

Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und
intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen
Liposomen-DNA-Komplexen für den Gentransfer

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer nat.

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

Cathleen Lehmann, Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1. Einführung	8
1.1. Entwicklung der Gentherapie	8
1.2. Verfahren zum Gentransfer	11
1.2.1. Physikalische Verfahren	11
1.2.2. Virale Systeme	11
1.2.3. Nicht virale Systeme	14
1.2.4. Lipid-vermittelter Gentransfer	15
1.2.5. Das HVJ-Liposomen-Konzept	16
1.2.6. Virosomen	18
1.2.7. Kationische Liposomen	19
1.3. Wechselwirkungen zwischen DNA und kationischen Lipiden	20
1.4. Hypothetische Modelle zur Aufnahme und zur intrazellulären Transportroute der Partikel	21
1.5. Zielstellung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Negativ-Kontrastierung	27
2.2. Einbettung	27
2.3. Ultramikrotomie und Kontrastierung	28
2.4. DNA-Spreitung	28
2.5. Schrägbedampfung	29
2.6. Fixierung, Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung	29
2.7. Sputterung und Bedampfung der Proben	30
2.8. Röntgenmikroanalyse	30
2.9. Immunelektronenmikroskopie	31
2.10. Protein-A-Gold-Technik	31
2.11. Silberverstärkung von Goldmarkierungen	33
2.12. Messen der Bindung von kationischem Gold an der Zellmembran	33
2.13. Herstellen der Sendai-Virus-Liposomen	34
2.14. Sendai-Viren	34

2.15.	HVJ-Liposomen	35
2.16.	HVJ-Liposomen mit Phosphatidsäure	36
2.17.	Liposomen mit Gangliosid	36
2.18.	HVJ-Liposomen-Komplex	37
2.19.	Herstellung der Virosomen	37
2.20.	Präparation der Plasmid-DNA	39
2.21.	Goldmarkierung der DNA	39
2.22.	Komplexierung der DNA	40
2.23.	Präparation kationischer Liposomen	40
2.24.	Präparation kationischer Lipoplexe und Lipopolyplexe	40
2.25.	Zellkultur	41
2.26.	In vitro Gentransfer	41
2.27.	X-Gal-Färbung	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Morphologische und immunelektronenmikroskopische Charakterisierung von Sendai-Virus-Liposomen und Virosomen-DNA-Komplexen	42
3.1.1.	Morphologie von Sendai Viren	42
3.1.2.	Charakterisierung der Liposomen vor und nach der Inkubation mit Sendai Viren	44
3.1.3.	Nachweis fusogener Proteine auf den HVJ-Liposomen	45
3.1.4.	Ergebnisse aus den Transfektionsversuchen	46
3.1.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der HVJ-Liposomen	47
3.1.6.	Morphologische Charakterisierung von Virosomenpräparationen	48
3.1.7.	Nachweis fusogener Proteine auf den Virosomen	50
3.1.8.	Ergebnisse der DNA-Markierung	52
3.1.9.	Beladung der Virosomen mit DNA	52
3.1.10.	Morphologische und IEM Charakterisierung von Virosomen – Zusammenfassung der Ergebnisse	53

3.2.	Untersuchungen zu Aufnahme- und Transfektionsverhalten dieser Vesikel an unterschiedlichen Zellen	54
3.2.1.	Detektion der Virosomen auf den Zellen	54
3.2.2.	Verteilung in der Zelle	58
3.2.3.	Visualisierung viraler Proteine durch ImmunEM im Schnittbild	59
3.2.4.	Transfektion mit Virosomen	61
3.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Verteilung der Virosomen auf und in kultivierten Zellen	62
3.3.	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Struktur und Größe kationischer Liposomen-DNA-Komplexe	63
3.3.1.	Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Morphologie cholesterolhaltiger Liposomen	63
3.3.2.	Charakterisierung von Liposomen aus doppelkettigen Lipiden	67
3.3.3.	Bildung von Liposomen-DNA-Komplexen (Lipoplexen)	67
3.3.4.	Morphologie von Polyplexen	70
3.3.5.	Charakterisierung von Lipopolyplexen	72
3.3.6.	Zusammenfassung der Charakterisierung der Struktur und Größe kationischer Liposomen-DNA-Komplexe	73
3.4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Komplexe bei der Überwindung verschiedener Zellbarrieren	74
3.4.1.	Nachweis der Lipoplexe an der Plasmamembran	74
3.4.2.	Nachweis negativer Ladungen an der Zellmembran	78
3.4.3.	Aufnahme	78
3.4.4.	Intrazelluläre Verteilung der Lipoplexe	79
3.4.5.	Veränderung der Lipidstruktur	80
3.4.6.	Freisetzung aus dem Endosom	81
3.4.7.	Intrazelluläre Verteilung von DAC-Chol-Protaminsulfat–Lipopolyplexen	83
3.4.8.	Vergleichende Betrachtung von Lipoplexen und Lipopolyplexen	87
3.4.9.	Kontrollversuche mit kationischem Gold und Gold-markierter DNA	87
3.4.10.	Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus	89
3.4.11.	Überwindung zellulärer Barrieren – Zusammenfassung	92

4.	Diskussion	93
4.1.	HVJ-Liposomen und Virosomen	93
4.2.	Charakterisierung der Struktur und Größe von kationischen Liposomen- und DNA-Komplexen	96
4.2.1.	Liposomen	96
4.2.2.	Lipoplexe	97
4.2.3.	Polyplexe und Lipopolyplexe	99
4.3.	Untersuchung der Komplexe bei der Überwindung der zellulären Barrieren	101
4.3.1.	Bindung	101
4.3.2.	Aufnahme	102
4.3.3.	Verteilung der Endosomen in den Zellen	104
4.3.4.	Veränderung der Lipoplexe in den Endosomen	105
4.3.5.	Freisetzung aus dem Endosom	106
4.3.6.	Eintritt der DNA in den Kern	107
5.	Zusammenfassung	110
6.	Summary	112
	Literaturverzeichnis	113

Abkürzungen

Ak	Antikörper
AM	Ammoniummolybdat
AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
AVE	artificial virus envelope
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Chol	Cholesterol
DAC-Chol	3 β [N-(N,N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DC-Chol	3 β [N-(N',N'-dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DCQ-Chol	Ethylendiamin-[N-(Carboxycholesteryl)-N',N'-dimethyl-N'-(2-hydroxyethyl)-ammonium]bromid
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium
DOCSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(N5-carbamoyl-spermine)-propan
DOPC	1,2-Dioleoylphosphatidylcholin
DOPE	1,2-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSGA	N-Amidino- β -alanin-[2-(1,3-dioleoyloxy)propyl]amid-hydrochlorid
EM	Elektronenmikroskopie
F	Fusions-Protein des Sendai Virus
FKS	Fötales Kälberserum
HN	Hämagglutinin/Neuraminidase- Protein des Sendai Virus
HMG1	high mobility group 1- Protein
HVJ	(Hemagglutinating Virus of Japan) Sendai Virus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
Ig	Immunglobulin
kbp	Kilobasenpaare
L-Protein	Large Protein des Sendai Virus
LacZ	β -Lactamase-Gen für das Enzym β -Galaktosidase
M-Protein	Matrixprotein des Sendai Virus
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	modifiziertes Eagle`s Medium
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin

PE	Phosphatidylethanolamin
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
PS	Protaminsulfat
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut(-Medium)
RT	Raumtemperatur
Sp-Chol	Dicarbobenzoxy spermin- Carbamoyl-Cholesterol
SpPutChol-	N-(Carboxycholesteryl)-N'-(L-6-carboxyspermyl)-1,4-diaminobutan tetrahydrochlorid
SPOESL	N ⁵ -(Estra-3-oxycarbonyl-17-ol)-spermin-
TK	Thymidinkinase
UA	Uranylacetat
Vergr.	Vergrößerung
w/w	weight/weight =Gewichtsverhältnis
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

1. Einführung

1.1. Entwicklung der Gentherapie

Der Gentransfer- das Einbringen von Genen in Zellen- ist zweifelsfrei zu einer innovativen Technik geworden. Er wurde in den letzten Jahren auch zu einer wichtigen ökonomischen Komponente, z.B. durch den Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen in der Nahrungsmittelproduktion, Mikroorganismen (z.B. Öl-abbauende Bakterien) sowie Zellen in Bioreaktoren oder transgenen Tieren zur Produktion pharmazeutisch wirksamer Proteine.

Weitere Anwendungen des Gentransfers haben zu einer Vielzahl von Methoden und Techniken geführt. In der Zellbiologie ermöglicht der Gentransfer das Studium von Gen- und Proteinfunktionen sowie deren Regulationen einerseits und die gezielte Veränderung von Zellen durch neue Gene andererseits.

Die Anwendungen des Gentransfers im humanen Bereich führten letztlich zur Entwicklung der Gentherapie. Hinter dem Begriff "Gentherapie" verbirgt sich die Idee, durch ein gezieltes Einbringen ausgewählter therapeutischer Gene in erkrankte Körperzellen, Patienten zu heilen (Anderson, 1997).

Dabei unterscheidet man zwischen somatischer und der Keimbahn-Therapie. Während die Keimbahn-Therapie beim Menschen aus ethischen Aspekten in Deutschland gegenwärtig verboten ist, findet die somatische Therapie in einer Vielzahl von Ländern z.B. den USA, England, Deutschland bereits ihre Anwendung besonders in der Krebstherapie.

Erste hypothetische Konzepte zur Gentherapie wurden bereits in den 60er und 70er Jahren vorgestellt (Friedmann, T. and Roblin, R., 1972; Tatum, E.L., 1966). Als Ziel der Gentherapie wurde anfangs die Behandlung von Erbkrankheiten definiert (Rüger, R., 1997). Bisher sind mehr als 4000 verschiedene Krankheitsbilder bekannt, die auf angeborene Defekte einzelner oder mehrere Gene z.B. Mucoviszidose oder fam. Hypercholesterinämie beruhen.

Die Anwendung neuer molekularbiologischer Techniken führte zur Identifizierung genetischer Komponenten in einigen multifaktoriellen Krankheiten, wie Herz- Kreislaufkrankungen, Diabetes u.a.. Schließlich wurden Krebserkrankungen zu den wichtigsten Zielen in der Gentherapie. Dies liegt am meist bösartigen Charakter der Erkrankung sowie an den wachsenden Erkenntnissen über die Mechanismen der Onkogene (Friedmann, T. and Motulsky, A.G., 1999). Einen neuen und vielversprechenden Ansatz zum besseren Verständnis von Herzerkrankungen bietet die molekulare Kardiologie. Die Gentherapie in der Kardiologie konzentriert sich vor allem auf die Angiogenese, Restenose (Tanner, 1999), Gefäßneubildung nach Herzinfarkt, Muskelneubildung bei der Herzmuskelschwäche, Beeinflussung der Fettstoffwechselstörungen und Entwicklung neuer Medikamente (Herzzentrum Völklingen/ Saar, 2001).



Abb. 1: Einsatz der Gentherapie bei verschiedenen Erkrankungen (gemessen in klinischen Protokollen) nach <http://www.wiley.co.uk>, 2001 punktuell verändert

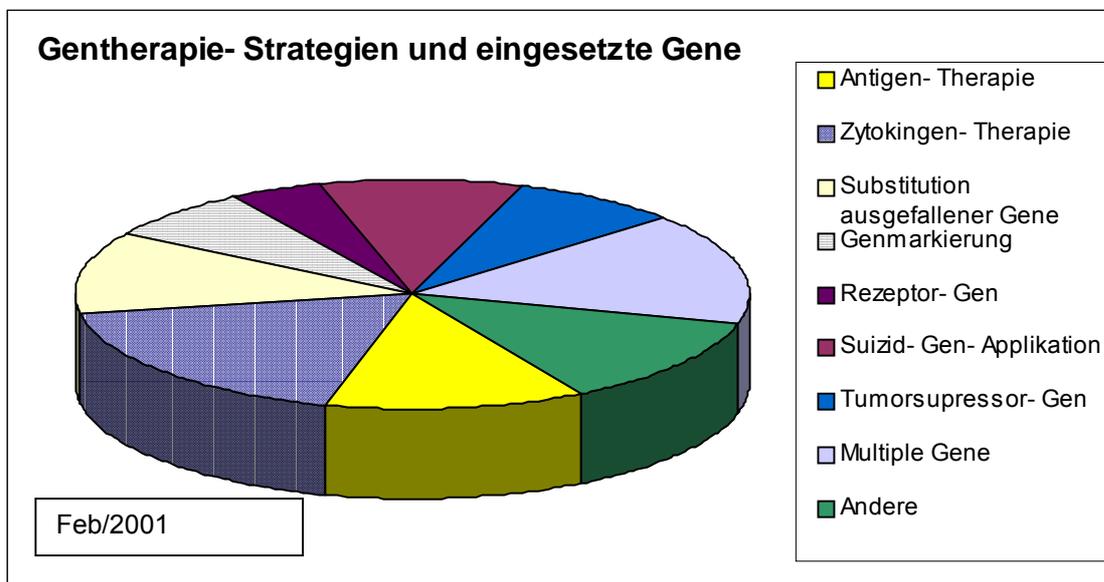


Abb. 2: Arten der Gentherapie (gemessen in klinischen Protokollen) nach <http://www.wiley.co.uk>, 2001, punktuell verändert

Einen weiteren Aufschwung erhält die Gentherapie durch die Erforschung des menschlichen Genoms. Das Ziel der Bemühungen um die Entzifferung des menschlichen Genoms formulierte einer der führenden Wissenschaftler so: "Wenn wir das menschliche Genom erst durchschauen... (wird) das Zeitalter einer individualisierten Medizin anbrechen" (Brown, K., 2000). Der Wettlauf um dessen Entzifferung wurde im Juni 2000 offiziell für beendet erklärt. Trotzdem wird es noch weitere Jahrzehnte dauern, bis die eigentliche Funktion der Gene und Proteine erforscht ist.

Nicht zuletzt wird auch die Gentherapie von diesen Daten profitieren. Molekularbiologen fanden bisher in Brustkrebszellen 277 Gene, die in keinem weiteren Gewebe aktiviert sind (Ezzel, 2000). Dies ermöglicht neue, auch gentherapeutische Ansätze. Einige experimentelle Gentherapien sind in Abbildung 2 aufgeführt.

Ein Ansatz besteht z.B. darin, in die entarteten Zellen Gene für toxische Moleküle einzubringen. Wird ein solches Gen exprimiert, geht die Zelle zugrunde. Bei der Suizidtherapie exprimieren die transfizierten Tumorzellen Proteine, die aus nebenwirkungsarmen Medikamenten toxische Abkömmlinge metabolisieren (Brand und Strauß, 1997; Narita et al., 2001). Andere Konzepte suchen gewisse Krebsmutationen zu korrigieren oder zu kompensieren. Ein Großteil der Studien befasst sich mit Mechanismen der Immuntherapie (Antikörper- und Zytokingentherapie) mit dem Ziel das Immunsystem zu einer effizienten Immunantwort gegen die Tumorzellen zu mobilisieren (Blaese, 1997; Miyata et al., 2001).

Die Übertragung von genetischem Material steht im Mittelpunkt des Gentransfers. Die dazu genutzten Transfersysteme haben zum Ziel, genetisches Material (DNA oder RNA) in Zellen einzubringen und die transferierten Gene zur Expression zu bringen (Rüger, 1997). Für diesen Transfer sind spezielle Transportsysteme notwendig. Diese müssen die DNA verpacken und aufnehmen, einen Schutz vor mechanischen und enzymatischen Einflüssen bieten und letztendlich effizient in die Zielzellen gelangen.

Dabei sollten sie keine oder kaum Nebenwirkungen zeigen, keine oder kaum Immunreaktionen hervorrufen, nicht toxisch wirken, biologisch abbaubar sein und zell- oder organspezifisch wirken. Außerdem sollte die Expression der transferierten Gene regulierbar sein (Rüger, 1997).

Zum Transfer wurden in der letzten Dekade unterschiedliche Techniken entwickelt. So lassen sich Nucleinsäuren mit Hilfe von Viren, viralen Proteinen, Polymeren oder Lipiden in die Zellen schleusen. Grundsätzlich findet man eine Einteilung dieser Verfahren in physikalische, virale und nicht virale Systeme (Tab. 1).

1.2. Verfahren zum Gentransfer

1.2.1. Physikalische Verfahren

Seit 1982 wird die Elektroporation für den Gentransfer genutzt (Neumann et al., 1982). Dabei werden die in Suspension gehaltenen Zellen einem Spannungsfeld ausgesetzt. Dies bewirkt eine kurzzeitige Öffnung der Zellmembran durch die die Komplexe aufgenommen werden. Die Effizienz kann je nach Zelltyp bis zu 90 % betragen (Rüger, 1997; Tuting, 1999).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Mikroinjektion, wobei die DNA ins Zytoplasma einzelner Zellen injiziert wird. Beide Verfahren werden vor allem im Labor bzw. ex vivo angewendet (Strauss und Brand, 1997). Ferner wurde der Transfer von Nukleinsäuren mit speziellen Impfpistolen und der Beschuß von Zellen und Geweben mit DNA-beschichteten Mikropartikeln (Gene gun) erprobt (Rüger, 1997; Dileo et al., 2003).

Nachteilig wirkt sich bei diesen Verfahren aus, dass nur eine geringe Zahl von Zellen getroffen wird bzw. die Verfahren nur im Labor unter ex vivo Bedingungen einsetzbar sind.

1.2.2. Virale Systeme

Viren existieren seit einigen Millionen Jahren. Es sind kleinste Partikel, die genetisches Material enthalten. Ihre Fortpflanzung setzt den Transfer des viralen Genoms in passende Wirtszellen voraus. Anschließend werden die zellulären Funktionen zur Transkription und Translation viraler Gene benutzt, um neue Viruspartikel zu erzeugen (Alberts et. al, 1994). Für den erfolgreichen Transfer des genetischen Materials sind Viren gut geeignet, denn sie besitzen natürliche Voraussetzungen, um

- an die Zielzelle anzudocken
- über Fusion oder Endozytose in die Zellen zu gelangen
- sich vor abbauenden Enzymen (Nukleasen) im Zytoplasma zu schützen
- sich im Plasma zu vermehren oder in den Zellkern zu gelangen
- das eigene genetische Material in die Wirts-DNA zu integrieren und die Produktion von Proteinen zu veranlassen.

Um Viren als Vektoren nutzen zu können, wird ein Teil der genetischen Information, der für die Replikationsfähigkeit in der Zielzelle sowie die Infektiosität verantwortlich ist, gegen ein Marker- oder Therapie-Gen ausgetauscht. Gleichzeitig soll auf diese Weise die unkontrollierte Ausbreitung im Organismus unterbunden werden.

Besondere Bedeutung haben retrovirale Vektoren erlangt. Retroviren sind ubiquitär verbreitet und zählen sowohl Vertebraten als auch Invertebraten zu ihren natürlichen Wirten (Weiss et al., 1985).

Retrovirale Vektoren wurden in 2/3 aller klinischen Studien eingesetzt (Brand und Strauss, 1997). Sie können fremde DNA-Sequenzen bis zu 8 kbp aufnehmen, ins Wirtszellgenom integrieren und ermöglichen daher eine Langzeitexpression (Brand und Strauss, 1997). Allerdings können nur sich teilende Zellen transfiziert werden. Außerdem wirkt sich nachteilig aus, dass die eingeschleuste DNA an beliebigen Stellen im Wirtsgenom integriert. Dadurch können chromosomale Gene in ihrer Funktion gestört oder verändert werden, wobei letztlich die Gefahr besteht, dass dadurch die Entwicklung von Tumoren gefördert wird.

Adenoviren werden als Alternative zu retroviralem Gentransfer verwendet. Sie infizieren leicht menschliche Zellen und rufen normalerweise Infektionen der Atemwege hervor. Sie können ähnlich wie Retroviren leicht ein therapeutisches Gen aufnehmen und ihre Fracht in den Zellkern transportieren. Allerdings wird die Nukleinsäure dort nicht ins Wirtsgenom eingebaut, so dass sie nur vorübergehend aktiv ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass ein Großteil der Bevölkerung mit Adenoviren infiziert ist, so dass eine gentherapeutische Anwendung zu einer heftigen Immunantwort führen kann (Rüger, 1997). Auf Grund ihrer guten Transfektionseigenschaften haben Adenoviren große Bedeutung bei der experimentellen Gentherapie erlangt. Allerdings zeigt der Todesfall eines Patienten nach adenoviraler Gentherapie (Lehmann, 1999), dass virale Vektoren noch nicht sicher und einfach zu handhaben sind. Durch Kombination mit kationischen Lipiden können adenovirale Vektoren modifiziert werden (Ma et al., 2002)

Weiterhin werden adeno-assoziierte Viren getestet. Sie gelten als nicht humanpathogen, bauen aber Gene in die Wirtschromosomen ein. Nachteilig wirkt sich auch die geringe Größe der Viren aus, die die Aufnahmekapazität für Fremdgene (4,7 kbp) erheblich einschränkt (Brand und Strauss, 1997). Ein zehnfach größeres Potential um Fremdgene aufzunehmen, zeichnen Herpes-Viren aus (Brand und Strauss, 1997). Außerdem können sie fast alle menschlichen Zellen infizieren. Ihre Anwendung wird vor allem durch ihre starke Zytotoxizität limitiert (Huard et. al, 1995). Auch Vakziniaviren werden getestet, die immerhin 25 kbp Fremd-DNA aufnehmen können.

Neben den bisher beschriebenen viralen Systemen haben auch Sindbis- und Sendai Viren Bedeutung erlangt. Letztere sind in Zellkulturen nur mäßig pathogen, haben eine weite Palette an Wirtszellen und erreichen eine hohe Anzahl Kopien in Zellen. Die Geschwindigkeit der Replikation ist umgekehrt proportional zur Genlänge, wobei Konstrukte zwischen 0,4 und 3,2 kbp eingefügt werden können. Sendai Viren dienen nicht nur als Vektoren (Yonemitsu et al., 2000; Shoji et al., 2003), sondern auch zur Herstellung fusogener Liposomen und Virosomen (Sakai et al., 1999). Sendai Viren fusionieren sowohl mit Liposomen als auch mit Zellmembranen bei neutralem pH-Wert. Bei der Fusion entlassen sie ihren Inhalt direkt ins Zytoplasma und umgehen dadurch Degradierungen durch Endosomen.

Die am häufigsten diskutierten Nachteile viraler Vektoren sind auftretende Immunreaktionen, die mehrfache Applikationen verhindern, sowie Sicherheitsaspekte bei der Herstellung und Anwendung der Vektoren. Als Vorteile gelten vor allem die hohe Transfektionseffizienz viraler Vektoren.

	Vorteile	Nachteile	Anwendungen
Retrovirus (38,3 %)	hohe Transfektionsrate stabile Expression transfiziert nur sich teilende Zellen	immunogen limitiert durch geringe Größe einzufügender Gene teure und komplizierte Präparation	Krebs AIDS
Adenovirus (25,6 %)	erreicht fast alle Zelltypen hohe Transfektionsrate	hoch immunogen transiente Expression enthalten virale Gene	Krebs Mucoviszidose Muskeldystrophie
Liposomen (12,8 %)	leichte Präparation nicht immunogen leicht zu variieren große DNA-Abschnitte transportierbar	kurzzeitige Genexpression, meist niedriger als bei viralen Vektoren	Haut Endothelzellen
nackte DNA (8,5 %)	leicht in großen Mengen zu präparieren	ineffiziente Aufnahme (Ausnahme: Muskel)	Haut Muskel
Pox-Virus (6,4 %)	hohe Transfektionsrate große DNA-Abschnitte integrierbar	hoch immunogen	lokale Anwendungen
Adeno- assoziierte Viren (1,9 %)	transfizieren auch sich nicht teilende Zellen galten bisher als nicht humanpathogen	limitiert durch geringe Größe einzufügender Gene	ähnlich Adenoviren
Herpes simplex Virus (0,6 %)	hohe Virustiter große DNA-Fragmente integrierbar	immunogen zytotoxisch	neurologische Erkrankungen

Tab.1: Übersicht über Vektoren in der Gentherapie, geordnet nach ihren Anwendungen in klinischen Protokollen (Stand Feb. 2001) nach <http://www.wiley.co.uk>, 2001 und Orkin and Motulsky., 1995

1.2.3. Nicht virale Systeme

Obwohl synthetische Vektoren später als virale zum Gentransfer verwendet wurden, ist die Zahl der Anwendungen steigend. Dies spiegelt sich unter anderem auch in der Publikationsrate wieder. Gab es 1987 bei synthetischen Gentransfermethoden weniger als 10 Publikationen, so stiegen sie innerhalb von 10 Jahren auf ca. 120 Artikel/ Jahr (Felgner et al., 1999).

Synthetische Vektoren sind künstlich hergestellte Substanzen, die auf Grund ihrer mehrfach positiven Ladung DNA binden können. Zu den synthetischen Vektoren zählen

- Polymere
- Peptide
- Proteine
- Lipide.

DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) war eines der ersten synthetischen Polymere, die verwendet wurden, um Zellen zu transfizieren (Vaheri, 1965). Vor allem in vitro können auf diese Art hohe Transfereffizienzen erreicht werden. Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Zelltoxizität.

Graham und Eb (1973) entdeckten die Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation. Die negativ geladene DNA wird mit Kalziumionen ausgefällt. Die dabei entstehenden Komplexe werden von der Zelle aufgenommen (Felgner, 1999; Batard et al. 2001)

Es werden auch hochverzweigte sphärische Polymere, sogenannte Dendrimere, verwendet, wobei sich Polymerstrukturen mit endständig geladenen Aminogruppen um ein zentrales Molekül anordnen. Der Vorteil dieser Partikel besteht in genau definierten Molekülen mit hoher Reproduzierbarkeit. Allerdings können erst nach dem teilweisen Entfernen der endständigen Amine, der sogenannten Aktivierung hohe Transfereffizienzen erreicht werden. Diese Aktivierung birgt die Gefahr unkontrollierter Abbaureaktionen.

Häufig wird Poly-Lysin verwendet um DNA zu kondensieren (Wu and Wu, 1988). Wagner und Mitarbeiter zeigten, dass Poly-Lysin für den Rezeptor vermittelten Gentransfer bei Hepatozyten genutzt werden kann, wenn es an Transferrin gebunden wird. Andere Polymere, die für die Genübertragung verwendet werden, sind Polyethylenimin (PEI) oder Chitosan (Koping-Hoggard et al., 2001).

Auch Proteine können DNA komplexieren. Böttger und Mitarbeiter (1988) demonstrierten Gentransfer mit dem nicht chromosomalen Kernprotein HMG1 (high mobility group) an kultivierten Zellen. Fritz und Mitarbeiter (1996) kondensierten die DNA erst mit dem Histon (H1), bevor sie in einem weiteren Schritt mit Lipofektin komplexiert und danach erfolgreich zum Gentransfer verwendet wurde.

In den 80er Jahren wurden erstmals Lipide (Fraley et. al., 1980; Felgner, 1987) zur Übertragung von genetischem Material verwendet.

1.2.4. Lipid-vermittelter Gentransfer

Lipidmoleküle besitzen einen polaren und einen apolaren Anteil. In Abhängigkeit von der Größe des hydrophilen, polaren Lipidkopfes zur hydrophoben Schwanzgruppe entstehen in wässriger Lösung Mizellen, Lipiddoppelschichten oder hexagonale Phasen. Liposomen sind definiert als mikroskopische Strukturen, die aus amphiphilen Lipiddoppelschichten bestehen.

Der amphiphile Charakter der Lipide ermöglicht den Einschluss sowohl wasserlöslicher als auch lipidlöslicher Substanzen in die Liposomen. Auf Grund dieser einzigartigen Eigenschaften finden sie Verwendung als Träger verschiedener Substanzen wie Zytostatika, Antibiotika, als Gentransfersvesikel und in der Kosmetikindustrie (Lasic and Papahadjopoulos, 1995).

Liposomen zeichnen sich durch folgende Vorteile aus:

1. schnelle Präparation in großen Mengen
2. Möglichkeit DNA-Fragmente ins Wirtsgenom einzubringen
3. Fehlen viraler Nukleinsäuren
4. keine Möglichkeit unerwünschter Selbstvermehrung (Biosicherheit)
5. Möglichkeit des zellspezifischen Targetings (Hugh and Sleight, 1991).

Ein Nachteil dieser herkömmlichen Liposomen ist die geringe Verkapselungseffizienz für Nukleinsäuren.

Aus diesem Grund wurden klassische Liposomen auf verschiedene Weise modifiziert.

Durch Veränderung der Lipidmischung und Verwendung kationisch geladener Lipide kann die Beladung mit DNA um ein Vielfaches gesteigert werden.

Zur Erhöhung der spezifischen Bindung an Zielzellen werden an konventionelle Liposomen Antikörper oder Teile davon gekoppelt, die an bestimmte Oberflächenrezeptoren binden und so zur Zellspezifität beitragen (Lasic, 1997).

Eine Möglichkeit die Aufnahme der Liposomen in die Zelle zu erhöhen, bieten fusogene Liposomen. Dabei sollen durch Einbau viraler fusogener Proteine, z.B. von Sendai Viren in die Lipidschichten, die Vorteile der Viren wie Fusogenität mit denen der Liposomen kombiniert werden. Diese Idee wurde im Sendai-Virus-Liposomen- oder auch HVJ-Liposomen-Konzept aufgegriffen (HVJ steht für Hemagglutinating Virus of Japan).

1.2.5. Das HVJ-Liposomen-Konzept

Sendai Viren oder auch Hemagglutinating Virus of Japan sind Mäuseviren der Paramyxovirusgruppe. Dabei handelt es sich um Viren mit einer Lipidhülle, die als nicht humanpathogen gelten.

Die Viruspartikel werden als pleomorph beschrieben bei einem mittleren Durchmesser von 150-250 nm (Haywood, 1991). Das Virus ist aus einem Nukleokapsid und einer Lipidmembran (Envelope) aufgebaut. Das Nukleokapsid ist ein etwa 18 nm dicker und 1100 nm langer Strang, der in der Virushülle aufgerollt ist (Horne and Waterson, 1960; Hosaka et al., 1966). Er beinhaltet eine virale RNA, die von Untereinheiten eines Nukleoproteins bedeckt ist und helikale Strukturen ausbildet (Mountcastle et al., 1970).

Das Nukleoprotein schützt die Nukleinsäure und ist mit weiteren Proteinen (P, L) assoziiert, die vor allem für Transkriptionsprozesse verantwortlich sind (Stone et al., 1971).

Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht und 3 weiteren Proteinen. An der Innenseite der Lipidhülle ist ein Matrix-Protein (M) lokalisiert und mit dem Nukleokapsid verbunden. (Kim et al., 1979). Zwei weitere Proteine sind in die Lipidmembran eingebettet und als Spikes sichtbar. Diese Spikes sind etwa 10 nm lang (Haywood, 1991) und setzen sich aus den viralen Glykoproteinen Hämagglutinin/Neuraminidase (HN) und einem Fusionsprotein (F) zusammen. Diese Glykoproteine sind Transmembranproteine und für die viralen Eigenschaften der Partikel wie Fusion, Hämolyse und Hämagglutination verantwortlich (Scheid and Choppin, 1974).

Sendai Viren fusionieren sowohl mit der Zellmembran als auch mit Liposomen bei neutralem pH-Wert. Der Inhalt der Viren gelangt dadurch direkt ins Zytoplasma ohne Umwege der Endosomen und Lysosomen. Dadurch können Degradierungen durch Enzyme der Lysosomen vermieden werden (Dzau et al., 1996).

In den 80er Jahren wiesen Haywood und Boyer (1981) elektronenmikroskopisch nach, wie Sendai Viren mit Liposomen als Modellmembranen fusionieren. Bei der Fusion verschmilzt die äußere Hülle der Viren mit den Lipidschichten der Liposomen. Dabei entstehen sogenannte fusogene Liposomen oder HVJ-Liposomen. Sie sind durch Spike-Proteine in der Lipidhülle gekennzeichnet. Die Fusion findet bei neutralem pH-Wert statt und weist ein Maximum zwischen pH 7,5 und 8 auf (Haywood, 1991).

1989 wurde in Japan erstmalig eine Technik entwickelt, die es ermöglicht diese HVJ-Liposomen als Transportvesikel für DNA zu nutzen. Zur Präparation der HVJ-Liposomen wird DNA - teils mit einem Kernprotein HMG 1 komplexiert - in Liposomen, bestehend aus Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und Cholesterol, eingeschlossen und mit UV-inaktivierten Virionen inkubiert. Die Transfektionseffizienz von Kernproteinen wie HMG1 wurde von Böttger (1988) nachgewiesen.

Mit dem Transportsystem HVJ-Liposomen wurden, in einem Leberlappen der Ratte, 85 % der Zellen erfolgreich mit einem Markergen transfiziert (Kaneda et al., 1995). Während bei viralen Systemen

nach wiederholter Anwendung Zytotoxizitäten und Immunreaktionen auftreten, wurden auch nach mehrfacher Applikation der HVJ-Liposomen keine toxischen Reaktionen und nur eine geringe Immunantwort beobachtet (Kaneda et al., 1999).

Um die Effizienz der HVJ-Liposomen zu steigern, wurde die Lipidzusammensetzung modifiziert. In der zweiten Generation der HVJ-Liposomen wurden weitere anionische Lipide wie Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder Sphingomyelin eingefügt. Das führte zur Entwicklung der sogenannten HVJ-AVE-Liposomen (AVE steht für artificial viral envelope) (Saeki et al., 1997). Diese Liposomen ähneln in der Zusammensetzung der Lipidhülle der HIV-Viren. Mit diesen Vesikeln können Muskel- und Leberzellen 5-10 mal so effektiv wie mit HVJ-Liposomen der ersten Generation und ebenso effektiv wie mit Adenoviren transfiziert werden.

Die hohe Transfektionsrate wird unter anderem mit der guten Verkapselungseffizienz (10-30 %) in den Liposomen begründet. Nach Schätzungen von Dzau et al. (1996) können 400-600 Plasmide in einem Liposom eingeschlossen werden.

Eine andere Methode den Gentransfer zu optimieren, bietet die Verwendung kationischer Lipide, wie DC-Chol in den HVJ-Liposomen (Kaneda, 1999, 2001). Kationische HVJ-Liposomen wurden erfolgreich eingesetzt, um Knochenmark und Milz sowie Epithelien der Atemwege zu transfizieren (Yonemitsu et al., 1997; Jiang et al., 2002).

Organ	Tier	Genprodukt	Expression
Leber	Ratte Maus	und Insulin, Renin LacZ,	7-14 Tage
Niere	Ratte	Wachstumsfaktoren (Transforming growth factor β)	7 Tage
Heart	Ratte	Wachstumsfaktoren (Transforming growth factor β) Hitzeschockprotein HSP70 Mn-Superoxiddismutase Bcl-2	>2 Wochen
Skelettmuskel	Maus, Ratte	Dystrophin, Decorin Luciferase	2-4 Wochen
Arterie	Ratte, Kaninchen	Angiotensin converting enzyme constitutive NO-Synthase p21 p53	>2 Wochen
Lunge	Ratte	Wachstumsfaktoren (Transforming growth factor β , Platelet derived growth factor) LacZ	>2 Wochen
Patellar ligament	Ratte	LacZ	>4 Wochen

Gehirn	Ratte	LacZ	>2 Wochen
Auge	Maus und Affe	LacZ	>2 Wochen
Haut	Ratte	LacZ	7-10 Tage
Hoden	Maus	Chloramphenicol acetyltransferase	>8 Monate

Tab.2: In vivo Gentransfer mit HVJ-Liposomen verändert nach Dzau et al. (1996)

Ein Nachteil der HVJ-Liposomen ist die transiente Expression. Um die Expressionsdauer zu verlängern, wurde ein Plasmid konstruiert, das Teile des Epstein Barr Virus enthält, wie den EBV-Promotor (Saeki et al., 1998). Somit konnte die Expression noch einmal von 14 Tagen in der Leber der Maus auf über 35 Tage gesteigert werden (Kaneda et al., 1999).

Das Plasmid gelangt in den Zellkern, wird jedoch nicht in das Wirtsgenom eingebaut, sondern liegt extrachromosomal vor.

Als Vorteile des HVJ-Liposomen-Systems gegenüber anderen Vektoren gelten die

1. effektive Transfektion in vivo und in vitro,
2. Transfektion sich nicht teilender Zellen,
3. geringe Biogefährdung durch inaktivierte Sendai Viren,
4. einfache Präparation (im Vergleich zu Adenoviren)
5. Fusion bei neutralem pH-Wert (Mann et al., 1997).

HVJ-Liposomen erwiesen sich in vielen Tiermodellen als besonders erfolgreich, zumindest in den Händen der Teams von Kaneda und Dzau. Diese fusogenen Liposomen wurden bei Herz- und Kreislauferkrankungen sowie in der Gentherapie erfolgreich eingesetzt, um Plasmide und Oligonukleotide zu übertragen (Tab. 2).

1.2.6. Virosomen

Virosomen sind Vesikel, in deren Lipidschicht virale Spike-Proteine eingebaut oder rekonstituiert wurden. Diese Rekonstitution beinhaltet, dass das gewünschte Protein mit Hilfe von Detergenzien aus seiner nativen Virusmembran isoliert und nach Entfernung der Lösungsmittel in neu geformte Lipidvesikel platziert wird. Dabei können sowohl die nativen als auch exogene Lipide zugesetzt werden (Walter et al., 1991). In der Literatur sind Virosomen beschrieben, die aus verschiedenen Virusarten präpariert wurden, z.B. aus Sendai Virus, Influenza, Sindbis, Masern, Herpes, Retroviren u.a..

Die Rekonstitution fusogener Proteine des Sendai Virus in Virosomen zeichnet sich durch einige Vorteile gegenüber den HVJ-Liposomen aus. Ein Vorteil ist die saubere Präparation. So können Kontaminationen mit viralen Nukleinsäuren vermieden werden. Des Weiteren lässt sich die

Zusammensetzung der Virosomen durch Modifizierung der Lipide optimieren oder den gegebenen Verhältnissen anpassen (Walter, 1991). Gentransfer mit Virosomen aus Sendai-Virus-Proteinen erscheint besonders attraktiv, da die Vesikel bei neutralem pH-Wert mit der Zellmembran fusionieren und die DNA so vor lysosomalen Degradierungen geschützt ist.

Virosomen nehmen eine mittlere Stellung zwischen Liposomen und Viren als Vektoren ein. Den aufgeführten Vorteilen steht jedoch eine relativ aufwendige Präparation gegenüber.

Diese erfolgt in mehreren Schritten:

1. Solubilisierung,
2. Isolation der Proteine
3. Vesikelformation.

Der Aufschluss der Viren erfolgt mit Detergenzien in deren Ergebnis Mizellen aus Proteinen, Detergenz und / oder Lipiden entstehen. In einem nächsten Schritt wird das gewünschte Protein von den Virusresten getrennt und isoliert. Dies kann mit verschiedenen Methoden geschehen. Nach Zugabe von Lipiden und Beladung, z.B. mit DNA, bilden sich nach Entfernung des Detergenz erneut Vesikel.

Virosomen lassen sich auf verschiedene Weise anwenden. Neben dem Einsatz als Transfervesikel für genetisches Material (Ramani et al., 1997, 1998), wird über den Transport von Pharmazeutika und Toxinen berichtet (Bagai and Sakar, 1993). Weiterhin dienen sie zur Induktion einer Immunantwort, z.B. zur Antikörperproduktion. Außerdem wurden Virosomen als Modellobjekte verwendet, um Fusionsmechanismen, Lipid-Protein-Interaktionen oder den Mechanismus der Rekonstitution zu studieren (Walter, 1991).

1.2.7. Kationische Liposomen

Ganz ohne Verwendung viraler Proteine kann mit kationischen Liposomen genetisches Material übertragen werden. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht infektiös sind und keine oder nur eine geringe Immunogenität aufweisen. Auf Grund ihrer positiven Ladung binden sie DNA elektrostatisch und formen Komplexe, sogenannte Lipoplexe. Weiterhin vermitteln die Liposomen den Kontakt zur negativ geladenen Zellmembran (Clark and Hersh, 1999).

Der Prototyp kationischer Liposomen wurde in den 80er Jahren von Felgner (1989) entwickelt. Dabei handelt es sich um das synthetische Lipid DOTMA (N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium). In den nachfolgenden Jahren wurde eine fast unüberschaubare Menge neuer Lipide mit unterschiedlichen Strukturen synthetisiert. Die meisten kationischen Lipide weisen eine positiv geladene Kopfgruppe auf, die über eine Verbindungsbrücke (Spacer) an einen lipophilen Anker gebunden ist (Gao and Huang, 1995). Kationische Lipide lassen sich nach verschiedenen Aspekten einteilen, so z.B. nach ihrer Struktur, Anzahl der Ladung, kationischen Kopfgruppe und Ankergruppe.

Ein Teil der Lipide besitzt ein Cholesterolgrundgerüst (DAC-Chol, Sp-Chol), andere sind durch doppelkettige Lipide (DOCSPER, DOSGA) aufgebaut. Die Kopfgruppe ist der eigentliche Ladungsträger. Nach der Anzahl der Ladungen lassen sich monokationische (DAC-Chol) und polykationische Lipide (DOCSPER) unterscheiden. Während natürlich vorkommende Lipide eine Esterbindung besitzen, weisen synthetisch hergestellte Lipide häufig eine Etherbindung auf. Diese ist chemisch stabiler, kann jedoch in der Zelle nicht abgebaut werden. Lipide mit Etherbindung wirken daher in der Zelle oft toxisch (Lasic, 1993). Auf Grund dieser Zelltoxizität wird verstärkt nach dem Einsatz natürlich vorkommender Substanzen und biologisch abbaubarer Lipide gesucht.

In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei kationische Lipide erfolgreich entwickelt und getestet. Dabei handelt es sich um DAC-Chol - ein Cholesterolderivat mit einer monokationischen Kopfgruppe (Reszka et al., 1995) und DOCSPER - ein doppelkettiges Lipid mit einer Sperminkopfgruppe (Schneider, et al., 1996; Groth et al., 1998). Spermin ist ein natürlich vorkommendes Polyamin, das im Kopf der Spermien die DNA verpackt und komplexiert. DAC-Chol ist ein Cholesterolderivat und besitzt eine Strukturanalogie zu dem von Gao und Huang (1991) synthetisierten DC-Chol. Es zeichnet sich aber durch seine geringere Toxizität aus (Groth, 2000).

Die Liposomenbildung muß zum Teil durch sogenannte Helferlipide unterstützt werden (Wrobel and Collins, 1995). Dabei handelt es sich um neutrale doppelkettige Lipide wie DOPE, PC oder auch Cholesterol. So sind einige Cholesterolderivate ohne Helferlipide nicht in der Lage, Liposomen zu bilden. Bei anderen, z.B. doppelkettigen Verbindungen, kann durch einen gewissen Anteil an Helferlipiden die Transfektionseffizienz noch gesteigert werden (Fasbender et al., 1997).

1.3. Wechselwirkungen zwischen DNA und kationischen Lipiden

Kationische Liposomen und DNA bilden auf Grund elektrostatischer Kräfte Komplexe, sogenannte Lipoplexe. Die Struktur und die Ladung dieser Komplexe ist von speziellem Interesse, denn die Transfektionseffizienz ist in hohem Maße abhängig von der Quantität der DNA, die in die Zelle gelangt (Behr, 1994). Labat-Moleur et al. (1996) schätzten an Hand elektronenmikroskopischer Befunde, dass bei einer Transfektion mit Lipopolyamin-DNA-Komplexen eine Epithelzelle etwa 500 Lipid-DNA-Komplexe (je 200 nm große Komplexe) aufnimmt. Das entspricht einer DNA-Menge von ca. 50.000 Plasmiden.

Aus der Literatur sind Untersuchungen zur Aufklärung der Lipoplex-Strukturen bekannt. Die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Studien zeigen verschiedene Formen von Komplexen, z.B. kettenartige Strukturen (Gershon et al., 1993), oligolamellare Strukturen im Kryo-EM (Gustafsson et al., 1995), sowie Fusionsereignisse und röhrenartige Strukturen nach Gefrierbruch (Sternberg et al., 1994).

Mit Hilfe moderner hochauflösender Techniken, wie AFM und Röntgenkleinwinkelstreuung, konnten bislang nicht bekannte Gesetzmäßigkeiten bei der Interaktion von DNA mit kationischen Lipiden gefunden werden (Safinya, 2001).

Die Komplexbildung wird in erster Linie durch das Verhältnis von Lipid und DNA bestimmt. Bei der Mischung von Liposomen und DNA binden die positiv geladenen Kopfgruppen der Lipide an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren.

Nach dem derzeitigen Wissensstand entstehen dabei flüssigkristallin-ähnliche Komplexe. Diese Komplexe bestehen aus multilamellaren Strukturen, wobei sich Lipidbilayer und DNA-Monolayer alternierend abwechseln (Rädler et al., 1997).

Bei der Kondensation mit kationischem Lipid werden an allen Phosphatgruppen der DNA die natürlichen Gegenionen durch kationische Lipide ersetzt.

Die Mehrzahl der Autoren beobachtete, dass die Größe der Komplexe vor allem vom DNA-Lipidverhältnis abhängig ist (Gershon et al., 1993; Zuidam and Barenholz, 1998; Groth, 2000). Ist die DNA-Konzentration kleiner als die der Liposomen, entstehen neben einzelnen kationischen Liposomen etwa ein μm -große Komplexe, zusammengesetzt aus Lipiden und DNA (Rädler, et al., 1997). Bei steigender DNA-Konzentration bis zu einem annähernd neutralen Verhältnis von DNA und Lipid werden vor allem größere und zunehmend neutrale Komplexe beobachtet. Der Größenzuwachs beruht darauf, dass die Oberflächenladung der Liposomen durch Bindung der DNA reduziert wird. Dadurch wird gleichzeitig die Abstoßung zwischen den Liposomen herabgesetzt, was wiederum zur Vergrößerung der Komplexe führt. Neutral geladene Komplexe halten auf Grund van der Waals-Kräfte zusammen. Bei einem Überschuss an DNA wurden negativ geladene Komplexe und freie DNA beobachtet. Die geringere Größe geladener Komplexe ist dadurch zu erklären, dass sich die gleichnamig geladenen Partikel abstoßen (Gustafsson et al., 1995; Rädler et al., 1997).

Neben dem Zusammenhang zwischen der Komplexzusammensetzung und deren Größe wurden mittels Röntgenkleinwinkelstreuung die submikroskopische Struktur der Komplexe untersucht. Unabhängig von der verwendeten DNA-Größe fanden Rädler und Mitarbeiter (1997) nach dem Mixen von DNA und Liposomen, dass DNA zwischen den Lipidbilayern kondensiert. Dabei entstehen hochgeordnete multilamellare Strukturen. Die DNA ist in diesen Komplexen zwischen den Bilayern mit regulärem Abstand angeordnet.

Bei diesen Untersuchungen steht natürlich die Frage im Vordergrund, welche der gebildeten Komplexe besonders effektiv transfizieren. Die Mehrzahl der Autoren (Schwartz et al., 1995; Zabner et al., 1995) fand mit annähernd neutralen bis leicht positiven Komplexen gute Transferergebnisse.

Neben dem Lipid/DNA-Verhältnis wirken weitere Einflüsse auf die Lipoplexstruktur. So fanden Hui et al. (1996) kleinere Lipoplexe, wenn diese mit dem Helferlipid DOPC statt DOPE präpariert wurden. Schließlich wird auch der Zeit (Ross and Hui, 1999), Art und Menge der Ionen in der Lösung (Barthel et al., 1993) und weiteren Faktoren (Zelphati et al. 1998; Groth, 2000) Einfluss auf die Bildung der Lipoplexe zugeschrieben.

1.4. Hypothetische Modelle zur Aufnahme und zur intrazellulären Transportroute der Partikel

Aufnahme

Der erste Schritt der Aufnahme ist die Anheftung der Lipoplexe an die Zellmembran. Dabei vermitteln die positiv geladenen Lipide den Kontakt zwischen der negativ geladenen DNA und der gleichfalls negativ geladenen Glykokalix der Zellmembran. Die Bedeutung dieses Schrittes konnten Hui und Mitarbeiter (1996) in ihren Arbeiten zeigen. Denn an Zellen, die mit Pronase behandelt wurden, einem Enzym, das die Glykokalix zerstört, erfolgte weder Bindung noch Aufnahme der Komplexe. Insbesondere Proteoglukane, wie z.B. Heparansulfat, scheinen bei Bindung und Aufnahme eine besondere Rolle zu spielen (Mounkes et al., 1998; Ruponen et al., 2001).

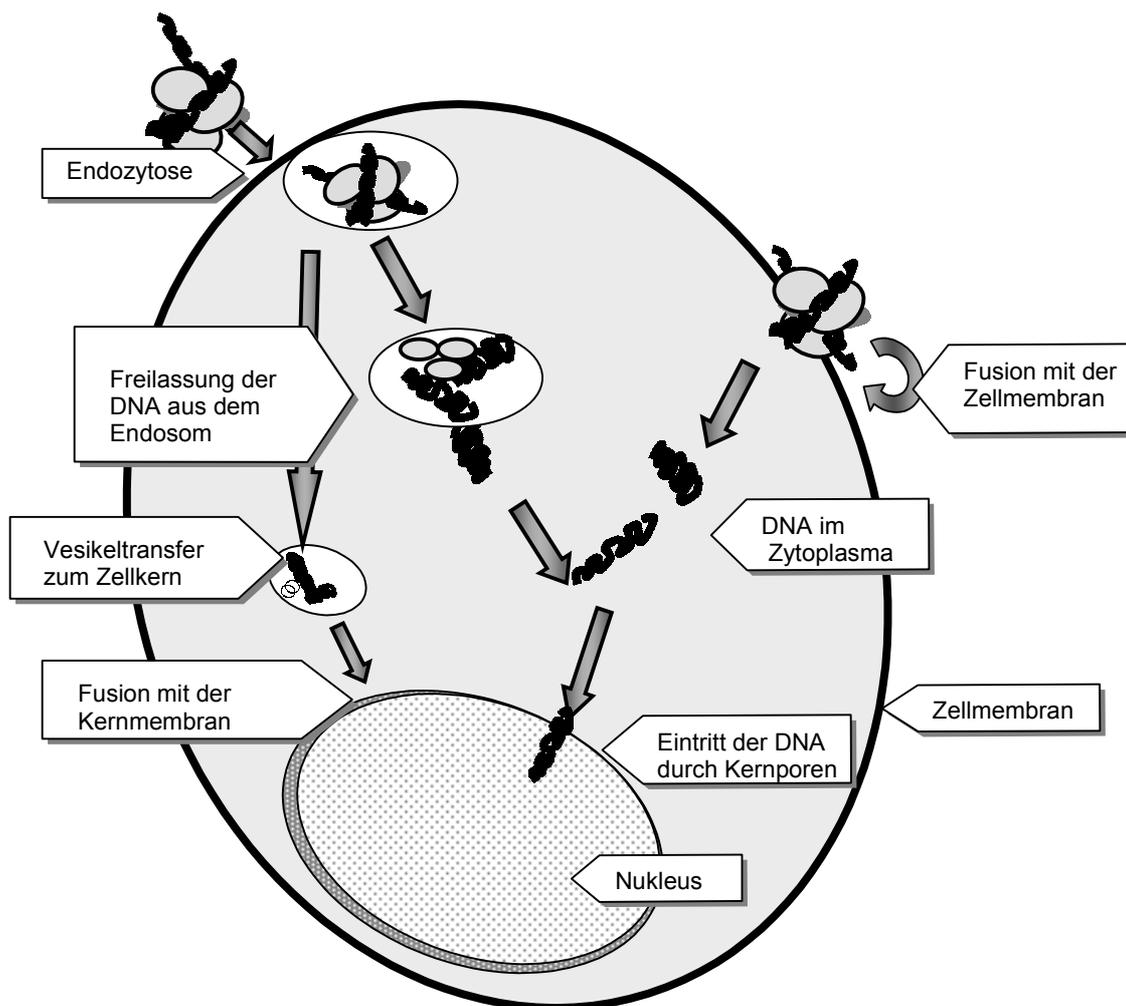


Abb. 3: Verschiedene Modelle zur Aufnahme und Verteilung von Lipoplexen

Früheren Auffassungen zufolge gelangen kationische Liposomen durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle. Zu dieser anfänglichen Annahme haben die fusogenen Eigenschaften kationischer Lipide beigetragen (Düzgünes et al., 1989; Felgner and Ringold, 1989).

Neuere Untersuchungen mit modernen mikroskopischen Techniken haben jedoch gezeigt, dass die Hauptaufnahmeroute über endozytotische Mechanismen erfolgt (Matsui et al., 1996; Conrood et al., 1997; Chu et al., 1999; Serafino et al., 1999; Labat-Moleur, et al. 1996; Zabner et al. 1995; Zhou and Huang, 1994).

Als Endozytose wird dabei die Aufnahme von Stoffen in von Zellmembranabschnitten umschlossenen Vesikeln bezeichnet (Rabinovitch, 1995).

Nach dem derzeitigen Wissensstand können Endozytosemechanismen auf Grund ihrer Charakteristik, wie Größe aufzunehmender Partikel und Beteiligung von Rezeptoren, weiter klassifiziert werden in Phagozytose oder Endozytose in engerem Sinne. Letztere umfasst rezeptorvermittelte Endozytose sowie Pinozytose (Mellmann, 1996).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Friend et al. (1996) zeigen die Aufnahme der Lipoplexe durch coated pits. Diese Fakten weisen auf eine rezeptorvermittelte Aufnahme hin.

Arbeiten von Lam und Cullis (2000) deuten auf eine Beteiligung von Kalzium-Rezeptoren bzw. Kalzium-abhängigen Prozessen hin. Die Autoren beobachteten eine verbesserte endozytotische Aufnahme und eine Erhöhung der Transfektionseffizienz bei Zusatz von Kalzium.

Ereignisse in der Zelle

Vorgänge in den Endosomen

Endozytotisch aufgenommene Partikel gelangen ins Endosom und enden oft in Lysosomen (Alberts et al., 1995). Einige Stunden nach Applikation wurden Lipoplexe von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen mikroskopischen Techniken in der Nähe des Zellkerns im perinukleären Raum beobachtet (Serafino et al., 1999; Zabner et al., 1995). Es ist derzeit noch nicht geklärt, wie sie dorthin gelangen. Einer Hypothese zufolge wandern frühe Endosomen mit den endozytierten Molekülen langsam nach innen und reifen zu späten Endosomen, die sich dann zu Lysosomen entwickeln. Einer anderen These zufolge erfolgt der Transport von frühen zu späten Endosomen über ein vesikuläres Transportkompartiment (Alberts et al., 1995).

Letztlich muss die DNA in den Kern gelangen, damit das gewünschte Protein exprimiert werden kann. Wahrscheinlich ist es notwendig, dass sich die DNA vor dem Eintritt in den Kern vom Lipid trennt. Diese Vermutung erhielt durch Versuche von Zabner und Mitarbeitern (1995) neue Nahrung. Sie zeigten, dass Lipoplexe schlechter transfizieren, wenn sie direkt in den Kern anstatt ins Zytoplasma injiziert werden.

Die Dissoziation von DNA und Lipid findet nach Auffassung von Xu und Szoka (1996) in den Endosomen statt. Nach Vorstellung der Autoren destabilisieren die aufgenommenen Lipoplexe die Endosomenmembran. Dadurch werden Flip-Flop-Mechanismen anionischer Lipide ausgelöst. Diese führen schließlich zur Ladungsneutralisierung und damit zur Dissoziation von Lipid und DNA. Gleichzeitig kann es zu Fusionen zwischen der Endosomenmembran und dem Lipoplex kommen, in dessen Ergebnis DNA ins Zytoplasma gelangt. Dieses Modell wird durch Untersuchungen von Friend und Mitarbeitern (1996) untermauert, die Gold-markierte DNA auch außerhalb der Endosomen beobachteten. Weiterhin registrierten Wattiaux und Mitarbeiter (1997) nach Transfektion eine Zunahme von lysosomalen Enzymen im Zytosol, die durch Löcher in der Endosomenmembran in das Zytosol gelangt sein könnten.

Zytoplasma

Nach Mikroinjektion nackter Plasmid-DNA ins Zytoplasma kultivierter Zellen wurde in weniger als 1 % der Zellen Proteinexpression nachgewiesen (Capecchi, 1980). Vermutlich wird die DNA von Teilen des Zytoskeletts zurückgehalten (Dowty et al., 1995). Neue Untersuchungen von Safinya et al. (2000) zeigen, dass sich kationische Lipide und F-Actin zu verschiedenen Strukturen formieren und so die Transfektionseffizienz und Toxizität beeinflussen können.

Außerdem ist auch ein Abbau der DNA durch Enzyme denkbar. Orrantia und Chang (1990) fanden nach Kalzium-Phosphat-Präzipitation im Zytoplasma nur Bruchstücke von zum Teil wenigen Basenpaaren der eingesetzten DNA wieder. Im Gegensatz dazu registrierten sie in Endosomen sowohl intakte als auch teils abgebaute DNA.

Kerntransport

Nach dem heutigen Kenntnisstand wird angenommen, dass die DNA vom Zytoplasma aus in den Kern gelangt (Dowty et al., 1995; Cotten et al., 1992).

Der Eintritt der DNA in den Kern erfolgt über Kernporen (Agutter and Prochnow, 1994). Die ca. 3000-4000 Porenkomplexe wirken als molekulares Sieb: Verschiedene Makromoleküle mit einer Größe bis zu 45 kDa können frei hindurch diffundieren, größere Moleküle bedürfen einer aktiven und selektiven Aufnahme (Alberts et al., 1995).

Auch der Zutritt von DNA in den Kern ist größenabhängig. Studien von Hagstrom und Mitarbeitern (1997) ergaben, dass DNA mit einer Größe von 2 kb deutlich weniger effizient aufgenommen wird, als 1 kb DNA. Die meisten verwendeten Therapie- oder Markergene haben aber eine Größe von 4-6 kbp.

Nach neuen Untersuchungen (Jans et al., 1998; Cartier and Reszka, 2002) geht man davon aus, dass sogenannte Kernerkenntnissequenzen an der (zu transferierenden) DNA eine gezielte Aufnahme bewirken. Kernerkenntnissequenzen, sogenannte NLS (nuclear location signals) sind spezielle basische Peptide, die ein gezieltes Einschleusen von Proteinen in den Kern ermöglichen (Boulikas,

1997). Diese Kernerkennungssequenzen werden Poly-Lysin, SV 40 T-ag und anderen, oft viralen, Proteinen bzw. Teilen davon zugeschrieben. Der Transport in den Kern beinhaltet, dass Substanzen mit dem NLS an den Porenkomplex, speziell an ein als Importin bezeichnetes Protein binden und dann unter Energieverbrauch in den Kern geschleust werden (Jans et al., 1998).

Durch Einfügen dieser Sequenzen an die zu transferierende DNA erhofft man sich verbesserten Eintritt der DNA in den Kern (Chan and Jans, 1999).

Im Gegensatz dazu deuten elektronenmikroskopische Befunde von Friend und Mitarbeitern (1996) auf eine Fusion von Lipoplexen und der Kernmembran.

Allerdings gibt es auch Hinweise auf einen möglichen Vesikeltransfer von Endosomen zur Kernmembran, wo es möglicherweise zur Fusion mit der Kernmembran kommt (Orrantia and Chang, 1990).

1.5. Zielstellung der Arbeit

Gentransfervesikel (Carrier) werden heute meistens nach dem Zufallsprinzip gefunden, durch Synthese neuer Substanzen und anschließendem Test zum Gentransfer an verschiedenen Zelllinien oder unter in-vivo-Bedingungen. Sie werden mit verschiedenen biophysikalischen Methoden, wie Messen der Größen, der Ladung an der Oberfläche der Liposomen (Zetapotential) und anderen charakterisiert. Die Eignung zum Transfervesikel wird mit Hilfe von Markergenen auf Zellkulturen nachgewiesen. Gleichzeitig gibt es Möglichkeiten die Zelltoxizität durch mikroskopische Beobachtung zu beurteilen und durch Messen der sauren Phosphatase als Ausdruck der Zellschädigung (Groth et al., 1997) nachzuweisen.

Viel weniger Interesse wird dem Weg der Carrier in den Zellen und Geweben geschenkt. Dabei ist es notwendig Details der Verteilung zu untersuchen, um die einzelnen Abläufe und Schritte des Gentransfers besser verstehen und die Vektoren optimieren zu können.

Um die einzelnen Abläufe und Schritte auf subzellulärem Niveau zu analysieren, bieten sich mikroskopische Techniken an.

