auszuwirken, weshalb die automatisierte Abarbeitung der Platten im Folgenden ohne Zentrifugation nach der Lyse durchgeführt wurde.

Einführung eines Mischschrittes nach der Lyse

Bei der manuellen Abarbeitung der Assays im 96-Well werden die Zellen nach erfolgter Lyse mit Hilfe einer Pipette homogenisiert (2.2.5.1). Dieser Schritt wurde im Pipettierroboter durch Einführung eines Mischschrittes, der von den Pipettiernadeln ausgeführt wurde, simuliert. Da aus robotertechnischen Gründen ein Mischschritt mit einer Flüssigkeitszugabe gekoppelt werden musste, wurden beim Mischen 30 µl 0,9%ige Kochsalzlösung zugegeben. Durch diesen Schritt wurde einerseits das Lysatvolumen erhöht und andererseits eine bessere Durchmischung des Lysats erzielt.

Das resultierende Gesamtvolumen von 80 µl pro Well (zusammengesetzt aus 50 µl Lysat und 30 µl NaCl-Lösung) war ausreichend für die Detektion und Entnahme von insgesamt 40 µl

Lysat (plus mind. 10 % Volumenüberschuss, der von den Pipettiernadeln aufgenommen wurde) für die beiden folgenden Assays (à 20 µl) (s. dort). Ein geringeres Lysatvolumen würde aufgrund eines niedrigeren Flüssigkeitsspiegels zu Detektionsschwierigkeiten der Pipettiernadeln in den Wells führen und außerdem kein Reservevolumen (20 µl, um einen Assay wiederholen zu können) im Well mehr beinhalten. Ein höheres Volumen würde eine Verdünnung des Lysats verursachen und damit den Proteingehalt pro eingesetztes Testvolumen verringern (s. u.).

3.1.4.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels des BCA-Assays

Als Bezugsgröße für die Luciferaseaktivität wurde der Proteingehalt der Zellen nach der Transfektion verwendet. Zusätzlich diente der Proteingehalt als Nachweis für eine (eventuelle) Abnahme der Zellzahl aufgrund der zytotoxischen Wirkung von Lipoplexten. Die Bestimmung des Proteingehalts der transfizierten Zellen wurde – im Hinblick auf die Automatisierung – im 96-Well-Plattenformat durchgeführt.

Hierzu erwies sich der BCA-Assay als ausreichend sensitiv für den Nachweis geringer Proteinmengen, die sich aus 25 % des Lysats von 5000-10000 Zellen pro 96-Well (Tab. 2.1) ergeben.

Das Prinzip dieses Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen in alkalischem Milieu in der Anwesenheit von Proteinen. Je zwei Moleküle des Nachweisreagenzes, der 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure, können mit einem Cu^{1+} -Ion einen wasserlöslichen Komplex bilden, der sich durch eine starke Absorption bei 562 nm auszeichnet [127]. Dementsprechend konnte die (Violett)färbung der Probe nach erfolgter Reaktion photometrisch (bei 550 nm) bestimmt werden.

Da über einen weiten Bereich (s. im Folgenden) ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen dem Grad der Färbung und dem Proteingehalt besteht, konnte aus dem Extinktionswert der Proteingehalt der Probe berechnet werden. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet, das in demselben Puffersystem (Lysepuffer/NaCl 5:3) gelöst wurde wie die lysierten Zellen. Nach Zugabe des BCA-Reagenzes stimmten das Absorptionsmaximum des Standards bei 562 nm und der Probe (bei 564 nm) überein, was die Basis für die Vergleichbarkeit beider Proteinmessungen darstellte.

Probenvolumen im Proteinassay

Laut Assayvorschrift werden pro 100 µl Probe oder Standard 2 ml BCA-Reagenz verwendet. Im hier ausgearbeiteten BCA-Assay wurden je 20 µl des Zelllysats aus jedem Well mit 200 µl Reagenz versetzt (siehe unter 2.2.5.1). Dieses Probenvolumen (20 µl) stellt einen Kompromiss zwischen verschiedenen Erfordernissen dar: Ein geringeres Volumen würde zu einem niedrigeren Proteingehalt führen, der bei Unterschreitung der Nachweisgrenze nicht mehr erfasst werden könnte (Tab. 3.10, folgendes Kapitel). Bei einem höheren Volumen müsste die

Reagenzmenge prozentual erhöht werden, was die Fassungskapazität der Kavitäten (ca. 300 µl) überschreiten würde.

Kalibrationskurven

Mit Hilfe von Proteinstandards aus Serumalbumin (Stammlösung 1 mg/ml; gelöst in Lysepuffer/NaCl), die durch serielle Verdünnung hergestellt wurden, konnten reproduzierbare Kalibrationskurven erstellt werden (Abb. 3.28). Die Extinktionswerte wurden jeweils aus dem arithmetischen Mittel einer Doppelbestimmung (zwei Wells pro Standard) berechnet. Der Kurvenverlauf war annähernd linear, ließ sich jedoch genauer durch ein Polynom 2. Grades beschreiben (Quadratfunktion: $y = ax^2 + bx + c$) (Abb. 3.28). Mit Hilfe der Auswertesoftware konnte die Proteinkonzentration bzw. -menge anhand der Regressionskurve berechnet werden (2.2.5.2). Die Nachweisgrenze, d. h. der kleinste erfassbare Wert, wurde durch eine fortlaufende Verdünnungsreihe mit insgesamt 10 Standards ermittelt (Tab. 3.10).

Standard (µg/Well) (theoretisch)	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04
Extinktion bei 550 nm	0,539	0,295	0,176	0,101	0,061	0,035	0,019	0,012	0,007	0,005
Proteingehalt (µg/Well) (berechnet)	20,12	9,54	5,27	2,80	1,55	0,73	0,24	0,04	< 0	< 0
Abweichung (%)	+0,6	-4,6	+5,4	+12,0	+24,0	-15,8	-22,6	-75,0	n. a.	n. a.

Tab. 3.10 Ermittlung der Nachweisgrenze im BCA-Test

Angegeben sind die theoretische Proteinkonzentration der Standards, die gemessenen Extinktionen bei 550 nm (um den Reagenzienleerwert korrigiert) sowie der aus der Standardkurve berechnete Proteingehalt. Die Angabe „µg/Well“ bezieht sich auf 20 µl Standard (plus 200 µl BCA-Reagenz) pro Well einer 96-Well-Messplatte. Extinktion und Proteinkonzentration sind jeweils das arithmetische Mittel aus einer Doppelbestimmung. (n. a. = nicht auswertbar)

Da bei der Berechnung der Transfektionseffizienz (2.2.5.2) der Quotient aus Luciferaseaktivität und (absoluter) Proteinmenge (in 20 µl Lysat) gebildet wurde, erfolgte die Angabe über den Proteingehalt nicht – wie sonst üblich – als Konzentrationsangabe (in mg/ml), sondern wurde auf die pro Well eingesetzte Menge des BSA-Standards bezogen (µg/Well). Bis zu einem Proteingehalt von ca. 0,16 µg/Well ließen sich anhand der zugehörigen Standardkurve positive Werte berechnen (Tab. 3.10). Bei sehr geringen Extinktionen (etwa 0,010 und darunter) konnte die Proteinmenge nicht mehr exakt erfasst werden. Bei 0,16 µg/Well lag dementsprechend die Nachweisgrenze.

Während die aus der Standardkurve berechneten Werte für die drei höchsten Konzentrationen um etwa 1-10 % von den theoretischen abwichen, zeigten die folgenden drei Standards jeweils Abweichungen über 10 %, im Fall des Standards von 1,25 µg (theoret. Wert) sogar über 20 %. Mit sinkendem Proteingehalt wurde die Abweichung noch größer, sodass beim achten Standard sogar nur 25 % des theoretischen Wertes berechnet wurden. Aus diesem Grund wurden in sämtlichen Experimenten lediglich sechs Standards (in Doppelbestimmung) bis zu

einer absoluten Proteinmenge von minimal 0,63 µg/Well (Bestimmungsgrenze) verwendet. Eine solche Standardkurve mit sechs Standards ist beispielhaft in Abb. 3.28 dargestellt.

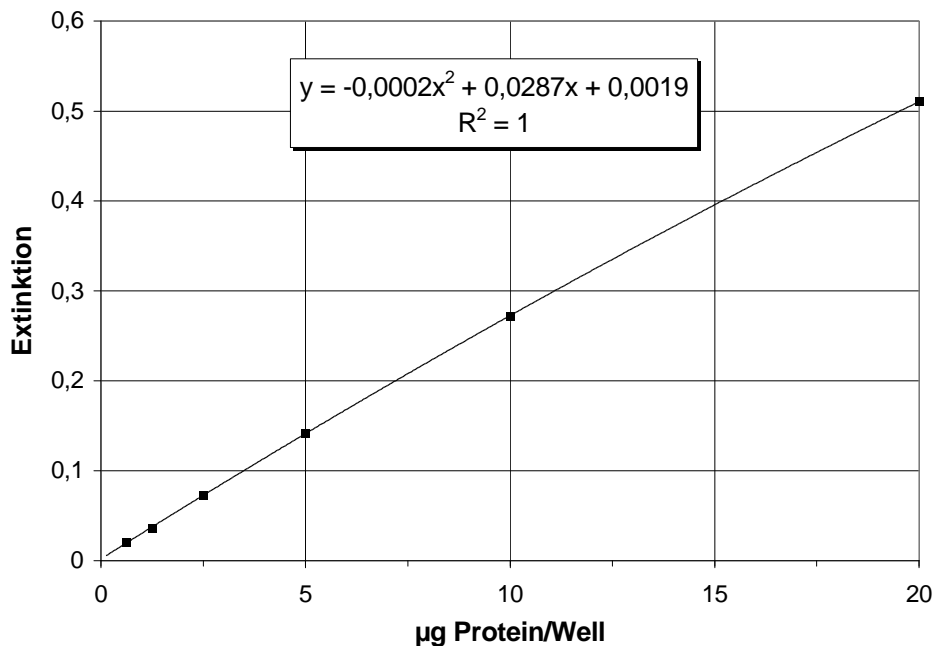


Abb. 3.28 Beispiel einer BSA-Standardkurve im BCA-Assay

Berechnet wurde die Kurve anhand der oben angegebenen Regressionsfunktion (Polynom zweiten Grades) aus den Extinktionen von sechs seriell verdünnten BSA-Standards im BCA-Assay.

Vergleich der Zytotoxizitätsbestimmung mittels BCA- und WST-1-Assay

Die (potenziell) zytotoxische Wirkung kationischer Lipide, die in Transfektionsexperimenten in Form von Lipoplexen eingesetzt werden, kann anhand verschiedener Methoden festgestellt und quantifiziert werden.

Zum einen gibt die Untersuchung im Auflichtmikroskop Aufschluss über Anzahl/Konfluenz, Verteilung und Aussehen der Zellen. Insbesondere bei adhärennten fibroblastenähnlichen Zellen wie den COS-7-Zellen ist ein Einziehen ihrer Fortsätze mit zunehmender Abrundung des Zellkörpers bei toxischer Wirkung zu beobachten.

Abb. 3.29 b zeigt dieses Verhalten exemplarisch an mit CAc43/DOPE/pCMXluc-Lipoplexen transfizierten COS-7-Zellen. Im Vergleich zu den mit DOTAP/pCMXluc transfizierten COS-7-Zellen (Abb. 3.29 a) ist die Vereinzelnung und Abrundung der Zellen nach CAc43/DOPE-vermittelter Transfektion deutlich zu erkennen (Abb. 3.29 b) und morphologisch gut zu unterscheiden. Neben dieser qualitativen Aussage lässt sich auch der etwaige quantitative Verlust von Zellen relativ zu unbehandelten oder mit nicht toxisch wirkenden Lipoplexen transfizierten Zellen abschätzen. Aus diesem Grund wurde generell die Zellmorphologie und Konfluenz vor jedem Transfektionsexperiment und vor Beginn der Post-Transfektionsassays zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mikroskopisch überprüft (siehe 2.2.5).

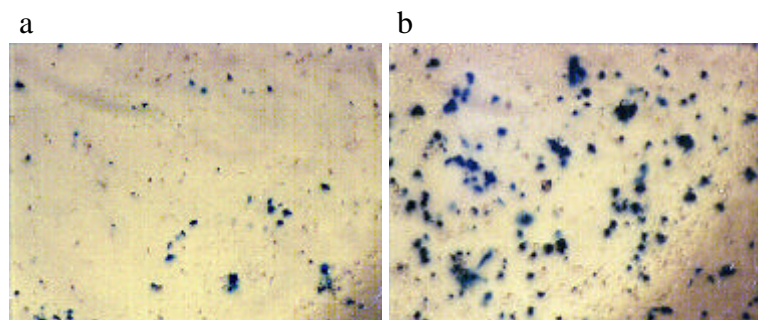


Abb. 3.29 Morphologie von COS-7-Zellen nach der Lipofektion mit kationischen Lipiden

COS-7-Zellen in 6-Well-Platten wurden mit (a) DOTAP/pCMX β -Gal-Lipoplexen, (b) CAC43/DOPE/pCMX β -Gal-Lipoplexen transfiziert (siehe unter 2.2.4.1). 46 h nach der Lipoplexzugabe wurde eine X-Gal-Färbung durchgeführt (2.2.6.2). Die Zellen wurden in einem Auflichtmikroskop im Phasenkontrast bei 40facher Vergrößerung betrachtet (Gesamtvergrößerung des Bildausschnitts 80 \times).

Zum anderen gibt es die Möglichkeit, mit verschiedenen nicht radioaktiven, meist kolorimetrischen Assays den (relativen) Zelltod bzw. die Stoffwechselaktivität der Zellen zu quantifizieren. Hierbei dient die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die mittels spezieller Proliferationsassays (MTT, WST-1 (Roche)) messbar ist [64, 103], als Zeichen für die Stoffwechselaktivität der Zellen. In diesen Testsystemen werden durch die Reaktion der Dehydrogenasen Tetrazoliumsalze in farbige Formazankristalle umgewandelt [6], die kolorimetrisch bestimmbar sind. Im Fall des MTT-Assays müssen diese Farbstoffe (Kristalle), die wasserunlöslich sind, zuerst über Nacht solubilisiert werden (2.2.6.1), während die im WST-1-Test entstehenden Farbstoffe per se wasserlöslich sind und die Färbung nach kurzer Inkubationszeit direkt gemessen werden kann [64, 103] (2.2.6.1). Durch die Behandlung mit der SDS und HCl enthaltenden Solubilisierungslösung sind die Zellen im ersten Fall für eine Weiterbehandlung unbrauchbar, während sie im zweiten Fall intakt bleiben und für weitere (Post-Transfektions)assays verwendet werden können (siehe im Folgenden).

Die mit Hilfe des BCA-Assays ermittelte Zytotoxizität wurde mit der Zytotoxizitätsbestimmung durch die Proliferationsassays verglichen. Hierzu wurden COS-7-Zellen mit CAC43/DOPE/pCMXluc-Lipoplexen in verschiedenen Lipid/DNA-Ladungsverhältnissen (s. hierzu Kapitel 3.1) sowie mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen (im Ladungsverhältnis 2,5) transfiziert. Um nach der Transfektion eine Platte für den WST-1-, den MTT-Assay und eine Platte für die Post-Transfektionsassays (BCA-Proteinassay und Luciferaseassay) verwenden zu können, wurden drei Experimente in separaten 96-Well-Platten durchgeführt. Zusätzlich wurde nach Durchführung des WST-1-Assays der Proteingehalt der Zellen im BCA-Assay bestimmt. Wie aus Abb. 3.30 ersichtlich, ergaben sich für die beiden Proteinbestimmungen mittels des BCA-Tests sowie für den WST-1-Test ähnliche Tendenzen bezüglich der toxischen Wirkung für die verschiedenen Lipid/DNA-Ladungsverhältnisse. Der MTT-Test führte hingegen bei allen Ladungsverhältnissen zu annähernd konstanten Messwerten, die weder der beobachteten noch einer gegenläufigen Tendenz zuzuordnen waren. Die größte Übereinstimmung zeigten der WST-1-Test und der BCA-Test, die beide mit denselben Zellen durchgeführt worden waren, sowie der BCA-Test der Kontrollplatte bis zum Ladungsverhältnis 5: sinkende Werte für die

Ladungsverhältnisse 1 bis 5 (Minimum) (Abb. 3.30). Ab einem Ladungsverhältnis von 7 waren etwas höhere, aber schwankende Werte zu beobachten. Die außergewöhnlich hohen Standardabweichungen in dem im Anschluss an den WST-1 durchgeführten BCA-Test erklären sich vor allem durch den Verlust von Zellen in einzelnen Wells aufgrund eines zusätzlichen Waschschrittes zur Entfernung des WST-1-Reagenzes.

Die zytotoxische Wirkung der Lipoplexe in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis konnte demnach durch den WST-1-Test wie den BCA-Test gleichermaßen erfasst werden. Das abweichende Ergebnis des MTT-Tests könnte auf einer zu geringen Sensitivität beruhen, um diese Unterschiede zu erfassen. Des Weiteren könnte eine ungenügende Solubilisierung des Formazanfarbstoffes als Erklärung in Betracht gezogen werden. Der MTT-Test erwies sich somit als ungeeignet für die Zytotoxizitätsbestimmung. Darüber hinaus konnte er aufgrund des Solubilisierungsschrittes – im Gegensatz zum WST-1-Assay – nicht mit den Post-Transfektionsassays kombiniert werden, da die Zellen nach dieser Behandlung nicht mehr intakt waren.

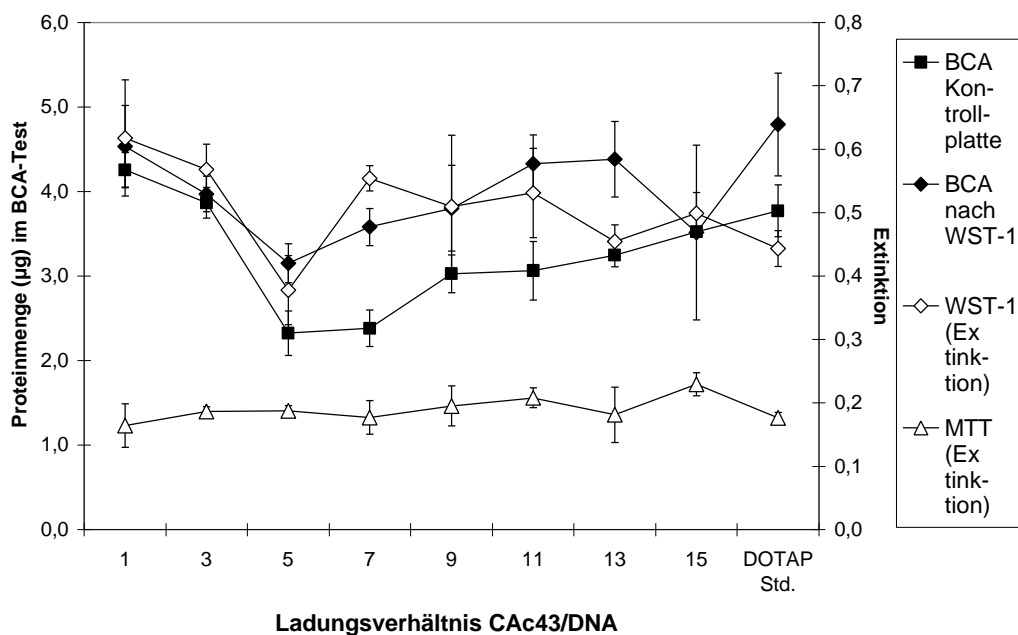


Abb. 3.30 Bestimmung der zytotoxischen Wirkung eines Transfektionslipids anhand von MTT-, WST-1- und BCA-Assays

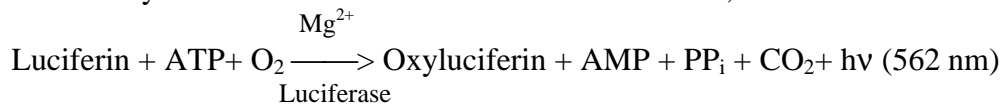
COS-7-Zellen in drei separaten 96-Well-Platten wurden mit Lipoplexen aus CAc43/DOPE bzw. DOTAP und pCMXluc transfiziert (s. unter 2.2.4.2). MTT-, WST-1- und BCA-Assay wurden durchgeführt, wie in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben. Zusätzlich wurde die Proteinmenge der Zellen bestimmt, die bereits im WST-1-Test eingesetzt wurden. Dargestellt sind für jedes Lipid/DNA-Ladungsverhältnis jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Wells. Für den DOTAP-Standard wurden je 8 Wells transfiziert und ausgewertet. Zur Veranschaulichung wurden die aus jedem Assay berechneten Einzelpunkte miteinander verbunden.

Da die Information über die Zytotoxizität aus dem WST-1-Assay die Daten über den Protein Gehalt widerspiegelte (Abb. 3.30), wurde letztlich auf die Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe eines separaten Assays verzichtet. Der (potenziell) zytotoxische Effekt von Lipoplexen

wurde weiterhin über die Bestimmung des Proteingehalts und die Beurteilung der Zellmorphologie ermittelt.

3.1.4.3 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität dient zum Nachweis der Expression des Luciferase-Reportergens in den transfizierten Zellen. Der hierzu eingesetzte Luciferase-Reportergenassay basiert auf der Enzymreaktion der Luciferase mit ihrem Substrat, dem D-Luciferin:



Bei dieser Reaktion werden Lichtquanten frei, die luminometrisch erfasst werden können. Der Luciferase-Reportergenassay ist bekannt für seine Sensitivität und hohe Dynamik des Messbereichs. Für einen spezifischen Reaktionstypus („Flash“) wurde daher die Linearität des Messbereichs in Abhängigkeit vom Probenvolumen und vom Assayvolumen im 96-Well überprüft. Darüber hinaus wurde der Einfluss weiterer Parameter, wie das Format/Fabrikat der Messplatten und die Temperatur des Substrats, auf die gemessene Lichtemission untersucht. Die Reproduzierbarkeit einer Messung wurde separat getestet.

Bestimmung der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit vom Reaktionstypus

Die Reaktion des Luciferaseenzym mit seinem Substrat, dem Luciferin, kann nach zwei verschiedenen Typen in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer ablaufen: Enthält die Substratlösung Coenzym A, so bleibt die Luciferaseaktivität über längere Zeit stabil auf gleichem Niveau (Abb. 3.32) („Glow Type“). Coenzym A fördert die Ablösung des Oxyluciferins (das die Enzymreaktion hemmt) von dem Enzym und erhöht dadurch die Lichtproduktion [41]. Ist kein Coenzym A während der Enzymreaktion zugegen, sinkt die Luciferaseaktivität innerhalb weniger Sekunden auf ein niedrigeres Niveau ab (Abb. 3.31) („Flash Type“).

Um den zeitlichen Verlauf einer Enzym-Substrat-Reaktion nach dem „Flash Type“ zu untersuchen, wurde die Lichtmenge, die während der Luciferasereaktion in einem 96-Well emittiert wird, über einen Zeitraum von ca. 24 min in insgesamt 50 Messungen von je 1 s bestimmt. Die Abstände zwischen den einzelnen Messungen betragen jeweils 30 s. Als Probe wurde das Lysat von mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierten COS-7-Zellen eingesetzt. Abb. 3.31 zeigt die graphische Darstellung der jeweils gemessenen Lichtmenge. Deutlich erkennbar ist der scharfe Peak („Flash“) bei ca. 7200 rlu im zweiten Messintervall. Bereits im dritten Zyklus, also 30 s später, sank der Wert auf knapp 4000 rlu und im vierten Zyklus auf etwa 2500 rlu. Ab der fünften Messung nahm die Lichtmenge langsamer ab, bis sie sich etwa im zehnten Zyklus auf einen für die Fortdauer der Messung annähernd konstanten Wert bei knapp 1000 rlu einpendelte. Der „Flash“, also der kurze und starke Anstieg der emittierten Lichtmenge als „Produkt“ der Luciferaseaktivität, war auf die ersten drei Mess-

zyklen, also die ersten etwa 1,5 bis 2 Minuten begrenzt. Daher ist eine Messung unmittelbar nach Zusammenbringen von Lysat und Substrat erforderlich.

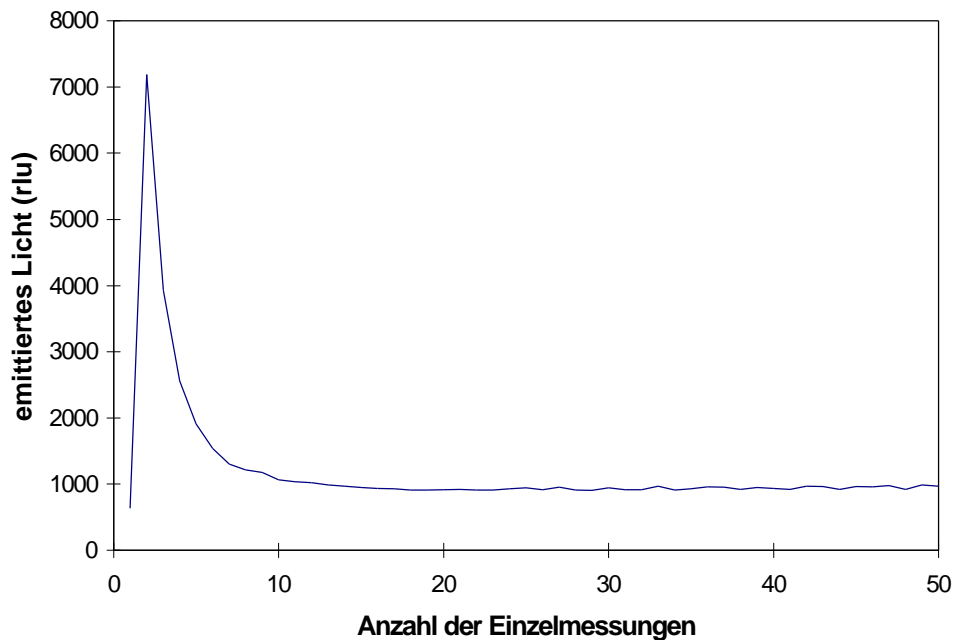


Abb. 3.31 Luciferaseaktivität einer „Flash Type“-Reaktion

Die Luciferaseaktivität von 20 µl Lysat aus COS-7-Zellen, die mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert worden waren, wurde in 50 einzelnen Messungen einer Kavität bestimmt. Abgebildet sind die als Kurve dargestellten einzelnen Messwerte aus 50 Zyklen (= Plattendurchläufe mit je einer Messung von je 1 s pro Well). Die Zeitabstände zwischen den Zyklen betragen jeweils 30 s.