Vor allem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können vielfältige Untersuchungen durchgeführt werden. So kann beispielsweise die Größe von Liposomen gemessen und gleichzeitig die Anzahl der Bilayer beurteilt oder DNA nachgewiesen werden. Mit immunelektronenmikroskopischen Methoden können verschiedene Proteine an den Partikeln lokalisiert werden. Schließlich lässt sich die Verteilung der Vektoren nach bestimmten Zeiten auf der Zellmembran genau beobachten. Vor allem kann in der Zelle der Weg der Gentransfervesikel beobachtet werden.

Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden verschiedene Lipid-basierte Gentransfersysteme zu charakterisieren und die Aufnahme und Verteilung in der Zellkultur zu untersuchen.

Dabei wurde besonderes Augenmerk auf solche Liposomenpräparationen gerichtet, die in der Arbeitsgruppe Drug Targeting entwickelt oder getestet wurden.

Untersucht wurden verschiedene kationische Lipide (wie DAC-Chol und DOCSPER) und deren Liposomen-DNA-Komplexe sowie fusogene Liposomen, wie HVJ-Liposomen und Virosomen.

Folgende Fragen waren bei der Untersuchung von Interesse:

- Charakterisierung von HVJ-Liposomen und Virosomen hinsichtlich ihrer Größe und Morphologie
- Nachweis viraler Proteine auf HVJ-Liposomen und Virosomen
- Dokumentation der in HVJ-Liposomen und Virosomen verkapselter DNA
- Aufnahme und Verteilung von Virosomen-DNA-Komplexen in kultivierten Zellen
- Untersuchung zur Eignung von Virosomen-DNA-Komplexen als Gencarrier

Im Hinblick auf kationische Liposomen waren folgende Fragen von besonderem Interesse:

Einfluss verschiedener Lipide, einschließlich Helferlipide auf die Liposomenbildung

Struktur von Lipoplexen

Dokumentation der Aufnahme von Lipoplexen in kultivierte Zellen

Untersuchungen zur Verteilung der Lipoplexe und zur Überwindung zellulärer Barrieren

Effekt der Vorkomplexierung mit kationischen Polymeren hinsichtlich Aufnahme, Verteilung und Transfektion der Lipoplexe

2. Material und Methoden

2.1. Negativ Kontrastierung

Die Technik der Negativkontrastierung ermöglicht eine kontrastreiche Abbildung kleiner Partikel, wie Makromoleküle, Viren, Liposomen und z.T. auch Bakterien. Bei dieser Methode werden die Partikel durch Schwermetallsalze, wie Uran, Wolfram oder Molybdän umhüllt. Dabei kann das Kontrastmittel in hydrophile Bereiche der Probe eindringen und das Wasser ersetzen. Die Schwermetalle stellen eine Barriere für Elektronenstrahlen dar, so dass das Objekt in negativem Kontrast erscheint - hell vor dunklem Untergrund (Hayat and Miller, 1990).

In den eigenen Versuchen wurden verschiedene Kontrastmittel wie Phosphorwolframsäure, (Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland) 2 % wässriges Ammoniummolybdat und 1-2 % wässriges Uranylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

10-20 µl einer verdünnten Probe wurden auf Formvar befilmte und Kohlenstoff verstärkte Netzen aufgetropft. Für die Kontrastierung mit Uranylacetat wurde nach dem Anheften der Partikel an das Netzen ein Teil der Probenflüssigkeit durch Kontrastmittel ersetzt und einige Minuten kontrastiert. Bei der Ammoniummolybdatkontrastierung wurde die gleiche Menge Kontrastmittel zur Probensuspension dazugegeben und 1-2 Minuten kontrastiert (Nermt, 1970). Nach dem Absaugen der Flüssigkeit und Trocknen wurden die Proben mikroskopiert.

Die Auswertung erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop JEM 100CX (Jeol, Tokyo, Japan) bei 80 kV.

2.2. Einbettung

Um den Weg der verschiedenen Gentransfervesikel in Zellkulturen zu untersuchen, wurden Zellen teils mit inkubierten Vehikeln in Epoxidharz Epon 812 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) oder für immunelektronenmikroskopische Studien in Acrylharz LR White (Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland) eingebettet, um anschließend Ultradünnschnitte anfertigen zu können.

Für die Einbettung in Epon wurde das Kulturmedium mit Puffer abgewaschen und die Zellen mindestens 2 Stunden mit 2 % Glutaraldehyd (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) in 0,05 M Phosphatpuffer fixiert (4 °C). Nach dem Waschen der Zellen (0,18 M Saccharose in 0,08 M Phosphatpuffer) wurden die Zellen aus den Kulturschalen geschabt, in BEEM-Kapseln überführt und zentrifugiert (2 Minuten, 3.000 rpm). Der Bodensatz, der die Zellen enthielt, wurde mit 1 % OsO₄-Kr₂O₇-Lösung über 2 Stunden nachfixiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 96, 100 % je 30 Minuten), wobei einige Präparate während der 30 %igen Ethanolstufe zusätzlich mit 0,5 % Uranylacetat „im Block“ kontrastiert wurden. Die Einbettung erfolgte über mehrere Zwischenstufen (Propylenoxid, Propylenoxid-Epon-Gemisch, Epon oder

Ethanol: Epon-Gemisch, Epon) in reines Epon. Die Blöckchen wurden mindestens 2-3 Tage bei 50-65 °C polymerisiert.

Zellen, die (mit Virosomen inkubiert und) für immunelektronenmikroskopische Versuche vorgesehen waren, wurden mit einem Gemisch aus 0,5 % Glutaraldehyd, 2 % Formaldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,4) fixiert und nach dem Auswaschen des ungebundenen Fixans in 1,5 % „low melt“ Agarose eingebettet. Die Entwässerung erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Anschließend wurden die Proben mit einem Gemisch aus LR White und Ethanol und reinem LR White stufenweise infiltriert (je 2 Stunden).

Die Einbettung erfolgte in Gelatinekapseln, die bei exakt 50 °C polymerisiert wurden.

2.3. Ultramikrotomie und Kontrastierung

Von den polymerisierten Proben wurden Übersichtsschnitte mit einer Dicke von 500-1000 nm angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer 1 % Methylblaulösung (gelöst in 1 % Borax) bei 60-80 °C ca. 2-3 Minuten gefärbt. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Farbstoffes wurden die Präparate mikroskopiert. An Hand der Übersichtsschnitte wurden die Blöckchen getrimmt und Ultradünnschnitte mit einer Dicke zwischen 70-100 nm geschnitten. Zum Schneiden wurden Glasmesser benutzt, die mit dem Knifemaker (LKB, Schweden) präpariert wurden. Die Schnitte wurden auf Formvar-befilmte und Kohlenstoff-verstärkte Netzchen übertragen und nach dem Trocknen entweder ungefärbt oder nach Kontrastierung ausgewertet. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte 30 Minuten in ethanolischem Uranylacetat (0,5 %) und nach zweimaligem Waschen 2-6 Minuten in Bleizitrat (Agar Scientific, Großbritannien) getaucht. Nach gründlichem Waschen in Aqua bidest wurden die Netzchen getrocknet und mikroskopiert.

2.4. DNA-Spreitung

Die Spreitungstechnik dient der Darstellung und Sichtbarmachung von DNA. Sie basiert auf einer 1969 von Kleinschmidt beschriebenen Methode. Das Prinzip dieser Technik besteht darin, dass ein basisches Polypeptid, z.B. Cytochrom C an die saure DNA bindet. Dieses Gemisch aus Polypeptid und DNA bildet einen dünnen Film auf einer Wasser- oder Pufferoberfläche. Die dreidimensionale verknäulte Struktur der DNA wird dabei in eine gestreckte zweidimensionale Lage gebracht (gespreitet) und kann mit Netzchen aufgefangen werden.

Die DNA wurde in den eigenen Versuchen nach einer wässrigen Variante der basischen Proteinfilm-Technik gespreitet (Fergusson, J. and Davis, R.W., 1985).

Zur Spreitung wurde ein Teflontrog (11x11x2 cm) mit einer frischen 0,25 M Ammoniumazetatlösung (Hypophase) gefüllt.

Die Spreitungslösung - bestehend aus 0,5 µg/ml DNA, 0,1 mg/ml Cytochrom C, sowie 0,5 M Ammoniumazetatlösung - wurde über einen schräg gestellten Objektträger aufgetragen. Der DNA - Proteinfilm wurde mit Formvar befilmten Kupfernetzchen aufgenommen, in 90 %igem Ethanol gespült und getrocknet.

Zur Kontrastverstärkung wurden die Netzchen schräg bedampft.

2.5. Schrägbedampfung

Die Schrägbedampfung dient der Kontrastverstärkung zarter Proben. Unter einem kleinen Winkel (< 10 °) wird dazu im Vakuum eine Metallschicht aufgedampft. Die dabei entstehenden Schatten verstärken auch geringe Strukturunterschiede, die dadurch sichtbar werden.

Neben gespreiteter DNA wurden auch unkontrastierte Liposomen oder Lipoplexe schräg bedampft.

Die Bedampfung erfolgte in einer kommerziellen Hochvakuumbedampfungsanlage (HBA120/2 Fa. Carl Zeiss Jena) entsprechend der Betriebsanweisung bei 35 mA für 2-3 Minuten, wobei der Probenteller mit den aufgeklebten Netzchen gleichmäßig gedreht wurde. Der Abstand des Probenteller zur Verdampfungsquelle betrug ca. 6 cm bei einem Winkel von 6-8 °. Als Verdampferquelle diente Platin-Iridiumdraht, der auf eine Schlinge aus Wolframdraht gewickelt wurde.

Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie

2.6. Fixierung, Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung

Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde die Verteilung der Gentransfervesikel auf der Oberfläche kultivierter Zellen analysiert. Dazu wurden die Partikel oder die DNA teilweise mit kolloidalem Gold markiert und mit Silber verstärkt (s. Immunmarkierungen). Zellen verschiedener Linien wurden auf Thermanoxplättchen kultiviert und nach Abschluss der Inkubation mit Liposomen oder Virosomen wurden die Zellen erst mit Medium und anschließend mit PBS gewaschen, ehe sie mindestens 20 Minuten mit 2 % Glutaraldehyd fixiert wurden. Die Proben wurden dann in einer aufsteigenden Azetonreihe (25, 50, 70, 90, 100, 100 %) je 15-20 Minuten/Stufe entwässert. Die Trocknung der Proben erfolgte mit der Methode der Kritisch-Punkt-Trocknung. Diese arbeitet nach dem Prinzip, dass jenseits einer bestimmten Temperatur und eines bestimmten Drucks die Phasengrenze flüssig/gasförmig verschwindet, da beide Aggregatzustände gleiche Dichten und Volumina aufweisen.

Dadurch werden Schäden beim zu trocknenden Gewebe weitestgehend vermieden, die sonst durch Oberflächenspannungen entstehen.

Für Kohlendioxid liegen die Werte des kritischen Punktes bei 31 °C und 7,4 Pa (Ohnsorge, J. u. Holm, R., 1989). Die Zellen wurden dazu in einer speziellen Apparatur 5-6 mal bei 4 °C mit flüssigem Kohlendioxid gespült, bevor sie oberhalb des kritischen Punktes bei 9,0 Pa und 40 °C getrocknet wurden. Die trockenen Proben wurden anschließend besputtert.

2.7. Sputterung und Bedampfung der Proben

Da biologisches Material von Natur aus nicht elektrisch leitend ist, ist es notwendig die Oberfläche von Proben, die im Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden sollen, mit einer leitenden Schicht zu versehen, um Aufladungen an der Probenoberfläche beim Beobachten zu vermeiden und die Bildqualität zu verbessern. Diese leitende Schicht wurde durch Aufputtern einer Gold/Palladium-(Au/Pd)-Lage hergestellt. Proben, die für die Mikroanalyse vorgesehen waren, wurden mit einer leitenden Kohleschicht versehen. Die getrockneten Proben wurden mit Leit-Tabs auf Messing- oder Kohlenstoffhalter montiert und im Sputtercoater SCD020 mit Au/Pd (Fa. Balzers, Liechtenstein) 80 s, 40 mA oder Kohlefadenverdampfung (Fa. Balzers, Liechtenstein) entsprechend der Betriebsanweisung des Gerätes präpariert.

Das Prinzip des Sputtern besteht darin, dass in einer Probenkammer bei einem Druck von 5 bis 10 Pa ein Hochspannungsfeld zwischen einer Kathode (Target) und einer Anode (Präparattisch) angelegt wird. In einer Argonatmosphäre stoßen freie Elektronen auf Argonatome und schlagen dabei aus der äußeren Schale ein Elektron. Die resultierenden Argonionen werden zur Kathode beschleunigt und schlagen bei ihrem Auftreffen Metallatome, z.B. Gold und Palladium, aus dem Target, die sich auf dem Präparat als dünne und gleichmäßige Schicht niederschlagen.

Die Zellen aus den Gentransfer-Versuchen wurden 80 Sekunden mit Gold-Palladium besputtert. Das entspricht bei einem genutztem Sputterstrom von 40 mA einer Schichtdicke von ca. 17 nm. Die Proben wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop JSM-25SIII (Jeol, Tokyo, Japan) bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV ausgewertet.

2.8. Röntgenmikroanalyse

Die Röntgenmikroanalyse bietet in Kombination mit der Rasterelektronenmikroskopie zusätzliche Informationen über Morphologie, Oberflächenstrukturen, sowie deren Zusammensetzung von bestimmten Probenbereichen. Dies ist nützlich, um Strukturen auf der Zelle zu identifizieren oder Goldmarkierungen zu detektieren. Bei der Röntgenmikroanalyse werden durch den Elektronenstrahl

aus der Probe Elektronen aus kernnahen Bereichen des Atoms herausgeschlagen. Die dabei entstehende Lücke wird durch Elektronen aus energetisch höheren Orbitalen unter Abgabe von Energie wieder aufgefüllt. Die frei werdende Energie wird in Form charakteristischer Röntgenstrahlung emittiert. Jedes Element ist durch seinen speziellen Atomaufbau gekennzeichnet und besitzt daher ein einmaliges Röntgenspektrum, wobei energetisch verschiedene Linien zu Röntgenserien zusammengefasst werden. Elektronenbeschuss bewirkt eine Röntgenemission bis zu einer Objektiefe von 9 μm (Röntec, pers. Mitt.). Bei der EDS (energiedispersives System) passieren die emittierten Röntgenstrahlen ein Berylliumfenster und treffen auf den Detektor. Hier erzeugen sie durch Kristallgitterdefekte einen Strom von Lithiumatomen. Die dabei ausgelösten elektrischen Impulse sind den Röntgenstrahlen proportional und werden in einem Vielkanalspektrometer analysiert (Plattner u. Zingsheim, 1987).

Die Aufnahme der Spektren erfolgte stets unter gleichen Bedingungen: einer Beschleunigungsspannung von 25 kV, der Zeit von 300 Sekunden. Zur Auswertung wurde ein Programm der Fa. Röntec genutzt.

2.9. Immunelektronenmikroskopie

Immunelektronenmikroskopische Methoden wurden genutzt, um einerseits die biologische Aktivität viraler Proteine, wie Hämagglutinin/Neuraminidase, oder das Fusionsprotein an Sendai Viren und Gentransfervesikeln, wie HVJ-Liposomen und Virosomen, nachzuweisen sowie um deren Weg in kultivierten Zellen zu beobachten. Dazu wurden monoklonale Antikörper und polyklonale Antiseren gegen die viralen Glykopeptide eingesetzt. Diese wurden mit der Protein-A-Gold-Technik nachgewiesen. Außerdem wurde Marker-DNA mit Gold markiert.

Zum Nachweis von Goldmarkierungen z.B. an DNA oder Virosomen auf der Zelloberflächen wurden diese mit Silber verstärkt bevor sie Rasterelektronenmikroskop ausgewertet wurden (Abb.4).

2.10. Protein-A-Gold-Technik

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass Protein A, ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, einerseits an ein Fc-Teil von IgG-Molekülen (Antikörper) und andererseits über positiv geladene Gruppen an negativ geladenes kolloidales Gold relativ stabil bindet (Kleinig u. Sitte, 1986). Mit dieser Technik sollten die viralen Proteine Hämagglutinin und Neuraminidase sowie das Fusionsprotein auf Sendai Viren und Sendai-Virus-Liposomen-Präparationen nachgewiesen werden. Hämagglutinin/Neuraminidase ist notwendig zum Anheften der Viren an Membranen, das Fusionsprotein ist nötig zur Fusion (Kingsbury et al., 1978).

Die Technik der Goldmarkierung erfolgte in Anlehnung an Lennisson, J. (1985).

Die Sendai-Virus oder Sendai-Virus-Liposomen-Probelösungen wurden auf Netzen getropft und 20 Minuten inkubiert. Nach dem Absaugen nicht adsorbierter Lösung erfolgte die Maskierung unspezifischer Bindungstellen mit PBS-Glycin. Dazu wurden 50 mM Glycin in PBS gelöst und filtriert.

Zum Waschen und Verdünnen von Antikörpern und Protein-A-Gold wurde PBG (0,2 % Gelatine sowie 0,5 % Rinderserumalbumin in PBS, pH 7,4) verwendet. Die Proben wurden eine Stunde mit den Antikörpern inkubiert. Die monoklonalen Antikörper wurden anfangs in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt, auf Grund unbefriedigender Ergebnisse später unverdünnt eingesetzt. Polyklonale Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBG erfolgte die Kopplung mit 50fach verdünntem Protein-A-Gold. Die Netze inkubierten eine Stunde. Bevor abschließend die Schnittkontrastierung oder Negativkontrastierung erfolgte, wurden die Proben mehrmals mit PBG, PBS und destilliertem Wasser gespült.

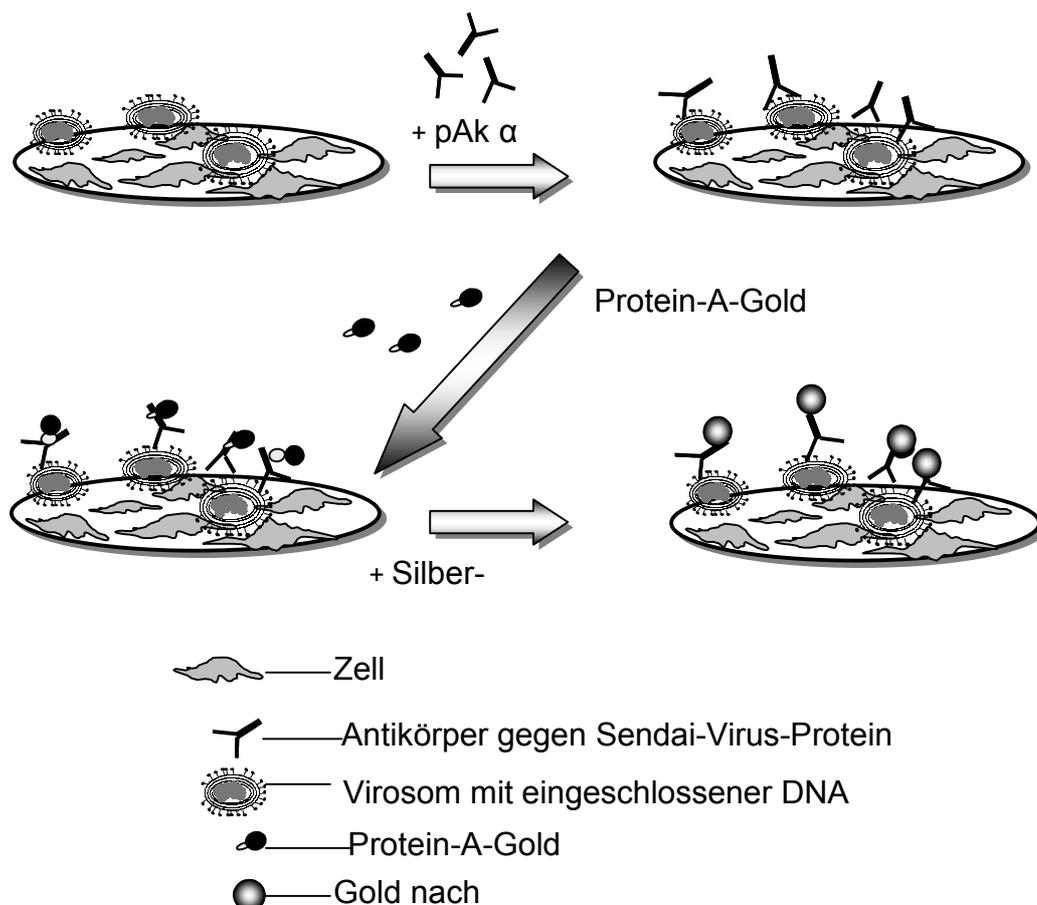


Abb. 4: Nachweis fusogener Proteine mit Hilfe von Protein-A-Gold-Technik und Silberverstärkung

2.11. Silberverstärkung von Goldmarkierungen

Da bei den Markierungsversuchen relativ kleines Gold (5, 10, 15 nm) eingesetzt wurde, mussten alle Gold-markierten Proben für die Raster EM mit Silber verstärkt werden, um die Vesikel im Mikroskop identifizieren oder mittels EDX nachweisen zu können. Für die Silberverstärkung wurde ein handelsüblicher Silberverstärkungs-Kit (Fa. BBI) genutzt. Die Komponenten wurden nach Vorschrift gemischt und auf die Proben getropft. Zur Ermittlung einer geeigneten, gut erkennbaren Korngröße wurde Gold sowohl auf Plättchen als auch auf Nickelnetze getropft und mit Silber verstärkt, wobei nach 5, 10, 15 und 20 Minuten die Reaktion gestoppt, die Proben gewaschen, getrocknet und im Mikroskop analysiert wurden. Eine gute Verstärkung wurde je nach Goldgröße nach ca. 10-15 Minuten ermittelt, da nach dieser Zeit die Silberkörner im REM sichtbar und mit der Röntgenmikroanalyse detektierbar waren.

Nach der Silberverstärkung wurden die Plättchen mit destilliertem Wasser gründlich gespült und über eine Azetonreihe entwässert wie unter 2.6. beschrieben.

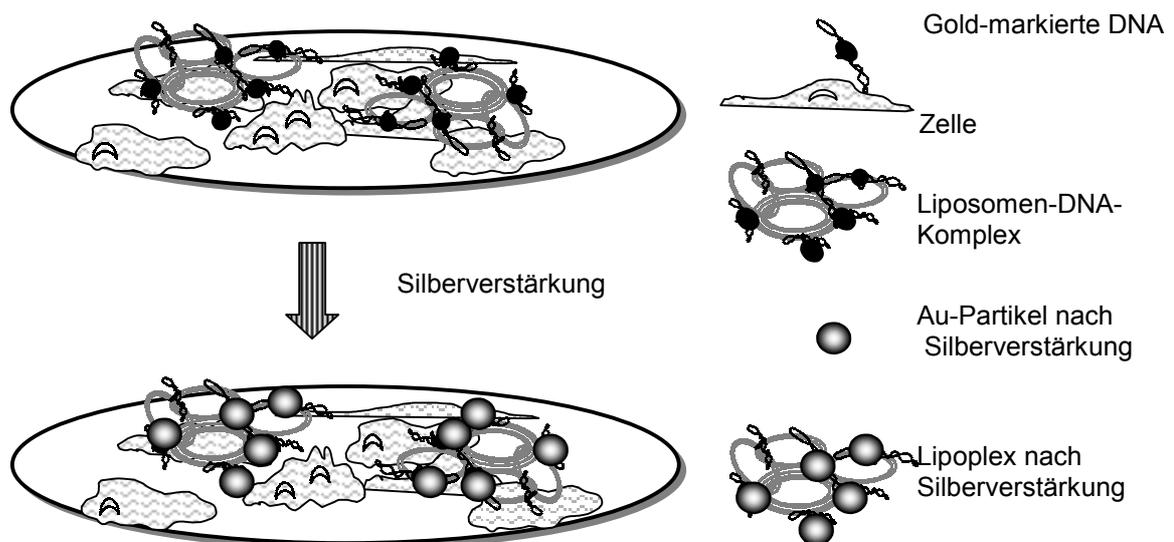


Abb. 5: Silberverstärkung von Goldmarkierungen für die Rasterelektronenmikroskopie

2.12. Messen der Bindung von kationischem Gold an der Zellmembran

Die Bindung von Liposomen an der Zelloberfläche ist der erste Schritt zu deren Aufnahme. Um zu prüfen wie sich die negative Oberflächenladung bei den einzelnen Zelllinien unterscheidet und dies möglicherweise in der Aufnahme der Partikel widerspiegelt, wurde an verschiedenen Zelllinien die Bindung von kationischem Gold untersucht. Ein ähnlicher Versuch wurde von Matsui et al. (1996)

beschrieben, wobei kationisches Ferritin als positiv geladener Marker verwendet wurde. Zur Ermittlung der Bindung von kationischem Gold wurden verschiedene Zelllinien 1,5 Stunden mit kationischem Gold (bei 4 °C) inkubiert. Die Temperatur von 4 °C sollte gewährleisten, dass die Goldpartikel nur an der Zellmembran binden, nicht aber aufgenommen werden. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Goldpartikel wurden die Zellen fixiert und die Goldmarkierung mit Silber verstärkt.

2.13. Herstellung der Sendai-Virus-Liposomen

Sendai-Virus-Liposomen oder HVJ-Liposomen (HVJ-Hemagglutinating virus of Japan) stellen eine besondere Form von Gentransfervesikeln dar. Sie vereinen die fusogenen Eigenschaften der Sendai Viren mit den Vorteilen der Liposomen, wie Verkapselung von Proteinen oder DNA.

2.14. Sendai-Viren

Gereinigte und charakterisierte Sendai Viren und Virosomen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. M.F.G. Schmidt im Institut für Immunologie und Molekularbiologie, City Campus VetMed der FU Berlin präpariert und unserer Arbeitsgruppe zu Gentransferexperimenten zur Verfügung gestellt.

Sendai Viren wurden in der Allantois-Flüssigkeit 11 Tage alter Hühnerembryonen vermehrt.

Die mit Jod desinfizierten Eier wurden in der Nähe der Allantoismembran punktiert und mit 200 µl einer Virus-Stammlösung mit 30 hämagglutinierenden Einheiten je 1 µg Protein in PIPES-Puffer infiziert. Nach Verschluss des Loches wurden die Eier 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Ernte erfolgte durch partielles Entfernen der Eischale und Entnehmen der Allantoisflüssigkeit, die anschließend zentrifugiert wurde (1500 g, 30 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde bei 25.000 g, 4 °C für 2,5 Stunden in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Virusediment wurde in einem kleinen Volumen Pipes-Puffer aufgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Zur Charakterisierung der biologischen Aktivität wurde die Hämagglutination und der Hämolysetiter bestimmt.

2.15. HVJ-Liposomen

Die Präparation der HVJ-Liposomen, schematisch dargestellt in Abb. 6, umfasste folgende Schritte

1. Präparation des Lipidfilms
2. Herstellung der Liposomen und Einschluss von DNA
3. Inkubation der Liposomen mit SV
4. Abtrennung nicht fusionierter SV und Liposomen mittels Dichtegradientenzentrifugation

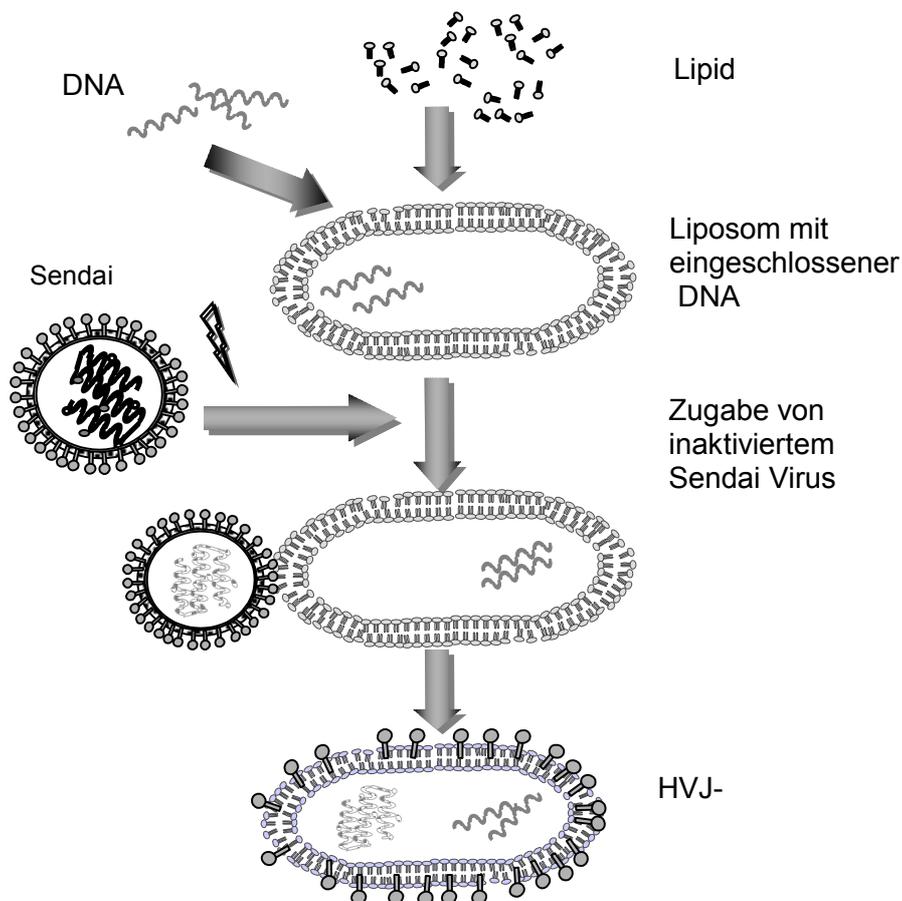


Abb. 6: Schematische Darstellung der Präparation von HVJ-Liposomen

2.16. HVJ-Liposomen mit Phosphatidsäure

Für die Versuche zum Gentransfer wurden Liposomen verschiedener Typen und Zusammensetzungen eingesetzt. Die Präparationen erfolgten entsprechend dem Protokoll von Kaneda (1994) und Haywood (1982), wobei einige Arbeitsschritte modifiziert wurden.

Die Lipide Phosphatidylcholin, Cholesterol und Phosphatidsäure wurden in einem molaren Verhältnis von 5:4:1 in einem Gemisch von Chloroform, Methanol und Wasser (1:0,8:0,2) gelöst, in einem Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der entstandene Lipidfilm wurde in Tetrahydrofuran gelöst und mit der in Puffer gelösten DNA oder der Farbstofflösung Carboxyfluorescein gemischt und kurz beschallt. Nach Abdampfen der Etherphase am Rotationsverdampfer wurden die Liposomen durch einen 0,2 µm Polycarbonatfilter extrudiert und das freie nicht eingeschlossene Carboxyfluorescein über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt.

2.17. Liposomen mit Gangliosid

Als Rezeptoren für Sendai Viren dienen Sialinsäure-haltige Substanzen wie z.B. Glycophorin. Auch Ganglioside, bestehend aus den neutralen Zuckern Glucose, Galactose und N-Acetyl-Galactosamin und einem oder mehreren Sialinsäureresten und agieren als Rezeptoren für Sendai Viren (Haywood, 1986). Sendai Viren binden an Liposomen, die Ganglioside mit einer terminalen Sialinsäure z.B. G_{D1} besitzen.

Für die Liposomenpräparation wurde ein Gangliosid Typ III mit 20 % N-Acetylneuraminsäure verwendet. Es wurden Liposomen nach dem Protokoll von Haywood (1982) mit folgender Zusammensetzung präpariert: PC:PE:CH: G_{D1} 0,7:0,3:0,66:0,03 µmol.

Die Lipide PC:PE:CH wurden in Chloroform gelöst und in einem Rundkolben mit dem in einem Gemisch von Chloroform, Methanol und Wasser (1:0,8:0,2) gelösten Gangliosid gemischt. Am Rotationsverdampfer wurde das Gemisch bis zur Trocknung eingeeengt. Durch Zugabe der gelösten DNA und nachfolgendem Schütteln entstanden Liposomen vom Typ MLV.

Lipide	Mischungsverhältnis	Liposomentyp	fusogene Proteine
PC:CH:PA	5:4:1	REV	15.000 HAU
PC:PE:CH: G_{D1}	0,7:0,3:0,66:0,03 µmol	MLV	15.000 HAU

Tab. 3: Zusammensetzung der HVJ-Liposomen

2.18. HVJ-Liposomenkomplex

Der HVJ-Liposomenkomplex bildet sich durch Fusion von Liposomen und Sendai Viren. Sendai Viren wurden vor der Präparation zur Inaktivierung mit UV-Licht bestrahlt. Dann wurden 500 µl der Liposomenlösung mit 10 µl Sendai Virus gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml BSS wurde der Ansatz auf 37 °C erwärmt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Trennung von ungebundenem Sendai Virus und Sendai-Virus-Liposomenkomplex erfolgte über einen Dichtegradienten, hergestellt aus 30, 40 und 60 % Sucroselösung oder einem Ficollgradienten gleicher Zusammensetzung. Die Probelösung wurde durch Zentrifugation 2 Stunden bei 22500 rpm getrennt.

Die Komplexe wurden anschließend im Elektronenmikroskop ausgewertet. Parallel dazu wurden Zellkulturen transfiziert.

2.19. Herstellung der Virosomen

Virosomen stellen einen weiteren Typ fusogener Transportvesikel dar, zu deren Produktion nur bestimmte Virusproteine benötigt werden.

Die Präparation der Virosomen erfolgte anfangs nach dem klassischen Protokoll der Gruppe um Loyter (Gitman u. Loyter, 1984; Gitman et al. 1985), in dem Sendai Virosomen lediglich aus dem viralen Extrakt, bestehend aus Spikeproteinen und endogenen viralen Lipiden ohne zusätzliche externe Lipidgabe hergestellt wurden. Auf Grund wenig zufriedenstellender Ergebnisse nach Verwendung dieser Vorschrift wurde geprüft, ob sich der Zusatz von Lipiden positiv auf Partikelgröße und Form auswirkt. Dazu wurden die Lipide Cholesterol (CH), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) in unterschiedlichen variierenden Mengen eingesetzt. Die Optimierung der Virosomenpräparation erfolgte durch K.K.H. Bareesel (1997) im Rahmen seiner Dissertation im Institut für Immunologie und Molekularbiologie der FU Berlin. Die optimierte Herstellung der Virosomen umfasst folgende Schritte: 1. Aufschluss der Sendai Viren mit Detergenz, 2. Bildung gemischter Mizellen und Abtrennung des Nukleokapsids, 3. Zugabe externer Lipide und komplexierter DNA, 4. Entfernung des Detergenz und Rekonstitution der viralen Proteine in die neu gebildete Lipidmembran.

Zur optimierten Herstellung der Virosomen wurde ein Lipidgemisch von Cholesterol (CH), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) im Verhältnis: CH:SM:PC:PE; 35:35:20:10:27 mol% eingesetzt. Die Lipide wurden in Chloroform gelöst und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Der so getrocknete Lipidfilm wurde in PIPES-Puffer aufgenommen. Sendai Viren wurden in 2 % TritonX-100 in PIPES-Puffer aufgeschlossen (4 °C, 1

Stunde). Dabei wurde die Virusmembran aufgebrochen und gemischte Mizellen, bestehend aus Virusproteinen, Lipiden und Detergenzmolekülen gebildet. Im Detergenz wurden nicht lösliche Bestandteile durch Zentrifugation (100.000 x g, 4 °C, 50 min) entfernt. Plasmid-DNA - in deionisiertem Wasser - und Poly-L-Lysin wurden in einem Verhältnis 1:1,5 gemischt und mit der vorbereiteten Lipidsuspension sowie den Mizellen gemischt. Die Rekonstitution der Virosomen erfolgte dann durch schrittweises Entfernen des Detergenz mittels SM-2 Biobeads, wobei sich die viralen Proteine (Spikes) in die neu gebildete Lipidschichten integrierten. Die Virosomensuspension wurde letztlich zentrifugiert (100.000 x g, 4 °C, 45 min) und das so gewonnene und gereinigte Virosomensediment in DMEM resuspendiert (0,1-0,5 mg/ml Protein) und bei 4 °C gelagert.

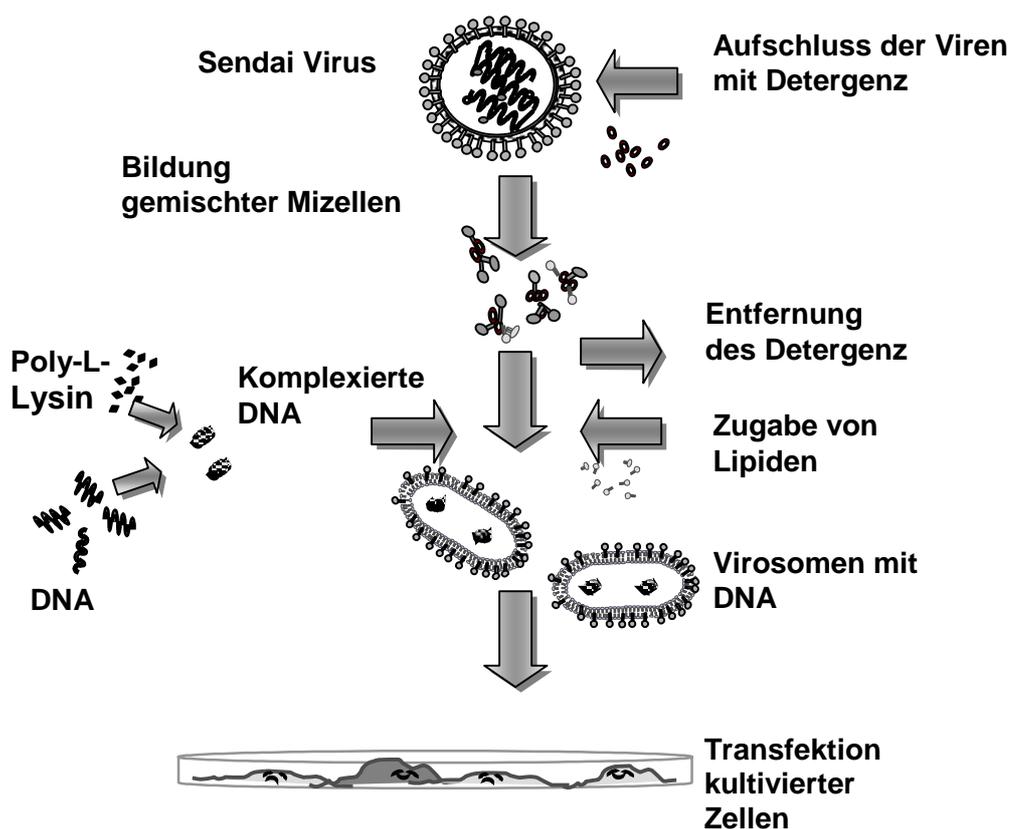


Abb. 7: Schema der Virosomenpräparation

2.20. Präparation der Plasmid-DNA

Präparation, Reinigung und Charakterisierung der DNA wurde von verschiedenen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die Herstellung der DNA erfolgte entsprechend einem von Groth et al. (1996) optimierten Verfahren zur chemischen Transformation von *E. coli*.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und zur Transfektion wurde das Plasmid pUT651 verwendet. Die Amplifikation der Plasmide erfolgte in *E. coli*-Bakterien (Groth 2000). Mit Hilfe der alkalischen Lyse wurden die Bakterien aufgeschlossen. Durch Natriumacetatfällung wurde bakterielle DNA und Proteine von der Plasmid-DNA getrennt. Die Reinigung der DNA erfolgte mit Ionenaustauschersäulen nach Vorschrift des Herstellers (Quiagen, 1995). Abschließend erfolgte die Kontrolle auf Verunreinigung mit Proteinen und die Konzentrationsbestimmung (Groth, 2000).

2.21. Goldmarkierung der DNA

Um den Weg der DNA zu verfolgen oder auch die Menge der in Liposomen verkapselten Plasmide abzuschätzen, wurde die DNA mit einer Goldmarkierung versehen.

Anfangs wurde die DNA mittels einer Biotin-Streptavidin-Bindung mit Gold versehen. Die Markierung erfolgte nach einem Protokoll von Zabner et. al. (1995). Die DNA-Lösung, bestehend aus 100 µg des Plasmids, wurde mit 1,63 µg photoaktivierbarem Biotin (Pierce, Rockford, USA) gemischt, 2 Minuten mit UV-Licht 312 nm angeregt und säulenchromatografisch von ungebundenem Biotin gereinigt. Eine Lösung von 29 µg biotinyliertem Plasmid wurde mit 1 ml Streptavidin-Gold (10 nm) (Amersham, Amersham, UK) für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Reinigungsschritt mit Hilfe einer Säule wurde die Präparation 24 Stunden gegen HEPES-Puffer pH 7,4 dialysiert.

Eine schnellere und weniger aufwendige Markierungsmethode wurde mit kationischem Gold erreicht. Dabei handelt es sich um kolloidales Gold, das mit Poly-L-Lysin konjugiert wurde (British Biocell International Ltd, Cardiff, UK). Poly-L-Lysin besteht aus positiv geladenen Aminosäureketten, die auf Grund ihrer Ladung an negativ geladene DNA bindet.

Ein Vorteil dieser Methode ist die einfache Präparation, bei der nur ein einziger Inkubationsschritt nötig ist. Die DNA wird nur mit kationischem Gold gemischt. Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen wurden zwei Goldgrößen (5 und 15 nm) sowie Mischungsverhältnisse zwischen 0,025, 0,05 und 0,1 µg PLL-Gold je µg DNA eingesetzt.

2.22. Komplexierung der DNA

Die Zugabe polykationischer Agenzien zur negativ geladenen DNA führt zur Reduzierung des DNA-Volumens und wird als Kondensation bezeichnet (Bloomfield, 1996). Neben einer Verringerung des Volumens sollte durch die Komplexierung die DNA vor Abbau durch Nukleasen in der Zelle geschützt und die Aufnahme in die Zelle ermöglicht werden.

Für die Versuche mit Virosomen erfolgte die Kondensation der DNA nur mit Poly-L-Lysin. Die DNA (3 µg) wurde erst mit Poly-L-Lysin Gold markiert, ehe durch Zugabe definierter Mengen von (1,5, 3 und 6 µg) Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat Polyplexe präpariert und nach Negativkontrastierung oder auch Schrägbedampfung ausgewertet wurden.

2.23. Präparation kationischer Liposomen

Die Präparation der Liposomen und Lipoplexe wurde hauptsächlich von Detlef Groth im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.

Kationische Lipide und Helferlipide wurden in Chloroform gelöst (10 mg/ml) und gemixt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Lipidfilm getrocknet. Nach Zugabe von deionisiertem Wasser bildeten sich unter Schütteln die Liposomen (Groth, 2000).

2.24. Präparation kationischer Lipoplexe und Lipopolyplexe

Die Präparation der Lipoplexe erfolgte durch Mischen der gelösten DNA und Liposomen.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Lipoplexe verwendet, um Zellen zu transfizieren.

Lipopolyplexe - Komplexe aus Liposomen, DNA und Polykationen- wurden präpariert, indem die DNA mit Protaminsulfat oder Poly-L-Lysin (Polykationen) vorkomplexiert und anschließend mit Liposomen inkubiert wurde.

2.25. Zellkultur

Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in Mikrotiterplatten angelegt. Als Medium wurde für F98-Zellen DMEM, für N64-Zellen MEM und für CC531- und MCF7-Zellen RPMI-1640-Medium verwendet, jeweils mit 10 % fötalem Kälberserum. Für Transfektionsversuche sät man die Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten für elektronenmikroskopische Untersuchungen in 24-Well-Zellkulturplatten je 1-2 Tage vor Versuchsbeginn ca. 10^5 Zellen ein. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.26. In-vitro Gentransfer

Vor der Transfektion wurden die Zellen mit Medium (ohne FKS) gewaschen, anschließend entweder mit 300 µl Virosomen (150 µg Protein), Sendai-Virus-Liposomen, Lipoplexen oder Lipopolyplexen inkubiert. Nach ca. 3 Stunden wurde die Lösung durch komplettes Zellzuchtmedium ersetzt und weitere 48-72 Stunden kultiviert, bevor die Transfektionseffizienz bestimmt wurde.

2.27. X-Gal-Färbung

Zellen, die das Markergen β-Gal integriert und Galaktosidase exprimiert haben, färben sich nach Zugabe der Lösung blau und erlauben so eine Beurteilung der Gentransfereffizienz.

Für die Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit der Färbelösung aus 0,85 mg X-Galaktose, 3 mM Kaliumhexacyano-III ferrat, 3 mM Kaliumhexacyano-IV ferrat und 1,1 mM Magnesiumchlorid inkubiert. Anschließend konnten die Zellen mikroskopiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische und immunelektronenmikroskopische Charakterisierung von Sendai-Virus-Liposomen und Virosomen-DNA-Komplexen

3.1.1. Morphologie von Sendai Viren

Sendai Viren gehören zur Gruppe der Paramyxoviren (Kingsbury, et al., 1978). Sie bildeten den Ausgangspunkt der Präparation von fusogenen HVJ-Liposomen und Virosomen.

Zur Beurteilung der Morphologie wurden sie negativ kontrastiert, im Mikroskop ausgemessen und verschiedene Antikörper eingesetzt, um die biologischen Eigenschaften der Viren zu beurteilen.

Die Morphologie und der Aufbau der Sendai Viren lässt sich nach Negativkontrastierung darstellen und in Abhängigkeit der Kontrastierung verschiedene Details beobachten. So konnte nach Einsatz von Uranylacetat (UA) vor allem die Oberfläche, nach Benutzung von Ammoniummolybdat (AM) eher die innere Virusstruktur beobachtet werden. Deutlich ist eine Gliederung in Hülle und Nukleokapsid erkennbar. Das Nukleokapsid ist von helikaler Symmetrie und in der Hülle aufgerollt. Es beinhaltet neben der Virus RNA mehrere Arten verschiedener Proteine, die einerseits die genetische Information schützen, andererseits Transkriptionsfaktoren darstellen (s. Einleitung). Die Hülle der Viren besteht aus Proteinen und einer Lipiddoppelschicht. Die viralen Glykoproteine sind in der Lipidmembran verankert (Knutton, 1977).

Spikes findet man teils gleichmäßig, teils ungleichmäßig über die Virusoberfläche verteilt. Die Morphologie und Größe der SV erschien sehr variabel. Diese Eigenschaft wird als Pleomorphismus bezeichnet (Horne and Waterson, 1960). Sie ist abhängig vom Alter der Virionen und wird durch die Präparation beeinflusst (Kim et al., 1979).

Zur Größenbestimmung wurden 800 Sendai Viren im Mikroskop ausgemessen. Die durchschnittliche Größe betrug 150 nm (149 ± 56 nm). Die kleinsten Viren wurden mit 40 nm, das größte Viruspartikel immerhin mit 720 nm ermittelt (s. Abb. 8).

Weiterhin wurden immunelektronenmikroskopische Methoden genutzt, um die biologische Aktivität der Viren zu charakterisieren. Dazu wurden monoklonale Antikörper gegen das F- und HN-Protein sowie polyklonale Antiseren eingesetzt. Zum Nachweis der Antikörper wurde die Protein-A-Gold-Technik genutzt und auf 200 Viren der Anteil des gebundenen Goldes bestimmt. Trotz z.T. unverdünnt eingesetzter monoklonaler Antikörper konnte nur mäßige Goldbindung an den Spikes beobachtet werden. Mit Hilfe der polyklonalen Antikörper wurden je nach Antikörperkonzentration zwischen 0,5 und 2 Goldpartikel je Virus dokumentiert.

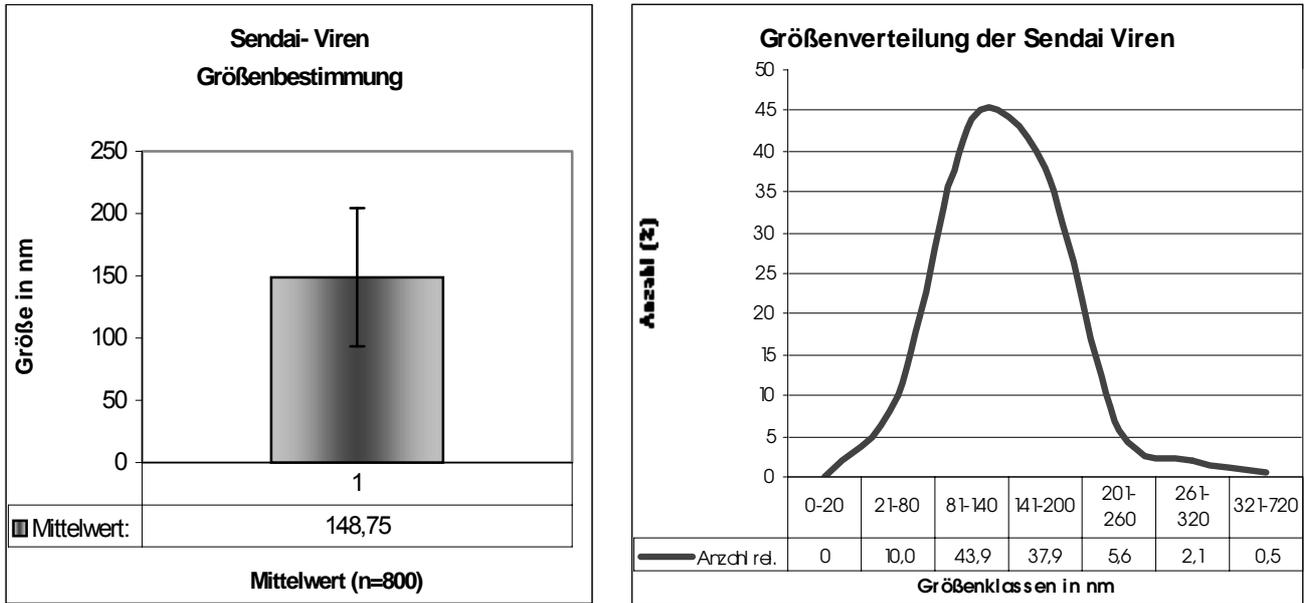


Abb. 8: Größenbestimmung und Größenverteilung der Sendai Viren

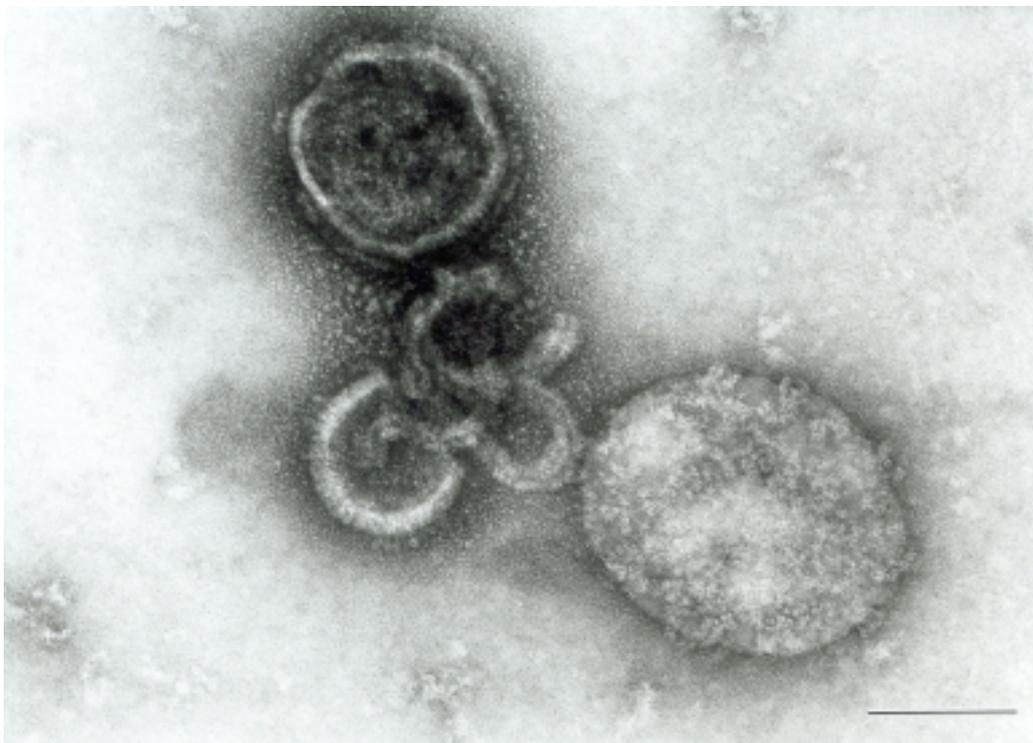


Abb. 9 a: Sendai Viren nach Negativkontrastierung mit 2 % Uranylacetat.
200.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm



Abb. 9 b: Sendai Viren nach IEM mit pAk gegen Sendai-Virus-Protein. 300.000fache Vergrößerung.
Der Balken entspricht 100 nm

3.1.2. Charakterisierung der Liposomen vor und nach der Inkubation mit Sendai Viren

Liposomen wurden nach jedem Präparationsschritt im EM analysiert:

1. nach der Präparation der Liposomen
2. nach der Inkubation mit Sendai Viren
3. nach dem Abtrennen ungebundener Viren

Die Liposomen wurden vorher entweder mit UA oder AM negativ kontrastiert und fotografiert. Für die Liposomenpräparationen kamen zwei verschiedene Lipidzusammensetzungen zur Anwendung, wobei die Versuche bis zu dreimal wiederholt wurden.

Die Ausgangsliposomen waren häufig mehrschichtig und von sehr unterschiedlicher Größe. So wurden Partikel mit Durchmessern zwischen 100 und 1000 bzw. 2000 nm beobachtet.

HVJ-Liposomen entstehen durch Fusion von Sendai Viren mit Liposomen. Bei diesem Vorgang sollten die viralen Proteine in die Liposomenmembran integriert und den Liposomen die fusogenen

Eigenschaften der Sendai Viren übertragen werden. Zur Inaktivierung des viralen Genoms wurden die Viren vor der Fusion mit UV-Strahlung inaktiviert. Die Fusion von Sendai Viren und Liposomen verläuft nach Beschreibung von Haywood (1991) und Tsao/Huang (1986) in drei Schritten: Nach der Bindung erfolgt die Stabilisierung der Bindung und schließlich die Fusion.

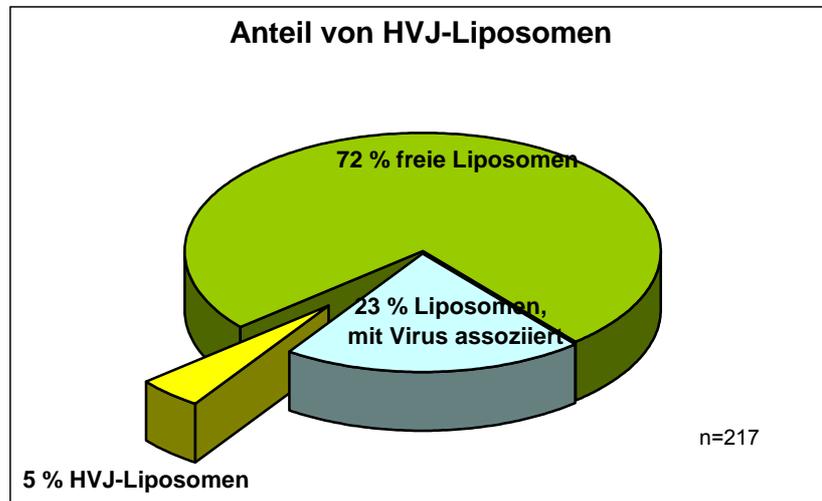


Abb. 10: Verhältnis von freien und fusionierten Liposomen nach Inkubation mit Sendai Viren

Nach der Inkubation von Liposomen mit Sendai Viren war ein Teil der Viren an Liposomen adsorbiert, wobei ein einzelnes Virus bis zu vier Liposomen gleichzeitig binden konnte. Ein kleiner Teil der Liposomen - 5 % - konnte als das gewünschte Fusionsprodukt HVJ-Liposomen identifiziert werden. Diese Liposomen sind durch ihren oft unregelmäßigen Spikebesatz auf der Oberfläche gekennzeichnet. Weiterhin bleibt meist virales Nukleokapsid in einem Teil der Liposomen sichtbar. Der größte Teil der Liposomen (84 %) war weder mit Sendai Viren assoziiert noch fusioniert (Abb. 10) Zwischen den einzelnen Liposomentypen bzw. der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung (Gangliosid, Phosphatidsäure) konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. In beiden Liposomenpräparationen wurden jeweils überwiegend freie und ungebundene Liposomen und nur wenige HVJ-Liposomen nachgewiesen.

3.1.3. Nachweis fusogener Proteine auf den HVJ-Liposomen

Der Nachweis der biologischen Aktivität viraler Proteine in der Liposomenmembran erfolgte unter Einsatz monoklonaler Antikörper gegen HN- und F-Protein und durch Verwendung der Protein-A-Gold-Technik.

Mit Hilfe dieser Technik konnte die Hämagglutinin/Neuraminidase und auch die Fusionsaktivität der HVJ-Liposomen nachgewiesen werden. (Die entsprechenden Antikörper wurden unverdünnt eingesetzt, die Protein-A-Gold-Lösung 1:50 verdünnt.) Auf den HVJ-Liposomen konnten teilweise bis zu 3 Goldpartikel nachgewiesen werden. Auf Grund der relativ schwachen Bindung der monoklonalen Antikörper an native Sendai Viren kann aber aus diesen Ergebnissen keine Aussage zur Veränderung der Fusionsfähigkeit von HVJ-Liposomen im Vergleich zu nativen Viren abgeleitet werden.

3.1.4. Ergebnisse aus den Transfektionsversuchen

Um die Funktionsfähigkeit als Gentransferliposomen zu testen, wurde das Markergen pUT 651 (10 µg in 50 µl Puffer gelöst) in die Liposomen eingeschlossen und mit Sendai Viren fusioniert.

Kultivierte Zellen (F98) wurden mit den präparierten HVJ-Liposomen für 2 Stunden inkubiert und 48 Stunden später nach der X-Gal-Färbung lichtmikroskopisch ausgewertet.

Die Transfektionseffizienz der HVJ-Liposomen beschränkte sich auf einige wenige blaue Zellen bis maximal 1 % der Zellen. Unterschiede zwischen den Liposomenpräparationen konnten nicht beobachtet werden, da die Gentransferrate zu gering war.

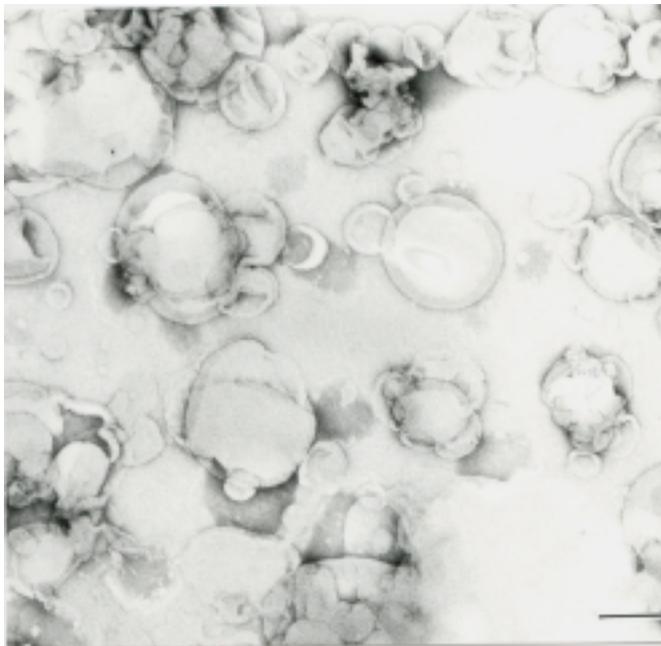


Abb. 11: Liposomen vor der Fusion mit Sendai Viren. Negativ kontrastiert mit 2 % UA Vergrößerung 40.000fach. Der Balken entspricht 200 nm

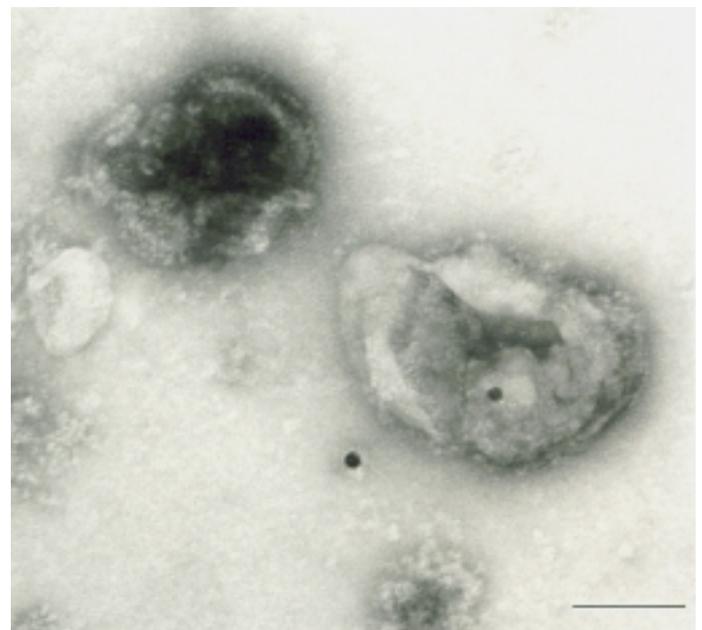


Abb. 12: HVJ-Liposomen, Nachweis der viralen Glykoproteine mit monoklonalen Antikörpern gegen HN-Protein. Negativ kontrastiert mit 2 % UA Vergrößerung 150.000fach. Der Balken entspricht 100 nm.