Um die Kinetik der Lichtemission der Luciferasereaktion nach dem „Glow Type“ im Vergleich zum „Flash Type“ zu betrachten, wurde ein kommerzieller, Coenzym A enthaltender Luciferaseassay verwendet (Constant Light Signal, Roche). Hierzu wurde die Lichtemission aus vier Lysatproben zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: sofort nach Start der Reaktion (0 h), nach 2 h und nach 5 h.

Es zeigte sich eine langsame Abnahme der Lichtemission bis auf etwa 75 % des Ausgangswertes nach 5 h Reaktionsdauer (Abb. 3.32). Bedingt durch die sehr langsame Abnahme des Messsignals ist es im Gegensatz zur „Flash Type“-Reaktion nicht notwendig, die Lichtemission direkt nach Reaktionsstart zu bestimmen. Die Luciferasereaktion nach dem „Glow Type“ erlaubt daher eine zeitverzögerte Messung nach Reaktionsstart und könnte beispielsweise bei der Untersuchung länger andauernder Reaktionen oder für Verlaufskontrollen von Vorteil sein. Hinsichtlich eines Screenings mit hohem Plattendurchsatz wäre die Verwendung der teureren Coenzym A-haltigen Substratlösung nicht sinnvoll und ein Reaktionstypus nach dem „Flash Type“ vorzuziehen. Dies war aufgrund der technischen Gegebenheiten möglich, da das Substrat im verwendeten Luminometer direkt in die einzelnen Wells injiziert und somit die „Flash Type“-Reaktion zeitgleich mit dem Beginn der Messung gestartet werden konnte. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in den Post-Transfektionsassays wurde daher weiter-

hin unter den bisher verwendeten Bedingungen durchgeführt („Flash Type“-Reaktion bei einer Messdauer von 10 s pro Well).

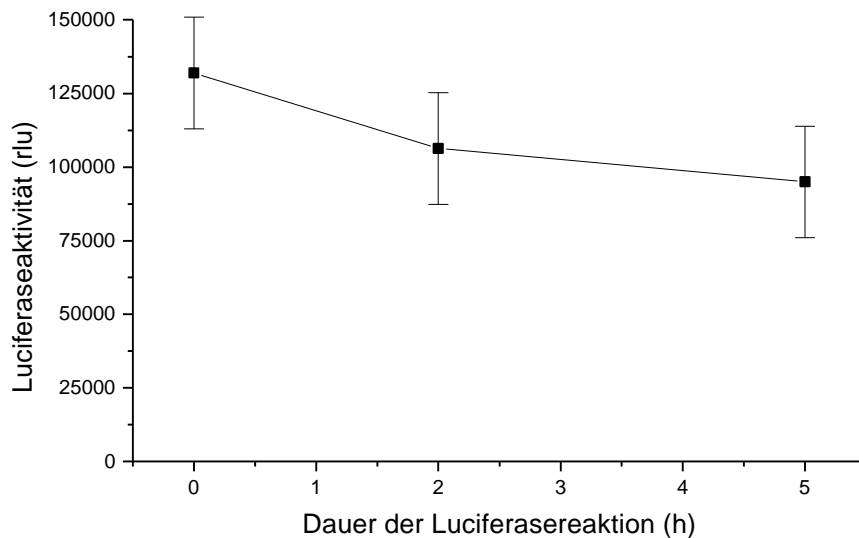


Abb. 3.32 Luciferaseaktivität einer „Glow Type“-Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer

Die Luciferaseaktivität in mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierten COS-7-Zellen in vier verschiedenen 96-Wellen wurde mit dem Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal (Roche) bestimmt und gemittelt. Die Messungen wurden unmittelbar nach Reaktionsstart (0 h) sowie nach 2 h und 5 h separat (10 s Messzeit pro Well im „Fast Kinetics“-Modus) durchgeführt. Zur Veranschaulichung wurden die einzelnen Mittelwerte für jeden Zeitpunkt zu einer Kurve verbunden.

Plattentypen

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden generell weiße, blickdichte Mikrotiterplatten verwendet, da in durchsichtigen Platten Streulicht aus benachbarten Wells die Messergebnisse beeinflussen kann. Spielt nun auch das Plattendesign eine Rolle, z. B. ob die Kavitäten in die Platte eingelassen sind oder einzeln – wie Kamine – nach oben ragen? Aus dieser Überlegung heraus wurde jeweils Lysat einer Probe in vier weiße Platten unterschiedlicher Hersteller pipettiert, die Lichtemission der Luciferasereaktion bestimmt und die Messergebnisse miteinander verglichen.

Wie aus Tab. 3.11 hervorgeht, wurden unabhängig vom Plattentyp annähernd gleiche Luciferaseaktivitäten für eine Probe gemessen. Die Abweichungen zwischen je 7 Proben innerhalb einer Platte lagen alle im Bereich des Mittelwertes (\pm Standardabweichung) aus allen Proben ($n = 28$), zeigten also keine signifikante Abweichung. Tendenziell schienen einzelne Fabrikate durchgängig etwas höhere (Greiner) oder niedrigere Werte (Dynatech) zu erbringen. Diese Abweichung war sehr gering und nicht von der Form der Wells (kaminartig oder eingesenkt) abhängig, da beide genannten Plattentypen eingesenkte Wells trugen. Alle weiteren Messungen wurden generell in Optiplates- oder Corning-Mikrotiterplatten durchgeführt.

Plattentyp	Costar (k)	Optiplate (k)	Dynatech (e)	Greiner (e)	Mittelwert
Probe 1	8130 ± 467 (6 %)	8047 ± 144 (2 %)	7932 ± 78 (1 %)	8205 ± 370 (5 %)	8079 ± 325 (4 %)
Probe 2	7965 ± 419 (5 %)	7631 ± 686 (9 %)	7603 ± 734 (10 %)	7871 ± 542 (7 %)	7768 ± 622 (8 %)
Probe 3	1879 ± 144 (8 %)	1944 ± 88 (5 %)	1886 ± 198 (11 %)	1968 ± 176 (9 %)	1919 ± 162 (8 %)
Probe 4	2269 ± 315 (14 %)	2184 ± 278 (13 %)	2023 ± 118 (5 %)	2290 ± 245 (11 %)	2191 ± 271 (12 %)

Tab. 3.11 Einfluss des Fabrikats weißer 96-Well-Platten auf die gemessene Lichtemission einer Luciferase-reaktion

COS-7-Zellen wurden mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert. Aus jeder Probe wurden 20 µl Lysat in die entsprechenden Wells einer Messplatte pipettiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt sind jeweils (um den zugehörigen Reagenzienleerwert auf den einzelnen Platten korrigiert) Mittelwert, Standardabweichung (und Variationskoeffizient) der relativen Lichteinheiten (rlu) für je 7 Probenwells pro Platte sowie für die gesamte Probe (n = 28 Wells). Die Platten bestehen entweder aus in die Plattenoberfläche eingelassenen Wells (e) oder kaminartig hochstehenden Wells (k).

Linearität des Messbereichs

Wie bereits in den Kapiteln 3.1.4.1 und 3.1.4.2 diskutiert, sollten 20 µl des Lysats der transfizierten Zellen zur Bestimmung der Luciferaseaktivität in einem 96-Well eingesetzt werden. Hierzu wurde überprüft, welche Auswirkungen eine Variation der jeweils eingesetzten Lysatmenge auf die bei der Luciferasereaktion gemessene Menge emittierten Lichts (in rlu) hat.

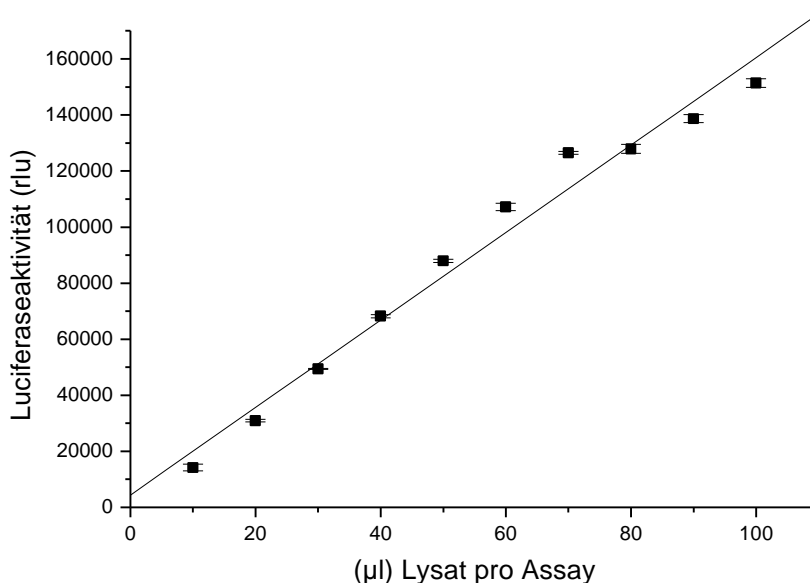


Abb. 3.33 Bestimmung der Luciferaseaktivität (in rlu) in Abhängigkeit vom Lysatvolumen

Zu unterschiedlichen Volumina an Lysat (in Lysepuffer/NaCl, vereinigte Proben aus 16 96-Wells) aus mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierten COS-7-Zellen wurden je 80 µl Luciferin-Substratlösung gegeben und die Luciferaseaktivität bestimmt. Das Gesamtvolumen im Assay betrug 180 µl, der Volumenausgleich erfolgte mit Lysepuffer/NaCl. Die Messpunkte stellen je Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) der Bestimmungen aus zwei Wells dar. Zusätzlich abgebildet ist eine Regressionsgerade, die aus den Werten erstellt wurde.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Menge der Luciferin-Substratlösung (80 μl) für diese Reaktionen ausreichend war. Wie aus Abb. 3.33 ersichtlich, stieg die Lichtemission aus dem Zellysate von COS-7-Zellen, die mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert worden waren, mit zunehmendem Lysatvolumen von 10-100 μl an. Der Anstieg war annähernd linear und konnte durch eine Regressionsgerade beschrieben werden.

In einem zweiten, analogen Experiment wurden 10-100 μl Lysat aus COS-7-Zellen verwendet, die mittels der Lipidmischung DC-CHOL/DOPE transfiziert worden waren. Da hierbei höhere relative Lichteinheiten (rlu) in der Luciferasereaktion erreicht wurden, konnte der Messbereich nach oben hin ausgedehnt werden. Anhand des Kurvenverlaufs, wiederum charakterisiert durch eine Regressionsgerade, zeigte sich die Linearität des Messbereichs bis in eine Höhe von rund einer Million relativen Lichteinheiten (Abb. 3.34).

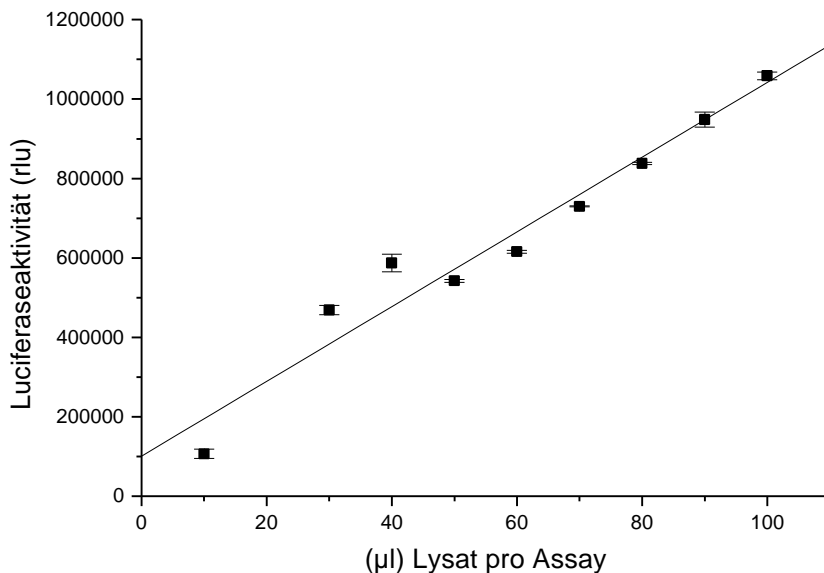


Abb. 3.34 Luciferaseaktivität (in rlu) in Abhängigkeit vom eingesetzten Lysatvolumen

46 h nach der Transfektion mit DC-CHOL/DOPE/pCMXluc-Lipoplexen wurden COS-7-Zellen lysiert, die Lyseate aus 16 Wells vereinigt und die jeweils angegebenen Mengen zur Bestimmung der Luciferaseaktivität eingesetzt. Substrat- und Assayvolumen waren jeweils konstant mit 80 μl bzw. 180 μl . Volumenunterschiede wurden durch Lysepuffer/NaCl ausgeglichen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung der Luciferaseaktivitäten aus zwei Wells (Messpunkte mit Fehlerbalken) sowie eine Regressionsgerade.

Aus beiden Experimenten geht hervor, dass die Luciferaseaktivität mittels des gewählten Messverfahrens bei einer Lysatmenge von 20 μl zuverlässig und über einen weiten Bereich linear (von niedrigen bis sehr hohen Lichtemissionen) erfasst werden kann. Die Substratmenge (80 μl) lag auch bei hoher Luciferaseaktivität bzw. hoher Enzymmenge in ausreichendem Überschuss vor. Substratmangel hätte aufgrund ungenügender Absättigung des Luciferaseenzyms bei höherer Enzymkonzentration (in einem größeren Lysatvolumen) zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf geführt. In den folgenden Experimenten wurde stets ein Lysatvolumen von 20 μl /Well bei einem Substratvolumen von 80 μl eingesetzt.

Abhängigkeit der Luciferaseaktivität vom Assayvolumen

Um zu untersuchen, inwieweit das Assayvolumen, d. h. das während der Messung im Well befindliche Volumen, die gemessene Luciferaseaktivität beeinflusst, wurde der Luciferaseassay mit unterschiedlich großen Volumina durchgeführt. Das eingesetzte Lysat- und Substratvolumen wurde jeweils konstantgehalten und das Gesamtvolumen durch Zugabe von Wasser erhöht. Mit zunehmendem Gesamtvolumen nahm die Luciferaseaktivität nahezu linear ab (Abb. 3.35), und zwar von ca. 19300 rlu bei einem Assayvolumen von 100 μ l auf knapp 14000 rlu bei 200 μ l. Bei einer Verdopplung des Volumens wurde die Luciferaseaktivität demzufolge um rund 30 % reduziert. Da die Konzentration von Enzym und Substrat in diesem Fall halbiert wurde, könnte dieser Effekt einfach durch die Verdünnung entstanden sein; entweder weil sich die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von Enzym und Substrat verringert hatte oder weil pro Volumeneinheit weniger Lichtquanten detektiert wurden. Da sich eine Erhöhung des Gesamtvolumens (über das Volumen von 100 μ l hinaus) nicht von Vorteil für den Luciferaseassay erwies, wurde das Gesamtvolumen von 100 μ l für alle folgenden Experimente beibehalten.

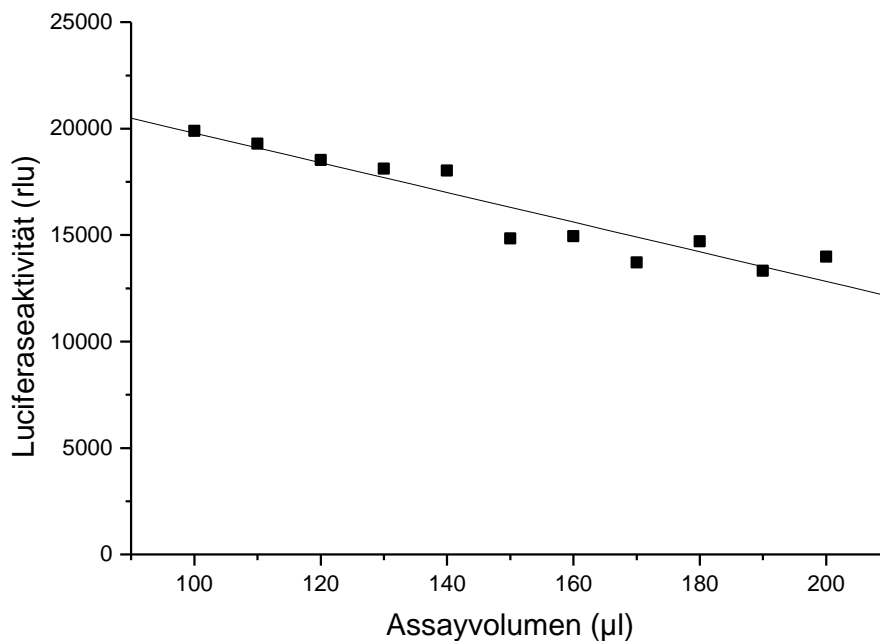


Abb. 3.35 Abhängigkeit der Luciferaseaktivität vom Assayvolumen

Zu 20 μ l Zelllysät von mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexten transfizierten COS-7-Zellen (vereinigte Proben aus mehreren 96-Wellen) wurde jeweils ein unterschiedliches Volumen an Wasser sowie 80 μ l Substratlösung in ein 96-Well der Messplatte gegeben und die Luciferaseaktivität gemessen. Aus den Messpunkten wurde eine Regressionsgerade erstellt.

Einfluss der Substrattemperatur auf die Transfektionseffizienz

Bei einer Enzymreaktion gilt die sogenannte RGT-Regel, d. h. durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur wird die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert. Im Fall der Luciferasereaktion wäre bei erhöhter Temperatur des Substrats oder Lysats ein Anstieg der Luciferaseaktivität zu erwarten. Da es technisch wesentlich einfacher war, die Substratlösung auf eine konstante Temperatur zu bringen und diese während der Messung auch zu halten, als die MTP mit den Lysaten zu temperieren, wurde die Luciferasereaktion jeweils mit Substratlösung unterschiedlicher Temperatur durchgeführt. Als Proben wurden Lysate von COS-7-Zellen verwendet, die mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfiziert worden waren.

Substrattemperatur	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Platte 1: 23 °C (RT)	710 ± 495	1371 ± 1001	33 ± 25
Platte 2: 38 °C	1671 ± 434	3982 ± 2078	77 ± 31
Faktor (Platte 2/Platte 1)	2,4	2,9	2,3

Tab. 3.12 Einfluss der Substrattemperatur auf die Höhe der Transfektionseffizienz

COS-7-Zellen in zwei 96-Well-Platten wurden mit DOTAP-Lipoplexen (pro Probe ein Lipoplexansatz) transfiziert. Nach 46 h wurde die Transfektionseffizienz (rlu/µg Protein) bestimmt und hierfür Substratlösung von 23 °C (Platte 1) bzw. 38 °C (Platte 2) verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für 8 Wells einer Platte berechnet.

Der Einfluss der Temperaturerhöhung der Substratlösung von 23 °C auf 38 °C auf die gemessene Lichtmenge zeigte sich durch einen Anstieg der Transfektionseffizienzen um den Faktor 2-3 (Tab. 3.12), was der RGT-Regel entspricht.

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, sollte die Temperatur des Substrats für sämtliche Experimente gleich – und unabhängig von der Umgebungstemperatur – sein, da auch Schwankungen von wenigen Grad Celsius Einfluss auf die Luciferaseaktivität (und somit auf die berechnete Transfektionseffizienz) haben. Während der etwa 18-minütigen Messung einer voll belegten 96-Well-Platte ist zudem eine Erwärmung des Substrats im Geräteinnenraum nicht auszuschließen. Deshalb wurde, da im verwendeten Luminometer keine Temperiervorrichtung eingerichtet war, generell vor jeder Plattenmessung ein Temperaturabgleich durchgeführt (2.2.5.2).

Reproduzierbarkeit einer Messung

Mit zunehmendem Automatisierungsgrad bei der Durchführung der Transfektionsexperimente steigt auch der Plattenumsatz pro Experiment. Innerhalb eines Experiments sollten die Messergebnisse jedoch vergleichbar sein, unabhängig davon, auf wie viele Testplatten das Experiment aufgeteilt wurde. Um die Reproduzierbarkeit einer Messung zu beurteilen, wurden zwei Platten mit gleichen Proben belegt und zu verschiedenen Zeitpunkten (im Abstand von 3 h) die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Die Mittelwerte der resultierenden Luciferaseaktivitäten aus den einzelnen Zeilen der Testplatten wurden jeweils miteinander verglichen.

Zeile	A	B	C	D	E	F	G	H	arithm. Mittel (n = 80)
Platte 1	341164	330820	325989	332556	330583	333717	347070	348850	336344
	± 23151	± 5932	± 9292	± 6050	± 7541	± 7051	± 4955	± 9119	± 13206
Platte 2	270403	292481	294245	303527	305171	305036	298116	282253	293904
	± 22347	± 10841	± 7960	± 11942	± 10360	± 10897	± 13927	± 17875	± 18076
Quotient 2/1 (%)	79	88	90	91	92	91	86	81	87

Tab. 3.13 Reproduzierbarkeit der gemessenen Luciferaseaktivität für zwei Testplatten

Zwei Testplatten wurden mit je 80 Proben aus Lysat von mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen transfizierten COS-7-Zellen belegt und mit einer Zeitdifferenz von 3 h gemessen, Platte 1 (erste Messung), Platte 2 (nach 3 h). Angegeben sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen einer Zeile (n = 10 Wells) sowie von allen Proben einer Platte (n = 80 Wells).

Hierbei zeigte die nach 3 h gemessene Platte 2 durchgängig niedrigere Luciferaseaktivitäten als Platte 1 (Tab. 3.13). Eine mögliche Erklärung liegt in einer geringen Abweichung der Substrattemperatur zwischen beiden Messzeitpunkten, z. B. bedingt durch eine höhere Raumtemperatur, die eine schnellere Erwärmung des Puffers im Geräteinnenraum zur Folge haben könnte (siehe voriges Kapitel). Ein weiterer Grund könnte in einer reduzierten Luciferaseaktivität oder einer verringerten Enzymmenge liegen, da während der 3 h (Zeitdifferenz) auch ein Teil der Enzyme seine Aktivität verloren haben bzw. abgebaut worden sein könnte. Da solche Faktoren nicht völlig auszuschließen sind, wurden in allen Messungen Kontrollen (Reagenzienleerwerte) auf jeder Platte eingesetzt, um Schwankungen zu erfassen, die durch äußere Parameter hervorgerufen werden können.

3.1.4.4 Ermittlung der Transfektionseffizienz

Basierend auf den Ergebnissen der in dieser Arbeit entwickelten Post-Transfektionsassays wurde der Erfolg des Gentransfers stets als Transfektionseffizienz (Quotient aus Luciferaseaktivität und Proteingehalt) angegeben. Dies hat den Vorteil, dass Schwankungen im Proteingehalt, die durch die toxische Wirkung der Lipoplexe hervorgerufen werden können, direkt in das Ergebnis (Transfektionseffizienz) eingehen (Kapitel 3.1.4.4).

In vielen In-vitro-Studien wird jedoch auf einen Referenzwert wie Proteingehalt oder Zellzahl verzichtet [3, 35, 36, 129, 146]. Jedoch ist es gerade in Fällen, in denen der Proteingehalt variiert, wichtig, diesen Bezugswert (Proteingehalt) zur Verfügung zu haben, beispielsweise beim Vergleich der Transfektionseffizienzen in vivo in verschiedenen Geweben [84, 92, 93, 135]. Unter diesen Umständen sollte in jedem Fall die Transfektionseffizienz und nicht die Luciferaseaktivität dargestellt werden.

Transfektionsrate vs. Transfektionseffizienz

Zum Nachweis des Gentransfers mittels eines Reportergenassays besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Transfektionseffizienz oder die Transfektionsrate zu bestimmen. Beide Begriffe sollten terminologisch streng getrennt werden. Während die Transfektionseffizienz durch die Luciferaseaktivität bezogen auf den Proteingehalt ausgedrückt wird, bezieht sich die Transfektionsrate auf die Zahl bzw. den prozentualen Anteil transfizierter Zellen. Wie am Beispiel des in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Luciferase-Reportergenassays ersichtlich, kann von den gemessenen Lichtquanten nicht auf die Zahl der transfizierten Zellen rückgeschlossen werden. Zu diesem Zweck bietet sich der β -Galaktosidase-Reportergenassay an, mit dessen Hilfe sich die Zahl der Zellen quantifizieren lässt, die das Reporterprotein exprimieren [88]. Zum Gentransfer wird ein Plasmid, das das bakterielle LacZ-Gen trägt, eingesetzt. Dessen Genprodukt ist das Enzym β -Galaktosidase, das nach Reaktion mit dem Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) bei Zugabe eines speziellen Eisenpuffers zu einer Blaufärbung der transfizierten Zellen führt (X-Gal-Färbung).

Beide Methoden wurden in einem Parallelexperiment im DOTAP-vermittelten Gentransfer in COS-7-Zellen miteinander verglichen. Um gleiche Voraussetzungen für den Gentransfer zu schaffen, wurden Plasmide verwendet, die mit Ausnahme des jeweiligen Reportergens identisch aufgebaut waren (pCMXluc bzw. pCMX β -Gal).



Abb. 3.36 Bestimmung der Transfektionsrate für COS-7-Zellen im 96-Well mittels der X-Gal-Färbung

COS-7-Zellen (Aussaat 5000 Zellen pro 96-Well) wurden mit DOTAP/pCMX β Gal-Lipoplexen transfiziert. 46 h nach der Lipoplexzugabe wurde eine X-Gal-Färbung durchgeführt (2.2.6.2). Abgebildet ist ein Ausschnitt aus einem 96-Well nach einer Aufnahme im Auflichtmikroskop im Phasenkontrast. Vergrößerung 80 \times .

Abb. 3.36 zeigt das Resultat der X-Gal-Färbung für DOTAP/pCMXluc-transfizierte COS-7-Zellen in einem 96-Well. Die blau gefärbten, d. h. β -Galaktosidase exprimierenden Zellen sind deutlich zu erkennen und stellen gemessen an der gesamten Zellzahl pro Well nur einen geringen Prozentsatz dar (ca. 2 %).