3.1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der HVJ-Liposomen

HVJ-Liposomen stellen einen neuen Typ fusogener Liposomen dar. Sie verbinden die Vorteile von Liposomen (gezieltes Verkapseln von genetischem Material oder anderer Wirkstoffe) mit denen der Sendai Viren (Fusionsfähigkeit bei neutralem pH-Wert und Umgehung des endozytotischen Aufnahmeweges).

Sendai Viren wurden mit Hilfe der Negativkontrastierung und Immunelektronenmikroskopie charakterisiert. Die Viren waren ca. 150 nm groß und mit Hilfe verschiedener Antikörper konnten Hämagglutinin/Neuraminidase und Fusionsaktivität nachgewiesen werden. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass

1. Sendai Viren mit Liposomen unterschiedlicher Lipidkompositionen fusionieren,
2. HVJ-Liposomen mit elektronenmikroskopischen Methoden identifizierbar sind und
3. die Spikes auf den HVJ-Liposomen noch fusogene Eigenschaften besitzen.

Es war aber trotz dieser Vorteile der HVJ-Liposomen nicht möglich, mit diesen Partikeln reproduzierbaren Gentransfer zu erreichen. Auf Grund der unbefriedigenden Ergebnisse bei der Ausbeute an HVJ-Liposomen sowie der geringen Transfektionseffizienz wurden die Versuche zur Präparation von Sendai-Virus-Liposomen eingestellt.

3.1.6. Morphologische Charakterisierung von Virosomenpräparationen

Virosomen stellen einen weiteren neuen Typ fusogener Gentransfervesikel dar. Während bei HVJ-Liposomen inaktivierte Viren und Liposomen fusionieren, werden für die Virosomenpräparation nur die Spikeproteine benötigt, die in eine Lipidmembran rekonstituiert werden (s. S. 38, Abb. 7).

Die Charakterisierung der Virosomen erfolgte mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Techniken. So wurde Morphologie, Größe und Verteilung der Spikes nach Negativkontrastierung, die biologischen Eigenschaften wie Fusionsaktivität mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie bestimmt.

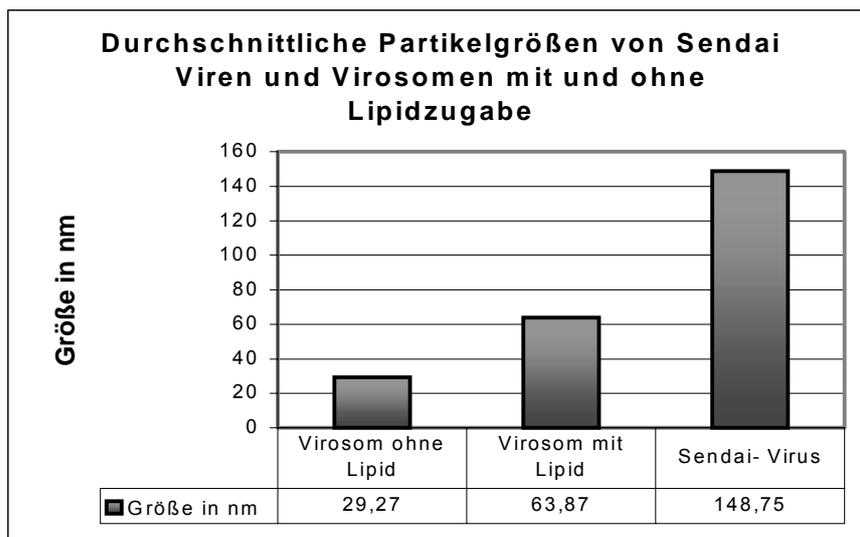


Abb. 13: Größen von Sendai Viren und Virosomen (n=800)

Virosomen, die nach dem klassischen Protokoll der Gruppe um Loyter (Gitman u. Loyter, 1984; Gitman et al., 1985), ohne zusätzliche Lipidgabe hergestellt wurden, waren sehr ungleichmäßig in ihrer Morphologie. Spikeproteine schienen nur z.T. in Envelopes eingebaut worden zu sein. Ein Teil der Proteine war in Aggregaten assoziiert. Außerdem waren die Partikel sehr klein, 70 % der Virosomen wiesen Durchmesser von nur 40-60 nm auf (Abb. 13, 14a). Im Gegensatz dazu waren die Virosomen, die nach der optimierten Variante mit zusätzlichen Lipiden präpariert wurden, größer. Sie präsentierten sich zwar als heterogene Partikelpopulation, jedoch wurden Größen zwischen 40 bis mehreren hundert nm beobachtet. Den größten Anteil bildeten Virosomen zwischen 40 und 100 nm. Die Formen der Virosomen waren rund bis oval. Die Anzahl der Lipidschichten ließ sich nach Negativkontrastierung mit Ammoniummolybdat sowie nach Auswertung von Ultradünnschnitten bestimmen. So konnten neben unilamellaren Virosomen bis zu 6 Lipidschichten in den Virosomen beobachtet werden. Spikes waren gleichmäßig und in der korrekten Position mit den Köpfchen der Spikes nach außen orientiert - rechtwinklig zur Lipidschicht in die Lipidmembran rekonstituiert (s. Abb. 15). Bei multilamellaren Vesikeln wurden auch in inneren Schichten Spikes beobachtet.

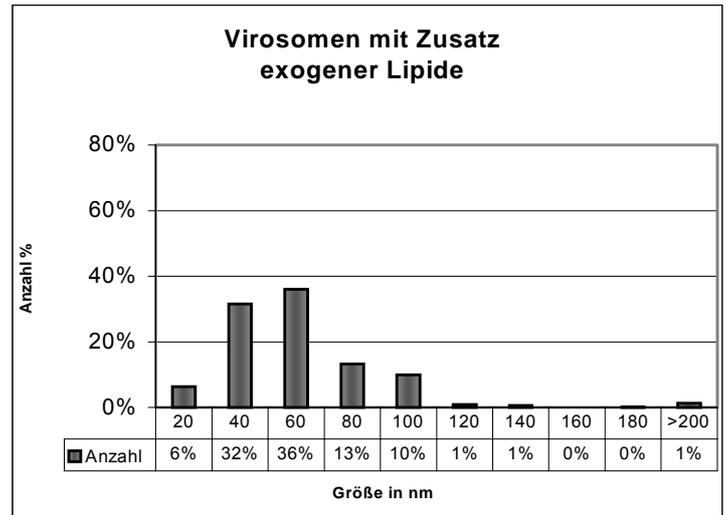
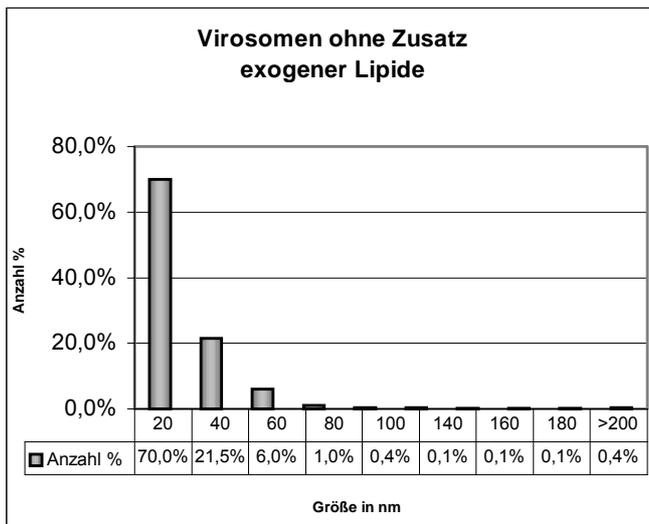


Abb. 14a: Größenverteilung der Virosomen:
Präparation ohne Lipidzugabe

Abb. 14b: Größenverteilung der Virosomen:
Präparation mit Lipidzugabe

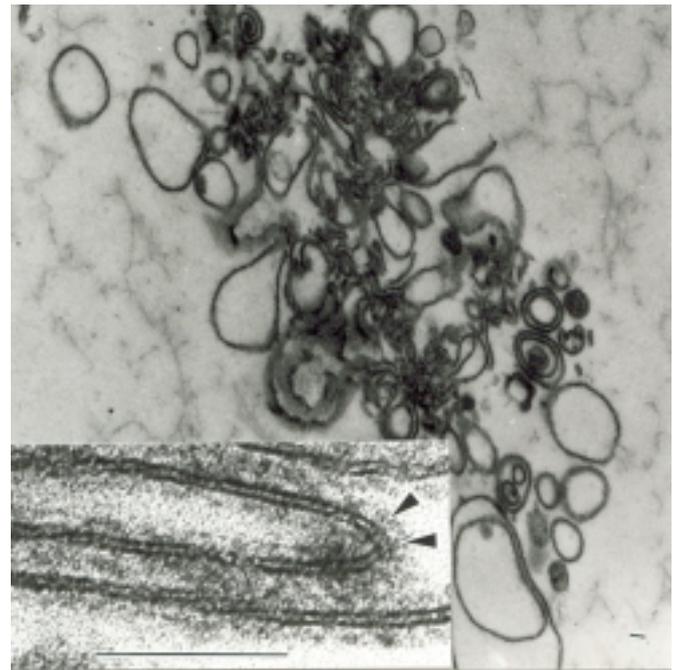
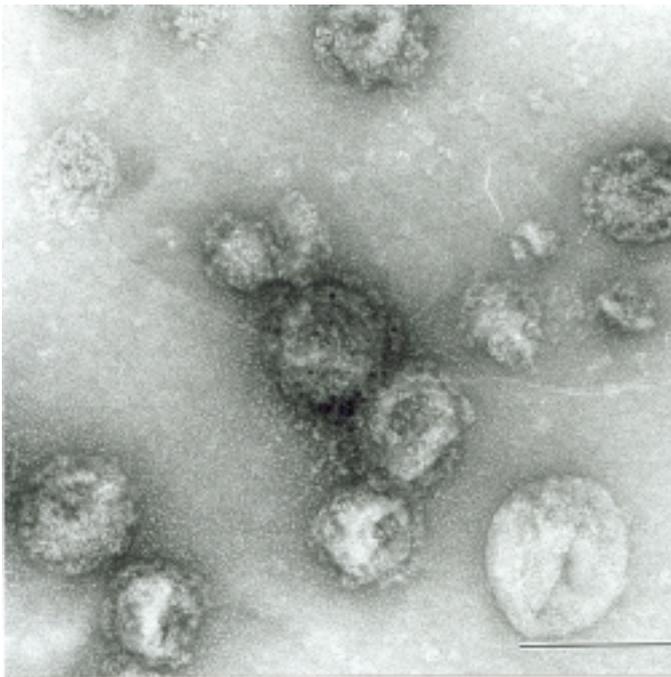


Abb. 15: Morphologie der Virosomen,
a) nach Negativkontrastierung mit 2 % UA
200.000fache Vergrößerung

b) nach Ultradünnschnitten
20.000fache Vergrößerung.

Kleines Bild 250.000fache Vergrößerung

In den Virosomenpräparationen wurden überwiegend Virosomen mit einer Größe zwischen 40-100 nm beobachtet (a). Die unterschiedliche Größenverteilung wird in Abb. b deutlich. Das Inset zeigt einen Ausschnitt aus einer Lipidschicht mit rekonstituierten Spikeproteinen. Die Balken entsprechen jeweils 100 nm.

3.1.7. Nachweis fusogener Proteine auf den Virosomen

Neben dem korrekten Einbau der Spikes wurden auch die Funktionsfähigkeit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern geprüft. Dazu wurden mono- und polyklonale Antikörper und Protein-A-Gold Technik verwendet. Besonders gute Goldbindung konnte nach Einsatz der polyklonalen Antiseren verzeichnet werden. Aber auch mit monoklonalen Ak gegen HN- und F-Protein konnte die Funktionsfähigkeit der Spikes gezeigt werden. Allerdings war die Goldbindung nach Einsatz des Antikörpers gegen das F-Protein bei allen untersuchten Präparationen schlechter als die Ergebnisse mit HN-Antikörpern.

Wenig befriedigende Ergebnisse wurden bei Virosomen erreicht, die ohne zusätzliche Lipidgabe hergestellt wurden. Hier wurden unabhängig von den genutzten Antikörpern unbefriedigende Antikörper- bzw. Goldbindung beobachtet.

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurde von je 200 Virosomen die Zahl der gebundenen Goldpartikel ausgezählt. Wie die Ergebnisse in Abb. 16 dargestellt zeigen, hat die Zugabe exogener Lipide großen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften der Virosomen.

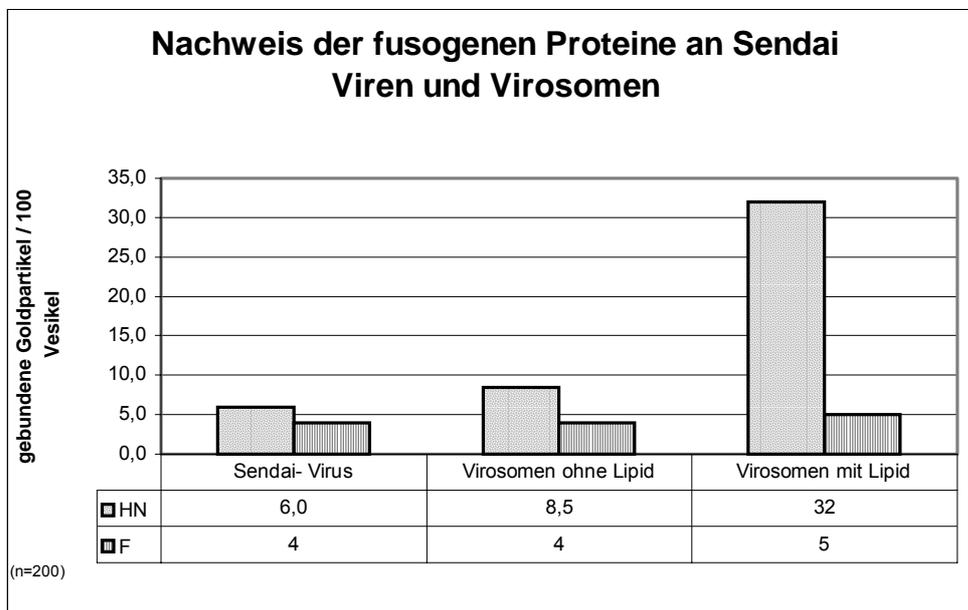


Abb. 16: Nachweis der fusogenen Proteine an Sendai Viren und Virosomen

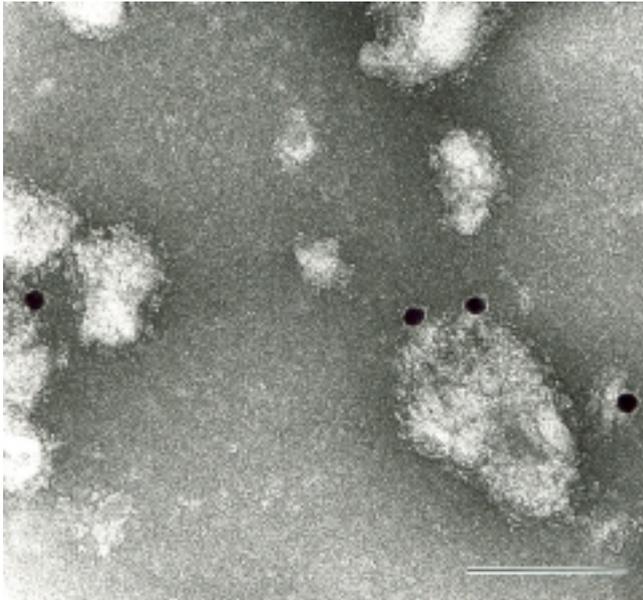


Abb. 17a: Nachweis des HN-Proteins mit monoklonalen Antikörpern mAk SV-HN, 200.000fache Vergrößerung



Abb. 17b: Nachweis des F-Proteins mit monoklonalen Antikörpern mAk SV-F, 200.000fache Vergrößerung

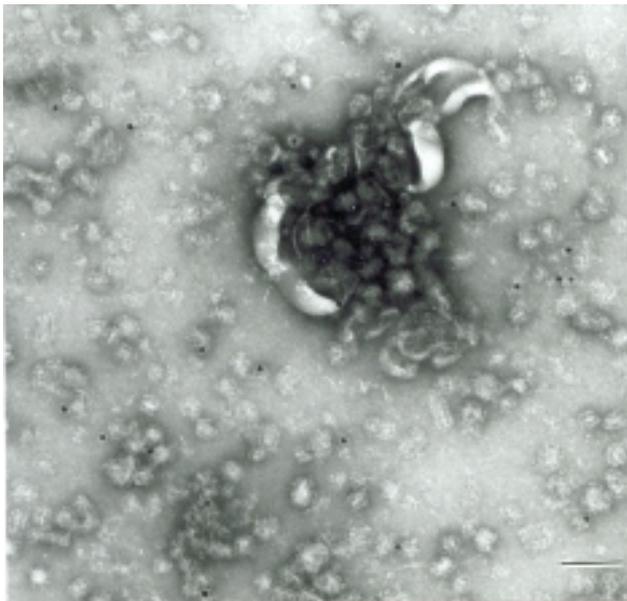


Abb.17c: Nachweis der viralen Glykoproteine mit polyklonalem Antiserum gegen F- und HN-Protein. 75.000fache Vergr.

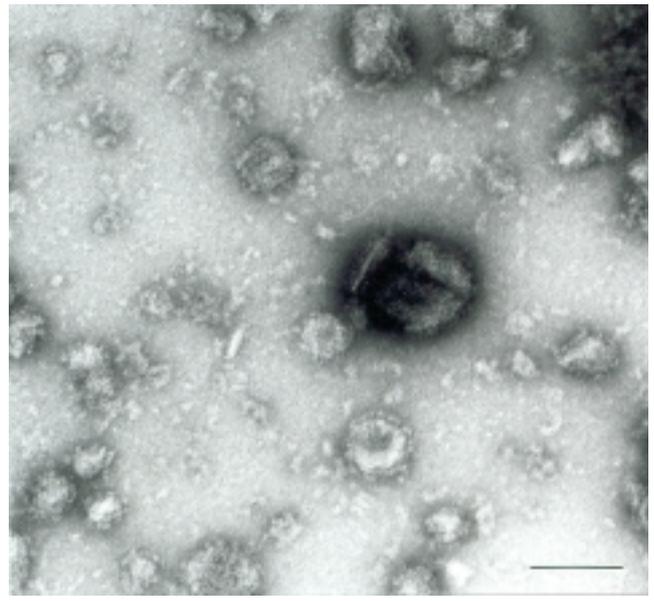


Abb. 17d: Kontrolle: Virosomen ohne Antikörper, aber mit Protein-A-Gold 125.000fache Vergr.

Abb. 17 a-d: Virosomen nach Immun-EM, Nachweis fusogener Proteine mit verschiedenen Antikörpern. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit Protein-A-Gold (15 nm). Die Balken entsprechen jeweils 100 nm.

3.1.8. Ergebnisse der DNA-Markierung

Die Markierung der DNA in Virosomen erfolgte ausschließlich mit kationischem Gold. Um zu bestimmen, unter welchen Bedingungen eine zufriedenstellende Markierung erreicht wird, wurde 5 und 15 nm kationisches Gold sowie verschiedene Mischungsverhältnisse analysiert.

Um die Effizienz der Markierung abzuschätzen, wurden markierte Plasmide gespreitet, schrägbedampft und im Mikroskop oder vom Foto etwa 300 Plasmide ausgezählt.

Beide Goldgrößen lassen sich zur Markierung der DNA einsetzen, jedoch scheint Plasmid-DNA nach Inkubation mit 15 nm Gold ungleichmäßiger verteilt zu sein. Gute Resultate wurden erreicht, wenn 1 µg Plasmid-DNA mit 0,05 µg Poly-L-Lysin-Gold-Konjugat (5 nm) gemischt und etwa 30 Minuten inkubiert wurden. Eine Erhöhung der Goldkonzentration führt zu einer höheren Markierungsdichte, allerdings wurden dann bei Verwendung von 5 nm Gold auch freie und ungebundene Goldpartikel beobachtet. Aus diesen Gründen wurde zur Markierung von 1 µg Plasmid-DNA 0,05 µg PLL-Gold (5 nm) eingesetzt. Mit dieser Technik erhalten etwa zwischen 10-20 % der eingesetzten Plasmide eine Goldmarkierung.

3.1.9. Beladung der Virosomen mit DNA

Um die Eignung der Virosomen für den Gentransfer zu testen, wurde das Plasmid (LacZ) als Markergen während der Rekonstitution zur Virosomenpräparation zugefügt. Das verwendete Plasmid hatte eine Größe von 6,4 kbp, das entspricht einer Länge von etwa 2.100 nm im linearisierten Zustand (Kleinig, H. u. Sitte, P., 1986). Um Volumen und Länge der DNA zu komprimieren, können chemische Agenzien, multivalente Kationen wie Polyamine mit der DNA gemischt werden. Dies führt zur Kondensierung der DNA und zur Reduzierung des Volumens (Bloomfield, 1996).

Die Plasmid-DNA wurde für die Virosomenversuche, wie unter Material und Methode beschrieben, mit Poly-L-Lysin komplexiert und während der Rekonstitutionsphase zugefügt. Mit Hilfe der DNase Behandlung konnte Ponimaskin et al. (2000) zeigen, dass die Poly-L-Lysin-komplexierte DNA in Virosomen eingeschlossen wird und resistent gegen DNase-Abbau ist, wenn die Virosomen mit externer Lipidzugabe präpariert wurden. Im Gegensatz dazu findet DNase-Verdauung statt, wenn die DNA nicht mit Poly-L-Lysin komplexiert oder komplexierte DNA in Virosomen eingeschlossen wird, die nicht nach der optimierten Variante der Virosomenpräparation hergestellt wurden.

Zum elektronenmikroskopischen Nachweis der in Virosomen verkapselten DNA wurde diese vor Komplexierung mit Poly-L-Lysin mit kationischem Gold (5 nm) markiert. Die Virosomen wurden dann nach Negativkontrastierung auf eingeschlossene Goldmarkierungen untersucht, die Größe der Virosomen gemessen und die Anzahl der Goldkolloide geschätzt.

Der Einschluss der DNA war abhängig von der Größe der Virosomen. Gold-markierte DNA konnte nur in größeren Virosomen ab 200 nm Durchmesser lokalisiert werden. Daher wurden in einem weiteren Versuch 200 Virosomen mit einem Durchmesser zwischen 200 und 8000 nm analysiert. In etwa 30 % der Virosomen konnte Gold-markierte DNA lokalisiert werden (Abb. 18). Diese großen Virosomen enthielten überwiegend mehr als 100 Goldkolloide, das entspricht ca. 500 eingeschlossenen Plasmiden/Virosom.

Die DNA-Poly-L-Lysin-Komplexe waren ca. 20 nm groß und beinhalteten bis zu 6 Goldpartikel, die jeweils am Rand gebunden waren. Möglicherweise stellen die Goldpartikel ein sterisches Hindernis bei der Komplexierung dar, so dass markierte DNA nur am Rand der Komplexe eingebaut werden kann.

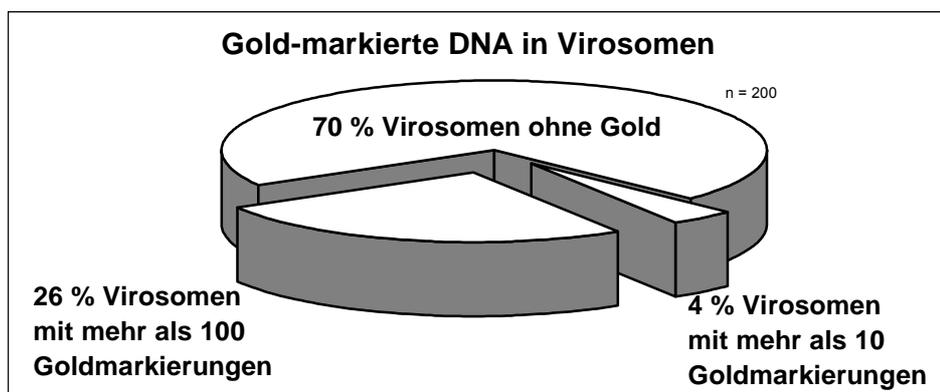


Abb. 18: Verteilung der DNA in Virosomen. 26 % der Virosomen mit einer Größe zwischen 200 und 800 nm enthielten etwa 500 Plasmide je Virosom (mehr als 100 Goldmarkierungen) und 4 % ca. 50 Plasmide (mehr als 10 Goldmarkierungen). In 70 % der untersuchten Virosomen konnte keine Goldmarkierte DNA lokalisiert werden.

3.1.10. Morphologie von Sendai-Virus-Liposomen und Virosomen-DNA-Komplexen- Zusammenfassung der Ergebnisse

Virosomen stellen einen weiteren Typ fusogener Gentransfervesikel dar. Ihre Eigenschaften sind abhängig von der Herstellung bzw. der externen Zugabe einer optimierten Lipidmischung. Die optimierten Virosomen sind im Mittel kleiner (50-60 nm) als die nativen Sendai Viren. Trotzdem ist es möglich mit Poly-L-Lysin komplexierte DNA in den Innenraum der Virosomen zu verkapseln. Der DNA-Gehalt ist abhängig von der Virosomengröße. Etwa 25 % der analysierten Virosomen mit einer Größe zwischen 200-8.000 nm enthielten jeweils mehr als 100 Goldmarkierte Plasmide. Ein weiterer wichtiger Parameter zur Beurteilung der Partikel stellen die fusogenen Eigenschaften der Virosomen dar. Sie wurden mit Hilfe immunoelektronenmikroskopischer Techniken beurteilt. Sowohl mit monoklonalen Antikörpern gegen Hämagglutinin/Neuraminidase und das Fusionsprotein als auch mit polyklonalen Antiseren konnte gezeigt werden, dass die Virosomen fusogene Eigenschaften besitzen.

3.2. Untersuchungen zu Aufnahme- und Transfektionsverhalten dieser Vesikel an unterschiedlichen Zellen

3.2.1. Detektion der Virosomen auf den Zellen

Nach der Charakterisierung der Virosomen mit Hilfe der Transmissions-EM wurde deren in-vitro Verhalten wie Bindung, Aufnahme und Verteilung auf und in der Zelle untersucht. Dazu wurden F98-Zellen (Rattengliomzelle) und CC531-Zellen (Rattencoloncarzinomzelle) kultiviert und mit Virosomen inkubiert. Nach Standardpräparation (fixieren, entwässern, trocknen und sputtern mit Gold/Palladium) ließen sich nur große Virosomenkomplexe im Rasterelektronenmikroskop sicher identifizieren. Deshalb wurden die Zellen nach der Inkubationszeit fixiert und mittels polyklonaler Antiseren gegen Sendai-Virus-Protein, sowie Protein-A-Gold-Technik und Silberverstärkung markiert, mit einer leitenden Kohleschicht bedampft und mit Hilfe der Röntgenmikroanalyse und rückgestreuter Elektronen ausgewertet.

Eine Möglichkeit Informationen über die Virosomenverteilung auf den Zellen zu erhalten, bot die Nutzung rückgestreuter Elektronen für die Auswertung. Die Rückstreuung von Elektronen ist abhängig von der Ordnungszahl. Gold- und Silbermarkierungen führen auf Grund ihrer hohen Massendichte zu einer hohen Ausbeute rückgestreuter Elektronen, die dann im Gegensatz zu biologischem Material eine gute Unterscheidung der Strukturen ermöglicht. Die rückgestreuten Elektronen erscheinen als heller Fleck oder Punkt auf Bildschirm und Foto. An Hand der rückgestreuten Elektronen wurde die Menge der gebundenen Virosomen (mit einer Größe > 200 nm) geschätzt. Je nach Zelllinie und Behandlung wurden zwischen 400 und 960 Zellen fotografiert und die gebundenen Virosomenkomplexe ausgezählt (Abb. 19). Wie Abb. 19 zeigt, hat die Inkubationszeit bei beiden untersuchten Zelllinien großen Einfluss auf die Verteilung der Partikel. Nach 30 Minuten wurden auf ca. 4,5 % der Zellen und nach 3 Stunden auf 8-9 % der Zellen Virosomen gezählt. Das zeigt auch, dass die Bindung der Virosomen nach 30 Minuten noch nicht abgeschlossen ist.

Nach Goldmarkierung und Silberverstärkung wurden auch kleinere Virosomen auf der Zelloberfläche einiger F98-Zellen nachgewiesen. Dies konnte nicht auf allen Zellen und auch nicht bei den Coloncarcinomzellen CC531 beobachtet werden.

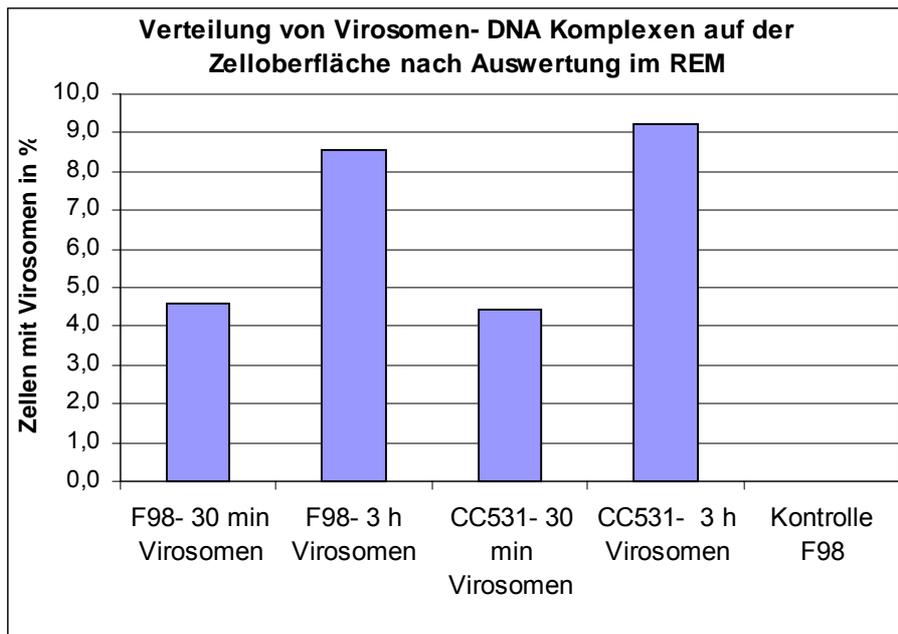


Abb. 19: Verteilung der Virosomen auf kultivierten Zellen. Ausgewertet wurden zwischen 400 und 960 Zellen sowie die dazugehörigen Partikeln je Behandlung und Zelllinie. Mit zunehmender Inkubationszeit erhöht sich die Zahl der gebundenen Virosomen-DNA-Komplexe auf den Zellen.

Die Aufnahme größerer Virosomen ließ sich nach 3 Stunden Inkubation bei der Zelllinie CC531 dokumentieren. Dabei scheint es sich um Phagozytose zu handeln, denn teilweise sind Membranausstülpungen der Zelle zu erkennen, die die Virosomen umschließen. Trotz Nachweis fusogener Proteine auf den Virosomen konnten keine Fusionsereignisse beobachtet werden. Es gelang auch nicht in der Nähe größerer Virosomen eine Erhöhung von Virusproteinen auf der Zellmembran nachzuweisen, wie sie bei Fusionsprozessen beschrieben wurden (Aroeti, B. and Henis, Y.I., 1991). Fusionen von Zellen untereinander, ausgelöst durch Fusionsproteine der Virosomen ließen sich ebenfalls zu keiner Zeit und bei keiner der untersuchten Zelllinien nachweisen.

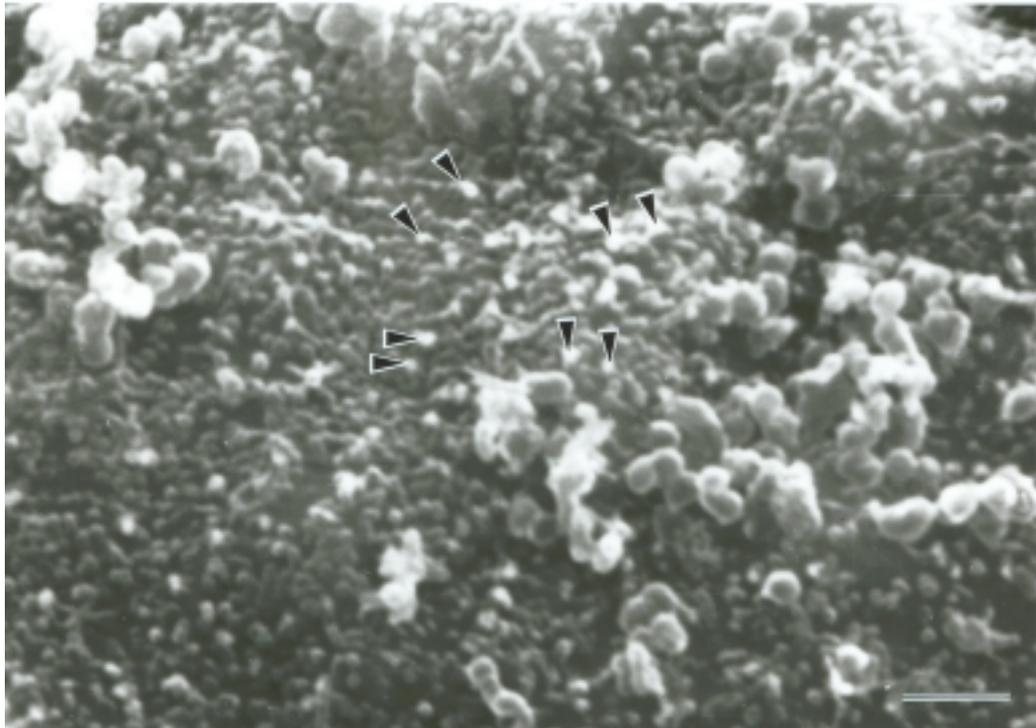


Abb. 20a: Nachweis der viralen Proteine auf F98-Zellen mit polyklonalem Antiserum gegen Sendai-Virus-Protein, Protein-A-Gold (15 nm) und Silberverstärkung (Pfeil). 14.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 1 μm .

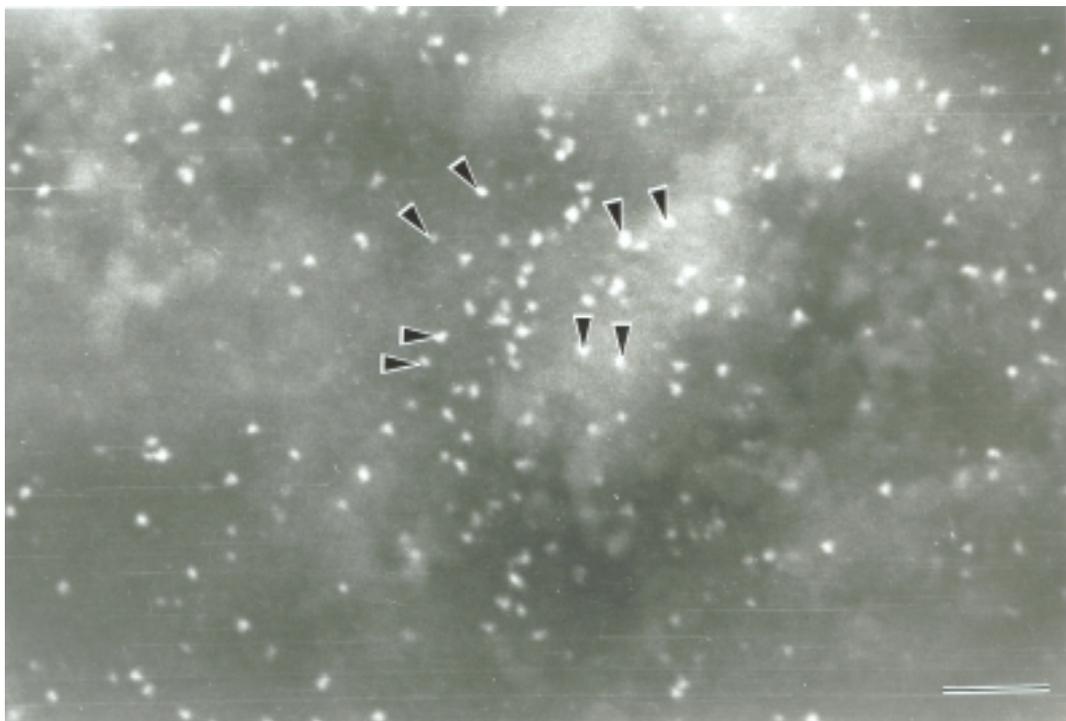


Abb. 20b: Darstellung der Zelloberfläche (aus Abb. 20a) im Modus der rückgestreuten Elektronen. Silberverstärkte Goldmarkierungen erscheinen als heller Fleck (Pfeil). 14.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 1 μm .

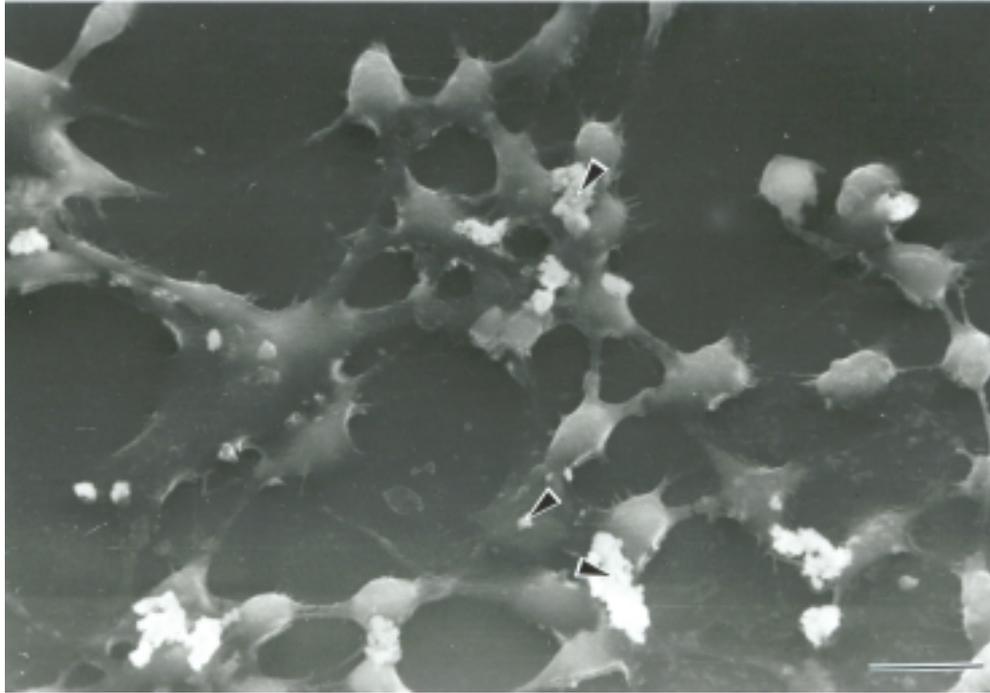


Abb. 21a: CC531-Zellen mit Virosomen, Verteilung der Partikel nach Immunogoldmarkierung und Silberverstärkung. 1.500fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 10 μm .

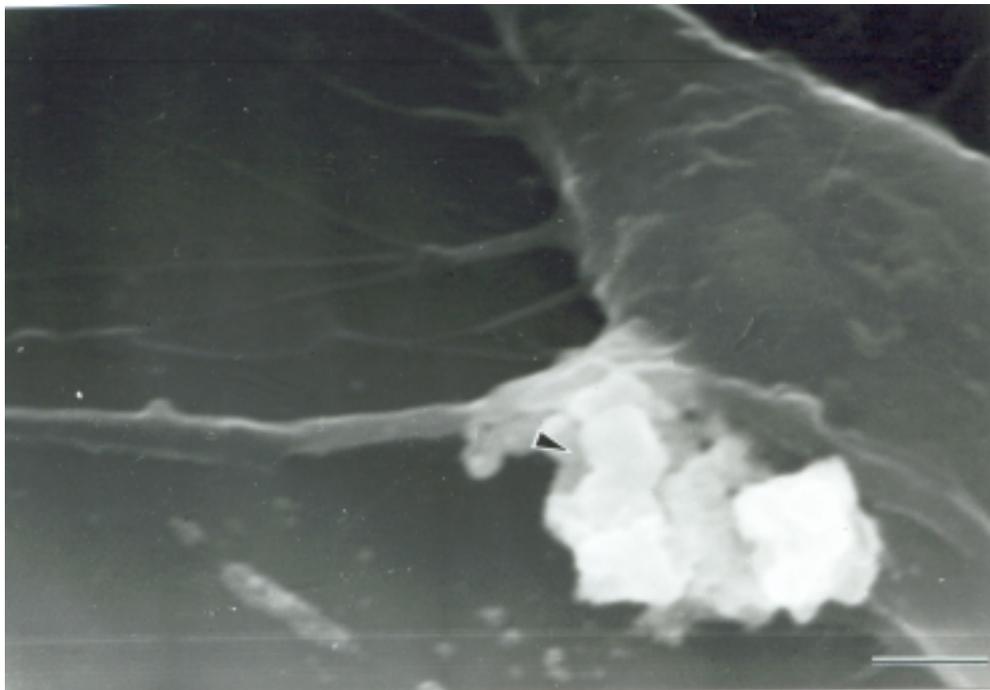


Abb. 21b: CC531-Zellen nach Inkubation mit Virosomen: Teil einer Zelle mit Virosom nach Immunogoldmarkierung u. Silberverstärkung, 14.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 1 μm .

3.2.2. Verteilung in der Zelle

Um Aufnahme und Verteilung in den Zellen besser analysieren zu können, wurden kultivierte Zellen der Linien CC531 und F98 nach Inkubation mit leeren oder DNA-beladenen Virosomen in Epoxidharz eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in den meisten Fällen unkontrastiert ausgewertet, um die mit Gold-markierte DNA gut nachweisen zu können.

Die Aufnahme und Verteilung der Virosomen in den Zellen ließ sich an Hand der Gold-markierten DNA verfolgen. Da DNA nur in Virosomen mit einer Größe von mehr als 200 nm nachgewiesen wurde, ließ sich in den Epon-eingebetteten Proben nur der Weg größerer und DNA-haltiger Virosomen verfolgen. Bei einigen Zellen wurde die Aufnahme von Virosomen dokumentiert. Dabei konnten 3 verschiedene Stadien beobachtet werden:

Anheften der Virosomenkomplexe an die Zellmembran

Umschließen der Komplexe durch Filopodien oder Pseudopodien

Einschluss in die Zelle in Endosomen

Auf Grund dieser Charakteristik scheinen DNA-beladene Virosomen mit einer Größe von mehr als 200 nm vor allem über Endozytose in die Zelle zu gelangen.

Ein Teil der Präparationen wurden quantitativ ausgewertet. Dazu wurden je Behandlung und Zelllinie zwischen 91 und 337 Zellquerschnitte ausgewertet und in den Schnitten die Anzahl und ungefähre Lage der Virosomen erfasst. Wie bei den Proben für das Rasterelektronenmikroskop stieg die Zahl der lokalisierten Virosomen in beiden Zelllinien mit Zunahme der Inkubationszeit (s. Abb. 22).

DNA-beladene Virosomen wurden nach 0,5 und 3 Stunden sowohl an der Zellmembran als auch in der Zelle in Endosomen beobachtet. Längere Inkubationszeiten führten in und an den Zellen zu einer Anreicherung mit Virosomen. Während nach 0,5 Stunden an der Zellmembran von F98-Zellen nur in jeder 100. und in Endosomen nur in jeder 150. Zelle Virosomen beobachtet wurden, waren nach 3 Stunden in jeder 10. Zelle Virosomen-DNA-Komplexe an die Zellmembran gebunden und in jeder 50. Zelle in Endosomen eingeschlossen.

Einzelne Goldpartikel wurden auch im Zytoplasma beobachtet. Da die Schnitte ohne Uranylacetat- und Bleizitratkontrastierung ausgewertet wurden, ist es nicht auszuschließen, dass einzelne Goldkörner in kleinen Vesikeln eingeschlossen waren, deren Membran auf Grund der fehlenden Kontrastierung schlecht sichtbar war. Es ist aber auch möglich, dass Gold-markierte DNA durch Fusionen ins Zytoplasma gelangte.

Nach 3-stündiger Inkubation mit Virosomen ließen sich in F98-Zellen Vesikel mit einzelnen Goldmarkierung auch in unmittelbarer Nähe der Kernmembran beobachten (s. Abb. 23c). In diesen Vesikeln waren keine Virosomen- oder Poly-L-Lysin-DNA-Gold-Strukturen zu erkennen. Möglicherweise ist es ein Hinweis auf Vesikeltransport vom Endosom zum Kern (Orrantia and Chang, 1990).

Im Gegensatz zur Auswertung mit dem Raster-EM traten in den Schnittbildern trotz großen Probenumfangs Unterschiede zwischen beiden Zelllinien auf. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Präparation zurückzuführen, da Ultradünnschnitte nur einen kleinen Teil einer Zelle dokumentieren, während mit dem REM gleichzeitig eine große Zahl von Zellen bzw. die gesamte Oberfläche einer Zelle untersucht werden kann.

In Kontrollzellen wurde zu keiner Zeit Gold nachgewiesen.

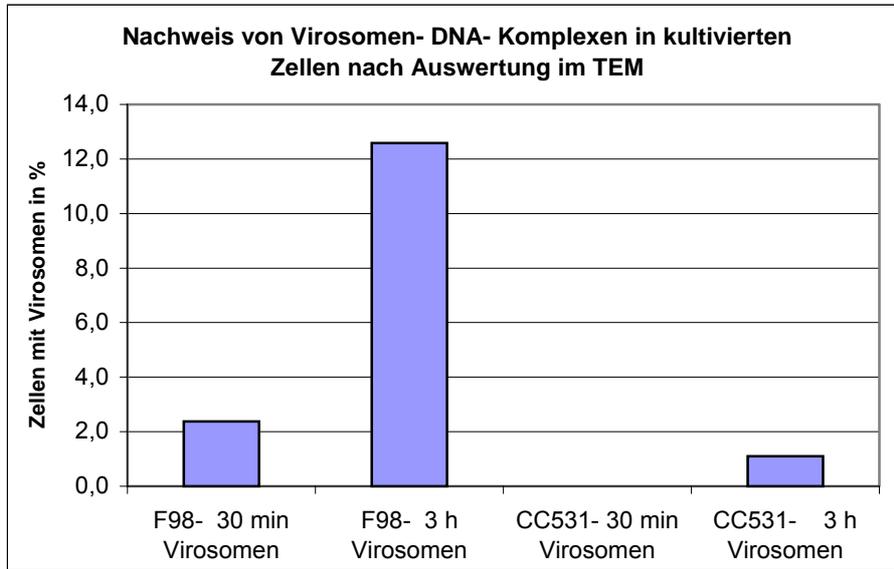


Abb. 22: Verteilung von Virosomen-DNA-Komplexen in Zellkulturen nach Auswertung im TEM

3.2.3. Visualisierung viraler Proteine durch Immun-EM im Schnittbild

Um zu untersuchen, ob sich Fusionen mit Hilfe immunelektronenmikroskopischer Methoden im Schnittbild nachweisen ließen, wurden Proben zur Erhaltung der Antigenität/nativen Proteinstruktur mit Glutaraldehyd-Formaldehyd fixiert und in Acrylharz LR White eingebettet.

In einem Vorversuch wurde die Konzentration von Ak und Protein-A-Gold (15 nm) ermittelt. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Antikörper 1:500 und die Goldlösung 1:100 verdünnt.

Die Schnitte wurden ohne Bleikontrastierung ausgewertet, um auch die Goldmarkierung der DNA zu detektieren. Goldmarkierungen wurden nicht auf allen angeschnittenen Zellen beobachtet, jedoch konnten nach 3 Stunden die meisten Markierungen nachgewiesen werden und zwar nur in der Nähe der Zellmembranen in Verbindung mit Gold-markierter DNA oder auch in Vesikeln oder sie waren von Filopodien oder anderen Membranausstülpungen umschlossen.

Die Morphologie der markierten Virosomen ließ sich mit dieser Technik nicht korrekt bestimmen, da Membranstrukturen auf Grund des fehlenden Einsatzes von Osmiumtetroxid und anderen Schwermetallen und Kontrastmitteln ungefärbt waren. Auch diese Ergebnisse weisen auf einen endozytotischen Aufnahmemechanismus hin. Es konnten keine Anzeichen für Fusionen von Virosomen mit Zellen oder Zell-Zellfusionen beobachtet werden.

Abb. 23a: Aufnahme von Virosomen-DNA-Komplexen (Pfeil) in F98-Zellen.
30.000fache Vergrößerung

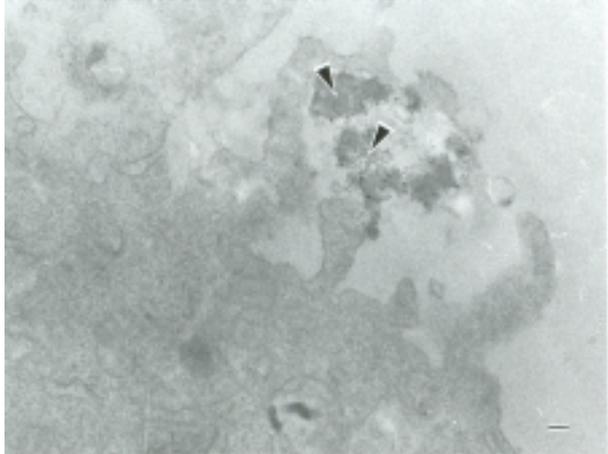


Abb. 23b: Virosomen-DNA-Komplexe im Endosom
60.000fache Vergrößerung

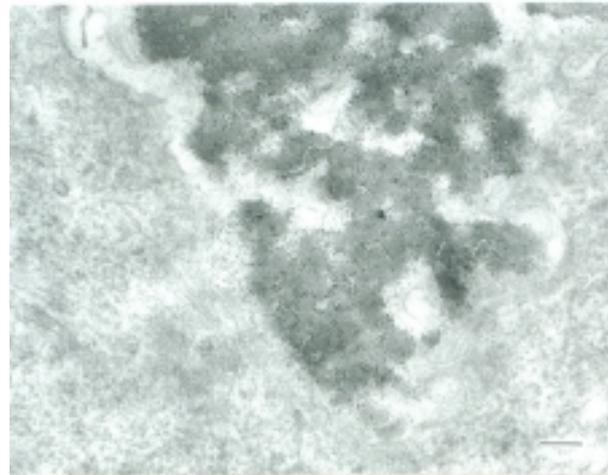


Abb. 23c: Endosom mit Goldmarkierung (Pfeil) in der Nähe der Kernmembran
100.000fache Vergrößerung

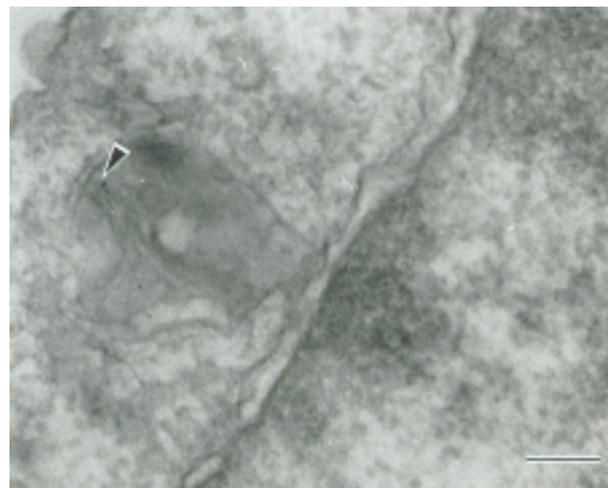


Abb. 23a-c: Aufnahme und Verteilung von Virosomen DNA-Komplexen in kultivierten Zellen. Die Balken entsprechen 100 nm.

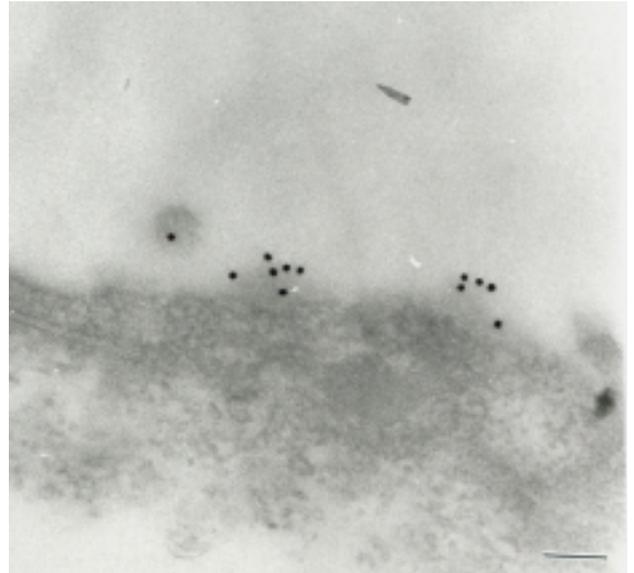
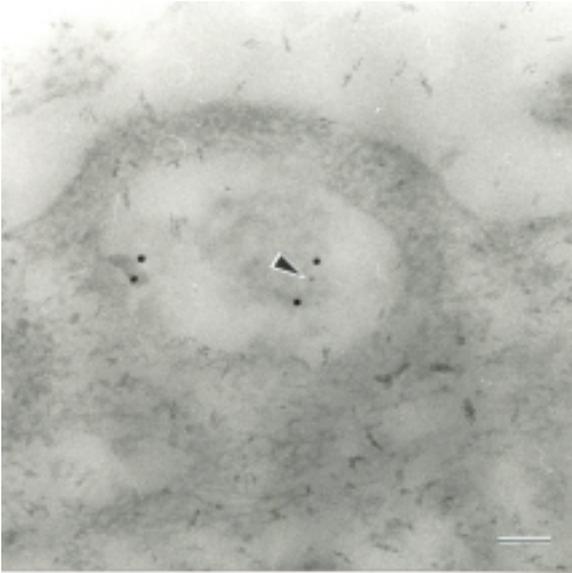


Abb. 24a: In Vesikeln eingeschlossene Virosomen-DNA-Komplexe. Doppelmarkierung: DNA 5 nm Gold (Pfeil), Virusproteine 15 nm Gold.

Abb. 24b: Virale Proteine an der Zellmembran.

Abb. 24: Nachweis fusogener Proteine an F98-Zellen nach Transfektion mit Virosomen. Der Nachweis der viralen Proteine erfolgte nach Einbettung der Zellen in LR White mit polyklonalem Antiserum und Protein-A-Gold (15 nm). (a, b) 80.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

3.2.4. Transfektion mit Virosomen

Um die Fähigkeit der Virosomen als Gentransfervesikel zu testen, wurde das Plasmid pUT651 (LacZ) in die Virosomen eingeschlossen. Zellen der Linie F98 und CC531 wurden damit wie im Methodenteil beschrieben, transfiziert. Nach Färbung der Zellen wurde die Transfektionseffizienz bestimmt, indem die Ausbeute an blauen Zellen ermittelt wurde.

Mit dem LacZ-Gen wurden etwa 1-3 % der F98-Zellen transfiziert. Das entspricht nur einem Bruchteil der Zellen, die nach 3 Stunden DNA-Virosomenkomplexe gebunden hatten. CC531-Zellen waren weniger gut zu transfizieren.

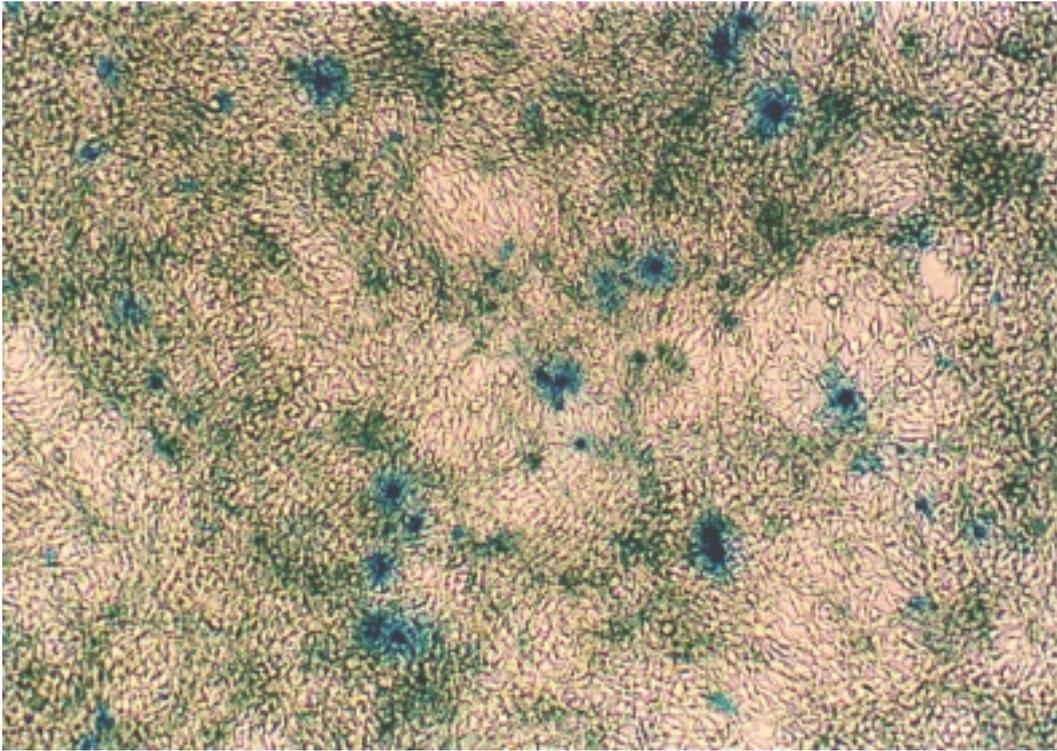


Abb. 25: Transfektion von F98-Zellen mit Virosomen

3.2.5. Zusammenfassung: Verteilung der Virosomen auf und in kultivierten Zellen

Nach Inkubation der Zellen mit Virosomen wurden vor allem nach 3-stündiger Inkubation Virosomen an und in der Zelle nachgewiesen. Die Verteilung der Virosomen ließ sich besonders gut nach Markierung der Virosomen mit polyklonalen Antiseren, Protein-A-Gold und Silberverstärkung im Raster beobachten. Eine längere Inkubationszeit führte zu einer höheren Anzahl Virosomen auf der Zelle.

Die Verteilung der Virosomen in der Zelle konnte nur an Hand der Gold-markierten DNA nachgewiesen werden. Teilweise wurde die Aufnahme durch Endozytose beobachtet. Mit Hilfe immunelektronenmikroskopischer Methoden konnte Virusprotein an der Zellmembran oder auch in der Zelle zusammen mit Gold-markierter DNA in der Nähe der Zellmembran nachgewiesen werden.

Trotzdem mit immunelektronenmikroskopischer Methoden fusogene Proteine auf den Virosomen detektiert wurden, schienen Fusionen als Aufnahmemechanismus zumindest für große Komplexe keine Rolle zu spielen.

3.3. Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Struktur und Größe kationischer Liposomen-DNA-Komplexe

Eine andere Möglichkeit Zellen zu transfizieren, bieten kationische Liposomen. Sie sind relativ einfach zu präparieren und zeichnen sich, wie beschrieben, durch eine Reihe weiterer Vorteile aus (s. Einleitung).

Eine Schlüsselfrage bei der Beurteilung und Optimierung von Transfektionen mit kationischen Lipiden bilden die physiko-chemischen Eigenschaften der Liposomen. Diese werden in erster Linie von der Lipidkomposition, Partikelgröße, Lipid/DNA-Verhältnis bestimmt (Gustafsson et al., 1995; Zelphati et al., 1998). Weiterhin werden sie durch Präparationsmethoden, Inkubationsdauer, Stabilität im Transfektionsmedium und biologische Eigenschaften der *in vitro*-Systeme beeinflusst (Groth, 2000).