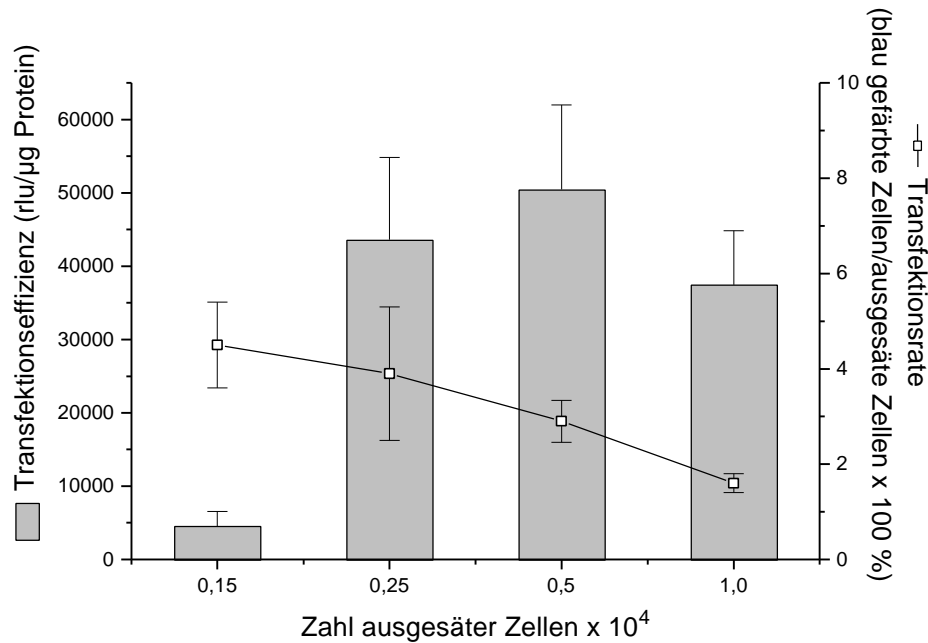


Abb. 3.37 Vergleich von Transfektionseffizienz und Transfektionsrate nach DOTAP-vermittelter Lipofektion

COS-7-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat in eine 96-Well-Platte mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen (zur Bestimmung der Transfektionseffizienz) bzw. mit DOTAP/pCMX β -Gal-Lipoplexen (zur Bestimmung der Transfektionsrate) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines Luciferase-Reporterassays ermittelt (2.2.5.2), die Transfektionsrate mittels einer X-Gal-Färbung (2.2.6.2). Zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden jeweils 8 Wells bzw. 16 Wells ausgewertet.

In Abb. 3.37 ist die jeweils ermittelte Transfektionseffizienz sowie die zugehörige Transfektionsrate für vier verschiedene Zellzahlen dargestellt. Mit Ausnahme der geringsten ausgesäten Zellzahl (1500 Zellen/Well) ergaben sich übereinstimmende Transfektionseffizienzen in den Teilexperimenten für 2500-10000 ausgesäte Zellen (vgl. 3.1.3.2). Die Transfektionsrate, der Prozentsatz blau gefärbter Zellen pro Kavität, wurde der Einfachheit halber auf die Zahl ausgesäter Zellen bezogen. Sie nahm mit größer werdender Zellzahl ab. Diese Tendenz zeigte sich auch unter Bezug der Zahl blau gefärbter Zellen pro Well auf den mittleren Proteingehalt der zugehörigen Transfektionseffizienz (Tab. 3.14).

Zahl ausgesäter Zellen pro 96-Well	1500	2500	5000	10000
β -Galaktosidase-positive Zellen/ausgesäte Zellen (%)	4,5 \pm 0,9	3,9 \pm 1,4	2,9 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2
β -Galaktosidase-positive Zellen/Proteingehalt (Zellen/µg)	10,4 \pm 2,1	9,7 \pm 3,5	8,4 \pm 1,2	6,6 \pm 1,0

Tab. 3.14 Ermittlung der Transfektionsrate bei verschiedenen Zellzahlen

Die Daten entstammen dem in Abb. 3.37 dargestellten Transfektionsexperiment. Zur Berechnung des Prozentsatzes β -Galaktosidase-positiver Zellen bezogen auf die Zahl ausgesäter Zellen pro 96-Well wurden je 16 Wells ausgewertet. Zur Bestimmung der Zahl β -Galaktosidase-positiver Zellen bezogen auf den Proteingehalt pro Well wurde der mittlere Proteingehalt aus je 8 Wells berücksichtigt (Daten aus dem Teilexperiment zur Transfektionseffizienz). Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.

Im Gegensatz zur Transfektionseffizienz scheint die Transfektionsrate bei verschiedenen Zellzahlen durch Bezug auf die ausgesäte Zellzahl oder auf den Proteingehalt nicht nivelliert zu werden (vgl. 3.1.3.2). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie, in der unterschiedliche Tendenzen im Vergleich von Transfektionseffizienz und Transfektionsrate nach DDAB-(N,N-Dimethyl-N,N-dioctadecyl-ammonium-bromid-)vermittelter Lipofektion von COS-7-Zellen beobachtet wurden [160].

Diese Unterschiede in den Transfektionsergebnissen könnten durch die unterschiedlichen Reportergensysteme beeinflusst worden sein: Da das Luciferaseprotein nur eine Halbwertszeit von 3 h aufweist [139], stellt die Transfektionseffizienz sozusagen eine Momentaufnahme der aktuellen Enzymmenge dar. Im Gegensatz dazu ist das β -Galaktosidaseenzym langlebiger. Demzufolge könnte die nach 46 h nachgewiesene β -Galaktosidase eine Anhäufung einer größeren Zahl von Enzymen (im Vergleich zu der im analogen Experiment gebildeten Luciferase) darstellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet wurden. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass zwar die Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz optimiert wurde, nicht aber das Verfahren zur Ermittlung der Transfektionsrate mit Hilfe des β -Galaktosidase-Reporterassays. Obwohl beide Systeme nicht zu identischen Ergebnissen führen, was auch an der kleinen Stichprobe gelegen haben könnte, gab die Transfektionsrate einen Einblick in die Dimension transfizierter Zellen (etwa 1-5 %, Abb. 3.36 und Tab. 3.14) im 96-Well.

3.2. Systematische Evaluation der Transfektionseigenschaften (Screening) von Lipiden und Lipidmischungen

Das in dieser Arbeit entwickelte vollständig automatisierte Verfahren zur Lipofektion ermöglicht es, die Transfektionseigenschaften einer großen Zahl von Lipiden bzw. Lipidmischungen in kurzer Zeit zu untersuchen und zu vergleichen.

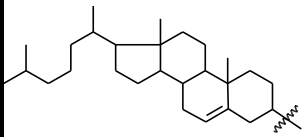
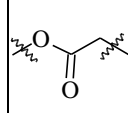

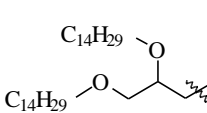
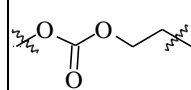
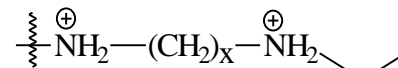
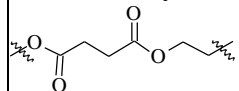
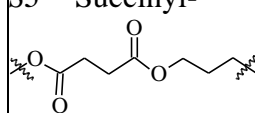
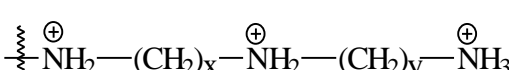
Ziel eines solchen *Screenings* ist das Auffinden herausragender, d. h. besonders effizienter und wenig toxischer Lipide/Lipidmischungen, sogenannter *Hits*. Dies ist besonders von Interesse für die Identifikation geeigneter Transfektionsreagenzien für verschiedene, möglicherweise schwer zu transfizierende Zellsysteme. Durch den Vergleich systematisch variiertes Lipide und Lipidmischungen (mit Helferlipiden) können aus den Screeningdaten Struktur-Wirkungs-Beziehungen über die lipidvermittelte Transfektion abgeleitet werden.

Hinsichtlich der zu erwartenden Datenflut aus den Screeningergebnissen wurde der Schwerpunkt der Screeninganalyse auf die folgenden Aspekte gelegt. Hiervon behandelt Punkt (1) den Screeningaspekt, die Punkte (2) bis (5) Aspekte der Struktur-Wirkungs-Beziehungen:

- (1) Welches Lipid/-mischung ist für die Transfektion einer bestimmten Zelllinie optimal?
- (2) Gibt es zwischen den Lipiden Unterschiede im Transfektionsverhalten?
- (3) In welchem Zusammenhang stehen Transfektionseffizienz und Zytotoxizität?
- (4) Welcher Einfluss auf Transfektionseffizienz und Toxizität geht von den Helferlipiden DOPE und Cholesterol aus?
- (5) Treten zell(linien)spezifische Unterschiede auf?

Lipide

Für das Screeningexperiment wurden 36 kationische Lipide, Lipidmischungen bzw. Transfektionsreagenzien, die kationische Lipide enthalten, eingesetzt. Als Reporterplasmid wurde der Vektor pCMXluc verwendet. Die Nomenklatur der in der Arbeitsgruppe synthetisierten kationischen Lipide [38] erfolgte nach den folgenden Strukturelementen (Tab. 3.15):

Lipidanker	Spacer	kationische Kopfgruppe
C Cholesterol 	Ac Acetyl- 	NMe₃ monokationisch (quartäres Ammonium) 
DMG Dimyristylglycerol 	C Carbonyl- 	xEt dikationisch ¹ (x Methylengruppen zwischen 1. und 2. Aminofunktion)  x = 3-6
	S2 Succinyl-  S3 Succinyl- 	xy trikationisch ² (y Methylengruppen zwischen 2. und 3. Aminofunktion)  x = 3-6 y = 2-3

Tab. 3.15 Nomenklatur der Strukturelemente der im Screening eingesetzten kationischen Lipide [38]

¹ zur Bezeichnung dikationisch siehe Fußnote 3 auf der folgenden Seite

² zur Bezeichnung trikationisch siehe Fußnote 3 auf der folgenden Seite

Zellen

Das Lipidscreening wurde an insgesamt sechs Zelllinien durchgeführt. Darunter waren drei humane Krebszelllinien, da Tumoren generell ein wichtiges gentherapeutisches Target darstellen. Es handelte sich um die Melanomzelllinie MEXF462NL, die Colonkarzinomzelllinie HT-29 sowie die Nierenkarzinomzelllinie RXF944L. Besonders über die Transfizierbarkeit der MEXF462NL- und RXF944L-Zellen ist bislang wenig bekannt.

Des Weiteren wurde die SV40-transformierte, humane Bronchioepithelzelllinie 16HBE-140 [77] eingesetzt, da Epithelien des respiratorischen Traktes ebenfalls wichtige Zielzellen für Transfektionsexperimente – mit dem Fernziel einer somatischen Gentherapie – sind. Diese Zelllinie ist für das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) besonders interessant, da sie eine Mutation des CFTR- (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-) Gens aufweist [77].

Neben den etablierten Zelllinien wurde eine Primärzelllinie von Nabelschnurothelzellen (HUVEC) als Beispiel für teilungsaktive, nicht entartete oder transformierte Zellen verwendet. Dieser Zelltyp könnte gleichzeitig als Studienobjekt für eine antiangiogene Gentherapie dienen.

Die COS-7-Zelllinie, die in dieser Arbeit bereits für die Entwicklung des Screeningverfahrens eingesetzt wurde, wurde als Vergleichszelllinie auch im Lipidscreening verwendet. Obwohl

diese Zellen weder humanen Ursprungs sind noch ein Target für die somatische Gentherapie darstellen, sind sie wegen ihrer leichten Transfizierbarkeit sehr gut für die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Lipiden geeignet.

Experimentelle Durchführung (2.2.4.4)

Aus den Lipiden resp. Lipidmischungen wurden Liposomen hergestellt und mit dem Reporterplasmid pCMXluc komplexiert. Obwohl die Zusammensetzung der Lipidmischungen und Reagenzien bis auf einen Fall (FuGENE™6) bekannt war, war (aufgrund der unterschiedlichen pK-Werte der Aminogruppen) über die tatsächliche Ladung der Lipide in vielen Fällen keine exakte Aussage möglich⁵. Daher wurden die zur Komplexbildung eingesetzten Lipid- und DNA-Mengen statt auf das bisher zugrunde gelegte Ladungsverhältnis (positive Ladung des kationischen Lipids/negative Ladung der DNA) auf das Verhältnis N/P (Anzahl der Aminogruppen der Kopfgruppe des kationischen Lipids/negative Ladungen der DNA) bezogen [122]. Im Screening wurden pro Lipid Lipoplexe in acht N/P-Verhältnissen von 1-15 eingesetzt.

Gemäß dem in Kapitel 3.1 vorgestellten 96-Well-Plattenlayout (Abb. 3.1) wurden drei Testlipide pro Zellkulturplatte zum Screening verwendet (8 N/P-Verhältnisse von 1-15, jeweils in Dreifachbestimmung). Zur Kontrolle wurde pro Zellkulturplatte ein Transfektionsexperiment mit DOTAP im Ladungsverhältnis 2,5 durchgeführt (DOTAP-Std. in Achtfachbestimmung).

Auswertung der Daten

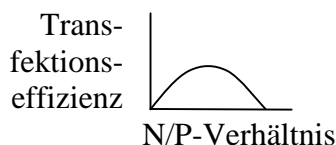
Separat für jede Zelllinie wurden alle Daten zu den einzelnen Lipid(mischung)en in analoger Weise ausgewertet. Die Auswertung bezieht sich wegen eines Fehlers bei der Herstellung von DMGAcNMe₃/CHOL-Liposomen lediglich auf 35 der 36 Lipide.

Für jedes N/P-Verhältnis eines Lipids⁶ wurden die mittlere Transfektionseffizienz und der mittlere Proteingehalt bestimmt. Für den DOTAP-Std. aller Platten (12 Platten mit insgesamt n = 96 Wells pro Zelllinie) wurde jeweils die mittlere Transfektionseffizienz sowie der mittlere Proteingehalt berechnet.

Zur Einordnung und zum Vergleich der Daten zwischen den Zelllinien wurde jeweils der Wertebereich (minimaler und maximaler Wert) aus den Transfektionseffizienzen und Proteinmengen für alle Testlipide ermittelt (Tab. 3.17 a-3.22 a). Zum Vergleich der Transfektionseigenschaften aller in einer Zelllinie eingesetzten Lipide wurde zusätzlich die maximal erreichte Transfektionseffizienz sowie das zugehörige Transfektionsprofil ermittelt. Hierzu wurden die Transfektionsprofile (vgl. Kapitel 3.1.2.2) nach ihrer Form unterschieden (Tab. 3.16).

⁵ Im Folgenden werden Lipide mit zwei oder drei Aminofunktionen lediglich aus stilistischen Gründen auch als dikationisch bzw. trikationisch bezeichnet.

⁶ Im Folgenden werden alle getesteten Lipide, Lipidmischungen sowie Transfektionsreagenzien bisweilen unter der Bezeichnung Lipide zusammengefasst.



Profiltyp	Beschreibung	Schemat. Darstellung
Peak	max. erreichte Transfektionseffizienz bei ein bis drei untersuchten N/P-Verhältnissen	∩
Plateau	maximale Transfektionseffizienz erstreckt sich über mindestens vier untersuchte N/P-Verhältnisse	∩---∩
Konstant	keine wesentliche Änderung bei verschiedenen N/P-Verhältnissen	—
Ansteigend	zunehmende Transfektionseffizienz mit steigendem N/P-Verhältnis	/
Tal	hohe Transfektionseffizienz bei niedrigem wie bei hohem N/P-Verhältnis	∪
n. a.	nach den obigen Kriterien nicht auswertbares Profil	

Tab. 3.16 Charakterisierung der verschiedenen Transfektionsprofile

Zur Beschreibung und zum Vergleich der Zytotoxizitäten wurde für jedes Lipid die minimale Proteinmenge sowie die Proteinmenge bei maximaler Transfektionseffizienz (und das jeweils zugehörige N/P-Verhältnis) angegeben. Die Proteinmenge bei maximaler Transfektionseffizienz wurde mit der Proteinmenge für den DOTAP-Standard verglichen und folgendermaßen eingestuft (zur Berechnung siehe Kapitel 2.2.4.4):

- ++ (nicht zytotoxisch)
- + (geringere Zytotoxizität als DOTAP-Std.)
- +/- (Zytotoxizität wie DOTAP-Std.)
- (höhere Zytotoxizität als der DOTAP-Std.)
- (sehr zytotoxisch)

Die so aufbereiteten Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind – nach Zelllinien getrennt – in den Tabellen 3.17-3.22 in den folgenden Kapiteln zusammengefasst. Zur besseren Überschaubarkeit wurden die verschiedenen Lipidgruppen (Lipide mit einer, zwei oder drei Aminofunktionen) sowie die käuflichen Transfektionsreagenzien in den einzelnen Tabellen voneinander abgegrenzt.

Als Lipidserien werden im Folgenden strukturverwandte Lipide bezeichnet, die beispielsweise den gleichen Lipidanker und den gleichen Spacer (Tab. 3.15) tragen, z. B. die DMGAc-Serie (alle drei Lipidgruppen) oder die CAcxy-Serie (nur Lipide mit drei Aminofunktionen). In den folgenden Kapiteln (3.2.1-3.2.6) werden separat die Ergebnisse für die sechs Zelllinien vorgestellt. Hierzu wurden jeweils einzelne Themen (Wertebereich; Transfektionseffizienzen und –profile; Zytotoxizität; Einfluss von Helferlipiden) analysiert.

Es schließt sich eine vergleichende Diskussion der Ergebnisse aus den einzelnen Kapiteln an (3.2.7). Dort wird der Frage nachgegangen, ob es für jede Zelllinie ein optimales Transfektionslipid gibt (1). Die Transfektionseigenschaften der Lipide (Punkt 2) sowie die zytotoxische Wirkung werden verglichen (Punkt 3) und der Einfluss der Helferlipide untersucht (Punkt 4). Als letzter Punkt werden spezifische Unterschiede diskutiert, die zwischen den einzelnen Zelllinien auftreten.

3.2.1 MEXF462NL

Wertebereich

In dieser Melanomzelllinie erreichte der DOTAP-Standard eine mittlere Transfektionseffizienz von 329 rlu/ μ g (Tab. 3.17 a). Die maximale Transfektionseffizienz im gesamten Experiment betrug über 10000 rlu/ μ g. Bei allen Lipid(mischung)en traten gut messbare Transfektionseffizienzen auf. Die mittlere Proteinmenge für den Standard lag im oberen Bereich aller beobachteten Proteinmengen.

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/ μ g)	mittl. Proteinmenge (μ g)
DOTAP-Std. (n = 96)	329 \pm 235 (VK 72 %)	2,22 \pm 0,53 (VK 24 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 5-10045	Minimum-Maximum 0,25-3,63

Tab. 3.17 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Standard und Testlipide nach Lipofektion von MEXF462NL-Zellen in 96-Wells

Angegeben sind das arithmetische Mittel der Transfektionseffizienzen und zugehörigen Proteinmengen aus 96 Wells (DOTAP-Std.) bzw. 3 Wells (Testlipide). Für den DOTAP-Std. wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Für die 35 Testlipide (Tab. 3.17 b) wurde der insgesamt kleinste sowie der größte Messwert der mittleren Transfektionseffizienz und des mittleren Proteingehalts bestimmt.

Transfektionseffizienzen und -profile

Von den 35 Testlipiden erzielte die Lipidmischung CAc52/DOPE in der Gruppe der trikationischen Lipide bei einem N/P-Verhältnis von 9 die höchste Transfektionseffizienz (rund 10000 rlu/ μ g) (Tab. 3.17 b). Die höchste Transfektionseffizienz unter den monokationischen Lipiden wurde durch Transfektion mit CACnMe₃/DOPE erreicht (rund 3000 rlu), bei den Lipiden mit zwei Aminofunktionen durch CAc4Et/DOPE (über 5000 rlu/ μ g). Die käuflichen Transfektionsreagenzien erreichten maximal 2257 rlu/ μ g (FuGENE™6) und damit im Vergleich das niedrigste Maximum aller Lipidgruppen.

Die Transfektionsprofile zeichneten sich unabhängig vom Lipidtyp in den meisten Fällen durch einen distinkten Peak, in einigen Fällen durch ein Plateau aus. Diese lagen meist bei den N/P-Verhältnissen, bei denen auch die höchste Transfektionseffizienz auftrat. Lediglich in Einzelfällen wurde ein zweiter Peak bei N/P-Verhältnissen von 13 bis 15 beobachtet, z. B. bei DMGAcNMe₃.

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	1285	13	2 Peaks N/P 3-7; N/P 13-15	0,93	15	0,97	--
DMGAcNMe ₃ /DOPE	1034	15	n. a.	1,26	15	1,26	-
CACNMe ₃ /DOPE	3021	5	Peak N/P 1-3	0,61	5	0,61	--
CC2NMe ₃ /DOPE	2557	3	Peak N/P 1-5	1,26	3	1,26	-
DOTAP	1712	1	Peak N/P 1	1,02	1;3	1,02	--
DOTAP/DOPE	1277	5	Peak N/P 3-5	0,35	15	0,65	--
DC-CHOL/DOPE	2558	3	Peak N/P 1-5	0,92	15	1,03	--
DMRIE	345	3	Peak N/P 3-5	1,50	3	1,50	-
DMRIE/CHOL	1276	5	Plateau N/P 1-9	0,71	3	0,98	--
DMGAc4Et	1729	5	Plateau N/P 3-9	0,41	13;15	0,78	--
DMGAc4Et/DOPE	523	3	Peak N/P 1-3	1,21	15	1,96	+/-
DMGAc4Et/CHOL	1354	1	Peak N/P1-3	0,99	15	2,09	+/-
CAC3Et/DOPE	2451	3	Peak N/P 3-7	0,67	15	1,70	+/-
CAC4Et/DOPE	5069	3	Peak N/P 3-5	0,35	9;13	0,94	--
CAC5Et/DOPE	2050	7	Plateau N/P 1-7	0,70	7	0,70	--
CAC6Et/DOPE	2450	3	Peak N/P 1-3	0,89	15	1,48	-
CC24Et/DOPE	2614	3	Peak N/P 1-3	0,25	13	0,68	--
DMGAc43	4807	7	Peak N/P 7	0,91	9	0,93	--
DMGAc43/DOPE	471	5	Plateau N/P 3-13	1,89	15	2,39	+/-
DMGAc43/CHOL	3059	13	n. a.	1,03	15	1,10	--
CAC32/DOPE	4037	5	Plateau N/P 5-11	0,43	9	0,63	--
CAC33/DOPE	3044	7	Plateau N/P 3-9	0,53	15	0,74	--
CAC42/DOPE	3599	15	konst.	0,44	13;15	0,44	--
CAC43/DOPE	6175	7	Peak N/P 7-9	0,33	7;9	0,33	--
CAC52/DOPE	10045	9	Peak N/P 9	0,37	9	0,37	--
CAC53/DOPE	3485	9	Peak N/P 9	0,79	13	0,88	--
CAC62/DOPE	2821	5	Peak N/P 5-9	0,53	15	0,64	--
CAC63/DOPE	1036	9	Plateau N/P 5-13	0,52	13	0,65	--
CC243/DOPE	2177	7	Peak N/P 5-9	0,73	15	1,14	--
CS243/DOPE	4382	13	2 Peaks, N/P 7; N/P 13-15	0,42	15	0,50	--
CS343/DOPE	3437	9	Plateau N/P 3-9	0,52	15	0,89	--
DOSPER (Roche)	1878	5	Peak N/P 5	0,91	5	0,91	--
FuGENE™6 (Roche)	2257	9	2 Peaks N/P 9; 15	1,22	15	1,30	-
Transfectam® (Promega)	1158	7	Peak N/P 5-7	1,24	5	1,67	-
Lipofectamine (Life Techn.)	71	3	n. a.	2,18	3	2,18	+/-

Tab. 3.17 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von MEXF462NL-Zellen

anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); konst. = konstant; n. a. = nicht auswertbar; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; siehe Kapitel 3.2: Auswertung der Daten

Zytotoxizität

Bezüglich der Zytotoxizität wurden deutliche Unterschiede in den Proteingehalten zwischen den Lipiden beobachtet. Die mittleren Proteinmengen umfassten einen Bereich zwischen 0,25 µg und 3,63 µg (Tab. 3.17 a). Die Proteinmenge bei der jeweils maximalen Transfektionseffizienz eines Lipids bzw. Transfektionsreagenzes überstieg in keinem Fall die Proteinmenge des DOTAP-Standards (Tab. 3.17 a) und wurde in den meisten Fällen als sehr toxisch (--) eingestuft (Tab. 3.17 b). Sie stimmte in etwa zwei Drittel aller Fälle nahezu mit der (für das Lipid bzw. Reagenz) minimalen Proteinmenge überein.

Die monokationischen Lipide führten in 6 von 9 Fällen zu einer starken Zytotoxizität (--), die dikationischen Lipide in 4 von 8 Fällen und die trikationischen in 13 von 14 (Tab. 3.17 b). Die Lipoplexe der Transfektionsreagenzien führten demgegenüber eher zu geringen Zytotoxizitäten. Die beiden Lipide, die die höchsten Transfektionseffizienz erzielten (CAc52/DOPE, CAc43/DOPE), zeigten die niedrigsten Proteingehalte insgesamt (0,37 µg bzw. 0,33 µg). Lipide, die im Vergleich dazu zu geringeren, aber untereinander ähnlichen maximalen Transfektionseffizienzen führten, wiesen beträchtliche Unterschiede im zugehörigen Proteingehalt auf (z. B. CAc3Et/DOPE, 2451 rlu/µg (1,70 µg), CAc6Et 2450 rlu/µg (1,48 µg) und CC24Et/DOPE 2614 rlu/µg (0,68 µg)).

Helferlipide

Das helferlipidfreie Lipid der DMGAc-Serie erzielte in den drei betreffenden Lipidgruppen jeweils die höchste Transfektionseffizienz und die höchste relative Zytotoxizität. Die Mischung von Lipiden dieser Serie mit DOPE führte in zwei Gruppen zu einer deutlich geringeren Transfektionseffizienz. Die Zugabe von DOPE oder Cholesterol führte zu einer mehr oder weniger starken Minderung der Zytotoxizität.

Im Fall von DMRIE war die Transfektionseffizienz der Mischung mit Cholesterol gegenüber dem helferlipidfreien Lipid etwa viermal höher und die zytotoxische Wirkung etwas stärker (-- gegenüber -).

3.2.2 HT-29**Wertebereich**

Bei der Lipofektion der Zelllinie HT-29 erreichte der DOTAP-Standard im Mittel 5 rlu/µg; die maximale Transfektionseffizienz lag knapp über 100 rlu/µg.

Der Proteingehalt für den Standard von rund 5 µg lag etwas unter dem höchsten Messwert von 6,75 µg, aber deutlich über dem minimalen Wert (1,80 µg) (Tab. 3.18 a).

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/μg)	mittl. Proteinmenge (μg)
DOTAP-Std. (n = 96)	5 ± 3 (VK 74 %)	5,01 ± 0,70 (VK 14 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 0-109	Minimum-Maximum 1,80-6,75

Tab. 3.18 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Std. und Testlipide nach Lipofektion von HT-29-Zellen in 96-Well-Platten (s. Tab. 3.17 a)

Transfektionseffizienzen und -profile

Die monokationischen Lipide führten zu niedrigen Transfektionseffizienzen von maximal 35 rlu/μg (DC-CHOL/DOPE) (Tab. 3.17 b). Die kationischen Lipide mit zwei Aminofunktionen führten zu etwas höheren Transfektionseffizienzen von bis zu 90 rlu/μg (CAc4Et/DOPE). Die Lipide mit drei Aminofunktionen zeigten ein heterogenes Bild: Im Fall der Lipide mit dem DMG-Anker wurden Transfektionseffizienzen von unter 5 rlu/μg gemessen. Die Lipidserie CAcxy/DOPE erbrachte Transfektionseffizienzen von 40 rlu/μg bis über 100 rlu/μg (CAc43/DOPE und CAc62/DOPE). Bei den kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien erbrachte FuGENE™6 die höchste Transfektionseffizienz (61 rlu/μg).