Ziel der in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es, die Morphologie einiger kationischer Liposomen, speziell verschiedener Cholesterolderivate und doppelkettiger Lipide, in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung zu untersuchen. Außerdem wurde die Bildung von Lipoplexen (Liposomen-DNA-Komplexen) und Polyplexen (polykationische Peptid-DNA-Komplexe) analysiert.

3.3.1. Einfluss der kationischen Cholesterolderivate auf die Morphologie von unterschiedlichen Liposomen

Kationische Cholesterolderivate sind Lipide, deren Struktur sich einerseits aus einem Lipidteil dem Cholesterol, einem Spacer sowie der eigentlichen kationischen Kopfgruppe zusammensetzen. Für die Ladung sind positiv geladene primäre, sekundäre, tertiäre oder quaternäre Amine verantwortlich.

Derzeit gibt es mehr als 10 verschiedene kationische Cholesterolderivate, von denen 6 Abkömmlinge in den eigenen Versuchen untersucht wurden.

DAC-Chol-Liposomen

Ein großer Teil der Untersuchungen wurde mit DAC-Chol-Liposomen durchgeführt. Bei diesem Lipid handelt es sich um ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes monokationisches Lipid mit einem Cholesterolgrundgerüst (Reszka et al., 1995).

Die Präparation der Liposomen erfolgte mit verschiedenen Anteilen des Helferlipids DOPE. Damit sollten Eigenschaften wie Größe und Morphologie der Liposomen in Abhängigkeit von der

Lipidzusammensetzung untersucht werden. Die Charakterisierung der Liposomen erfolgte nach Negativkontrastierung mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops.

DAC-Chol-Präparationen ohne Helferlipid zeigten eine unterschiedliche Morphologie. Neben Lipidstapeln und flachen Scheiben von Lipidmembranen wurden keine echten Liposomen beobachtet. Dieser Befund bestätigt die in der Literatur beschriebenen Angaben, dass Cholesterolderivate ohne Zusatz neutraler Lipide nicht in der Lage sind, Liposomen zu bilden (Farhood et al., 1992). Präparationen mit 25 % Helferlipid bilden überwiegend gleichmäßig kleine Partikel aus. Ein Anstieg des DOPE-Anteils auf 50 % führt zu Liposomen mit einer Größe zwischen 25-600 nm.

Bei einer weiteren Erhöhung des Helferlipidanteils verschiebt sich die Größenverteilung der Liposomen in Richtung größerer Vesikel zwischen 50-1000 nm.

Untersuchungen von Groth (2000) zur Transfektionseffizienz haben gezeigt, dass für DAC-Chol ein gewisser Anteil von DOPE zur Transfektion nötig ist. Präparationen mit 100 % kationischem Lipid transfizieren nicht. Gute Ergebnisse wurden auf verschiedenen Zelllinien erzielt mit einer Liposomen Zusammensetzung von 30-60 % DAC und 60-30 % DOPE. Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen demonstrierten, sind diese Liposomen von unterschiedlicher Morphologie und bis zu 600 nm groß.

Name	Molekulargewicht	Lipidteil	Kopfgruppe	Ladung/ Molekül
DAC-Chol	519	Cholesterol	Methylamin	1 sekundäres Amin
DC-Chol	519	Cholesterol	Dimethylamin	1 tertiäres Amin
DCQ-Chol	564	Cholesterol	Hydroxyethyl-dimethyl-ethylamin	1 quarternäres Amin
Sp-Chol	680	Cholesterol	T-Spermin	2 primäre 1 tertiäres Amin
SpOESL	610	Estradiol	T-Spermin	2 primäre 1 tertiäres Amin
SpPUT-Chol	874	Cholesterol	T-Spermin	2 primäre 2 sekundäre Amine

Tab.3: Kationische Cholesterolderivate (nach Groth, 2000)

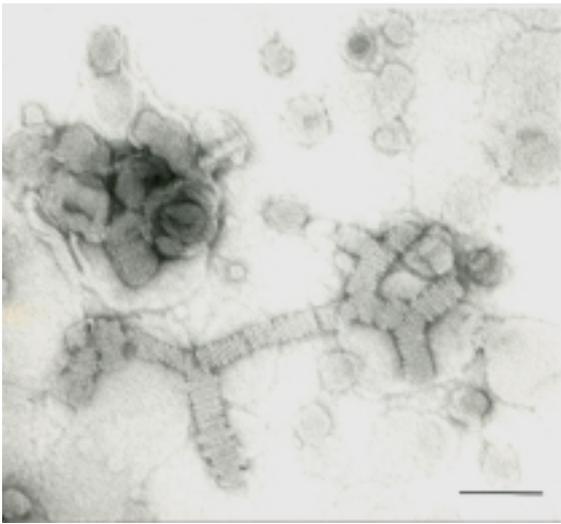


Abb. 26a: DAC100. DAC-Chol-Präparationen ohne Helferlipid. 130.000fache Vergrößerung

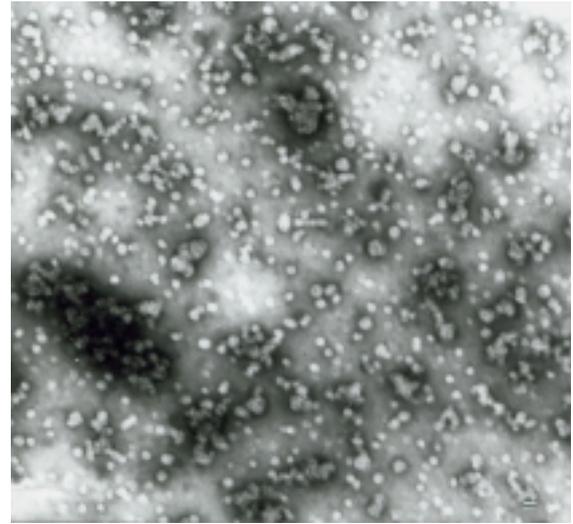


Abb. 26b: DAC75-Liposomen (75 % DAC-Chol, 25 % DOPE). 20.000fache Vergrößerung

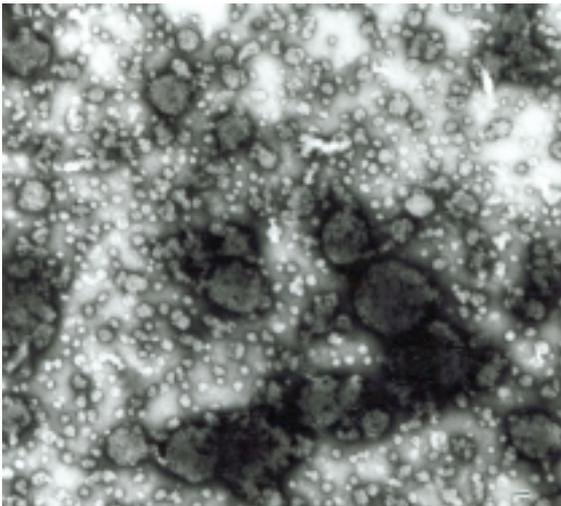


Abb. 26c: DAC50-Liposomen (50 % DAC-Chol, 50 % DOPE). 20.000fache Vergrößerung

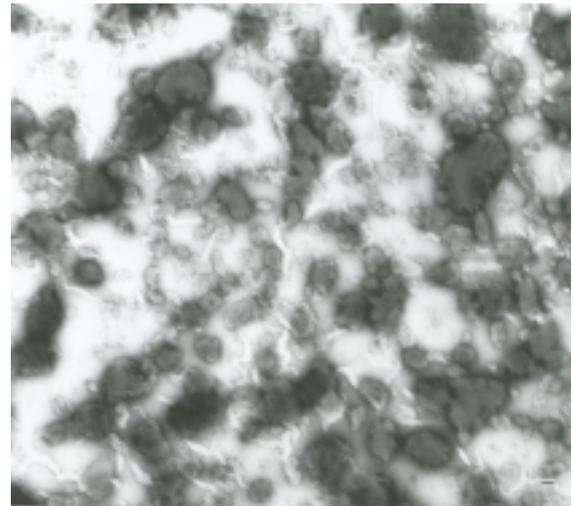


Abb. 26d: DAC25-Liposomen (25 % DAC-Chol, 75 % DOPE). 20.000fache Vergrößerung

Abb. 26: Größe von DAC-Chol-Liposomen in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung. In DAC-Chol-Präparationen ohne Helferlipid wurden keine echten Liposomen beobachtet. Eine Zugabe von Helferlipid führt zur Bildung von Liposomen. Während in Präparationen mit 25 % Helferlipid (w/w) (DAC75) kleine Liposomen (42 nm) beobachtet wurden, bewirkt eine weitere Erhöhung der Helferlipidkonzentration die Bildung größerer und gleichmäßigerer Liposomen. Die Präparationen wurden mit 2 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Balken entsprechen 100 nm.

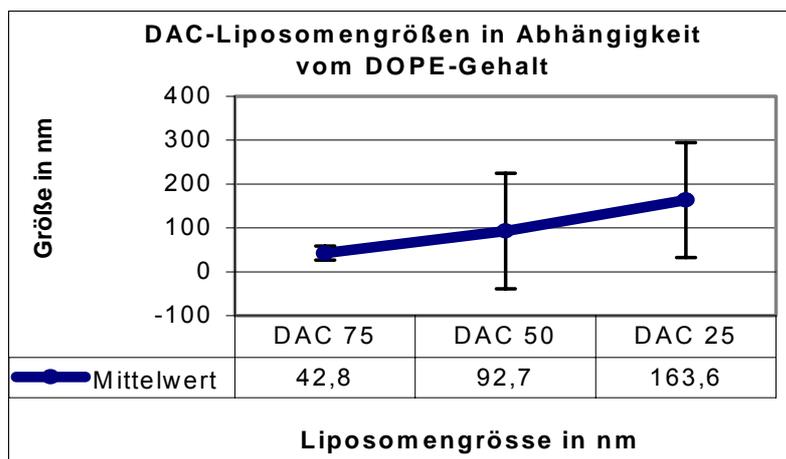


Abb. 27: Größenverteilung von DAC-Liposomen in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von DAC75, DAC50 und DAC25. In DAC75-Präparationen (25 % Helferlipid) sind die Liposomen sehr klein. Eine Erhöhung des Anteils an DOPE führt zur Verfielfachung der Liposomengröße (s. auch Abb. 26, S.65).

Weitere Cholesterolderivate

Ähnliche Beobachtungen wie bei den untersuchten DAC-Chol Liposomen wurden bei anderen Cholesterolderivaten gemacht. Die beobachteten Größen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Name	ohne Helferlipid	25 % DOPE	50 % DOPE	75 % (80 % ¹) DOPE
DAC-Chol	Stapel von Lipidschichten	25-80 nm	25-600 nm	50-1000 nm
DC-Chol	n.d.	n.d.	100-300 nm	100-3000 nm
DCQ-Chol	z.T. netzartige Strukturen	50-750 nm	n.d.	80 nm-600 nm
Sp-Chol	Mizellen	n.d.	40-300 nm	40-600-1000 nm
SpOESL	schlauch- und vesikelförmige Strukturen	n.d.	50-300 nm	300-700 nm ¹
SpPUT-Chol	Mizellen	n.d.	50-300 nm	300-700 nm ¹

Tab. 4: Einfluss des Helferlipids DOPE auf die Liposomengröße

Die Liposomen wurden nicht ausgezählt, sondern nur die am häufigsten bemerkten Größen notiert. So hatte das Helferlipid bei allen untersuchten Lipiden einen großen Einfluss auf die Morphologie der Liposomen. Ohne DOPE, also mit 100 %igen kationischem Cholesterolderivat, konnte keine Liposomenbildung beobachtet werden. Der Anteil des beigemischten Helferlipids wurde in Schritten von 25 % erhöht. Meist konnten schon in Präparationen mit 25 % DOPE kleine Liposomen beobachtet werden. Alle untersuchten Präparationen wurden mit steigendem DOPE-Gehalt gleichmäßiger. Präparationen ohne DOPE waren, wie bereits bei DAC-Chol-Liposomen beobachtet, nicht in der Lage die verschiedenen Zelllinien zu transfizieren (Groth, 2000).

3.3.2. Charakterisierung von Liposomen hergestellt aus doppelkettigen Lipiden

Neben cholesterolhaltigen Liposomen finden auch Liposomen aus doppelkettigen Lipiden für den Gentransfer Verwendung. Für die Charakterisierung der Liposomen und die Transfektionsuntersuchung wurden DOCSER-Liposomen eingesetzt. DOCSER ist ein Sperminderivat aus einem natürlich vorkommenden Glycerol (als Lipidteil) und einer Sperminkopfgruppe.

Zur Untersuchung der Struktur wurden Liposomenpräparationen mit verschiedenen Anteilen an DOPE negativ kontrastiert und ausgewertet. Im Gegensatz zu den untersuchten Cholesterolderivaten sind doppelkettige Lipide in der Lage auch ohne zusätzliches Helferlipid Liposomen zu bilden. Weiterhin scheint das Helferlipid auf Größe und Morphologie einen geringeren Einfluss auszuüben. Sie bilden Liposomen mit einer Größe zwischen 20-650 nm (Mittelwert 113 nm). Die Liposomen erscheinen nach Negativkontrastierung mit Ammoniummolybdat meist mehrschichtig.

Untersuchungen zur Transfektionseffizienz (Groth, 2000) zeigten, dass DOCSER-Liposomen mit und ohne Helferlipid DOPE in der Lage waren, Zellen zu transfizieren.

3.3.3. Bildung von Liposomen-DNA-Komplexen (Lipoplexe)

Zur Untersuchung der Lipoplexe wurden Liposomen aus Cholesterolderivaten und doppelkettigen Lipiden verwendet. Die Bildung von Lipoplexen erfolgte durch Mischen von DAC-30- oder auch DOCSER-100-Liposomen mit DNA. Ausgewertet wurden die Proben nach Negativkontrastierung oder Schrägbedampfung.

In beiden untersuchten Lipoplex-Präparationen wurde vor allem ein Größenzuwachs beobachtet. Während einzelne DAC-30-Liposomen Größen zwischen 100 und 450 nm aufwiesen, waren die Lipoplexe bis zu 1700 nm groß. Sowohl im Negativkontrast als auch nach Schrägbedampfung

erscheinen Lipoplexe als Komplexe, die aus einzelnen Liposomen aufgebaut sind. Außerdem erscheinen die Komplexe in Bezug auf Größe und Form sehr heterogen.

Um abzuschätzen, wie die DNA an der Komplexbildung beteiligt ist, wurde mit Gold-markierter DNA gearbeitet. Goldkolloide wurden an verschiedenen Stellen der Lipoplexe detektiert. Häufig war Gold am Rand der Komplexe sowie zwischen ursprünglichen Liposomen oder teilweise auch in der Mitte der Komplexe anzutreffen. Zur Quantifizierung der Befunde wurden von 200 Lipoplexen die Größe und die Zahl der Goldpartikel bestimmt.

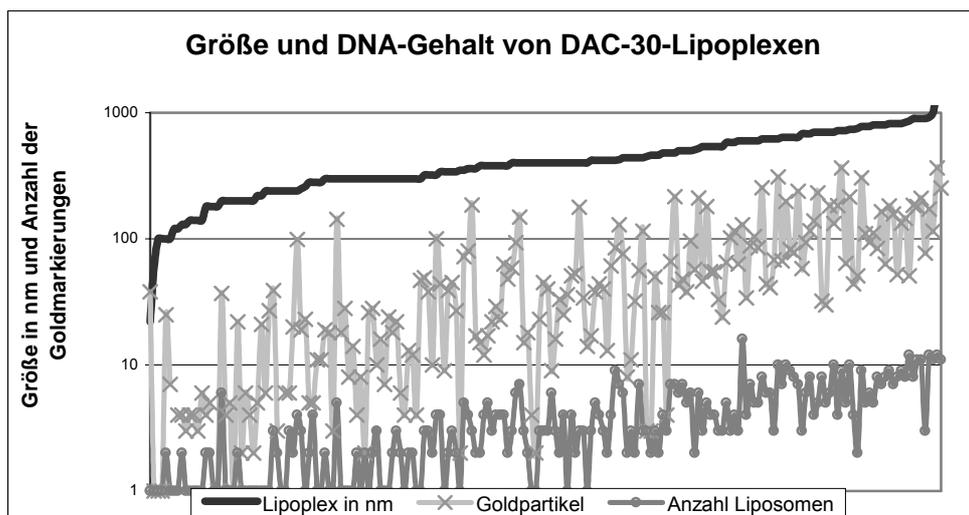


Abb. 28: Größe und DNA-Gehalt von DAC-30-Lipoplexe: Die Größe der Komplexe variierte zwischen 22 und 1700 nm. Bis zu 365 Goldpartikel wurden je Komplex gezählt.

Trotz der Heterogenität ist zu erkennen, dass größere Komplexe mehr DNA binden und aus einer größeren Anzahl Liposomen aufgebaut sind.

Abgeleitet von den oben gezeigten Resultaten ergibt sich für einen durchschnittlichen DAC-30-Lipoplex mittlerer Größe (450 nm), dass er aus 3-4 Liposomen aufgebaut ist und 60 Gold-markierte Plasmide transportiert (das entspricht ca. 300 Plasmiden).

In vitro Versuche zeigten, dass DAC-30-Lipoplexe gut transfizieren, z.B. F98-Zellen (Groth, 2000).

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen der DOCSPER-Lipoplexe. Auch hier konnte eine Abhängigkeit von Größe und DNA-Gehalt beobachtet werden. Während einzelne DOCSPER-100-Liposomen etwa 113 nm groß waren, wuchsen die Komplexe z.T. auf 1000 nm an.

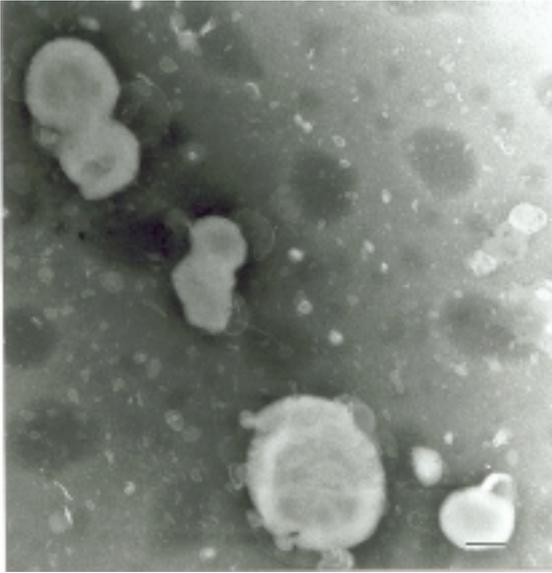


Abb. 29a: DAC-30-Liposomen, 60.000fache Vergrößerung.

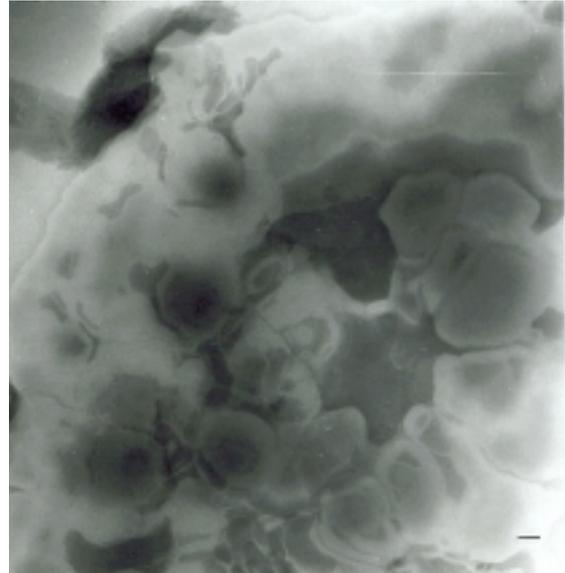


Abb. 29b: DAC-30-DNA-Lipoplexe, 30.000fache Vergrößerung



Abb. 29c: DAC-30-DNA-Lipoplexe mit Gold markierter DNA, Vergr.: 80.000fach

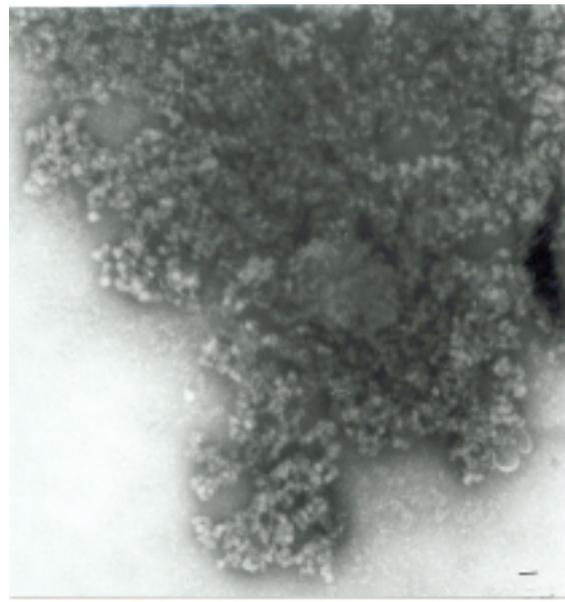


Abb. 29d: DOCSPER-Lipoplexe, 24.000fache Vergrößerung

Abb. 29: DAC-Liposomen und DAC- und DOCSPER-Lipoplexe. Während DAC-Liposomen 100-450 nm groß sind, erreichen Lipoplexe auch mehr als 1000 nm (b,d). Gold-markierte Plasmide wurden zwischen Liposomen, am Rand der Komplexe sowie in der Mitte der Komplexe detektiert. Die Präparationen wurden mit 2 % Ammoniummolybdat (a-c) oder 2 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Balken entsprechen 100 nm.

3.3.4. Morphologie von Polyplexen

Polyplexe sind Gemische aus DNA und synthetischen kationischen Polymeren. Die Aufgabe der kationischen Amphiphile besteht darin, die DNA zu komplexieren, sie zu verpacken und weiterhin vor zellulären Enzymen zu schützen (Sorgi et al., 1997).

Zur Bildung von Polyplexen wurde DNA (3 µg) erst mit Poly-L-Lysin-Gold markiert, ehe durch Zugabe definierter Mengen von (1,5, 3 und 6 µg) Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat (PS) Polyplexe präpariert und nach Negativkontrastierung oder auch Schrägbedampfung ausgewertet wurden.

Die Form und Struktur der Polyplexe war abhängig von den eingesetzten Konzentrationen. So wurden im Gemisch von 3 µg DNA und 1,5 µg PS überwiegend DNA-Strukturen sowie einige verdickte, geringfügig komplexierte DNA-Strukturen beobachtet. Nach Verdopplung der PS-Konzentration wurden einzelne sphärische PS-Partikel neben DNA-Strukturen beobachtet. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 6 µg PS führte zu überwiegend rund-ovalen bis walzenförmigen Komplexen. Unkomplexierte DNA-Strukturen konnten in diesen Präparationen nicht mehr nachgewiesen werden. Goldpartikel wurden meist im Randbereich der Polyplexe beobachtet.

Polyplexe aus Poly-L-Lysin unterschieden sich in ihrer Morphologie und Heterogenität kaum von denen aus PS (Abb. 31a, b).

Zur Quantifizierung der Beobachtungen wurden die je 100 Polyplexe (mit je 6 µg PS oder PLL) im TEM vermessen und der Goldgehalt bestimmt.

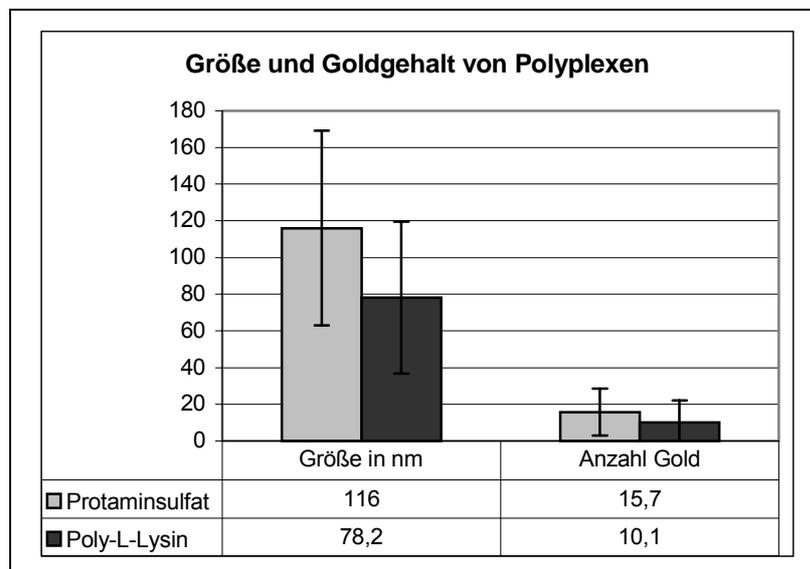


Abb. 30: Größe und Goldgehalt von Polyplexen: Sowohl Größe als auch DNA-Gehalt gemessen an den Goldmarkierungen der verschiedenen Polyplexe unterscheiden sich nur wenig.

Wie aus der Abb. 30 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Polyplexe morphologisch nur geringfügig voneinander. Die PS-Komplexe (116 nm) erschienen etwas größer als PLL-Komplexe (78 nm). Gleichzeitig wurden hier im Mittel auch mehr gebundene Goldpartikel registriert.

Allerdings differieren Größe und Goldgehalt proportional, so dass man feststellen kann, dass Partikel bei gleicher Größe auch gleiche DNA-Mengen binden. Da etwa 20 % der Plasmide mit Gold markiert waren, enthalten die Polyplexe bis zu 75 Plasmide.



Abb. 31a: Polyplexe aus 3 µg DNA und 3 µg Poly-L-Lysin negativ kontrastiert mit Uranylacetat, sek. Vergr.: 160.000fach. Der Balken entspricht 100 nm.



Abb. 31b: Polyplexe aus 3 µg DNA und 3 µg Protaminsulfat, negativ kontrastiert mit Uranylacetat, sek. Vergr.: 160.000fach. Der Balken entspricht 100 nm.

3.3.5. Charakterisierung von Lipopolyplexen

Lipopolyplexe sind ein Gemisch aus DNA und Polymeren sowie kationischen Liposomen. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Vorkomplexierung von DNA mit Protaminsulfat und anschließender Komplexierung mit kationischen Liposomen die Transfektionseffizienz weiter erhöht werden kann (Sorgho et al., 1997).

Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde 3 µg Gold-markierte DNA, 3 µg PS gemischt und mit steigenden Lipidkonzentrationen 0,5-30 µg (DAC-40) gemischt.

Die Auswertung erfolgte nach Negativkontrastierung der Komplexe. Die Morphologie der Komplexe war abhängig von den eingesetzten Konzentrationen. So konnten erst bei einer Lipidkonzentration von mehr als 0,95 µg/100 µl Liposomen nachgewiesen werden.

Polyplexe aus PS waren zwischen 100 und 120 nm groß und mit mehr als 10 Goldpartikeln dekoriert. Die Polyplexe waren teilweise an DAC-Liposomen gebunden.

Bei geringer Lipidkonzentration wurde keine Gold-markierte DNA auf den Liposomen beobachtet und keine Größenzunahme der Liposomen detektiert.

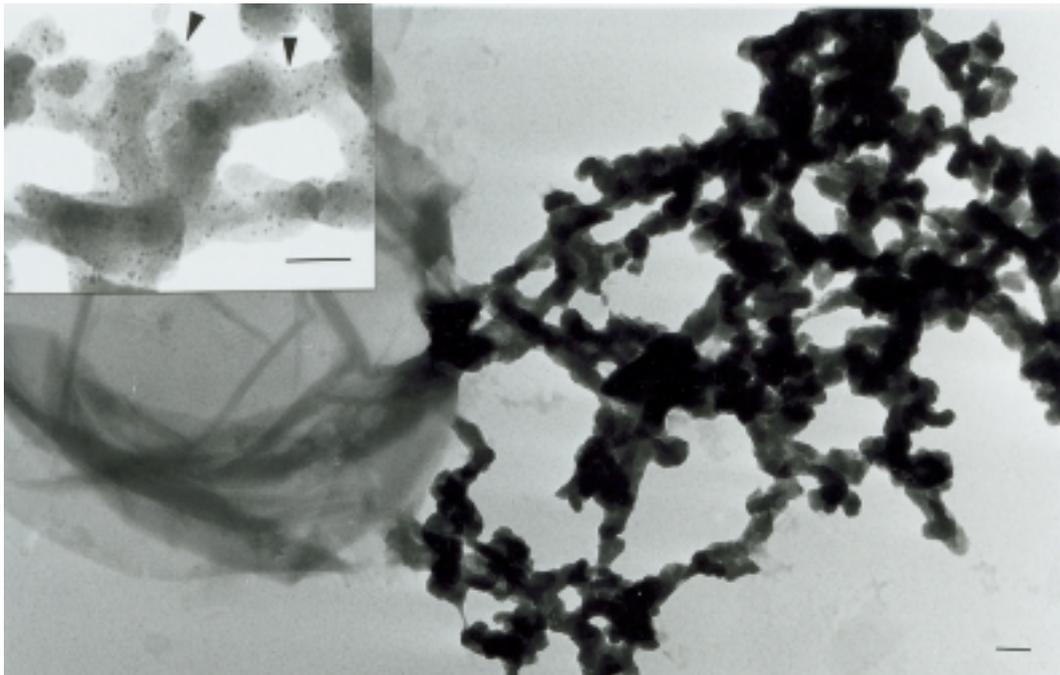


Abb. 32: Lipopolyplexe aus 3 µg DNA, 3 µg Protaminsulfat und 0,5 µg DAC-40-Liposomen. Die Komplexe wurden mit 2 % Uranylacetat kontrastiert und anschließend einmal gewaschen. Die Gold-markierte DNA bildet mit PS Polyplexe (kleines Bild), die an das DAC-Liposom gebunden sind. Auf dem Liposom wurde keine DNA detektiert. Großes Bild 40.000fache Vergrößerung, kleines Bild 80.000fache Vergrößerung. Die Balken entsprechen 100 nm.

Nach weiterer Erhöhung der Lipidkonzentrationen (15-30 µg/100 µl) konnten verschiedene Strukturen, z.B. große Aggregate aus Liposomen und Gold-markierter DNA, beobachtet werden.

Parallel zur morphologischen Charakterisierung wurde in unserer Arbeitsgruppe die Transfektionseffizienz der Partikel ermittelt. Demzufolge konnte in Abhängigkeit von der Lipidmenge und der Zelllinie eine 2-10fache Steigerung der Transfektion erreicht werden (Groth, 2000).