Die Transfektionsprofile zeigten meist distinkte Peaks bei N/P-Verhältnissen im Bereich zwischen 5 und 9. Diese stimmten bei den Lipidgruppen mit zwei und drei Aminofunktionen meist mit den N/P-Verhältnissen der maximalen Transfektionseffizienzen überein. In Fällen, in denen sehr niedrige Transfektionseffizienzen erzielt wurden, insbesondere bei den monokationischen Lipiden, waren die Profile häufig nicht auswertbar.

Zytotoxizität

Aus den Proteingehalten ging in etwa der Hälfte der 35 Fälle eine Übereinstimmung zwischen der minimalen und der Proteinmenge bei maximaler Transfektionseffizienz hervor (Tab. 3.18 b). Relativ zur mittleren Proteinmenge des DOTAP-Standards von rund 5 μg ergaben sich zwischen den einzelnen Lipidgruppen beträchtliche Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung: Die Proteingehalte nach der Transfektion mit monokationischen Lipiden ähnelten in 4 von 9 Fällen dem Standard. Starke Zytotoxizität wurde einmal beobachtet. Bei Lipiden mit zwei Aminofunktionen trat mittlere (-) bis starke (--) Toxizität in 7 von 8 Fällen auf, bei Lipiden mit drei Aminofunktionen in 12 von 13 (auswertbaren) Fällen. In dieser Gruppe wurden bei den beiden Lipidmischungen, die insgesamt die höchsten Transfektionseffizienzen erzielten (CAc43/DOPE und CAc62/DOPE), auch die niedrigsten Proteinmengen bei dem zugehörigen N/P-Verhältnis gemessen. Die Gruppe der Transfektionsreagenzien zeigte gegenüber dem Standard keinerlei zytotoxische Wirkung.

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	8	13;15	Tal	3,42	3	3,57; 3,48	--
DMGAcNMe ₃ /DOPE	12	1	n. a.	3,77	3	4,04	-
CACNMe ₃ /DOPE	11	1	n. a.	3,73	1	3,73	-
CC2NMe ₃ /DOPE	9	13	n. a.	3,99	3	5,41	+/-
DOTAP	13	1	Peak N/P 1	4,76	1	4,76	+/-
DOTAP/DOPE	11	15	Peak N/P 13-15	4,76	15	4,76	+/-
DC-CHOL/DOPE	35	3	Peak N/P 3	4,01	1	4,20	-
DMRIE	16	13	n. a.	3,66	1	5,62	+/-
DMRIE/CHOL	17	1	Peak N/P 1-3	4,08	3	4,23	-
DMGAc4Et	27	15	n. a.	3,00	3	3,93	-
DMGAc4Et/DOPE	16	7	2 Peaks N/P 7; 15	3,40	3	3,75	-
DMGAc4Et/CHOL	13	5;15	2 Peaks N/P 5; N/P 13-15	3,88	15	4,33; 3,88	+/-; -
CAC3Et/DOPE	14	9	Peak N/P 9	3,64	9	3,64	-
CAC4Et/DOPE	90	7	Peak N/P 5-7	2,75	7	2,75	--
CAC5Et/DOPE	48	7	Peak N/P 5-9	3,30	13	3,60	--
CAC6Et/DOPE	53	9	Peak N/P 5-9	3,59	9	3,59	--
CC24Et/DOPE	36	5	Peak N/P 5-7	3,08	5	3,08	--
DMGAc43	5	15	n. a.	3,43	7	3,99	-
DMGAc43/DOPE	3	11;15	n. a.	4,01	15	4,25; 4,01	-
DMGAc43/CHOL	3	n. a.	n. a.	3,74	13;15	n. a.	n. a.
CAC32/DOPE	66	7	Peak N/P 5-9	2,02	9	2,15	--
CAC33/DOPE	95	7	Peak N/P 7-9	1,80	9	2,33	--
CAC42/DOPE	67	5	Peak N/P 5	2,51	9	2,76	--
CAC43/DOPE	107	9	Peak N/P 9	1,90	9	1,90	--
CAC52/DOPE	61	7	Peak N/P 7-9	2,35	9	2,68	--
CAC53/DOPE	47	13	Plateau N/P 7-13	2,64	9	2,94	--
CAC62/DOPE	109	5	Peak N/P 3-5	2,12	5	2,12	--
CAC63/DOPE	40	5	Peak N/P 5-7	2,81	9	3,05	--
CC243/DOPE	22	9	Peak N/P 7-9	3,03	9	3,03	--
CS243/DOPE	18	9	Peak N/P 9-11	3,72	9	3,72	-
CS343/DOPE	7	9	n. a.	4,10	5	4,48	+/-
DOSPER (Roche)	13	7	Peak N/P 7	5,31	15	6,16	+
FuGENE™6 (Roche)	61	11	Peak N/P 11-15	4,32	15	4,91	+/-
Transfectam® (Promega)	7	11	n. a.	5,06	15	6,18	+
Lipofectamine (Life Techn.)	5	13;15	n. a.	5,26	15	5,97; 5,26	+; +/-

Tab. 3.18 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von HT-29-Zellen

anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); konst. = konstant; n. a. = nicht auswertbar; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; siehe Kapitel 3.2: Auswertung der Daten

Helferlipide

Durch Beimischung von Helferlipiden war in keinem Fall ein Einfluss auf die Höhe der maximalen Transfektionseffizienz erkennbar. Lediglich das N/P-Verhältnis, bei dem die maximale Transfektionseffizienz auftrat, verschob sich in einzelnen Fällen (jedoch uneinheitlich). Ein Einfluss auf die Zytotoxizität durch Kombination von Lipiden mit DOPE wurde nicht festgestellt. Die Mischung von Cholesterol mit DMGAc4Et führte gegenüber DMGAc4Et zu einer leicht verminderten Zytotoxizität. Die Kombination von DMRIE (+/-) mit Cholesterol führte zu einer leichten Toxizität (-).

3.2.4 RXF944L

Wertebereich

In der Nierenkarzinomzelllinie RXF944L erzielte der DOTAP-Standard eine geringe Transfektionseffizienz (27 rlu/ μ g) bei einem mittleren Proteingehalt von 4,55 μ g (Tab. 3.19 a). Der Wertebereich der Transfektionseffizienzen reichte bei den Testlipiden bzw. -reagenzien bis zu 1551 rlu/ μ g. Die Proteinmengen lagen zwischen 1,57 μ g und 6,33 μ g.

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/ μ g)	mittl. Proteinmenge (μ g)
DOTAP-Std. (n = 96)	27 \pm 21 (VK 80 %)	4,55 \pm 0,97 (VK 22 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 0-1551	Minimum-Maximum 1,57-6,33

Tab. 3.19 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Std. und Testlipide nach Lipofektion von RXF944L-Zellen (s. Tab. 3.17 a)

Transfektionseffizienzen und -profile

Unter den monokationischen Lipiden wurde die höchste Transfektionseffizienz durch Transfektion mit DMGAcNMe₃ (184 rlu/ μ g) bei einem N/P-Verhältnis von 13 erzielt (Tab. 3.19 b). Bei den Lipiden mit zwei Aminofunktionen erwiesen sich die Lipidmischungen CAc4Et/DOPE und CAc6Et/DOPE mit über 100 rlu/ μ g als beste Kombinationen. Unter den trikationischen Lipiden mit drei Aminofunktionen zeigte DMGAc43 mit Abstand die höchste Transfektionseffizienz von 739 rlu/ μ g beim N/P-Verhältnis 7. Das käufliche Reagenz FuGENE™6 führte in diesem Experiment zu der insgesamt höchsten Transfektionseffizienz (1551 rlu/ μ g).

Die Transfektionsprofile der monokationischen Lipide zeigten oftmals einen Peak bei N/P-Verhältnissen von 1 bis 5, die di- und trikationischen Lipide sowie die Transfektionsreagenzien in den meisten Fällen Peaks bzw. Plateaus bei N/P-Verhältnissen um 5 oder 7.

Die N/P-Verhältnisse der maximalen Transfektionseffizienzen entsprachen in vielen Fällen denen der Peaks.

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	184	13	Plateau N/P 5-15	3,06	15	3,10	-
DMGAcNMe ₃ /DOPE	143	7	Plateau N/P 3-9	3,73	15	3,79	±
CACNMe ₃ /DOPE	61	3	Peak N/P 3	3,55	1	3,85	±
CC2NMe ₃ /DOPE	96	3	Peak N/P 3	3,32	15	3,94	±
DOTAP	23	5	Peak N/P 1-5	3,97	9	4,14	±
DOTAP/DOPE	28	1	Peak N/P 1-3	3,72	15	4,23	±
DC-CHOL/DOPE	139	3	Peak N/P 1-3	4,04	3; 15	4,04	±
DMRIE	32	3	Peak N/P 1-5	4,22	15	4,64	±
DMRIE/CHOL	74	3	Peak N/P 3	3,57	3	3,57	-
DMGAc4Et	57	13	2 Peaks N/P 7; N/P 11-13	2,88	15	3,03	-
DMGAc4Et/DOPE	47	3	Peak N/P 1-3	3,47	1	4,37	±
DMGAc4Et/CHOL	85	3	Peak N/P 3	3,33	1	4,43	±
CAC3Et/DOPE	81	5	Peak N/P 5-7	2,57	15	4,02	±
CAC4Et/DOPE	103	5	Peak N/P 5	3,32	5	3,24	-
CAC5Et/DOPE	66	5,7	Peak N/P 3-7	3,16	15	3,67; 3,94	±
CAC6Et/DOPE	159	5	Peak N/P 5	3,51	15	3,96	±
CC24Et/DOPE	56	7	Peak N/P 5-9	2,28	15	3,55	-
DMGAc43	739	7	Peak N/P 7	3,17	7	3,17	-
DMGAc43/DOPE	83	3	n. a.	4,38	15	4,83	±
DMGAc43/CHOL	139	9	Plateau N/P 7-13	2,96	15	3,84	±
CAC32/DOPE	162	5	Peak N/P 5	2,91	15	3,34	-
CAC33/DOPE	181	7	Peak N/P 7	2,92	9	3,14	-
CAC42/DOPE	108	5	Peak N/P 5	3,63	15	4,68	±
CAC43/DOPE	38	7	Plateau N/P 1-7	3,68	15	4,05	±
CAC52/DOPE	219	15	Tal	2,50	15	2,50	--
CAC53/DOPE	75	15	anst.	2,00	15	2,00	--
CAC62/DOPE	102	3	Peak N/P 3	2,21	5	3,21	-
CAC63/DOPE	17	13	n. a.	3,05	15	3,69	±
CC243/DOPE	77	11	Plateau N/P 7-13	1,57	15	1,69	--
CS243/DOPE	118	11	Peak N/P 11-13	1,79	13	2,47	--
CS343/DOPE	242	7	Plateau N/P 1-9	1,77	15	2,67	-
DOSPER (Roche)	377	5	Peak N/P 5	3,78	15	4,18	±
FuGENE™6 (Roche)	1551	5	Plateau N/P 5-13	3,87	11	4,60	±
Transfectam® (Promega)	148	7	Peak N/P 7	4,56	15	5,36	±
Lipofectamine (Life Techn.)	24	9	n. a.	4,57	15	4,96	±

Tab. 3.19 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von RXF944L-Zellen

anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); n. a. = nicht auswertbar; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; Siehe Kapitel 3.2: Auswertung der Daten

Zytotoxizität

Die minimale Proteinmenge (Tab. 3.19 b) traf in 24 von 35 Fällen mit der höchsten Lipidmenge (N/P-Verhältnis 15) zusammen. Die größte Häufigkeit toxischer Effekte bei maximaler Transfektionseffizienz war bei den Lipiden mit drei Aminofunktionen zu sehen (9/14), gefolgt von den Lipiden mit zwei Aminofunktionen (3/8) und der Gruppe der monokationischen Lipide (2/9). Bei keinem der Transfektionsreagenzien ließ sich eine zytotoxische Wirkung feststellen.

Helferlipide

Die Kombination von Lipiden der DMGAc-Serie mit DOPE führte meist zu einer Reduktion der Transfektionseffizienz. Die Kombination mit Cholesterol führte hier in der Regel zu höherer Transfektionseffizienz als die Kombination mit DOPE. Auch im Fall von DMRIE ergab die Zugabe von Cholesterol eine Erhöhung der Transfektionseffizienz etwa um den Faktor 2. Die Zytotoxizität aller Lipidmischungen der DMGAc-Serie (+/-) war relativ zu dem helferlipidfreien Lipid (-) vermindert. Lediglich bei DMRIE/CHOL war eine leichte Steigerung der Zytotoxizität gegenüber DMRIE zu beobachten.

3.2.4 16HBE-140⁻

Wertebereich

Die Transfektionseffizienz des DOTAP-Standards lag im Mittel bei annähernd 1000 rlu/ μ g und einer mittleren Proteinmenge von 2,32 μ g (Tab. 3.20 a). Die im gesamten Experiment erfassten Transfektionseffizienzen bewegten sich zwischen 1 rlu/ μ g und rund 13000 rlu/ μ g. Der Bereich der Proteinmengen reichte von 0,60 μ g bis fast 5 μ g.

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/ μ g)	mittl. Proteinmenge (μ g)
DOTAP-Std. (n = 96)	976 \pm 601 (VK 62 %)	2,32 \pm 0,61 (VK 26 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 1-12999	Minimum-Maximum 0,60-4,98* μ g

Tab. 3.20 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Std. und Testlipide nach Lipofektion von 16HBE-140⁻-Zellen (s. Tab. 3.17 a)

*Werte aufgrund technischer Schwierigkeiten nur bedingt auswertbar

Transfektionseffizienzen und -profile

Die Lipoplexe der monokationischen Transfektionslipide erzielten in vielen Fällen Transfektionseffizienzen von mehreren tausend rlu/ μ g (Tab. 3.20 b). Der höchste Wert in dieser Gruppe wurde nach Transfektion mit DC-CHOL/DOPE (3895 rlu/ μ g) gemessen, gefolgt von DMRIE/CHOL (2919 rlu/ μ g). Unter den Lipiden mit zwei Aminofunktionen in der Kopfgruppe erzielte CC24Et/DOPE den höchsten Wert (3629 rlu/ μ g). Unter den trikationischen

Lipiden waren die insgesamt höchsten Transfektionseffizienzen von über 10000 rlu/ μ g zu sehen

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	586	3	Peak N/P 3	1,36	1	1,47	-
DMGAcNMe ₃ /DOPE	420	3	Peak N/P 3	1,52	15	1,61	-
CacNMe ₃ /DOPE	1054	1	Peak N/P 1-5	1,63	5	2,06	+/-
CC2NMe ₃ /DOPE	2281	3	Peak N/P 3	1,87	5	2,17	+/-
DOTAP	476	5	Peak N/P 3-5	2,32	5	2,32	+/-
DOTAP/DOPE	1648	3	Peak N/P 3	1,77	5	2,27	+/-
DC-CHOL/DOPE	3895	3	Peak N/P 3-5	1,79	5	2,03	+/-
DMRIE	1090	5	Peak N/P 3-7	2,12	3	2,64	+/-
DMRIE/CHOL	2919	5	Peak N/P 5-7	0,60	5	0,60	--
DMGAc4Et	300	15	2 Peaks N/P 3-7; N/P 11-15	1,28	1	2,13	+/-
DMGAc4Et/DOPE	728	3	Peak N/P 3	1,34	1	1,40	-
DMGAc4Et/CHOL	530	15	anst.	1,61	1	1,82	+/-
CAC3Et/DOPE	1372	5	Peak N/P 3-7	1,80	5	1,80	+/-
CAC4Et/DOPE	2118	5	Peak N/P 5	1,82	15	1,87	+/-
CAC5Et/DOPE	1717	5	Peak N/P 5	1,95	5	1,95	+/-
CAC6Et/DOPE	2198	5	Peak N/P 5	2,03	13	2,30	+/-
CC24Et/DOPE	3629	5	Peak N/P 3-7	0,68	5	0,68	--
DMGAc43	1074	5	Peak N/P 5-9	1,87	15	2,28	+/-
DMGAc43/DOPE	502	5	Peak N/P 5	2,33	11	2,51	+/-
DMGAc43/CHOL	2313	9	Peak N/P 9-11	1,70	11	2,34	+/-
CAC32/DOPE	8432	5	Peak N/P 5-7	1,88	15	2,45*	+/-*
CAC33/DOPE	5105	7	Peak N/P 5-7	1,51	5	2,74*	+/-*
CAC42/DOPE	12999	9	Peak N/P 7-9	1,71	15	3,93*	++*
CAC43/DOPE	1204	5	Peak N/P 5	1,75	5	1,75	+/-
CAC52/DOPE	10444	7	Peak N/P 7-9	1,89	7	1,89	+/-
CAC53/DOPE	1765	7	Peak N/P 7-9	2,24	7	2,24	+/-
CAC62/DOPE	4758	5	Peak N/P 5	1,30	3	1,40	-
CAC63/DOPE	1275	3	Peak N/P 3-5	1,58	3	1,58	-
CC243/DOPE	2293	7	Peak N/P 7-9	1,94	7	1,94	+/-
CS243/DOPE	4666	7	Peak N/P 7-11	1,10	7;9	1,10	--
CS343/DOPE	2941	7	Peak N/P 7	0,90	7	0,90	--
DOSPER (Roche)	1008	7	Peak N/P 7	2,53	5	2,90	+/-
FuGENE™6 (Roche)	4268	13	Peak N/P 13-15	1,07	15	1,63	-
Transfectam® (Promega)	266	15	Peak N/P 5-9	1,60	5	2,24	+/-
Lipofectamine (Life Techn.)	225	5	Peak N/P 3-5	1,67	5	1,67	-

Tab. 3.20 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von 16HBE-140-Zellen
 anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); n. a. = nicht auswertbar;
 TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; *Wert wegen technischer Schwierigkeiten nur bedingt auswertbar; siehe Kapitel 3.2 (Auswertung der Daten)

(CAc42/DOPE und CAc52/DOPE). Das Transfektionsreagenz FuGENE™6 erbrachte in seiner Gruppe die mit Abstand höchste Transfektionseffizienz von 4268 rlu/μg.

Die Transfektionsprofile der monokationischen Lipide zeigten meist einen deutlichen Peak bei einem N/P-Verhältnis von 3, die dikationischen um das N/P-Verhältnis 5. Die Transfektionsprofile in der Gruppe der Lipide mit drei Aminofunktionen waren durch je einen Peak charakterisiert, der in den meisten Fällen bei einem N/P-Verhältnis zwischen 5 und 9 lag. Die Profile der Transfektionsreagenzien waren uneinheitlich.

Die N/P-Verhältnisse der Peaks und der maximalen Transfektionseffizienzen waren fast in allen Lipidgruppen identisch.

Zytotoxizität

In den meisten Fällen (24/35) lag die relative Zytotoxizität im Toleranzbereich der Kontrolle (+/-). Gruppenspezifische Unterschiede zwischen den Lipiden waren nicht zu erkennen.

Helferlipide

In den Transfektionseffizienzen der DMGAc-Serie waren keine Übereinstimmungen bezüglich des Effekts von Helferlipiden zu erkennen. Der Zusatz von Helferlipiden führte in keiner Gruppe zu einer Veränderung der relativen Zytotoxizitäten. Die Mischung von DOPE mit DOTAP resultierte in einer etwa vierfach höheren Transfektionseffizienz ohne Einfluss auf die Zytotoxizität. Die Transfektionseffizienz der Kombination DMRIE/CHOL war doppelt so hoch wie die das ungemischten DMRIE; die Zytotoxizität deutlich höher (-- gegenüber +/-).

3.2.5 HUVEC

Wertebereich

Die mittlere Transfektionseffizienz des DOTAP-Standards lag bei 8 rlu/μg und einer mittleren Proteinmenge von 1,84 μg (Tab. 3.21 a). Die höchste gemessene Transfektionseffizienz betrug 375 rlu/μg. Die Proteinmengen umfassten einen Bereich von 0,3 μg bis über 2 μg.

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/μg)	mittl. Proteinmenge (μg)
DOTAP-Std. (n = 96)	8 ± 8 (VK 89 %)	1,84 ± 0,20 (VK 11 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 0-375	Minimum-Maximum 0,32-2,38

Tab. 3.21 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Std. und Testlipide nach Lipofektion von HUVEC-Zellen (s. Tab. 3.17 a)

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	29	15	Tal	1,22	15	1,22	--
DMGAcNMe ₃ /DOPE	363	5	Peak, N/P 3-5	0,54	15	0,90	--
CACNMe ₃ /DOPE	48	15	anst.	0,89	15	0,89	--
CC2NMe ₃ /DOPE	21	15	anst.	1,47	13	1,55	-
DOTAP	16	15	Tal	1,66	15	1,66	+/-
DOTAP/DOPE	36	15	Peak N/P 7; anst.	0,76	15	0,76	--
DC-CHOL/DOPE	24	15	anst.	1,73	15	1,73	+/-
DMRIE	31	15	anst.	1,35	15	1,35	--
DMRIE/CHOL	74	15	anst.	0,44	15	0,44	--
DMGAc4Et	34	15	anst.	1,36	15	1,36	--
DMGAc4Et/DOPE	219	9	Peak N/P 9	0,65	9	0,65	--
DMGAc4Et/CHOL	25	15	anst.	1,47	1	1,58	-
CAC3Et/DOPE	62	11	anst.	0,96	15	1,20	--
CAC4Et/DOPE	87	15	anst.	0,63	15	0,63	--
CAC5Et/DOPE	23	15	anst.	1,47	13	1,69	+/-
CAC6Et/DOPE	45	13	ab N/P 7 konst.	1,19	13	1,19	--
CC24Et/DOPE	14	15	anst. ab N/P 7	1,58	9	1,75	+/-
DMGAc43	27	15	anst.	1,30	9	1,45	--
DMGAc43/DOPE	96	13	anst.	0,97	9	1,19	--
DMGAc43/CHOL	29	15	anst.	1,43	15	1,43	--
CAC32/DOPE	375	9	Peak N/P 7-9	0,32	9	0,32	--
CAC33/DOPE	27	1	n. a.	1,17	15	1,38	--
CAC42/DOPE	19	15	n. a.	1,18	15	1,18	--
CAC43/DOPE	28	15	anst.	1,48	9	1,51	-
CAC52/DOPE	57	1	Tal	1,58	15	1,59	-
CAC53/DOPE	22	15	anst.	1,62	1	1,65	+/-
CAC62/DOPE	59	3	Peak N/P 3, anst.	1,53	9	1,77	+/-
CAC63/DOPE	19	15	anst.	1,54	15	1,54	-
CC243/DOPE	23	15	anst.	1,46	15	1,46	-
CS243/DOPE	12	15	anst.	1,73	1;9	1,90	+/-
CS343/DOPE	15	15	anst. ab N/P 9	1,85	1	1,93	+/-
DOSPER (Roche)	9	15	anst. ab N/P 9	1,93	1	2,10	+
FuGENE™6 (Roche)	171	15	anst.	0,35	13	0,52	--
Transfectam® (Promega)	17	15	anst.	1,84	9	1,89	+/-
Lipofectamine (Life Techn.)	14	15	anst.	1,81	9	1,90	+/-

Tab. 3.21 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von HUVEC-Zellen

anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); konst. = konstant; n. a. = nicht auswertbar; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; siehe Kapitel 3.2: Auswertung der Daten

Transfektionseffizienzen und -profile

Das monokationische Lipid DMGAcNMe₃/DOPE erzielte insgesamt die zweithöchste Transfektionseffizienz (über 300 rlu/μg) (Tab. 3.21 b). Bei Lipiden, die zwei Aminofunktionen trugen, führte die Transfektion mit DMGAc4Et/DOPE zur höchsten Effizienz (219 rlu/μg). Die insgesamt höchste Transfektionseffizienz von 375 rlu/μg erzielte die Lipidmischung CAc32/DOPE aus der Gruppe der trikationischen Lipide. FuGENE™6 führte bei den Transfektionsreagenzien zu der relativ höchsten Transfektionseffizienz von 171 rlu/μg. Die Transfektionseffizienzen aller übrigen Testlipide/Reagenzien lagen unter 100 rlu/μg.

Die meisten Transfektionsprofile stiegen mit zunehmendem N/P-Verhältnis an. Profile mit deutlichen Peaks wurden in fünf Fällen beobachtet, darunter waren die drei Lipidmischungen mit den insgesamt höchsten Transfektionseffizienzen.

Zytotoxizität

Die minimale Proteinmenge und die Proteinmenge bei maximaler Transfektionseffizienz lagen bei allen Testlipiden bzw. -reagenzien in einem ähnlichen Bereich. In den drei Lipidgruppen wurde in etwa der Hälfte der Fälle starke (--) relative Zytotoxizität beobachtet, in etwa einem Viertel leichtere Zytotoxizität (-). Die Transfektion mit FuGENE™6 resultierte in starker Zytotoxizität (--), während die übrigen Transfektionsreagenzien keine toxische Wirkung auslösten.

Helferlipide

In den drei Lipidgruppen ergab sich jeweils die relativ höchste (oder zweithöchste) Transfektionseffizienz für das Lipid der DMGAc-Lipidserie in Kombination mit DOPE. Erhöhte Zytotoxizität durch diese Lipidmischungen war nicht zu erkennen. Jedoch waren für die Kombinationen mit DOPE der minimale wie auch der Proteingehalt bei maximaler Transfektionseffizienz jeweils deutlich niedriger als für die anderen Lipide/-mischungen dieser Gruppe. In zwei Lipidgruppen änderte sich das Transfektionsprofil (Peak) der DOPE-Mischung gegenüber dem Ausgangslipid (ansteigend).

Durch Zugabe von DOPE zu DOTAP ergab sich eine leichte Erhöhung der Transfektionseffizienz (16 bzw. 36 rlu/μg) sowie eine Veränderung des Transfektionsprofils (Tal; Peak). Die relative Zytotoxizität stieg von untoxisch (+/-) auf stark toxisch (--). Die DMRIE/CHOL-Mischung erreichte im Vergleich zu DMRIE eine zweimal höhere maximale Transfektionseffizienz, der zugehörige Proteingehalt sank jedoch auf etwa 30 %.

3.2.6 COS-7

Wertebereich

Wie aus Tab. 3.22 a hervorgeht, lag die mittlere Transfektionseffizienz für den DOTAP-Standard bei annähernd 19000 rlu/μg mit einer zugehörigen Proteinmenge von rund 2,5 μg. Die

von den Testlipiden bzw. -reagenzien erreichten Effizienzen umfassten einen Bereich von 1439-643470 rlu/ μ g. Die Proteinwerte reichten von 0,20 μ g bis 3,19 μ g.

	mittl. Transfektionseffizienz (rlu/ μ g)	mittl. Proteinmenge (μ g)
DOTAP-Std. (n = 96)	18968 \pm 7097 (VK 37 %)	2,48 \pm 0,34 (VK 14 %)
Testlipide (n = 3)	Minimum-Maximum 1439-643470	Minimum-Maximum 0,20-3,19

Tab. 3.22 a Mittlere Transfektionseffizienzen und Proteingehalte für DOTAP-Std. und Testlipide nach der Lipofektion von COS-7-Zellen (s. Tab. 3.17 a)

Transfektionseffizienzen und –profile

Die höchste Transfektionseffizienz unter den monokationischen Lipiden wurde von DC-CHOL/DOPE erzielt und betrug 81887 rlu/ μ g (Tab. 3.22 b). In der Gruppe der Lipide mit zwei Aminofunktionen führte die Transfektion mit CC24Et/DOPE zur relativ höchsten Transfektionseffizienz von 227121 rlu/ μ g. Die insgesamt höchsten Effizienzen wurden durch die trikationischen Lipide der CAcxy-Serie erzielt. Spitzenreiter mit 643470 rlu/ μ g war die Lipidkombination CAc43/DOPE. Unter den Transfektionsreagenzien erreichte FuGENE™6 die mit Abstand höchste Transfektionseffizienz (156603 rlu/ μ g). Die Transfektionsprofile der monokationischen Lipide waren häufig durch einen Peak bei kleinen N/P-Verhältnissen (zwischen 1 und 5) charakterisiert. Die Profile der Lipide mit zwei Aminofunktionen zeigten in der Mehrzahl der Fälle einen Peak im Bereich um das N/P-Verhältnis 5. Lipide mit drei Aminofunktionen ließen ebenfalls meist (11/14) Peaks oder Plateaus bei N/P-Verhältnissen zwischen 3 und 9 erkennen. Ein ähnliches Bild ergab sich in 3 von 4 Fällen in der Gruppe der Transfektionsreagenzien mit je einem Peak um ein N/P-Verhältnis von 7.

Zytotoxizität

Die Lipoplexe der monokationischen Lipide lösten in 7 von 9 Fällen starke (--) oder weniger starke (-) Zytotoxizität bei maximaler Transfektionseffizienz aus. Bei dikationischen Lipiden wurde in allen Fällen (8/8) starke Zytotoxizität beobachtet, bei Lipiden mit drei Aminofunktionen in allen Fällen starke oder weniger starke Zytotoxizität. Nach der Transfektion mit den käuflichen Reagenzien trat nur in einem von vier Fällen Zytotoxizität auf.

Helferlipide

Die Mischung der Lipide DMGAc-Serie mit DOPE oder Cholesterol zeigte für die drei Lipidgruppen uneinheitliche Ergebnisse. Eine Erhöhung der maximalen Transfektionseffizienz wurde lediglich bei Zugabe von DOPE zu DMGAcNMe₃ beobachtet. Eine höhere Transfektionseffizienz durch Mischung mit DOPE war bei DOTAP/DOPE zu erkennen, durch Mischung mit Cholesterol bei DMRIE.

In der DMGAc-Serie war kein zytotoxischer Effekt durch die Lipidmischungen erkennbar. Die DOTAP/DOPE-Mischung führte bei maximaler Transfektionseffizienz zu einer Erhöhung

der relativen Zytotoxizität gegenüber DOTAP, die DMRIE/CHOL-Mischung zeigte verglichen mit DMRIE ebenfalls eine Zunahme der Zytotoxizität.

Lipid/Reagenz	max. TE (rlu/ μ g)	N/P der max. TE	Profil	min. Proteinmenge (μ g)	N/P der min. Proteinmenge	Proteinmenge bei max. TE (μ g)	relative Tox. vs. DOTAP-Std.
DMGAcNMe ₃	22183	1	Peak N/P 1-3	0,91	9	1,57	--
DMGAcNMe ₃ /DOPE	38965	13	anst.	1,49	15	1,84	-
CACNMe ₃ /DOPE	63182	3	Peak N/P (1-)5	1,02	9	1,45	--
CC2NMe ₃ /DOPE	52754	3	Peak N/P 1-3	1,69	15	2,35	+/-
DOTAP	13969	3	Peak N/P 1-5	2,03	9	2,04	-
DOTAP/DOPE	33920	13	Plateau N/P 5-15	1,52	15	1,65	--
DC-CHOL/DOPE	81887	1	Peak N/P 1	1,20	15	2,07	-
DMRIE	12539	3	Peak N/P 3	1,97	15	2,41	+/-
DMRIE/CHOL	58980	1	Peak N/P 1	1,35	7	1,61	--
DMGAc4Et	25379	3	Peak N/P 3-5	0,65	13	1,21	--
DMGAc4Et/DOPE	26224	15	anst.	1,31	15	1,31	--
DMGAc4Et/CHOL	27009	15	Plateau N/P 7-13	1,20	15	1,20	--
CAC3Et/DOPE	100462	5	Peak N/P 5-9	1,29	9	1,69	--
CAC4Et/DOPE	151771	3	Peak N/P 3-5	0,87	9	0,97	--
CAC5Et/DOPE	118167	3	Peak N/P 3	1,16	15	1,50	--
CAC6Et/DOPE	120778	5	Peak N/P 5	1,10	15	1,76	--
CC24Et/DOPE	227121	5	Peak N/P 5-7	0,40	13	0,85	--
DMGAc43	486504	9	Peak N/P 7-9	0,51	9	0,51	--
DMGAc43/DOPE	34030	11	+/- anst.	1,12	15	1,63	--
DMGAc43/CHOL	158715	13	anst.	0,98	13	0,98	--
CAC32/DOPE	233297	5	Peak N/P 5	0,81	9	1,21	--
CAC33/DOPE	216111	5	Peak N/P 3-5	0,70	13	1,33	--
CAC42/DOPE	225009	3	Peak N/P 3	1,43	7	1,99	-
CAC43/DOPE	643470	9	Peak N/P 7-9	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
CAC52/DOPE	318194	5	Peak N/P 5; Plateau N/P 7-15	0,96	15	1,05	--
CAC53/DOPE	177971	13	2 Peaks N/P 5; N/P 13	0,97	13	0,97	--
CAC62/DOPE	498943	9	Plateau N/P 3-13	0,27	13	0,34	--
CAC63/DOPE	83962	3	Peak N/P 3-5	1,25	5	1,69	--
CC243/DOPE	108961	5	Peak N/P 5	1,83	15	2,08	-
CS243/DOPE	277296	13	n. a.	0,95	9	1,29	--
CS343/DOPE	101961	9	Peak N/P 9	1,33	7	1,62	--
DOSPER (Roche)	75007	9	Peak N/P 5-9	2,25	15	2,42	+/-
FuGENE™6 (Roche)	156603	15	anst.	1,51	15	1,51	--
Transfectam® (Promega)	97774	7	Peak N/P 5-7	2,19	1	2,29	+/-
Lipofectamine (Life Techn.)	43361	7	Peak N/P 7	2,18	15	2,68	+/-

Tab. 3.22 b Charakterisierung der Transfektionsergebnisse nach Lipofektion von COS-7-Zellen

anst. = ansteigend (steigende Transfektionseffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis); n. a. = nicht auswertbar; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = Zytotoxizität; siehe unter 3.2 (Auswertung der Daten)

3.2.7 Zusammenfassung und Diskussion der Screeningergebnisse

Der Sinn und Zweck eines Screenings besteht in der Auffindung geeigneter, effizienter und wenig toxischer Transfektionslipide für verschiedene Zellsysteme. Daher wurden die Transfektionsergebnisse des Screenings nach zwei Gesichtspunkten zusammengefasst: der pro Zelllinie erreichten maximalen Transfektionseffizienz und der höchsten Transfektionseffizienz bei minimaler Zytotoxizität. Für die einzelnen Zelllinien wurde hierzu eine Rangfolge (*Hitliste*) der vier effizientesten Lipide/Reagenzien nach deren jeweils erreichter maximaler Transfektionseffizienz erstellt (Tab. 3.23). Daneben wurde untersucht, ob es einen für die Zelllinie charakteristischen Transfektionsprofiltyp gibt. Des Weiteren wurde eine zweite Lipidrangfolge aufgestellt, in der die Testlipide bzw. -reagenzien nach dem Kriterium „höchster Transfektionseffizienz bei minimaler Toxizität“ (Tab. 3.23) eingeordnet wurden.

Zell(lini)en	Lipidrangfolge gemäß TE ¹	TE (rlu/ μ g)	häufigster Profiltyp	Lipidrangfolge gemäß höchster TE bei min. Tox. ²	TE (rlu/ μ g)
MEXF462NL	CAC52/DOPE	10045	Peak	CAC3Et/DOPE	2451
	CAC43/DOPE	6175		DMGAc4Et/CHOL	1354
	CAC4Et/DOPE	5069		DMGAc4Et/DOPE	523
	DMGAc43	4807		DMGAc43/DOPE	471
HT-29	CAC62/DOPE	109	Peak	DOSPER	13
	CAC43/DOPE	107		Transfectam [®]	7
	CAC33/DOPE	95		FuGENE TM 6	61
	CAC4Et/DOPE	90		Lipofectamine	5
RXF944L	FuGENE TM 6	1551	Peak	FuGENE TM 6	1551
	DMGAc43	739		DOSPER	377
	DOSPER	377		CAC6Et/DOPE	159
	CS343/DOPE	242		Transfectam [®]	148
16HBE-140 ⁻	CAC42/DOPE	12999	Peak	CAC42/DOPE ³	12999
	CAC52/DOPE	10444		CAC52/DOPE	10444
	CAC32/DOPE	8432		CAC32/DOPE ³	8432
	CAC33/DOPE	5105		CAC33/DOPE ³	5105
HUVEC	CAC32/DOPE	375	anst.	CAC62/DOPE	59
	DMGAcNMe ₃ /DOPE	363		DC-CHOL/DOPE	24
	DMGAc4Et/DOPE	219		CAC5Et/DOPE	23
	FuGENE TM 6	171		CAC53/DOPE	22
COS-7	CAC43/DOPE	643470	Peak	Transfectam [®]	97774
	CAC62/DOPE	498943		DOSPER	75007
	DMGAc43	486504		CC2NMe ₃ /DOPE	52754
	CAC52/DOPE	318194		Lipofectamine	43361

Tab. 3.23 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse aus den Tab. 3.17-3.22 (jeweils a und b)

¹Rangfolge nach Höhe der Transfektionseffizienz, unabhängig von der relativen Zytotoxizität

²Rangfolge nach geringster Toxizitätsstufe (++, +, +/-); innerhalb einer Stufe nach Höhe der Transfektionseffizienz

³Werte wegen technischer Schwierigkeiten unter Vorbehalt

anst. = ansteigend; TE = Transfektionseffizienz; Tox. = relative Zytotoxizität; s. unter 3.2 (Auswertung)

Die in Tab. 3.23 zusammengefassten Daten sowie die Screeningergebnisse in den Kapiteln 3.2.1-3.2.6 sollten zur Beantwortung von Fragen beitragen, die unterschiedliche Aspekte des Screeningexperiments genauer behandeln.

3.2.7.1 Welche/s Lipid/-mischung ist für die Transfektion einer bestimmten Zell(lini)e optimal?

Mit Hilfe des Screenings konnten für jeden untersuchten Zelltyp die effizientesten Lipide bzw. -mischungen eindeutig identifiziert werden. Wie aus Tab. 3.23 ersichtlich, traten in den verschiedenen Zelllinien individuelle Rangfolgen auf. Es gab keine Übereinstimmung zwischen den Zellsystemen in dem jeweils effizientesten *Hit*. In nahezu allen Fällen führten überwiegend Lipide oder Lipidmischungen mit drei Aminofunktionen zu den höchsten Transfektionseffizienzen. Die jeweils erreichten maximalen Transfektionseffizienzen unterschieden sich deutlich und lassen auf zellspezifische Unterschiede im Niveau der Transfektionseffizienzen schließen (siehe 3.2.7.5). Das Ziel des Screenings, in verschiedenen Zellsystemen *Hits* zu finden, wurde klar erfüllt.

3.2.7.2 Gibt es zwischen den Lipiden Unterschiede im Transfektionsverhalten?

Bis auf wenige Ausnahmen zeigten die Lipide mit drei Aminofunktionen die höchsten Transfektionseffizienzen und waren in der Lipidrangfolge nach der Transfektionseffizienz am häufigsten (17/24) vertreten (Tab. 3.23). Unter diesen war 13-mal ein Lipid der CAcxy-Serie (kombiniert mit DOPE). In drei Fällen waren Lipide mit zwei Aminofunktionen wie auch Transfektionsreagenzien unter den besten vier, lediglich in einem Fall ein monokationisches Lipid. Insbesondere der Vergleich der strukturanalogen Lipidserien (DMGAc, CAc) in den drei Lipidgruppen deutet darauf hin, dass eine Erhöhung der Zahl der Aminofunktionen sich positiv auf die Transfektionseffizienz auswirkte.

Zwischen den Transfektionsprofiltypen innerhalb einer Zelllinie zeigte sich meist kein Unterschied, vorwiegend herrschte ein durch einen *Peak* charakterisiertes Profil vor (Tab. 3.23).

Unterschiede zeigten sich jedoch zwischen den Lipidgruppen in der Position des Peaks. Die Peaks bei den monokationischen Lipiden waren meist bei N/P-Verhältnissen um 3 zu finden, bei Lipiden mit zwei Aminogruppen um 5, bei den Lipiden mit drei Aminofunktionen sowie den Transfektionsreagenzien um 7. Mit steigender Zahl der Aminofunktionen einer Kopfgruppe wurde demzufolge mehr Lipid (pro Aminofunktion) im Lipoplex benötigt, um „optimale“, d. h. zu hoher Transfektionseffizienz führende Lipoplexe zu bilden. Dies könnte auf strukturbedingte Unterschiede in der Lipoplexbildung zwischen den Lipidgruppen zurückzuführen sein. Möglicherweise könnten auch verschiedene Aufnahmemechanismen in die Zellen für unterschiedliche Lipoplextypen vorliegen.

3.2.7.3 In welchem Zusammenhang stehen Transfektionseffizienz und Zytotoxizität?

Zur Beantwortung dieser Frage bietet sich der Vergleich der Rangliste der effizientesten Lipide bzw. -reagenzien mit der Rangliste der am wenigsten zytotoxischen, aber effizienten Kandidaten an. Während die trikationischen Lipide, besonders die CAC-Serie, sich insgesamt als effizienteste Gruppe erwiesen, war die Gruppe der Transfektionsreagenzien die effizienteste (10/24) bei geringster Zytotoxizität (Tab. 3.23). Diese (Transfectam, DOSPER, Lipofectamine) enthalten jeweils kationische Lipide (Lipopolyamine), die bekannt sind für ihre geringe zytotoxische Wirkung [5, 25, 57, 141]. Eine Studie, in der in verschiedenen Zelltypen eine geringere zytotoxische Wirkung von Lipofectamine gegenüber Lipofectin und DMRIE festgestellt wurde [74], bestätigt die hier erhaltenen Ergebnisse. Die geringe toxische Wirkung der Lipopolyamine könnte auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den natürlich vorkommenden Sperminen beruhen, möglicherweise aber auch durch ihr spezifisches Verhalten bei der Lipoplexbildung beeinflusst sein [158]. Demzufolge könnten strukturelle Unterschiede zwischen Lipiden auch eine unterschiedlich starke zytotoxische Wirkung der Lipoplexe verursachen. Mit Ausnahme der beiden Zelllinien 16HBE140⁺ und RXF944L erreichten die Testlipide, die sich durch geringe Toxizität auszeichneten, um das Fünf- bis Zehnfache geringere Transfektionseffizienzen als die effizientesten Testlipide. Daraus lässt sich schließen, dass die effizientesten Lipide aufgrund ihrer Struktur zwar zu höherer Transfektionseffizienz führten, diese jedoch in den meisten Fällen von einer zytotoxischen Wirkung begleitet war. Zur Auffindung effizienter und gleichzeitig untoxischer Lipide ist es daher erforderlich, noch weitere systematische Strukturvariationen an den Lipiden durchzuführen und deren Wirkung (Transfektionseffizienz und Zytotoxizität) im Transfektionsscreening zu vergleichen.

3.2.7.4 Welcher Einfluss geht von den Helferlipiden DOPE und Cholesterol aus?

Der Einfluss von Helferlipiden wurde an den Lipiden der DMGAc-Serie, die sowohl unkomprimiert als auch in Mischung mit DOPE oder Cholesterol zur Lipoplexbildung eingesetzt werden konnten, sowie an DOTAP (mit oder ohne DOPE) und DMRIE (mit/ohne Cholesterol) untersucht.

Transfektionseffizienz

Nach der Transfektion mit DOPE-Mischungen traten zwischen den verschiedenen Zellsystemen deutliche Unterschiede auf: Lediglich in HUVEC wurde einheitlich eine Verbesserung der Transfektionseffizienz durch Zugabe von DOPE zu DMGAc-Lipiden beobachtet (Abb. 3.20 b). In den anderen Zelllinien führten Mischungen mit DOPE zu heterogenen Transfektionseffizienzen, die teilweise sogar deutlich unter den Effizienzen für das jeweilige unkomprimierte DMGAc-Analog lagen.

Die Transfektionseffizienz von DOTAP/DOPE war in HUVEC, 16HBE-140⁻ sowie in COS-7-Zellen um das Zwei- bis Vierfache höher als die Transfektionseffizienz von DOTAP. Der Einfluss von DOPE auf die resultierende Transfektionseffizienz scheint von dem jeweiligen Zellsystem abhängig zu sein. DOPE-Mischungen wurde in der Literatur eine positive Wirkung auf die Transfektionseffizienz zugeschrieben [32, 36, 153]. Beispielsweise ermöglicht die Kombination von Lipiden, die einen Cholesterolanker tragen und per se keine Liposomen bilden [49], wie die Lipide der CAc-Serie, mit DOPE erst die Bildung von Liposomen. Dieser Effekt kann nach den hier gewonnenen Ergebnissen nicht verallgemeinert werden, sondern muss in Zusammenhang mit dem verwendeten Lipidsystem [33, 115] wie dem Zelltyp gesehen werden.

Die Kombination von Cholesterol mit Lipiden der DMGAc-Serie führte nur in einzelnen Fällen zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz. Hingegen wurde in allen Zelllinien mit Ausnahme von HT-29 die Transfektionseffizienz von DMRIE durch Mischung mit Cholesterol erhöht. Dies deutet auf eine zellunabhängige, lipidabhängige [22] Stabilisierung der DMRIE-enthaltenden Liposomen und Lipoplexe durch Cholesterol hin [7, 115]. Aus den Experimenten mit den Lipiden der DMGAc-Serie in Kombination mit DOPE oder Cholesterol ließ sich kein genereller Effekt der Helferlipide auf die Transfektionseffizienz ableiten.

Zytotoxizität

Eine Verminderung der relativen Zytotoxizität gegenüber dem ungemischten Lipid war lediglich in MEXF462NL-Zellen für alle Kombinationen der DMGAc-Lipide mit DOPE zu sehen. In mehreren Zelltypen war dieser Effekt auf die entsprechende monokationische Lipidmischung beschränkt. Die Kombination DOTAP/DOPE führte hingegen in drei Zelllinien zu einer Erhöhung der Zytotoxizität.

Die Mischung von Cholesterol mit DMGAc-Lipiden zeigte in einigen Zelllinien (RXF944L, HT-29, HUVEC) eine positive Wirkung im Vergleich zu dem reinen DMGAc-Analog. Demgegenüber war ein zytotoxischer Effekt der DMRIE/CHOL-Mischung in nahezu allen Zelltypen zu beobachten.

Aus diesen Ergebnissen geht eine deutliche Abhängigkeit des zytotoxischen Effekts der beiden Helferlipide von dem jeweils zur Kombination eingesetzten kationischen Lipid hervor. Zusätzlich scheinen die Zelltypen eine individuelle Empfindlichkeit gegenüber einzelnen Lipidmischungen aufzuweisen, die möglicherweise auf spezifische Unterschiede in der Lipoplexaufnahme hindeutet.

3.2.7.5 Treten zelllinienspezifische Unterschiede auf?

Zwischen den Screeningergebnissen für die einzelnen Zelllinien ließen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede feststellen.

Transfektionseffizienz

Für alle Zelllinien konnten Lipidranglisten nach höchster Transfektionseffizienz erstellt werden (Tab. 3.23). Jedoch unterschieden sich die hierbei erzielten Transfektionseffizienzen, die von etwa 100 rlu/ μ g (HT-29) über rund 10000 rlu/ μ g (MEXF462NL) bis zu mehr als 600000 rlu/ μ g (COS-7) reichten. Dies lässt ein für jeden Zelltyp spezifisches Niveau der Transfektionseffizienzen vermuten. Wie aus mehreren Untersuchungen hervorgeht, unterscheiden sich verschiedene Zelltypen bei der Transfektion unter den gleichen Bedingungen mit denselben Reagenzien in den erzielten Transfektionseffizienzen bzw. -raten [11, 56, 57]. Bei primären Endothelzellen wurde im Vergleich zu etablierten Zelllinien eine um mehrere Zehnerpotenzen geringere Transfektionseffizienz gemessen [11], was die hier für HUVEC beobachteten geringen Transfektionseffizienzen bestätigt.

Übereinstimmungen in den Rangfolgen der effizientesten Kandidaten waren am auffälligsten in den Zelllinien COS-7 und MEXF462NL mit drei von vier *Hits*. Berücksichtigte man den fünft- und sechstbesten mit, wären auch diese beiden Kandidaten (CS243/DOPE bzw. CAc32/DOPE, Tab. 3.17 b und 3.22 b) mit einzubeziehen. Dies könnte auf einen ähnlichen Aufnahmemechanismus der Lipoplexe in die Zellen hindeuten. Da zwischen COS-7- und MEXF462NL-Zellen (zell)spezifische Unterschiede in der Höhe der Transfektionseffizienzen zu erkennen waren, müssen noch andere, intrazelluläre Prozesse involviert sein. Zu diesen gehören die Freisetzung der DNA in das Zytosol und ihr Transfer in den Zellkern [30, 47, 80, 142]. Darüber hinaus könnten sämtliche an der Prozessierung des Reportergens beteiligten Schritte wie Transkription, Translation sowie die Stabilität der einzelnen Zwischenstufen und des Zielproteins die zellspezifischen Unterschiede in den Transfektionseffizienzen beeinflusst haben [105, 139]. In diesem Zusammenhang könnte der Zelltyp (bzw. die Art der Transformation einer Zelllinie) eine wichtige Rolle spielen: Beispielsweise sind sowohl die COS-7- als auch die 16HBE-140'-Zelllinie SV40-transformiert, d. h. sind in der Lage, Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung tragen, unabhängig von der zelleigenen DNA zu replizieren [51]. Da das Reporterplasmid pCMXluc diesen Ursprung trägt, könnte eine höhere Kopienzahl in der Zelle vorliegen, was zu einer erhöhten Genexpressionsrate führen könnte. Dies schließt jedoch einen für jeden Zelltyp individuellen Bereich von Transfektionseffizienzen nicht aus (s. o.).

Transfektionsprofile

Die Gemeinsamkeit zwischen den Zell(lini)en bestand in einem charakteristischen, im wesentlichen vom Lipidtyp unabhängigen Transfektionsprofil innerhalb einer Zelllinie. Zwischen den Zellsystemen gab es Unterschiede im Profiltyp: HUVEC waren die einzigen Zellen, deren charakteristisches Transfektionsprofil (steigende Transfektionseffizienzen bei zunehmendem N/P-Verhältnis) von dem Transfektionsprofil nach dem *Peak*-Typ abwich, das in den übrigen Zelllinien vorherrschte. Dort zeigte sich ein Zusammenhang zwischen maximaler Transfektionseffizienz und dem Peak, die meist bei identischem N/P-Verhältnis auftraten. Da in HUVEC die höchsten Transfektionseffizienzen bei sehr großen N/P-Verhältnissen erzielt

wurden, könnte für die meisten Lipide/-mischungen in diesen Zellen eine nicht ausreichende Lipoplexmenge vorgelegen haben. Hierbei wurden bei den drei effizientesten Lipidmischungen übereinstimmend Profile mit einem Peak beobachtet (im Gegensatz zu dem sonst vorherrschenden ansteigenden Profil), der bei einem für die jeweilige Lipidgruppe typischen N/P-Verhältnis lag. Für diese Lipidmischungen schien eine im Vergleich zu den anderen Lipid(mischung)en geringere Lipidmenge auszureichen. Möglicherweise deutet dies auf ein Transfektionsverhalten hin, das allen Zellen gemeinsam sein könnte: Für Lipide, die zu extrem hoher Transfektionseffizienz führen (*Hits*), könnte ein *Peak*-Profiltyp charakteristisch sein.

Zytotoxizität

Bereits die unterschiedliche Wirkung von Lipidmischungen mit Helferlipiden auf die einzelnen Zellsysteme (3.2.7.4) lässt eine individuelle „Empfindlichkeit“ der Zellen gegenüber den zur Transfektion eingesetzten Lipid(mischung)en vermuten.

Insgesamt schienen die Zelllinien MEXF462NL, HT-29 und COS-7 am empfindlichsten zu sein, d. h. die getesteten Lipide führten häufig zu hoher Zytotoxizität (--). Dies könnte auf unterschiedliche Zellzahlen (mittels Proteingehaltsbestimmung) zurückzuführen sein. Während ein geringer Proteingehalt für COS-7 und MEXF462NL auch zutraf (mittlere Proteinmenge für den DOTAP-Standard unter 2,5 µg), zeigten HT-29 einen etwa doppelt so hohen Proteingehalt für den Standard.

Da sich auch die Niveaus der Transfektionseffizienzen zwischen den drei Zelllinien deutlich unterschieden, konnte die Zytotoxizität nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der erreichten Transfektionseffizienz stehen.

Zum einen könnte eine lipidspezifische Wirkung der eingesetzten mono- bis „tri“kationischen Lipide vorliegen, bei denen eine steigende Anzahl von Aminogruppen pro Lipid in vielen Fällen zu höherer Toxizität führte. Dies galt nicht für die kommerziell erhältlichen Reagenzien, die als Sperminderivate zwar ebenfalls vier bis fünf Aminogruppen trugen, aber nahezu untoxisch waren (vgl. 3.2.7.3).

Zum anderen könnten zellspezifische Mechanismen der Lipoplexaufnahme an der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Transfektionslipiden beteiligt sein. Sowohl individuelle Aufnahmekapazitäten als auch Abbaumechanismen für Lipoplexe wären denkbar.

Diesbezüglich könnte eine Untersuchung zum Aufnahmemechanismus verschiedener Lipoplexe in die zu transfizierenden Zellen weiteren Aufschluss geben.

Fazit

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten automatisierten Transfektionsverfahrens konnten in jeder der sechs untersuchten Zelllinien viel versprechende Lipide (*Hits*) auffindig gemacht werden. Darunter waren jeweils sowohl extrem effiziente als auch untoxische, effiziente Screeningkandidaten. Dies deutet auf eine ausreichende Sensitivität des Messsystems hin, die es erlaubt, auch schwer transfizierbare Zellen erfolgreich zu testen, d. h. *Hits* zu finden. Die

Auswertung der zahlreichen aus dem Screening gewonnenen Daten ist die Basis für einen weiteren Automatisierungsschritt, die automatisierte Bewertung der Screeningdaten zum Auffinden von *Hits* und zur Aufdeckung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

3.3 Mechanistische Aspekte der Lipofektion

Aus den Ergebnissen des automatisierten Lipidscreenings zeichnen sich deutliche zell(typ)-spezifische Unterschiede im liposomenvermittelten Gentransfer ab:

Die verschiedenen Lipide bzw. -mischungen in den einzelnen Zelllinien erzielten oftmals bei unterschiedlichen Ladungsverhältnissen ihre maximalen Transfektionseffizienzen. Dies könnte auf verschiedene Aufnahmegeschwindigkeiten und -mechanismen für die unterschiedlichen Lipoplexe in die Zielzellen zurückzuführen sein. Die Lipoplexaufnahme in die Zellen wird auch in der Literatur vielfach als ein entscheidender Schritt des Transfektionsvorgangs angesehen [30, 153, 161]. Um über diese Zusammenhänge Aufschluss zu erhalten, wurden zunächst Untersuchungen zur Kinetik der Lipoplexaufnahme und zur Menge der aufgenommenen Lipoplexe exemplarisch an COS-7-Zellen durchgeführt. Anschließend wurde der Mechanismus der Lipoplexaufnahme in Abhängigkeit von dem verwendeten Lipoplextyp (für verschiedene Lipide und Ladungsverhältnisse) näher untersucht.

3.3.1 Kinetik der Lipoplexaufnahme

Transfektion in serumhaltigem Medium

Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik und zur Charakterisierung der von den Zellen aufgenommenen Lipoplexmenge wurden DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe für unterschiedlich lange Intervalle von 1 min bis zu 4 h mit COS-7-Zellen (in serumhaltigem Medium) inkubiert und nach 46 h die Transfektionseffizienz bestimmt. Um festzustellen, welcher Anteil der Lipoplexe während der verschiedenen Inkubationsdauern von den Zellen aufgenommen wurde, wurde das Transfektionsmedium (Zellüberstand) nach den entsprechenden Zeitintervallen („Prä-Transfektion“) jeweils auf nicht transfizierte COS-7-Zellen in einer zweiten Zellkulturplatte übertragen. Nach jeweils 4 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Transfektionseffizienz nach insgesamt 46 h bestimmt.

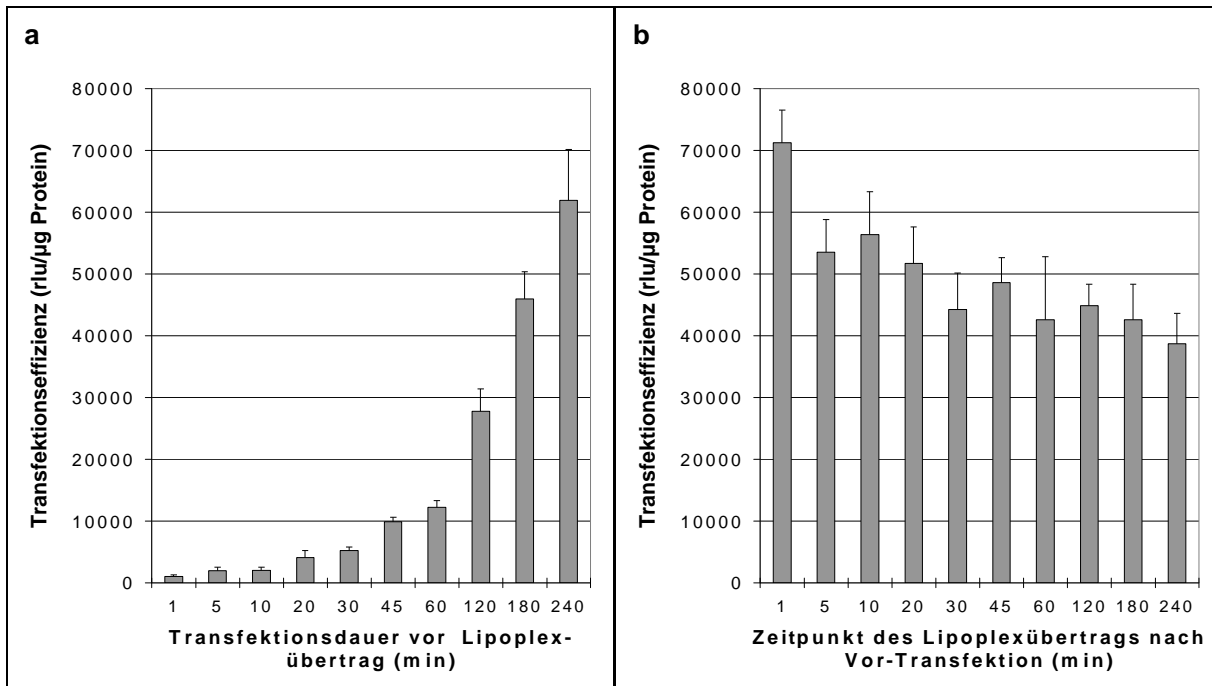


Abb. 3.38 Einfluss der Prä-Transfektionsdauer in serumhaltigem Medium auf die Effizienz der lipoplex-vermittelten Transfektion

COS-7-Zellen in einer 96-Well-Platte in serumhaltigem Medium wurden mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen, wie unter 2.2.4.1 beschrieben (mit Ausnahme eines Zentrifugationsschrittes), für die jeweils angegebene Zeitdauer transfiziert (Prä- oder Vor-Transfektion) (a). Anschließend wurde der gesamte, die Lipoplexe enthaltende Überstand eines jeden Wells auf COS-7-Zellen in einer zweiten 96-Well-Platte übertragen und die Lipoplexe für 4 h dort belassen (b). In allen Fällen wurde jeweils vier Stunden nach Zugabe der Lipoplexe ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Diagramm sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der Transfektionseffizienzen aus 8 Wells dargestellt.

Wie aus Abb. 3.38 a ersichtlich, stieg die Transfektionseffizienz mit zunehmender Inkubationsdauer der Lipoplexe auf den Zellen an. Bei einer Verdoppelung der Inkubationsdauer, beispielsweise von 30 min auf 60 min und von 60 min auf 120 min, nahmen auch die resultierenden Transfektionseffizienzen etwa um den Faktor 2 zu, d. h. der Anstieg der Transfektionseffizienz war nahezu linear. Bei einer Inkubationsdauer von 240 min wurde eine Transfektionseffizienz von etwa 62000 rlu/μg erzielt.

Als Resultat des Übertrags des Transfektionsmediums auf untransfizierte COS-7-Zellen zeigte sich die höchste Transfektionseffizienz von rund 71000 rlu/μg nach der kürzesten Prä-Transfektionsdauer von 1 min. Mit zunehmender Dauer der Prä-Transfektion bis zu etwa 20 min nahm die resultierende Transfektionseffizienz bis auf etwa 50000 rlu/μg ab und blieb auch bei Prä-Transfektionsdauern von bis zu vier Stunden nahezu konstant (Abb. 3.38 b).

Der lineare Anstieg der Transfektionseffizienz lässt im ersten Fall (Abb. 3.38 a) darauf schließen, dass durch eine verlängerte Verweildauer der Lipoplexe auf den Zellen ein größerer Anteil der Lipoplexe aufgenommen wurde. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in Kapitel 3.1.3.2 bei der Optimierung der Inkubationsdauer der Lipoplexe auf den Zellen beschrieben; der größte Unterschied in den resultierenden Transfektionseffizienzen trat dort zwischen der ein- und der zweistündigen Inkubationsdauer auf. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass die Transfektionseffizienz nach 4-stündiger Inkubationsdauer ein Plateau erreicht

hatte, was auch bei der hier untersuchten Aufnahmekinetik zu erwarten ist (Abb. 3.38 a). Im Gegensatz dazu schienen verschieden lange Prä-Transfektionsdauern die resultierende Transfektionseffizienz im Übertragsexperiment kaum zu beeinflussen. Die einzigen Unterschiede waren vor allem durch Prä-Transfektionszeiten von wenigen Minuten zu erkennen. Vergleicht man jeweils die Summe der Transfektionseffizienzen aus beiden Telexperimenten (Abb. 3.38 a und b), so ergeben sich für die größten Prä-Transfektionsdauern sowie die zugehörigen Übertragsexperimente auch die höchsten Gesamteffizienzen. Aus diesem Vergleich lässt sich vermuten, dass nur ein geringer Anteil der zur Transfektion eingesetzten Lipoplexe (während der Prä-Transfektion) tatsächlich von den Zellen aufgenommen wurde.

Diese Daten stehen klar im Gegensatz zu der von Zabner et al. gemachten Beobachtung, dass der größte Teil der applizierten DMRIE/DOPE/DNA-Lipoplexe von COS-7-Zellen nach 6 h Transfektionsdauer aufgenommen wurde [161]. In Übereinstimmung mit der genannten Untersuchung ist allerdings der aus dem langsamen Anstieg der Transfektionseffizienzen in Abb. 3.38 a zu schließende allmähliche Anstieg der Zahl aufgenommener Lipoplexe. Möglicherweise wurde in der genannten Studie nicht ausreichend zwischen lediglich außen an den Zellen anhaftenden und bereits internalisierten Lipoplexen diskriminiert [18].

Fluoreszenzuntersuchungen zur Lipoplexaufnahme

Die Kinetik der Aufnahme bzw. Anhaftung der Lipoplexe an bzw. in den COS-7-Zellen wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen untermauert. Hierzu wurden DOTAP-Liposomen, die mit 2 % Rhodamin-PE markiert waren, zur Lipoplexbildung mit dem Vektor pCMXluc eingesetzt. In 3,5 cm-Schalen kultivierte COS-7-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der Lipoplexe (1 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h) gewaschen, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Abb. 3.39 zeigt Aufnahmen der Präparate exemplarisch für die Zeitpunkte 15 min, 1 h und 4 h nach der Lipoplexzugabe (= Inkubationsdauer). Wie daraus ersichtlich ist, stieg die Zahl der Fluoreszenzsignale (d. h. Lipoplexe) auf den Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer der Lipoplexe an. Während 15 min nach der Lipoplexzugabe nur vereinzelt Lipoplexe auf den COS-7-Zellen zu erkennen waren (Abb. 3.39 a) – im Durchschnitt weniger als ein Fluoreszenzsignal pro Zelle –, war die Zahl der Lipoplexe pro Zelle nach 1 h bereits deutlich höher (Abb. 3.39 b): Auf jeder der abgebildeten Zellen waren ein bis mehrere Lipoplexe zu sehen. Demgegenüber waren die Zellen nach 4-stündiger Inkubation dicht mit Lipoplexen bepackt (Abb. 3.39 c). Obwohl vereinzelt Lipoplexe auch im Raum zwischen den Zellen zu erkennen waren, schien die Mehrzahl an oder auf den Zellen zu sitzen.

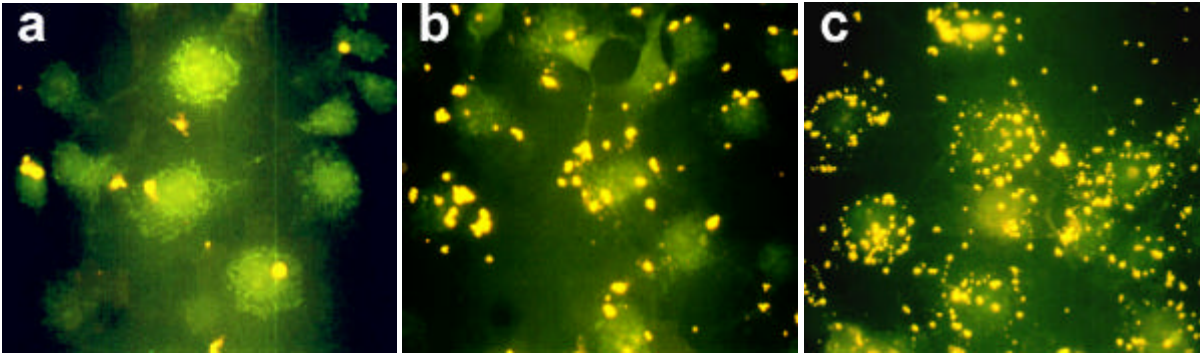


Abb. 3.39 Anlagerung fluoreszenzmarkierter Lipoplexe auf COS-7-Zellen nach der Transfektion
COS-7-Zellen in 3,5 cm-Schalen wurden mit Lipoplexen (im Ladungsverhältnis 2,5) aus rhodaminmarkierten DOTAP-Liposomen und dem Vektor pCMXluc transfiziert, wie unter 2.2.4.6 angegeben. Die Zellen wurden jeweils 15 min (a), 1 h (b) oder 4 h (c) nach der Lipoplexzugabe fixiert und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Vergrößerung (800 ×)

Diese Beobachtung dokumentiert die in Abb. 3.38 a dargestellte Kinetik der Lipoplexanlagerung an die COS-7-Zellen: Die Lipoplexe schwimmen direkt nach ihrer Zugabe zunächst für einige Zeit im Medium und sinken dann allmählich in Richtung Boden der Kulturschale. Bereits nach 15 min sind einzelne Lipoplexe zu den Zellen gelangt. Aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen den kationischen Lipoplexen (mit einem Ladungsverhältnis von 2,5) und der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembran bleiben mit der Zeit mehr und mehr Lipoplexe an den Zellen haften und nur ein kleinerer Anteil befindet sich auf dem Plattenboden. Möglicherweise spielt diesbezüglich auch die Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Rolle, d. h. der prozentuale Anteil bewachsener Bodenfläche an der Gesamtfläche des Wells. Nach 4 h Inkubationsdauer, nach der gewöhnlich ein Mediumwechsel vorgenommen wird (2.2.4.1), hat sich die Zahl der mit den Zellen assoziierten Lipoplexe im Verhältnis zur einstündigen Inkubation bereits vervielfacht (Abb. 3.39 c).

Diskriminierung zwischen adsorbierten und internalisierten Lipoplexen

Anhand dieser Aufnahmen (Abb. 3.39) ließ sich nicht feststellen, wie viele Lipoplexe sich auf der Oberfläche der Zellen befanden und wie viele bereits internalisiert worden waren. Selbst durch mehrfaches Waschen der transfizierten Zellen mit PBS vor der Fixierung für die Fluoreszenzmikroskopie ist es nicht möglich, nicht internalisierte, an den Zellen anhaftende Lipoplexe zu entfernen [18]. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenz der auf der Zelloberfläche befindlichen Lipoplexe durch eine Trypanblaufärbung gelöscht [18]. Lipoplexe, die nach dieser Behandlung noch fluoreszierten, mussten demnach bereits von den betreffenden Zellen aufgenommen worden sein. Die Auswirkung der Trypanblaufärbung auf die Zahl der Fluoreszenzsignale wurde am Beispiel zweier Präparate gezeigt. Hierzu wurden COS-7-Zellen analog zum oben dargestellten Experiment mit rhodaminmarkierten Lipoplexen inkubiert, nach 1 h bzw. 4 h fixiert und anschließend gefärbt. Zur besseren Hervorhebung der mit Trypanblau gefärbten Lipoplexe wurde die Aufnahme im FITC-Filter gezeigt.

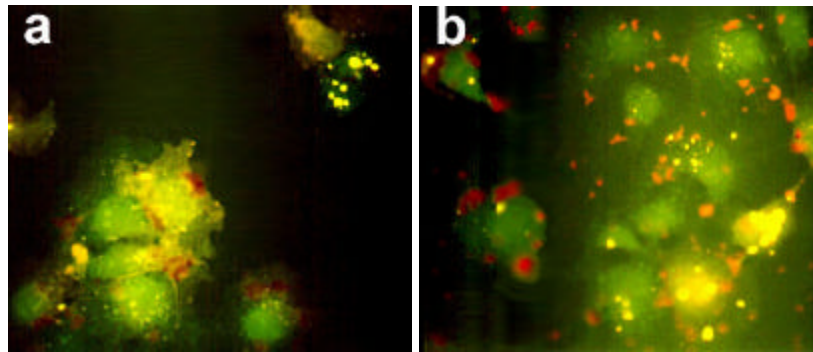


Abb. 3.40 Trypanblaufärbung nicht internalisierter fluoreszenzmarkierter Lipoplexe

COS-7-Zellen in 3,5 cm-Schalen wurden mit Lipoplexen (im Ladungsverhältnis 2,5) aus rhodaminmarkierten DOTAP-Liposomen und dem Vektor pCMXluc transfiziert, wie unter 2.2.4.6 angegeben. Die Zellen wurden nach 1 h (a) bzw. 4 h (b) Lipoplexinkubation fixiert, mit Trypanblau gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop im FITC-Filter fotografiert. Vergrößerung (800 ×)

1 h nach der Lipoplexzugabe zeigten lediglich einzelne Zellen ein Fluoreszenzsignal, das auf bereits aufgenommene Lipoplexe hinweist (Abb. 3.40 a). Außen befindliche Lipoplexe waren infolge der Trypanblaufärbung als rötliche Aggregate assoziiert mit den Zellen zu erkennen. Im Vergleich dazu waren nach 4-stündiger Inkubation die Zellen jeweils von zahlreichen rot gefärbten Lipoplexen umgeben. Die Zahl der Fluoreszenzsignale in den Zellen war ebenfalls deutlich höher. Diese Beobachtungen werden durch vergleichbare Untersuchungen bestätigt: Nach einstündiger Transfektion von COS-1-Zellen mit markierten DMRIE/DOPE/DNA-Komplexen fluoreszierten bereits 36 % der Zellen [161]. Nach einer Transfektionsdauer von 4 h wurde in 100 % der untersuchten CV-1-Zellen, die eng verwandt mit den in dieser Arbeit verwendeten COS-7-Zellen sind [51], fluoreszenzmarkierte Plasmid-DNA nachgewiesen [30].

Diese Ergebnisse liefern sowohl die Erklärung für die allmähliche Zunahme der Transfektionseffizienzen bei steigender Dauer der Lipoplexinkubation (Abb. 3.38 a) als auch dafür, dass nach vier Stunden Lipoplexinkubation nur ein Teil der Lipoplexe tatsächlich aufgenommen wurde: Wie sich aus den Ergebnissen der Fluoreszenzuntersuchungen ergibt, war die Zahl der internalisierten Lipoplexe nach 1 h und 4 h Inkubationsdauer wesentlich geringer als die Zahl der außen an der Zelle anhaftenden. Bei der durch elektrostatische Wechselwirkung bedingten Anlagerung der Lipoplexe an die Zellen handelt es sich demzufolge um einen rasch ablaufenden Prozess, während die tatsächliche Aufnahme in die Zellen langsamer und mit kontinuierlicher Geschwindigkeit (linear) vonstatten geht. Die Kapazität der Lipoplexaufnahme scheint ein Limit zu haben, sodass während der beobachteten Zeitspanne (4 h) nur ein kleiner Anteil der Lipoplexe von den Zellen internalisiert werden konnte.

Im Vergleich zu anderen Zelllinien lässt sich dennoch vermuten, dass die Lipoplexaufnahme für COS-7-Zellen keine entscheidende Barriere im Transfektionsgeschehen darstellt. In diesen Zellen können hohe Transfektionseffizienzen nachgewiesen werden, für die die Aufnahme von Lipoplexen eine Grundvoraussetzung ist. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse einer Untersuchung gestützt, in der gezeigt wurde, dass Muskelzellen, in denen keine Transgenexpression nachgewiesen wurde, auch keine Lipoplexaufnahme stattfand [60]. Aus dieser

Studie geht darüber hinaus eine Abhängigkeit der Lipoplexaufnahme vom Zelltyp hervor, was die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen für ein und dieselbe Lipidmischung in den verschiedenen, im Screening eingesetzten Zelltypen erklären könnte (Kapitel 3.2).

Transfektion unter serumfreien Bedingungen

Lipoplexe, die zur Transfektion von Zellen in serumhaltigem Medium eingesetzt werden, haben potenziell zwei Interaktionspartner: Serumproteine im Kulturmedium und die Zielzellen. Um zu untersuchen, ob die Aufnahmekinetik durch Interaktionen der Lipoplexe mit Serum(komponenten; Serumgehalt ca. 5 % im Transfektionsmedium) beeinflusst wurde, wurde ein analoges Transfektionsexperiment mit serumfreiem Kulturmedium durchgeführt.

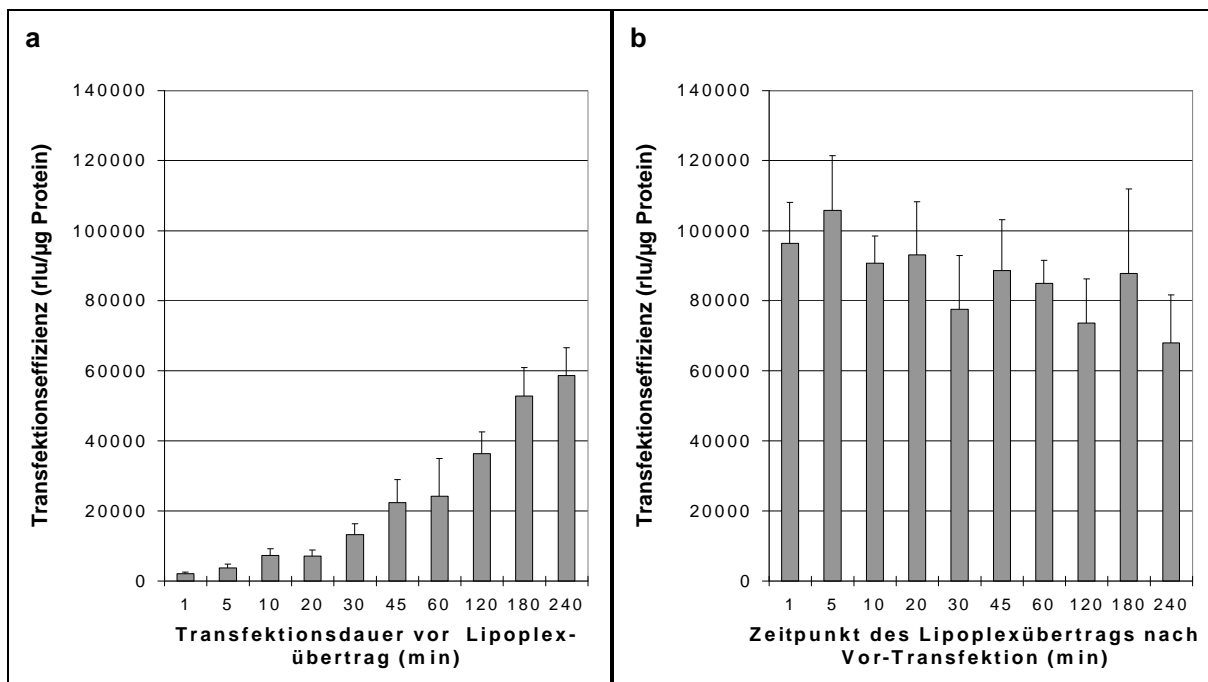


Abb. 3.41 Einfluss der Prä-Transfektionsdauer in serumfreiem Medium auf die Effizienz der lipoplexvermittelten Transfektion

COS-7-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen für die angegebene Zeitdauer transfiziert (Vor- oder Prä-Transfektion) (a). Anschließend wurde der gesamte, die Lipoplexe enthaltende Überstand pro Well auf COS-7-Zellen in einer zweiten 96-Well-Platte übertragen und die Lipoplexe für 4 h dort belassen (b). In allen Fällen wurde jeweils vier Stunden nach Zugabe der Lipoplexe ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Balken (mit Fehlerbalken) stellen jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der Transfektionseffizienzen aus 8 Wells dar.

Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie unter Verwendung serumhaltigen Mediums: Mit zunehmender Transfektionsdauer (d. h. Lipoplexinkubation) stieg auch die Transfektionseffizienz an (Abb. 3.41 a). Die in diesem Experiment erreichte maximale Transfektionseffizienz bei 240-minütiger Lipoplexinkubation stimmte mit knapp 60000 rlu/µg etwa mit der aus dem analogen Experiment mit Serum (Abb. 3.41 a) überein; im Vergleich dazu war der Anstieg der Transfektionseffizienz während der ersten Stunde etwas schneller: Mit Ausnahme der drei längsten Inkubationsdauern (120-240 min) wurden jeweils etwa doppelt so hohe Transfektionseffizienzen erreicht wie unter serumhaltigen Bedingungen. Beim zugehörigen Übertrags-

experiment war wie unter serumhaltigen Bedingungen eine leichte Tendenz zu abnehmenden Transfektionseffizienzen bei Prä-Transfektionsdauern von wenigen Minuten zu beobachten (Abb. 3.41 b). Allerdings wurden unter serumfreien Bedingungen etwa um den Faktor 1,5 höhere Transfektionseffizienzen erzielt.

Dies könnte auf eine leichte Verminderung der Transfektionsaktivität der Lipoplexe durch das Vorhandensein von Serum im Transfektionsmedium hindeuten. Die Lipoplexe könnten in serumhaltigem Medium zuerst mit den Serumproteinen und dann erst mit den Zellen in Wechselwirkung treten. Unter serumfreien Bedingungen wäre die Interaktion der Lipoplexe mit den Zellen schneller möglich, was zu den erhöhten Transfektionseffizienzen führen könnte.

Der Einfluss von Serum bzw. seinen Bestandteilen auf die Transfektionsaktivität von Lipoplexen wurde bereits mehrfach untersucht: Bei positiv geladenen DOTAP/DNA-Lipoplexen wurde eine höhere Reportergenaktivität unter serumfreien Bedingungen beobachtet als bei Vorhandensein eines 10%igen oder höheren Anteils an Serum [156]. Da dieser Effekt bei negativ geladenen Lipoplexen nicht auftrat [156], könnten Interaktionen mit (negativ geladenen) Serumproteinen, beispielsweise Albumin, zugrunde liegen [165]. Andererseits kann eine Zunahme der Lipoplexstabilität, beispielsweise durch Beimengung von Helferlipiden wie Cholesterol [22] oder DOPE oder durch Erhöhung des Ladungsverhältnisses [157], gleichfalls für eine reduzierte Serumempfindlichkeit verantwortlich sein [62, 85, 165]. Abgesehen von der Änderung der Transfektionseffizienzen war das Transfektionsverhalten der Lipoplexe in dem hier durchgeführten Übertragsexperiment durch die Anwesenheit serumhaltigen Transfektionsmediums nur wenig beeinflusst. Wenn Interaktionen mit Serumproteinen die Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen [31] dennoch beeinträchtigten, so war dieser Effekt auf die Lipoplexe gleichmäßig, wie eine Art Puffer, und wirkte sich nicht durch die verschiedenen Prä-Transfektionsdauern aus. Unabhängig von der Anwesenheit von Serum wurde nur ein geringer Anteil der im Transfektionsmedium vorhandenen Lipoplexe von den Zellen tatsächlich internalisiert.

Die in den hier vorgestellten Experimenten beobachtete relativ langsame Aufnahme der Lipoplexe in die COS-7-Zellen lässt auf einen aktiven, möglicherweise absättigbaren Aufnahmemechanismus schließen. Im Folgenden wurde daher der Aufnahmemechanismus von Lipoplexen in COS-7-Zellen näher untersucht.

3.3.2 Einfluss der Endozytose auf die Lipofektion von COS-7-Zellen

Über den Mechanismus, wie Lipoplexe in die zu transfizierenden Zellen gelangen, gibt es kein einheitliches Bild. Während frühere Transfektionsstudien von einer Fusion von Lipoplex (bzw. seinen Lipidkomponenten) und Zytoplasmamembran der Zielzelle ausgingen [35, 50, 168], stützen neuere Untersuchungen einen endozytotischen Mechanismus [47, 110, 161, 167].

Da die Ergebnisse der Lipoplexaufnahmekinetik in COS-7-Zellen auf einen aktiven Prozess (der Endozytose) hindeuten (3.2.1), wurden Endozytosehemmstoffe wie Cytochalasin B [96], Antimycin A oder Natriumazid (NaN_3) [81] eingesetzt und ihre Wirkung auf das Transfektionsergebnis untersucht. Cytochalasin B hemmt die Polymerisierung von Actin [134, 137], durch Antimycin A [87] und NaN_3 wird der zelluläre ATP-Gehalt vermindert [118, 121]. Auch werden die Zellen oft bei 4 °C inkubiert, um den Zellstoffwechsel und damit aktive Aufnahmeprozesse stillzulegen oder zumindest zu drosseln [96, 153].

DOTAP

Zunächst wurden alle vier Methoden in einem Transfektionsexperiment mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen im Ladungsverhältnis 2,5 angewendet und die resultierenden Transfektionseffizienzen miteinander verglichen (Abb. 3.42).

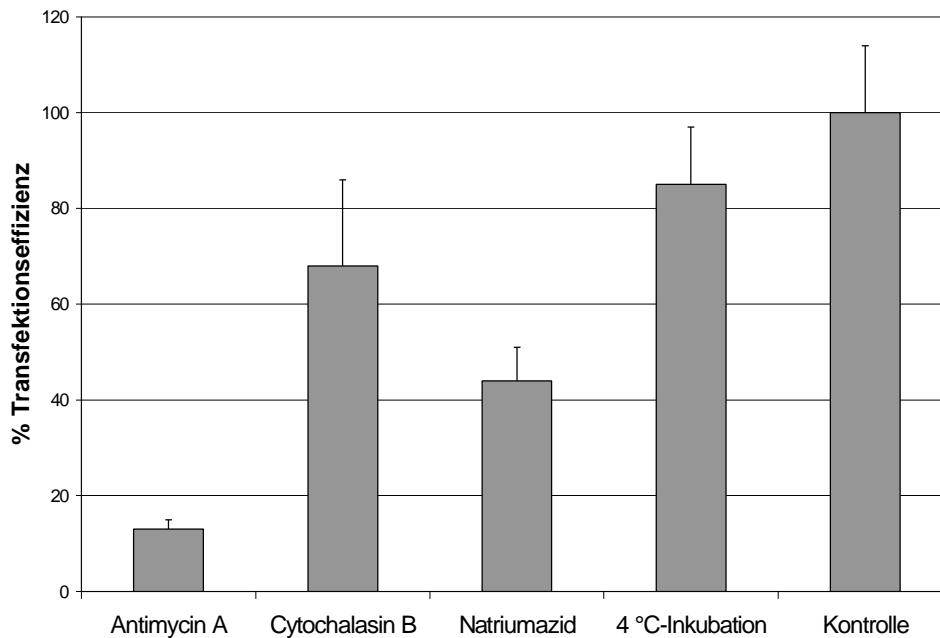


Abb. 3.42 Einfluss der Endozytosehemmung auf die Transfektionseffizienz von DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen

COS-7-Zellen wurden mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen im LV 2,5 transfiziert. Die Hemmung der Endozytose wurde durch Behandlung der Zellen mit Antimycin A, Cytochalasin B oder Natriumazid (NaN_3) bei 37 °C durchgeführt oder durch Inkubation bei 4 °C (Tab. 2.8, Kapitel 2.2.6.3). Die Transfektionseffizienzen und Standardabweichungen (als Fehlerbalken) wurden aus je acht 96-Wells ermittelt und als prozentualer Anteil der Transfektionseffizienz der Kontrolle (nicht vorbehandelte Zellen) ausgedrückt.

Im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion ohne Endozytosehemmung) war die größte Reduktion der Transfektionseffizienz (auf unter 20 %) für die Behandlung mit Antimycin A zu sehen. Die Einwirkung von Natriumazid führte zu einer auf knapp 50 % erniedrigten Transfektionseffizienz, Cytochalasin B zu einer auf knapp 70 % erniedrigten. Die 4 °C-Inkubation hatte den geringsten Effekt zur Folge; hier betrug die Transfektionseffizienz rund 85 % der Kontrolle. Aus den unterschiedlichen Transfektionseffizienzen geht eine spezifische und un-

terschiedlich starke Wirkung der Hemmstoffe auf die COS-7-Zellen hervor, die aber eindeutig für einen Endozytosemechanismus spricht.

Lediglich das Ergebnis der 4 °C-Inkubation scheint im Widerspruch zu der durch Antimycin A und Natriumazid erzielten Verringerung der Transfektionseffizienz zu stehen. Es weicht zudem von der gängigen Annahme ab, dass bei 4 °C keine Endozytose stattfindet [125], oder könnte auf einen Fusionsmechanismus hindeuten (dem aber die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen, in denen intakte Lipoplexe innerhalb der Zelle zu erkennen waren (3.2.1), widersprechen). Eine mögliche Erklärung könnte jedoch in einem Anhaften der Lipoplexe (durch elektrostatische Wechselwirkung) an der Zelloberfläche während der 4 °C-Inkubation liegen. DOTAP-Lipoplexe wiesen auch nach vierstündiger Prä-Transfektion von COS-7-Zellen noch genügend Stabilität bzw. Aktivität auf, um weitere Zellen zu transfizieren (Kapitel 3.2.1). Selbst wenn an der Zelloberfläche anhaftende Lipoplexe während der vierstündigen Inkubationszeit bei 4 °C nicht internalisiert wurden [125], könnten sie, sobald die Zellen in 37 °C ihre Endozytoseaktivität wieder aufnahmen, endozytiert worden sein. (Dass die Reduktion der Transfektionseffizienz durch Endozytosehemmung mittels der anderen Methoden in viel höherem Ausmaß auftrat, könnte an einer stärkeren und länger anhaltenden Beeinträchtigung des zellulären Stoffwechsels gelegen haben.) Indirekt setzen diese Ergebnisse eine unverminderte Bindung(sfähigkeit) der Lipoplexe an die Zellmembran voraus [153].

Abhängigkeit der Lipoplexaufnahme vom Lipoplextyp (Lipid und Ladungsverhältnis)

Möglicherweise könnten für Lipoplexe unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und unterschiedlicher Ladungsverhältnisse verschiedene Aufnahmeraten oder -mechanismen in die Zellen vorliegen, die das Auftreten von individuellen Transfektionsprofilen erklären könnten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Lipidmischungen mit charakteristischen Transfektionsprofilen in Transfektionsexperimenten mit COS-7-Zellen eingesetzt, in denen die Endozytose durch Antimycin A bzw. Natriumazid gehemmt wurde. Hierbei handelte es sich im ersten Fall um CAc43, dessen kationische Kopfgruppe drei Aminogruppen trägt und das in Kombination mit DOPE zu sehr hohen Transfektionseffizienzen bei einem Ladungsverhältnis von 5 führt (vgl. Kapitel 3.1.2.2). Als zweites Lipid wurde das monokationische DMGAcNMe₃ eingesetzt, das in Kombination mit Cholesterol in COS-7-Zellen leicht ansteigende Transfektionseffizienzen bei größer werdendem Ladungsverhältnis zeigt [39]. Aus jeder der Lipidmischungen und dem Vektor pCMXluc wurden Lipoplexe in acht Ladungsverhältnissen zwischen 1 und 15 hergestellt, zur Transfektion (mit und ohne die Endozytoseinhibitoren) eingesetzt und die resultierenden Transfektionseffizienzen verglichen (Abb. 3.43). Um einen internen Vergleichsstandard zu erhalten, wurden DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe im LV 2,5 unter gleichen Bedingungen zur Transfektion eingesetzt.

CAc43/DOPE

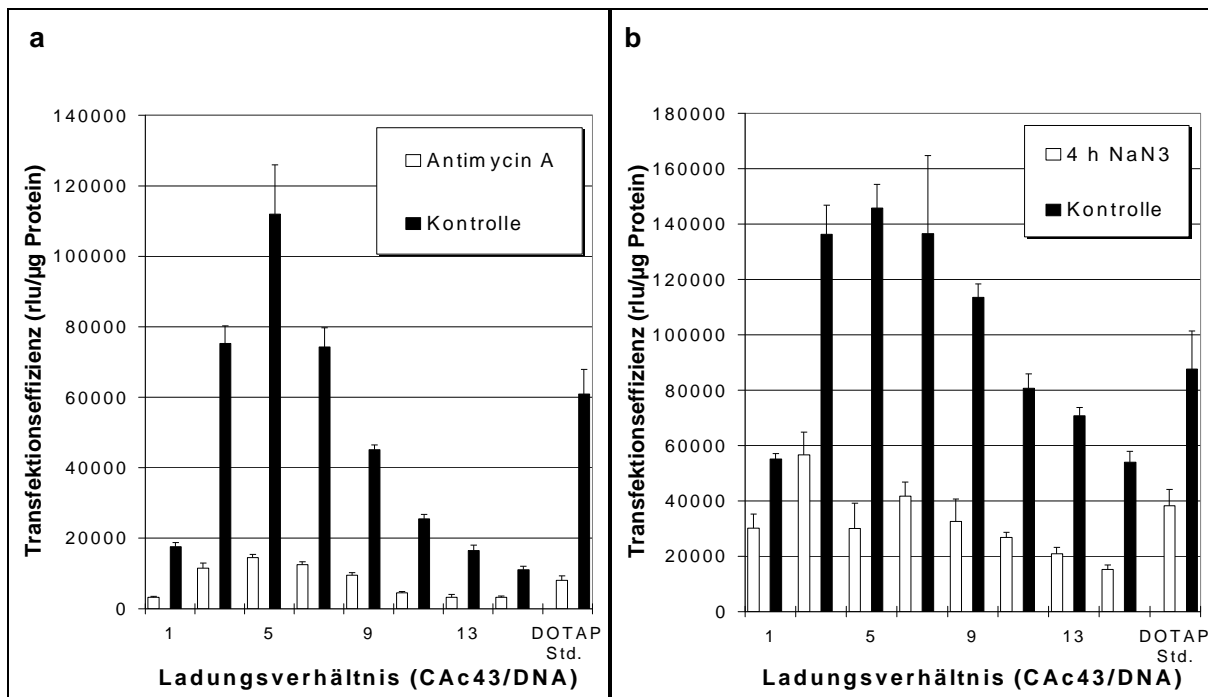


Abb. 3.43 Einfluss der Endozytosehemmung auf das Transfektionsprofil von CAc43/DOPE in COS-7-Zellen

Lipoplexe aus CAc43/DOPE und pCMXluc in 8 Ladungsverhältnissen wurden zur Transfektion von COS-7-Zellen eingesetzt. Als Vergleichsstandard wurden auch Zellen mit DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen (LV 2,5) transfiziert. Die Hemmung der Endozytose wurde in zwei separaten Experimenten durch Behandlung der Zellen mit Antimycin A (a) oder Natriumazid (b) bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden dazu, wie in Tab. 2.8, Kapitel 2.2.6.3 beschrieben, mit den jeweiligen Substanzen bzw. bei der jeweiligen Temperatur inkubiert; Kontrollzellen wurden ohne die Hemmstoffe transfiziert. Die dargestellten Transfektionseffizienzen und Standardabweichungen (als Fehlerbalken) wurden aus je drei 96-Wellen ermittelt. Für die Berechnung der Transfektionseffizienz des DOTAP-Standards (im LV 2,5) wurden die Einzelwerte aus 8 Wells berücksichtigt.

Abb. 3.43 zeigt, wie sich das Transfektionsprofil durch Hemmung der Endozytose ändern kann. Relativ zur Kontrolle (Transfektion ohne Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor) hatte die Einwirkung von Antimycin A eine massive, aber relativ gleichmäßige Abnahme der Transfektionseffizienzen für alle untersuchten Ladungsverhältnisse auf etwa ein Fünftel bis ein Sechstel der Kontrollwerte zur Folge. Dies führte zu einem der Kontrolle ähnlichen Transfektionsprofil bei insgesamt geringeren Transfektionseffizienzen (Abb. 3.43 a). Die Behandlung mit Natriumazid bewirkte bei den Ladungsverhältnissen 1 und 3 eine Reduktion der Transfektionseffizienzen auf etwa 50 %, für höhere Ladungsverhältnisse eine Reduktion auf 21-33 % (Abb. 3.43 b). Das Transfektionsprofil wich daher (insbesondere bei LV 5) etwas von dem Profil der Kontrolle ab.

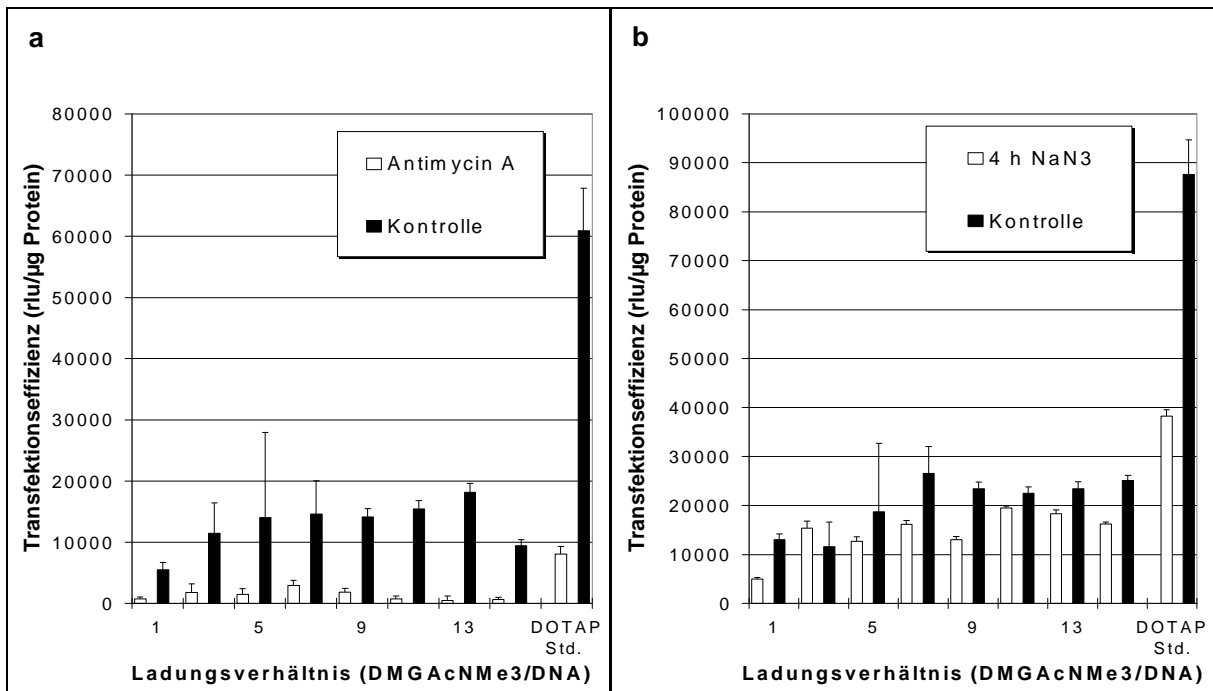
DMGAcNMe₃/CHOL

Abb. 3.44 Einfluss der Endozytosehemmung auf das Transfektionsprofil von DMGAcNMe₃/CHOL in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen in 96-Well-Platten wurden mit Lipoplexen aus DMGAcNMe₃/CHOL und pCMXluc in insgesamt 8 Ladungsverhältnissen transfiziert. Für das Kontrollexperiment wurden DOTAP/pCMXluc-Lipoplexe im LV 2,5 verwendet. Versuchsaufbau und Auswertung entsprachen den in der Legende zu Abb. 3.43 gemachten Angaben.

Das monokationische Lipid DMGAcNMe₃ in Kombination mit Cholesterol wurde unter gleichen Bedingungen wie CAc43/DOPE in den Experimenten eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit Antimycin A führte zu einer drastischen Abnahme der Transfektionseffizienzen relativ zu den Kontrollwerten auf 10-20 % für die Ladungsverhältnisse 1 bis 9 bzw. auf unter 10 % für die höheren Ladungsverhältnisse (Abb. 3.44 a). Dies resultierte in einem Transfektionsprofil mit sinkender Transfektionseffizienz bei steigendem Ladungsverhältnis, das von dem für DMGAcNMe₃/CHOL-typischen Profil, das mit zunehmendem Ladungsverhältnis leicht anstieg, deutlich abwich. Nach der Einwirkung von Natriumazid zeigte sich bei LV 1 eine deutliche Verringerung der Transfektionseffizienz relativ zur Kontrolle auf unter 40 %. Mit Ausnahme des Wertes für LV 3, der etwas über dem der Kontrolle lag, waren bei den übrigen Ladungsverhältnissen auf lediglich 56-87 % reduzierte Transfektionseffizienzen zu beobachten (Abb. 3.44 b). Das Transfektionsprofil ähnelte insgesamt dem Profil der Kontrolle, wobei der Anstieg der Transfektionseffizienz bei steigendem Ladungsverhältnis weniger deutlich war.

Diskussion der Ergebnisse für beide Lipidsysteme

Aus der Wirkung der Endozytosehemmung auf das Transfektionsverhalten der beiden Lipidsysteme lassen sich folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede feststellen:

In beiden Fällen führte die Endozytoseinhibition durch Natriumazid zu einer mehr oder weniger starken Reduktion der Transfektionseffizienzen. Dies lässt grundsätzlich auf eine Beteiligung aktiver Prozesse an der Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen schließen [118, 121]. Die Hemmung war bei CAC43/DOPE-vermittelter Transfektion am stärksten ausgeprägt. Da CAC43/DOPE von beiden Lipidsystemen die höchsten Transfektionseffizienzen erzielte, könnte sich hier die Drosselung ATP-abhängiger Aufnahmemechanismen stärker ausgewirkt haben als im Fall von DMGAcNMe₃/CHOL, in dem die Transfektionseffizienz generell auf einem niedrigeren Niveau lag. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass bei einem Ladungsverhältnis von 5, bei dem sonst die höchste Transfektionseffizienz bei CAC43/DOPE auftritt, der hemmende Effekt relativ zur Kontrolle am stärksten war (Abb. 3.43 b).

Eine Reduktion der Transfektionseffizienz bedingt durch eine geringere Zahl angelagerter Lipoplexe ist eher unwahrscheinlich, da, wie aus einer Studie mit Hep G2-Zellen hervorgeht, zwar die Internalisierung von DOTAP/DOPE-Liposomen durch Natriumazid in Kombination mit 2-Desoxyglucose reduziert wurde, nicht jedoch die Bindung an die Zellen [153]. Allerdings wurde offensichtlich die Aufnahme von Lipoplexen in die COS-7-Zellen durch Natriumazid nicht vollständig unterdrückt, was eine Beteiligung ATP-unabhängiger Aufnahmevorgänge vermuten lässt, die auch von dem jeweiligen Ladungsverhältnis der Lipoplexe abhängig sein könnten.

Ein noch klareres Bild ergab die Endozytosehemmung durch Antimycin A während der Transfektion, die in beiden Systemen eine massive Reduktion der Transfektionseffizienz zur Folge hatte (Abb. 3.43 a-3.44 a). Hier war nahezu keine Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis zu sehen. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam eine Untersuchung der Transfektion in mit Antimycin A behandelten Leukämiezellen (THP-1): Die Transfektionseffizienz der DOTAP/DNA-Lipoplexe in den Ladungsverhältnissen 1 und 2 war signifikant reduziert. Ausgehend von gleicher Transfektionseffizienz der unbehandelten Zellen war der Grad der Verminderung bei Einwirkung des Hemmstoffes für beide Ladungsverhältnisse ähnlich [109, 110].

Die hier ermittelten Daten über die Endozytosehemmung bei der Transfektion mit den Lipidsystemen DOTAP, CAC43/DOPE und DMGAcNMe₃/CHOL sprechen eindeutig für die Endozytose als hauptsächlichen Aufnahmemechanismus für Lipoplexe in COS-7-Zellen. Sie tragen damit zur Erklärung der aus dem Screening abgeleiteten zellspezifischen Unterschiede in den Transfektionsergebnissen bei. Sie liefern außerdem den Grundstein für weiterführende Untersuchungen zum Lipoplexaufnahmemechanismus anderer Zelltypen, wie den im Screening eingesetzten schwer zu transfizierenden HUVEC, um die Mechanismen der Lipofektion aufzuklären.

4 Literatur

- [1] R.C. Adami, W.T. Collard, S.A. Gupta, K.Y. Kwok, J. Bonadio, K.G. Rice, Stability of peptide-condensed plasmid DNA formulations. **J. Pharm. Sci.** 87 (1998) 678-683
- [2] E.W. Alton, M. Stern, R. Farley, A. Jaffe, S.L. Chadwick, J. Phillips, J. Davies, S.N. Smith, J. Browning, M.G. Davies, M.E. Hodson, S.R. Durham, D. Li, P.K. Jeffery, M. Scallan, R. Balfour, S.J. Eastman, S.H. Cheng, A.E. Smith, D. Meeker, D.M. Geddes. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis. A double-blind placebo-controlled trial. **Lancet** 353 (1999) 947-954
- [3] R.P. Balasubramaniam, M.J. Bennett, A.M. Aberle, J.G. Malone, M.H. Nantz, R.W. Malone, Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain. **Gene Ther.** 3 (1996) 163-172
- [4] B.J. Battersby, R. Grimm, S. Hübner, G. Cevc, Evidence for three-dimensional interlayer correlations in cationic lipid-DNA complexes as observed by cryo-electron microscopy. **Biochim. Biophys. Acta** 1372 (1998) 379-383
- [5] J.-P. Behr, B.A. Demeneix, J.-P. Loeffler, J. Perez-Mutul, Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86 (1989) 6982-6986
- [6] M.V. Berridge, A.S. Tan, K.D. McCoy, R. Wang, The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Roche-Biochemica** 4 (1996) 15-19
- [7] S. Bhattacharya, S. Haldar, The effects of cholesterol inclusion on the vesicular membranes of cationic lipids, **Biochim. Biophys. Acta** 1283 (1996) 21-30
- [8] J.C. Birchall, I.W. Kellaway, S.N. Mills, Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes. **Int. J. Pharm.** 183 (1999) 195-207
- [9] M. Boshart, F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein, W. Schaffner, A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. **Cell** 41 (1985) 521-530
- [10] T. Bouknikachvili, O. Aguerre-Chariol, M. Airiau, S. Lesieur, M. Ollivon, J. Vacus, Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes. **FEBS Lett.** 409 (1997) 188-194
- [11] O. Boussif, M.A. Zanta, J.-P. Behr, Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. **Gene Ther.** 3 (1996) 1074-1080
- [12] I. Bronstein, J. Fortin, P.E. Stanley, G.S.A.B. Stewart, L.J. Kricka, Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **Anal. Biochem.** 219 (1994) 169-181
- [13] B. Buchberger, E. Fernholz, H. v.d. Eltz, M. Hinzpeter, DOSPER liposomal transfection reagent: a reagent with unique transfection properties. **Boehringer Mannheim-Biochemica** 98 (1996) 27-29
- [14] M.R. Capecchi, High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. **Cell** 22 (1980) 479-488
- [15] N.J. Caplen, E.W.F.W. Alton, P.G. Middleton, J.R. Dorin, B.J. Stevenson, X. Gao, S.R. Durham, P.K. Jeffery, M.E. Hodson, C. Coutelle, L. Huang, D.J. Porteous, R. Williamson, D.M. Geddes, Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. **Nat. Med.** 1 (1995) 39-46
- [16] S.L. Chadwick, H.D. Kingston, M. Stern, R.M. Cook, B.J. O'Connor, M. Lukasson, R.P. Balfour, M. Rosenberg, S.H. Cheng, A.E. Smith, D.P. Meeker, D.M. Geddes, E.W.F.W. Alton, Safety of a single aerosole administration of escalating doses of the cationic lipid GL-67/DOPE/DMPE-PEG5000 formulation to the lungs of normal volunteers. **Gene Ther.** 4 (1997) 937-942
- [17] K. Chida, R. Sueyoshi, T. Kuroki, Efficient and stable gene transfer following microinjection into nuclei of synchronized animal cells progressing from G1/S boundary to early S phase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 249 (1998) 849-852
- [18] Q. Chu, J.D. Tousignant, S. Fang, C. Jing, L.H. Chen, S.H. Cheng, R.K. Scheule, S.J. Eastman, Binding and uptake of cationic lipid:pDNA complexes by polarized airway epithelial cells. **Hum. Gene Ther.** 10 (1999) 25-36

- [19] G.L. Clayman, A.K. el-Naggar, S.M. Lippman, Y.C. Henderson, M. Frederick, J.A. Merritt, L.A. Zumstein, T.M. Simmons, T.J. Liu, L. Ginsberg, J.A. Roth, W.K. Hong, P. Bruso, H. Goepfert, Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.** 16 (1998) 2221-2232
- [20] G.L. Clayman, D.K. Frank, P.A. Bruso, H. Goepfert, Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancer. **Clin. Cancer Res.** 5 (1999) 1715-1722
- [21] A.H. Conrad, M.A. Behlke, T. Jaffredo, G.W. Conrad, Optimal lipofection reagent varies with the molecular modifications of the DNA. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev.** 8 (1998) 427-434
- [22] K. Crook, B.J. Stevenson, M. Dubouchet, D.J. Porteous, Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum. **Gene Ther.** 5 (1998) 137-143
- [23] A.B. Cubitt, R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross, R.Y. Tsien, Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends Biochem. Sci.** 20 (1995) 228-255
- [24] N. Dan, The structure of DNA complexes with cationic liposomes - cylindrical or flat bilayers? **Biochim. Biophys. Acta** 1369 (1998) 34-38
- [25] E. Dodds, M.G. Dunckley, K. Naujoks, U. Michaelis, G. Dickson, Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. **Gene Ther.** 5 (1998) 542-551
- [26] E. Dodds, T.A. Piper, S.J. Murphy, G. Dickinson, Cationic lipids and polymers are able to enhance adenoviral infection of cultured mouse myotubes. **J. Neurochem.** 72 (1999) 2105-2112
- [27] R.F. Doll, J.E. Crandall, C.A. Dyer, J.M. Aucoin, F.I. Smith, Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. **Gene Ther.** 3 (1996) 437-447
- [28] J.Y. Dong, D. Wang, F.W. Van Ginkel, D.W. Pascual, R.A. Frizzell, Systematic analysis of repeated gene delivery into animal lungs with a recombinant adenovirus vector. **Hum. Gene Ther.** 7 (1996) 319-331
- [29] D.D. Dunlap, A. Maggi, M.R. Soria, L. Monaco, Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. **Nucleic Acids Res.** 25 (1997) 3095-3101
- [30] V. Escriou, C. Ciolina, A. Helbling-Leclerc, P. Wils, D. Scherman, Cationic lipid-mediated gene transfer: Analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. **Cell Biol. Toxicol.** 14 (1998) 95-104
- [31] V. Escriou, C. Ciolina, F. Lacroix, G. Byk, D. Scherman, P. Wils, Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. **Biochim. Biophys. Acta** 1368 (1998) 276-288
- [32] A. Farhood, N. Serbina, L. Huang, The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **Biochim. Biophys. Acta** 1235 (1995) 289-295
- [33] A. Fasbender, J. Marshall, T.O. Moninger, T. Grunst, S. Cheng, M.J. Welsh, Effects of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. **Gene Ther.** 4 (1997) 716-725
- [34] A. Fasbender, J. Zabner, B.G. Zeiher, M.J. Welsh, A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. **Gene Ther.** 4 (1997) 1173-1180
- [35] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wentz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84 (1987) 7413-7417
- [36] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P.L. Felgner, Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **J. Biol. Chem.** 269 (1994) 2550-2561
- [37] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.-P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F.C. Szoka Jr., A.R. Thierry, E. Wagner, G. Wu, Nomenclature for synthetic gene delivery systems (Editorial). **Hum. Gene Ther.** 8 (1997) 511-512
- [38] T. Fichert, Neue kationische Lipide für den Gentransfer. Untersuchungen zum Einfluss von systematischen Strukturvariationen auf die lipidvermittelte Transfektion. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2000
- [39] T. Fichert, A. Regelin, U. Massing, Synthesis and transfection properties of novel non-toxic monocationic lipids. Variation of lipid anchor, spacer and head group structure. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 10 (2000) 787-791

- [40] M.K. Foecking, H. Hofstetter, Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. **Gene** 45 (1986) 101-105
- [41] S.R. Ford, M.S. Hall, F.R. Leach, Enhancement of firefly luciferase activity by cytidine nucleotides. **Anal. Biochem.** 204 (1992) 283-291
- [42] E. Fortunati, A. Bout, M.A. Zanta, D. Valerio, M. Scarpa, In vitro and in vivo gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 1306 (1996) 55-62
- [43] S.J. Freedland, R.W. Malone, H.M. Borchers, Z. Zadourian, J.G. Malone, M.J. Bennett, M.H. Nantz, J.-H. Li, P.H. Gumerlock, K.L. Erickson, Toxicity of cationic lipid-ribozyme complexes in human prostate tumor cells can mimic ribozyme activity. **Biochem. Mol. Med.** 59 (1996) 144-153
- [44] B.D. Freemark, H.P. Blezinger, V.J. Florack, J.L. Nordstrom, S.D. Long, D.S. Deshpande, S. Nochumson, K.L. Petrak, Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid:cationic lipid complexes. **J. Immunol.** 160 (1998) 4580-4586
- [45] T. Friedmann, R. Roblin, Gene therapy for human genetic disease. **Science** 175 (1972) 949-955
- [46] T. Friedmann, Gentherapie: Viren als Vehikel. **Spektrum der Wissenschaft** 10 (1997) 50-55
- [47] D.S. Friend, D. Papahadjopoulos, R.J. Debs, Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 1278 (1996) 41-50
- [48] J.D. Fritz, H. Herweijer, G. Zhang, J.A. Wolff, Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. **Hum. Gene Ther.** 7 (1996) 1395-1404
- [49] X. Gao, L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 179 (1991) 280-285
- [50] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman, A. Minsky, Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. **Biochemistry** 32 (1993) 7143-7151
- [51] Y. Gluzman, SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. **Cell** 23 (1981) 175-182
- [52] C. Godon, M. Caboche, F. Daniel-Vedel, Transient plant gene expression: a simple and reproducible method based on flowing particle gun. **Biochimie** 75 (1993) 591-593
- [53] P.C. Gokhale, V. Soldatenkov, F.-H. Wang, A. Rahman, A. Dritschilo, U. Kasid, Antisense raf oligodeoxynucleotide is protected by liposomal encapsulation and inhibits Raf-1 protein expression in vitro and in vivo: implication for gene therapy of radioresistant cancer. **Gene Ther.** 4 (1997) 1289-1299
- [54] C.M. Gorman, L.F. Moffat, B.H. Howard, Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. **Mol. Cell Biol.** 2 (1982) 1044-1051
- [55] C.M. Gorman, M. Aikawa, B. Fox, E. Fox, C. Lapuz, B. Michaud, H. Nguyen, E. Roche, T. Sawa, J.P. Wiener-Kronish, Efficient in vivo delivery of DNA to pulmonary cells using the novel lipid EDMPC. **Gene Ther.** 4 (1997) 983-992
- [56] T. Griffiths, M. Russell, K. Froning, B.D. Brown, S.M. Scanlon, M. Almazan, R. Marcil, J.P. Hoeffler, The PerFect™ lipid optimizer kit for maximizing lipid-mediated transfection of eukaryotic cells. **BioTechniques** 5 (1997) 982-987
- [57] D. Groth, O. Keil, C. Lehmann, M. Schneider, M. Rudolph, R. Reszka, Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell-lines. **Int. J. Pharm.** 162 (1998) 143-157
- [58] D. Groth, O. Keil, M. Schneider, R. Reszka, Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. **Anal. Biochem.** 258 (1998) 141-143
- [59] J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson, M. Almgren, Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. **Biochim. Biophys. Acta** 1253 (1995) 305-312
- [60] A. Helbling-Leclerc, D. Scherman, P. Wils, Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes. **Biochim. Biophys. Acta** 1418 (1999) 165-175
- [61] D. Hirsch-Lerner, Y. Barenholz, Probing DNA-cationic lipid interactions with the fluorophore trimethylammonium diphenyl-hexatriene (TMADPH). **Biochim. Biophys. Acta** 1370 (1998) 17-30
- [62] H.E.J. Hofland, L. Shephard, S.M. Sullivan, Formation of stable cationic lipid/DNA complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93 (1996) 7305-7309
- [63] H.E.J. Hofland, D. Nagy, J.-J. Liu, K. Spratt, Y.-L. Lee, O. Danos, S.M. Sullivan, In vivo gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex. **Pharm. Res.** 14 (1997) 742-749

- [64] M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. **Biol. Pharm. Bull.** 19 (1996) 1518-1520
- [65] W.B. Jakoby, I.H. Pastan (Hrsg.), Cell Culture: Methods in Enzymology 58. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1988
- [66] C. Jiang, S.P. O'Connor, S.L. Fang, K.X. Wang, J. Marshall, J.L. Williams, B. Wilburn, Y. Echelard, S.H. Cheng, Efficiency of cationic lipid-mediated transfection of polarized and differentiated airway epithelial cells in vitro and in vivo. **Hum. Gene Ther.** 9 (1998) 1531-1542
- [67] K. Karikó, A. Kuo, E.S. Barnathan, D.J. Langer, Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. **Biochim. Biophys. Acta** 1369 (1998) 320-334
- [68] H. Keller, C. Yunxu, G. Marit, M. Pla, J. Reiffers, J. Thèze, P. Froussard, Transgene expression but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells. **Gene Ther.** 6 (1999) 931-938
- [69] M.-C. Keogh, D. Chen, F. Lupu, N. Shaper, J.F. Schmitt, V.V. Kakkar, N.R. Lemoine, High efficiency reporter gene transfection of vascular tissue in vitro and in vivo using a cationic lipid-DNA complex. **Gene Ther.** 4 (1997) 162-171
- [70] A. Kichler, K. Mechtler, J.-P. Behr, E. Wagner, Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. **Bioconjug. Chem.** 8 (1997) 213-221
- [71] A. Kichler, W. Zauner, M. Ogris, E. Wagner, Influence of DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA particles. **Gene Ther.** 5 (1998) 855-860
- [72] C. Kitson, B. Angel, D. Judd, S. Rothery, N.J. Severs, A. Dewar, L. Huang, S.C. Wadsworth, S.H. Cheng, D.M. Geddes, E.W.F.W. Alton, The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep epithelium. **Gene Ther.** 6 (1999) 534-540
- [73] I. Koltover, T. Salditt, J.O. Rädler, C.R. Safinya, An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science** 281 (1998) 78-81
- [74] K. Konopka, E. Pretzer, P.L. Felgner, N. Düzgünes, Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 1312 (1996) 186-196
- [75] R. Kronenwett, U. Steidl, M. Kirsch, G. Sczakiel, R. Haas, Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. **Blood** 91 (1998) 852-862
- [76] J.F. Kukowska-Latallo, A.U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D.A. Tomalia, J.R. Baker Jr., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93 (1996) 4897-4902
- [77] K. Kunzelmann, E.M. Schwiebert, P.L. Zeitlin, W.L. Kuo, B.A. Stanton, D.C. Gruenert, An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.** 8 (1993) 522-529
- [78] F. Labat-Moleur, A.-M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Fürstenberger, F. Oberling, E. Brambilla, J.-P. Behr, An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. **Gene Ther.** 3 (1996) 1010-1017
- [79] D.D. Lasic, H. Strey, M.C.A. Stuart, R. Podgornik, P.M. Frederik, The structure of DNA-liposome complexes. **J. Am. Chem. Soc.** 119 (1997) 832-833
- [80] D. Lechardeur, K.-J. Sohn, M. Haardt, P.B. Joshi, M. Monck, R.W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich, G.L. Lukacs, Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. **Gene Ther.** 6 (1999) 482-497
- [81] K.-D. Lee, S. Nir, D. Papahadjopoulos, Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: Rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. **Biochemistry** 32 (1993) 889-899
- [82] R. Leventis, J.R. Silvius, Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. **Biochim. Biophys. Acta** 1023 (1990) 124-132
- [83] L.H. Li, S.W. Hui, The effect of lipid molecular packing stress on cationic liposome-induced rabbit erythrocyte fusion. **Biochim. Biophys. Acta** 1323 (1997) 105-116

- [84] S. Li, M.A. Rizzo, S. Bhattacharya, L. Huang, Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. **Gene Ther.** 5 (1998) 930-937
- [85] S. Li, W.-C. Tseng, D. Beer Stolz, S.-P. Wu, S.C. Watkins, L. Huang, Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. **Gene Ther.** 6 (1999) 585-594
- [86] S. Li, S.-P. Wu, M. Whitmore, E.J. Loeffert, L. Wang, S.C. Watkins, B.R. Pitt, L. Huang, Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. **Am. J. Physiol.** 276 (1999) 796-804
- [87] J.F. Liao, J.P. Perkins, Differential effects of antimycin A on endocytosis and exocytosis of transferrin also are observed for internalization of beta-adrenergic receptors. **Mol. Pharmacol.** 44 (1993) 364-370
- [88] K. Lim, C.B. Chae, A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase. **BioTechniques** 7 (1989) 576-579
- [89] T. Lindl, J. Bauer, Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Fischer, Stuttgart, 2. Aufl. 1989
- [90] S. Liptay, H. Weidenbach, G. Adler, R.M. Schmid, Colon epithelium can be transiently transfected with liposomes, calcium phosphate precipitation and DEAE dextran in vivo. **Digestion** 59 (1998) 142-147
- [91] D.C. Litzinger, L. Huang, Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. **Biochim. Biophys. Acta** 1113 (1992) 201-227
- [92] F. Liu, H. Qi, L. Huang, D. Liu, Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. **Gene Ther.** 4 (1997) 517-523
- [93] Y. Liu, L.C. Mounkes, H.D. Liggitt, C.S. Brown, I. Solodin, T.D. Heath, R.J. Debs, Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. **Nat. Biotechnol.** 15 (1997) 167-173
- [94] J.P. Loeffler, J.P. Behr, Gene transfer into primary and established mammalian cell-lines with lipopolyamine-coated DNA. **Methods Enzymol.** 217 (1993) 599-617
- [95] U. Massing, J.T. Kley, L. Gürtesch, S. Fankhaenel, A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids. **Chem. Phys. Lipids** 105 (2000) 189-191
- [96] H. Matsui, L.G. Johnson, S.H. Randell, R.C. Boucher, Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. **J. Biol. Chem.** 272 (1997) 1117-1126
- [97] K.E. Matthews, S.B. Dev, F. Toneguzzo, A. Keating, Electroporation for gene therapy. **Methods Mol. Biol.** 48 (1995) 273-280
- [98] K.E. Matthews, A. Keating, Bead transfection of adherent cells. Gene transfer into adherent mammalian cells using glass beads. **Mol. Biotechnol.** 5 (1996) 259-261
- [99] S. May, A. Ben-Shaul, DNA-lipid complexes: stability of honeycomb-like and spaghetti-like structures. **Biophys. J.** 73 (1997) 2427-2440
- [100] G. McLachlan, D.J. Davidson, B.J. Stevenson, P. Dickinson, H. Davidson-Smith, J.R. Dorin, D.J. Porteous, Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. **Gene Ther.** 2 (1995) 614-622
- [101] R. Moog, Einschluss von Gemcitabin (dFdC) in vesikuläre Phospholipidgele: in vivo und in vitro - Untersuchungen zur Stabilität, Pharmakokinetik und antitumoralen Wirksamkeit. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 1998
- [102] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R.W. Graham, E.G. Saravolac, P.B. Joshi, Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. **Gene Ther.** 6 (1999) 403-411
- [103] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65 (1983) 55-63
- [104] G.J. Nabel, E.G. Nabel, Z.-Y. Yang, B.A. Fox, G.F. Plautz, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon, A.E. Chang, Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90 (1993) 11307-11311
- [105] V.T. Nguyen, M. Morange, O. Bensaude, Protein denaturation during heat shock and related stress. **J. Biol. Chem.** 264 (1989) 10487-10492

- [106] T. Nomura, K. Yasuda, T. Yamada, S. Okamoto, R.I. Mahato, Y. Watanabe, Y. Takakura, M. Hashida, Gene expression and antitumor effects following direct interferon (IFN)- γ gene transfer with naked DNA and DC-CHOL liposome complexes in mice. **Gene Ther.** 6 (1999) 121-129
- [107] S. Obika, W. Yu, A. Shimoyama, T. Uneda, T. Minami, K. Miyashita, T. Doi, T. Imanishi, Properties of cationic liposomes composed of cationic lipid YKS-220 having an ester linkage: adequate stability, high transfection efficiency, and low cytotoxicity. **Biol. Pharm. Bull.** 22 (1999) 187-190
- [108] A. El Ouahabi, M. Thiry, V. Pector, R. Fuks, J.M. Ruyschaert, M. Vandenbranden, The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. **FEBS Lett.** 414 (1997) 187-192
- [109] M.C. Pedroso de Lima, S. Simões, P. Pires, R. Gaspar, V. Slepishkin, N. Düzgünes, Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. **Mol. Membr. Biol.** 16 (1999) 103-109
- [110] P. Pires, S. Simões, S. Nir, R. Gaspar, N. Düzgünes, M.C. Pedroso de Lima, Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1418 (1999) 71-84
- [111] H. Pollard, J.-S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.-P. Behr, D. Escande, Polyethyleneimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. **J. Biol. Chem.** 273 (1998) 7507-7511
- [112] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. **Gene** 111 (1992) 229-233
- [113] L. Qin, Y. Ding, D.R. Pahud, E. Chang, M.J. Imperiale, J.S. Bromberg, Promoter attenuation in gene therapy: interferon- γ and tumor necrosis factor- α inhibit transgene expression. **Hum. Gene Ther.** 8 (1997) 2019-2029
- [114] J.O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C.R. Safinya, Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science** 275 (1997) 810-814
- [115] A.E. Regelin, S. Fankhaenel, L. Gürtesch, C. Prinz, G. v. Kiedrowski, U. Massing, Biophysical and lipofection studies of DOTAP-analogs. **Biochim. Biophys. Acta**, 1464 (2000) 151-164
- [116] P.C. Ross, M.L. Hensen, R. Supabphol, S.W.Hui, Multilamellar cationic liposomes are efficient vectors for in vitro gene transfer in serum. **J. Lipos. Res.** 8 (1998) 499-520
- [117] P.C. Ross, S.W. Hui, Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. **Gene Ther.** 6 (1999) 651-659
- [118] M. Sakai, K. Ogawa, Energy-dependent lysosomal wrapping mechanism (LWM) during autophagolysosome formation. **Histochemistry** 76 (1982) 479-488
- [119] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 2. Aufl. 1989
- [120] R.K. Scheule, J.A. St. George, R.G. Bagley, J. Marshall, J.M. Kaplan, G.Y. Akita, K.X. Wang, E.R. Lee, D.J. Harris, C. Jiang, N.S. Yew, A.E. Smith, S.H. Cheng, Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. **Hum. Gene Ther.** 8 (1998) 689-707
- [121] S.L. Schmid, L.L. Carter, ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. **J. Cell Biol.** 111 (1990) 2307-2318
- [122] K. Schughart, R. Bischoff, D. Ali Hadji, O. Boussif, F. Perraud, N. Accart, U.B. Rasmussen, A. Pavirani, N. van Rooijen, H.V.J. Kolbe, Effect of liposome-encapsulated clodronate pretreatment on synthetic vector-mediated gene expression in mice. **Gene Ther.** 6 (1999) 448-453
- [123] B. Schwartz, M.-A. Ivanov, B. Pitard, V. Escriou, R. Rangara, G. Byk, P. Wils, J. Crouzet, D. Scherman, Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. **Gene Ther.** 6 (1999) 282-292
- [124] A.L. Serafino, G. Novelli, S. Di Sario, A. Colosimo, P. Amicucci, F. Sangiuolo, G. Mossa, B. Dallapiccola, Cellular uptake and delivery monitoring of liposome/DNA complexes during in vitro transfection of CFTR gene. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 47 (1999) 337-344
- [125] S.C. Silverstein, R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Endocytosis. **Ann. Rev. Biochem.** 46 (1977) 669-722

- [126] S. Simões, V. Slepishkin, R. Gaspar, M.C. Pedroso de Lima, N. Düzgünes, Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. **Gene Ther.** 5 (1998) 955-964
- [127] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** 150 (1985) 76-85
- [128] F.L. Sorgi, S. Bhattacharya, L. Huang, Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. **Gene Ther.** 4 (1997) 961-968
- [129] D.R. Staggs, D.W. Burton, L.J. Deftos, Importance of liposome complexing volume in transfection optimization. **BioTechniques** 21 (1996) 792-798
- [130] L. Stamatatos, R. Leventis, N. Zuckermann, J.R. Silvius, Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. **Biochemistry** 27 (1988) 3917-3925
- [131] T. Stegmann, Y. Legendre, Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. **Biochim. Biophys. Acta** 1325 (1997) 71-79
- [132] B. Sternberg, F.L. Sorgi, L. Huang, New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. **FEBS Lett.** 356 (1994) 361-366
- [133] B. Sternberg, K. Hong, W. Zheng, D. Papahadjopoulos, Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo. **Biochim. Biophys. Acta** 1375 (1998) 23-35
- [134] C. Stourmaras, E. Stiakaki, S.B. Koukouritaki, P.A. Theodoropoulos, M. Kalmanti, Y. Fostinis, A. Gravanis, Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. **Biochem. Pharmacol.** 52 (1996) 1339-1346
- [135] N.S. Templeton, D.D. Lasic, P.M. Frederik, H.H. Strey, D.D. Roberts, G.N. Pavlakakis, Improved liposome:DNA complexes for increased systemic delivery and gene expression. **Nat. Biotechnol.** 15 (1997) 647-652
- [136] N.S. Templeton, D.D. Roberts, B. Safer, Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. **Gene Ther.** 4 (1997) 700-709
- [137] P.A. Theodoropoulos, A. Gravanis, A. Tsapara, A.N. Margioris, E. Papadogiorgaki, V. Galanopoulos, C. Stourmaras, Cytochalasin B may shorten filaments by a mechanism independent of barbed and capping. **Biochem. Pharmacol.** 47 (1994) 1875-1881
- [138] A.R. Thierry, P. Rabinovich, B. Peng, L.C. Mahan, J.L. Bryant, R.C. Gallo, Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. **Gene Ther.** 4 (1997) 226-237
- [139] J.F. Thompson, L.S. Hayes, D.B. Lloyd, Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. **Gene** 103 (1991) 171-177
- [140] H. Tolou, Administration of oligonucleotides to cultured cells by calcium phosphate precipitation method. **Anal. Biochem.** 215 (1993) 156-158
- [141] M.P. Turunen, M.O. Hiltunen, M. Ruponen, L. Virkamäki, F.C. Szoka Jr., A. Urtti, S. Ylä-Herttuala, Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes, **Gene Ther.** 6 (1999) 6-11
- [142] J. Vacik, B.S. Dean, W.E. Zimmer, D.A. Dean, Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. **Gene Ther.** 6 (1999) 1006-1014
- [143] R.G. Vile, S.J. Russell, N.R. Lemoine, Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. **Gene Ther.** 7 (2000) 2-8
- [144] L. Vitiello, A. Chonn, J.D. Wasserman, C. Duff, R.G. Worton, Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells. **Gene Ther.** 3 (1996) 396-404
- [145] L. Vitiello, K. Bockhold, P.B. Joshi, R.G. Worton, Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC:DOPE liposomes. **Gene Ther.** 5 (1998) 1306-1313
- [146] R. Wattiaux, M. Jadot, M.T. Warnier-Pirotte, S. Wattiaux-De Coninck, Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. **FEBS Lett.** 417 (1997) 199-202

- [147] M.J. Welsh, J. Zabner, Cationic lipid mediated gene transfer of CFTR: safety of a single administration to the nasal epithelia. **Hum. Gene Ther.** 10 (1999) 1559-1572
- [148] J.R. de Wet, K.V. Wood, M. de Luca, D.R. Helinski, S. Subramani, Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** 7 (1987) 725-737
- [149] C.J. Wheeler, P.L. Felgner, Y.J. Tsai, J. Marshall, L. Sukhu, S.D. Doh, J. Hartikka, J. Nietupski, M. Manthorpe, M. Nichols, M. Plewe, X. Liang, J. Norman, A. Smith, S.H. Cheng, A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93 (1996) 11454-11459
- [150] C.J. Wheeler, L. Sukhu, G. Yang, Y. Tsai, C. Bustamente, P. Felgner, J. Norman, M. Manthorpe, Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytoskeleton complexes. **Biochim. Biophys. Acta** 1280 (1996) 1-11
- [151] C.J. Wheeler, L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R.W. Graham, Y.P. Zhang, M.J. Hope, P. Scherrer, P.R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. **Gene Ther.** 6 (1999) 271-281
- [152] M. Wilke, E. Fortunati, M. van den Broek, A.T. Hoogveen, B.J. Scholte, Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. **Gene Ther.** 3 (1996) 1133-1142
- [153] I. Wrobel, D. Collins, Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. **Biochim. Biophys. Acta** 1235 (1995) 296-304
- [154] H. Wursthorn, Untersuchungen zur Lipofektion mit kationischen Lipiden. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 1997
- [155] Y. Xu, F. Szoka Jr., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. **Biochemistry** 35 (1996) 5616-5623
- [156] Y. Xu, S.-W. Hui, P. Frederik, F.C. Szoka Jr., Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. **Biophys. J.** 77 (1999) 341-353
- [157] J.-P. Yang, L. Huang, Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. **Gene Ther.** 4 (1997) 950-960
- [158] J.-P. Yang, L. Huang, Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. **Gene Ther.** 5 (1998) 380-387
- [159] Y. Yoshikawa, N. Emi, T. Kanbe, K. Yoshikawa, H. Saito, Folding and aggregation of DNA chains induced by complexation with lipospermine: formation of a nucleosome-like structure and network assembly. **FEBS Lett.** 396 (1996) 71-76
- [160] J. You, M. Kamihira, S. Iijima, Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. **J. Biochem.** 125 (1999) 1160-1167
- [161] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. **J. Biol. Chem.** 270 (1995) 18997-19007
- [162] W. Zauner, S. Brunner, M. Buschle, M. Ogris, E. Wagner, Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. **Biochim. Biophys. Acta** 1428 (1999) 57-67
- [163] O. Zelphati, X. Liang, C. Nguyen, P.L. Felgner, Production of functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA: implication for gene delivery. **J. Lipos. Res.** 8 (1998) 132-133
- [164] O. Zelphati, C. Nguyen, M. Ferrari, J. Felgner, Y. Tsai, P.L. Felgner, Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. **Gene Ther.** 5 (1998) 1272-1282
- [165] O. Zelphati, L.S. Uyechi, L.G. Barron, F.C. Szoka Jr., Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1390 (1998) 119-133
- [166] O. Zelphati, X. Liang, P. Hobart, P.L. Felgner, Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. **Hum. Gene Ther.** 10 (1999) 15-24
- [167] D.-D. Zhao, S. Watari, J.-T. Lee, S. Kouchi, H. Ohmori, T. Yasuda, Gene transfection by cationic liposomes: comparison of the transfection efficiency of liposomes prepared from various positively charged lipids. **Acta Med. Okayama** 51 (1997) 149-154

- [168] X. Zhou, L. Huang, DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta** 1189 (1994) 195-203
- [169] Y. Zou, G. Zong, Y.H. Ling, M.M. Hao, G. Lozano, W.K. Hong, R. Perez-Soler, Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. **J. Natl. Cancer Inst.** 90 (1998) 1130-1137
- [170] N.J. Zuidam, Y. Barenholz, Electrostatic parameters of cationic liposomes commonly used for gene delivery as determined by 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin. **Biochim. Biophys. Acta** 1329 (1997) 211-222
- [171] N.J. Zuidam, Y. Barenholz, Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. **Biochim. Biophys. Acta** 1368 (1998) 115-128
- [172] N.J. Zuidam, Y. Barenholz, Characterization of DNA-lipid complexes commonly used for gene delivery. **Int. J. Pharm.** 183 (1999) 43-46