3.3.6. Zusammenfassung der Charakterisierung der Struktur und Größe kationischer Liposomen-DNA-Komplexe

Die Struktur kationischer Liposomen wird hauptsächlich durch die Lipidzusammensetzung bestimmt. Bei Liposomen, hergestellt aus kationischen Cholesterolderivaten, ist der Gehalt an Helferlipid DOPE besonders wichtig im Hinblick auf die Morphologie und Größe. In allen untersuchten Cholesterolderivaten wurden mit steigendem DOPE-Gehalt größere und teils auch gleichmäßigere Liposomenpräparationen beobachtet. Cholesterolderivate ohne Helferlipid bildeten keine Liposomen. Kationische doppelkettige Lipide wie DOCSPER sind dagegen auch ohne Einsatz eines Helferlipids in der Lage Liposomen zu bilden und Zellen zu transfizieren.

Die Bildung der Lipoplexe (Komplexe aus kationischen Liposomen und DNA) scheint bei beiden untersuchten Lipidarten ähnlich zu verlaufen. Dazu wurden DAC-Chol- und DOCSPER-Liposomen untersucht. Jeweils nach dem Mischen von Liposomen und DNA konnte eine Komplexbildung beobachtet werden, die mit einer Größenzunahme gekoppelt ist. Dabei ist die eingesetzte DNA - soweit sie mit Gold markiert war - vor allem am Rand oder zwischen den ursprünglichen Liposomen zu detektieren. Im wässrigen Innenraum der Liposomen konnte DNA nicht mit Sicherheit oder nur selten lokalisiert werden. Unabhängig vom eingesetzten Lipid wurde festgestellt, dass die Anzahl gebundener Plasmide mit der Größe der Komplexe wächst.

Weitere Möglichkeiten zum Gentransfer bieten Polyplexe, Komplexe aus DNA und kationischen Peptiden, wie Protaminsulfat und Poly-L-Lysin. Polyplexe sind mit 80-120 nm wesentlich kleiner als die beschriebenen Lipoplexe. Auch in Kombination mit DAC-Chol-Liposomen (Lipopolyplexe) bleibt die DNA mit Protaminsulfat komplexiert und führt zur Verbesserung der Transfektion.

3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Komplexe bei der Überwindung verschiedener Zellbarrieren

Die Transfektion von Zellen ist erfolgreich, wenn die DNA in den Zellkern gelangt und das codierte Protein exprimiert wird. Dazu müssen die Gencarrier von den Zellen aufgenommen und die DNA unbeschädigt in den Kern gebracht werden. Die Kenntnisse über den intrazellulären Weg von Gentransfervesikeln, die notwendige Stabilität und die Art der Überwindung von Barrieren sind nur unzureichend. Daher war es Ziel dieser Untersuchungen, die Wege der Liposomen in der Zelle in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung zu analysieren, um Aussagen zum Mechanismus zu erhalten.

3.4.1. Nachweis der Lipoplexe an der Plasmamembran

Als erster Schritt einer Transfektion gilt die Aufnahme der DNA oder der Lipoplexe in die Zelle (Zabner et. al., 1995). Allerdings ist es dazu notwendig, dass die Komplexe erst einmal an die Zellmembran binden (Matsui et al., 1996).

Um die Bindung näher zu analysieren, wurden N64- und F98-Zellen mit verschiedenen Lipoplexen inkubiert und nach 5 und 30 Minuten sowie nach 3 und 48 Stunden Proben entnommen. Die Zellen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben fürs Raster-EM präpariert, im Falle Goldmarkierter DNA wurden die Präparate mit Silber verstärkt, mit Kohle bedampft und mit Hilfe der Röntgenmikroanalyse oder zurückgestreuter Elektronen ausgewertet.

Untersucht wurde das Verhalten von DAC30- und DOCSPER100-Lipoplexen, sowie DAC30-PS-Lipopolyplexen. Je nach Zeitpunkt der Probenentnahme wurden bereits 5 oder 30 Minuten nach Applikation Lipoplexe auf den Zellen beider Linien detektiert. Nach 3 Stunden ließen sich auf mehr als 50 % der Zellen Komplexe beobachten. Die größte Zahl der Lipoplexe wurden unabhängig von Zelllinie und Liposomenzusammensetzung erst nach 48 Stunden auf den Zellen detektiert.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse, wurden je Behandlung 100-200 Zellen und die Menge der darauf gebundenen Lipoplexe ausgezählt. Außerdem wurde im Modus der rückgestreuten Elektronen von je 10 zufällig ausgewählten Zellen bei höherer Vergrößerung die Zahl der Goldmarkierungen erfasst, um die DNA-Menge abzuschätzen.

Auf beiden Zelllinien erhöhte sich die Menge der gebundenen Lipoplexe mit Länge der Inkubationszeit. So wurden nach 0,5 Stunden auf 17-27 %, nach 3 Stunden zwischen 53 und 93 % und nach 48 Stunden auf 89-98 % aller Zellen Lipoplexe lokalisiert. Allerdings unterschieden sich die Zelllinien wie folgt: Nach 3 Stunden waren bereits an mehr als 90 % der N64-Zellen DAC30-Lipoplexe gebunden. Auf den Rattengliomzellen (F98) wurde dieser Wert erst nach 48 Stunden beobachtet (Abb. 33).

Gleichzeitig änderte sich auch die Zahl der Goldmarkierung auf den Zellen abhängig von der Zeit, der Zelllinie und der Liposomenzusammensetzung. Nach 48 Stunden Inkubation mit DAC30-Lipoplexen wurden etwa doppelt so viele Goldsignale auf den Zellen detektiert wie nach Einsatz von DOCSPER100, wobei auf N64-Zellen ca. 100 auf F98 Zellen 40 Goldmarkierungen detektiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits die Bindung von Lipoplexen auf der Zellmembran von verschiedenen Parametern beeinflusst wird, wie von der Zelllinie, der Inkubationszeit und der Zusammensetzung der Liposomen bzw. Lipoplexen.

Außer den beschriebenen DAC30- und DOCSPER100-Lipoplexen wurde das Verhalten von Lipopolyplexen untersucht. Dazu wurden F98- und N64-Zellen mit DAC30-Protaminsulfat-DNA-Komplexen inkubiert. Das Verhalten dieser Komplexe unterscheidet sich durch schnellere Bindung an die Zellmembran von den Lipoplexen.

Bereits nach 30 Minuten wurden auf 97-100 % der Zellen beider Linien Lipopolyplexe detektiert. Während auf N64-Zellen nach 30 Minuten über 700 Markierungen/Zelle gezählt wurden, konnte auf F98-Zellen nach 3 Stunden ein Maximum von 188 Goldmarkierungen beobachtet werden.

Nach 48 Stunden reduzierten sich die Goldmarkierungen auf 90-175/Zelle. Die Abnahme der gebundenen Partikel könnte durch Aufnahme in die Zelle erklärt werden. Das Verhalten der Lipopolyplexe scheint sich deutlich von dem der Lipoplexe durch eine schnellere und bessere Bindung der komplexierten DNA an der Zelloberfläche zu unterscheiden.

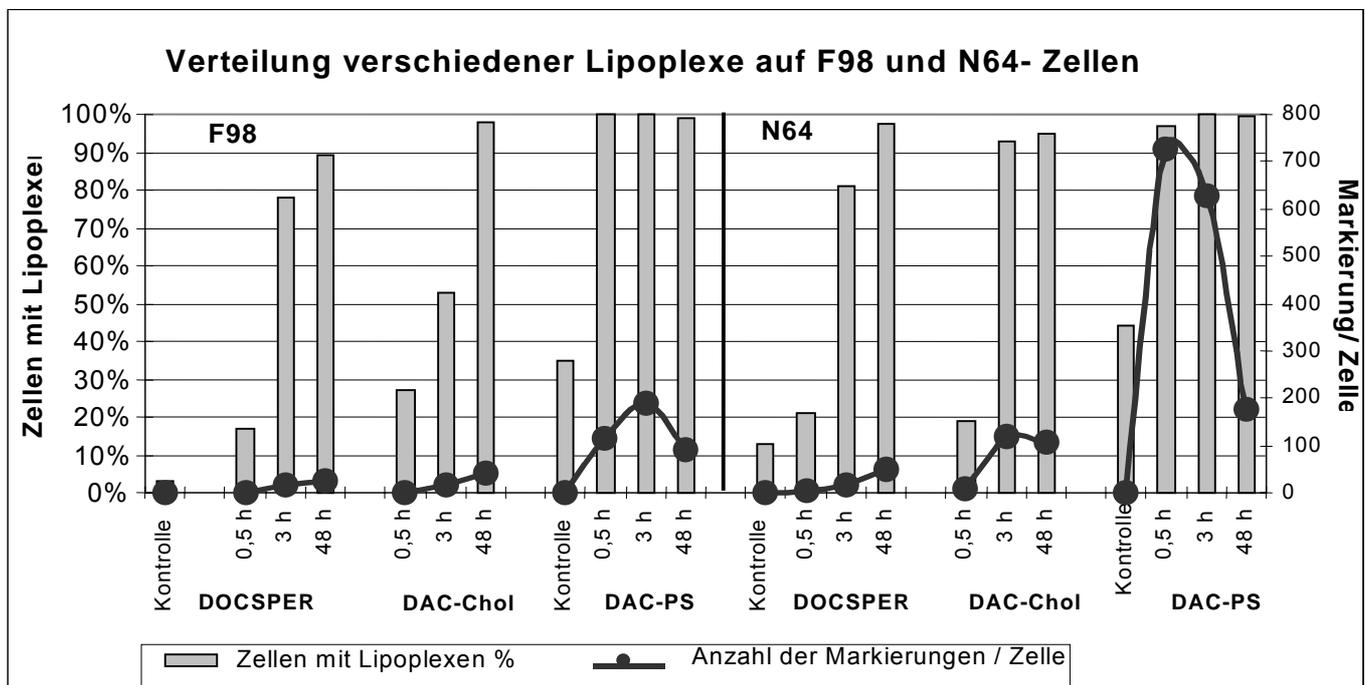


Abb. 33: Verteilung von DAC30- und DOCSPER100-Lipoplexen und DAC30-PS-Lipopolyplexen auf N64- und F98-Zellen und Verteilung der Goldmarkierungen. Mit zunehmender Inkubationszeit erhöht sich die Zahl der gebundenen Komplexe auf den Zellen. Die Anzahl der Goldmarkierungen je Zelle (Gold-markierte DNA) ist bei DAC30-PS-Lipopolyplexen um ein Vielfaches höher als bei den eingesetzten Lipoplexen.

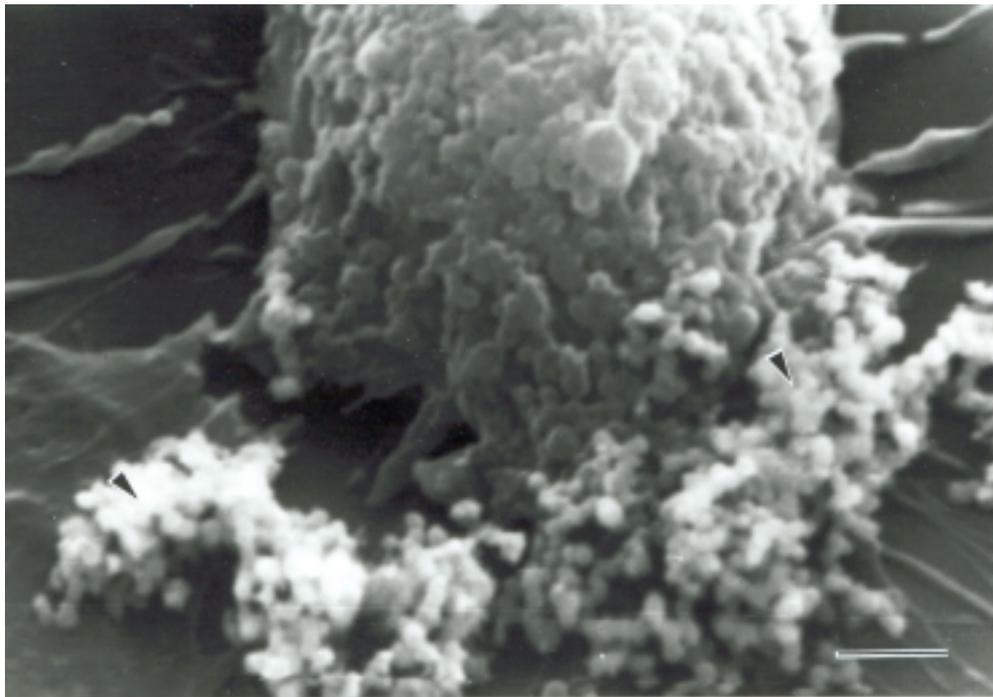


Abb. 34a: Teil einer kultivierten Zelle (N64) mit DAC-Lipoplexen (Pfeil), sek. Vergr: 14.000fach
Der Balken entspricht 1 μm .

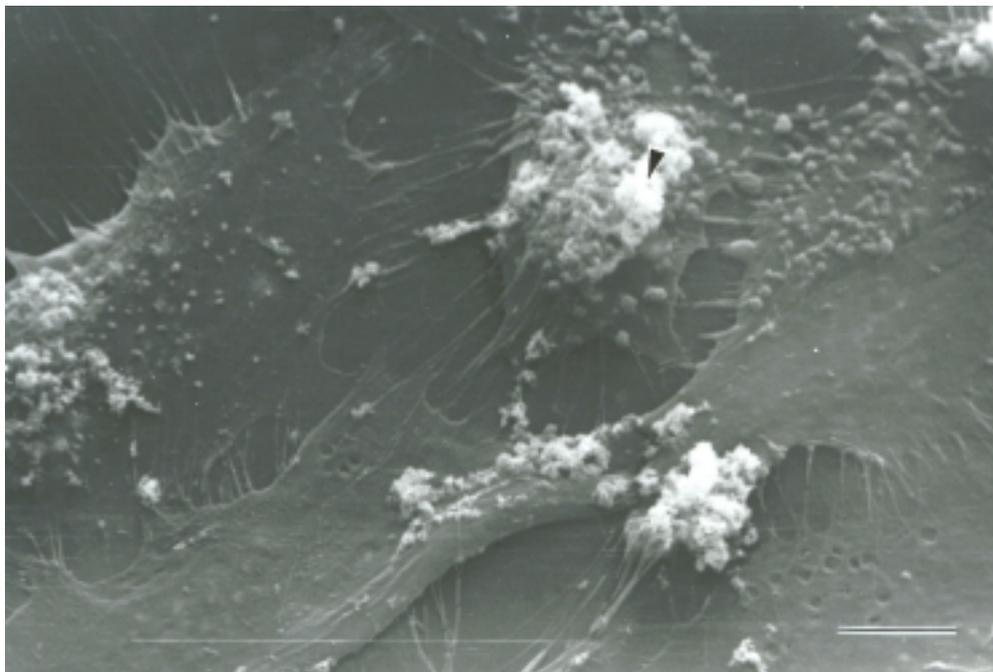


Abb. 34 b: N64-Zellen mit DOCSPER100-Lipoplexen, 3.000fache Vergrößerung. Der Balken
entspricht 5 μm .

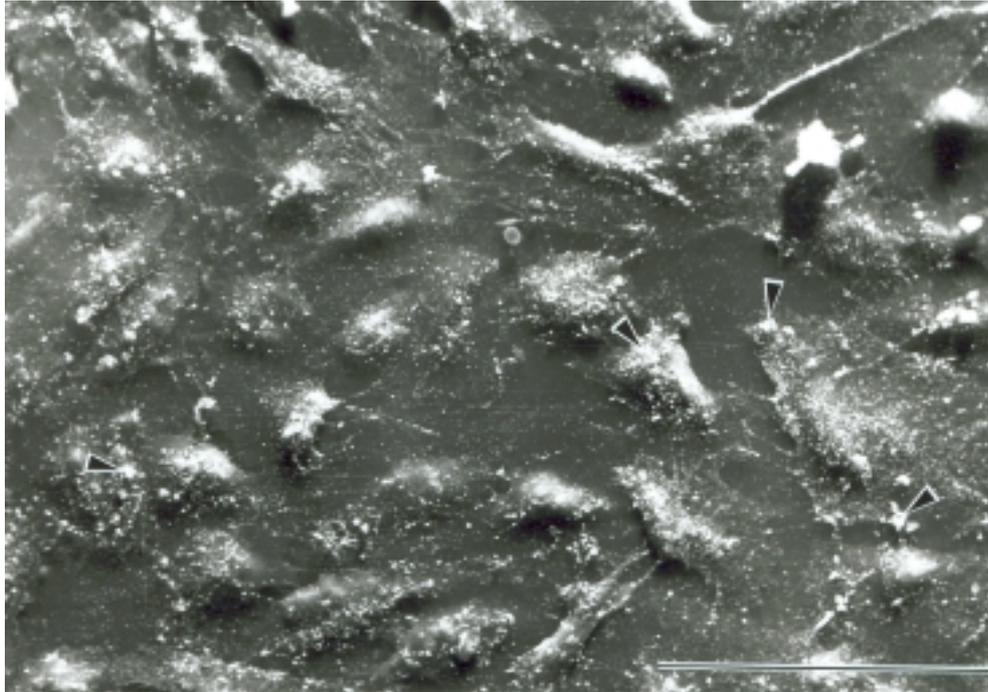


Abb. 35: Verteilung von DAC30-PS-Lipopolyplexen auf N64-Zellen 30 min nach der Inkubation sind die Komplexe (Pfeil) gleichmäßig verteilt. 900fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 5 μm .

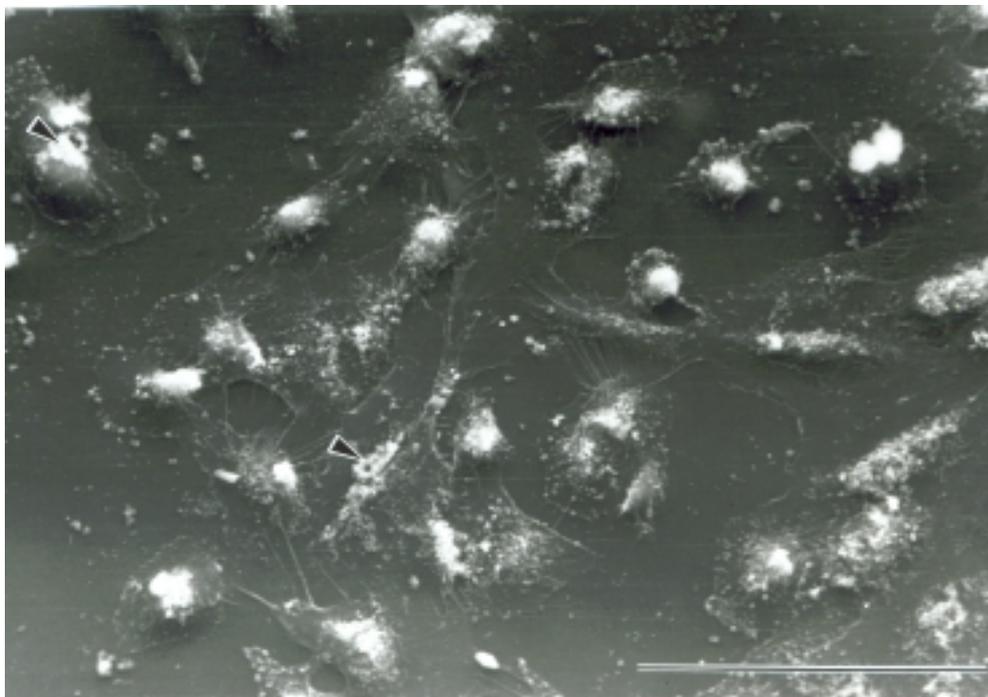


Abb. 36: Verteilung von DAC30-PS-Lipopolyplexen auf N64-Zellen: 48 Stunden nach Inkubation sind deutlich weniger Komplexe (Pfeil) auf den Zellen zu beobachten. 900fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 5 μm .

3.4.2. Nachweis negativer Ladungen an der Zellmembran

Um zu prüfen, ob unterschiedliches Bindungsverhalten der Lipoplexe auf unterschiedliche negative Oberflächenladungen der Zellen zurückzuführen ist, wurden Zellen verschiedener Linien kultiviert und mit kationischem Gold bei 4 °C inkubiert. Die Temperatur von 4 °C sollte gewährleisten, dass die Goldpartikel nur an den Zellmembranen binden, nicht aber aufgenommen werden.

Auf allen untersuchten Zelllinien wurde kationisches Gold gebunden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien waren eher geringfügig. Zellen der Linie N64 haben vor allem an den Spitzen der Filopodien verstärkt Gold gebunden. Bei anderen Zelllinien wie MCF7 ist die Goldbindung vor allem an kurzen Filopodien oder Mikrovilli zu beobachten. Eine Ausnahme der Bindung von kationischem Gold wurde bei der Zelllinie CC531 beobachtet. Hier wurden auf einigen Zellen so gut wie keine Goldpartikel detektiert, während andere gleichmäßig und stark markiert waren. Die vor allem bei der Untersuchung kationischer Liposomen genutzten Zelllinien F98 und N64 unterschieden sich jedoch kaum voneinander. Unterschiedliches Bindungsverhalten der Lipoplexe bzw. vor allem der Lipopolyplexe kann demzufolge nicht allein mit der unterschiedlichen Oberflächenladung erklärt werden.

3.4.3. Aufnahme

Weiterhin interessierte die Dokumentation der Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung der Komplexe. Dazu wurden Zellen mit Lipoplexen und Lipopolyplexen zu verschiedenen Zeiten fixiert und in Epon eingebettet. Die präparierten Schnitte wurden meist ohne zusätzliche Kontrastierung und zum Teil quantitativ ausgewertet. Der größte Unterschied zu den Rasterproben bestand darin, dass obwohl nach 48 Stunden Inkubation in den Rasterproben fast 100 % der Zellen mit Lipoplexen belegt waren, in den Dünnschnitten jedoch nur 20-30 % der Zellen mit Lipoplexen an der Zellmembran beobachtet wurden. Darin spiegelt sich auch die Tatsache wieder, dass die Lipoplexe nicht zu 100 % die Oberfläche der Zellen bedecken.

Die Bindung der Komplexe erfolgte an der Zellmembran oder an Membranausstülpungen der Zelle wie Filopodien oder Pseudopodien. Aus einigen Zellquerschnitten ließ sich auch entnehmen, dass Komplexe auch von Pseudopodien eingeschlossen werden. In F98-Zellen wurden an maximal 20 % der Zellen Lipoplexe an der Zelloberfläche beobachtet, an N64-Zellen waren es 30 %. Auch in Ultradünnschnitten erschien die Bindung und Aufnahme abhängig von der Inkubationszeit. Zwar konnten schon nach 30 Minuten in einzelnen Zellen Lipoplexe nachgewiesen werden, jedoch wurden die meisten Lipoplexe zwischen 3 und 48 Stunden beobachtet. DAC- und DOCSPER-Lipoplexe wurden in einfachen Vesikeln (>200 nm) transportiert. Coated pits oder coated Vesikel scheinen bei der Aufnahme keine Rolle zu spielen. Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen

Größenverhältnisse darstellen. Während die untersuchten Lipoplexe meist mehrere hundert Nanometer groß waren, weisen coated Vesikel nur einen Durchmesser von 150 nm auf (Alberts et. al, 1995).

Um den Aufnahmemechanismus näher zu charakterisieren, wurde das Toxin Cytochalasin B eingesetzt (s. Abschnitt 3.4.10.).

3.4.4. Intrazelluläre Verteilung der Lipoplexe

Lipoplexe wurden an Hand der Gold-markierten DNA in den Endosomen identifiziert. Die durchschnittliche Größe der Lipoplex-haltigen Endosomen betrug nach Applikation von DOCSPER-Lipplexen zwischen 300-550 nm und nach Inkubation von DAC-Lipplexen 700 bis 2400 nm. Der DNA-Gehalt, ermittelt an Hand der Goldmarkierung, betrug zwischen 40 (DOCSPER) und 75 Goldpartikel (DAC-Lipoplexe). Diese Goldmengen entsprechen etwa 200 bis 400 Plasmiden (Abb. 37).

Lipoplex-haltige Endosomen wurden in verschiedenen Bereichen der Zellen beobachtet, zunächst in der Peripherie und nach 3 bis 48 h auch in unmittelbarer Nähe des Zellkerns (Abb. 39). In Einzelfällen wurden sie auch in direkter Nähe von Mikrotubuli nachgewiesen.

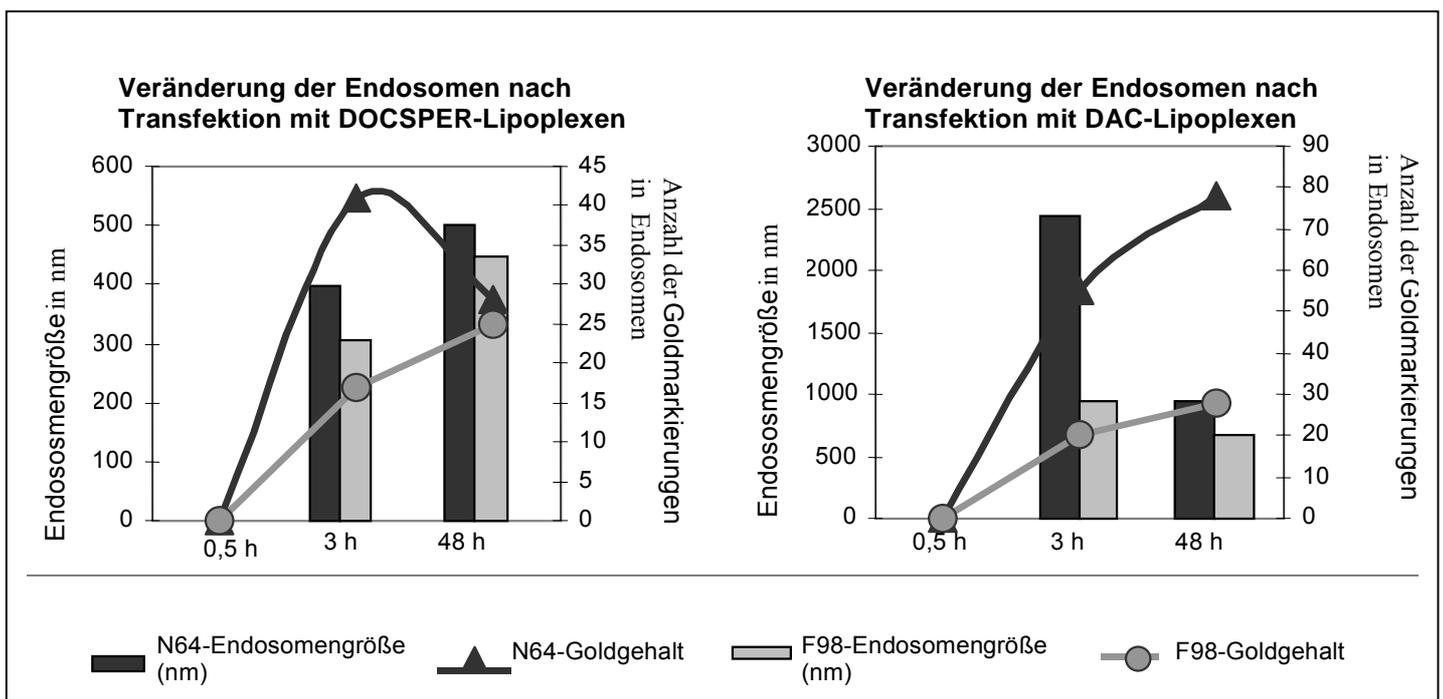


Abb. 37: Veränderung von Endosomen hinsichtlich Größe und DNA-Gehalt nach Transfektion mit DOCSPER- und DAC-Lipplexen. Nach 3 Stunden wurden bis zu 60 Goldmarkierungen (300 Plasmide) in den Endosomen beobachtet. Sowohl die Endosomengröße als auch die DNA-Menge wird von den Lipplexen, der Zelllinie und der Inkubationszeit beeinflusst.

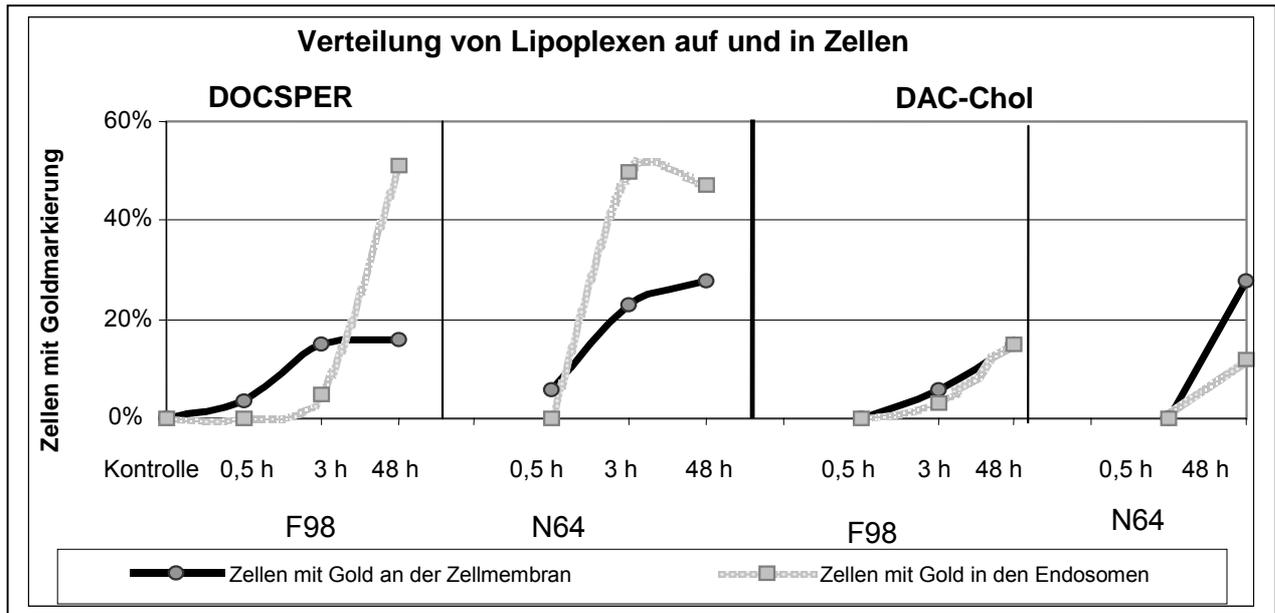


Abb. 38: Verteilung der Lipoplexe an der Zellmembran und in den Zellen nach Auswertung der Dünnschnitte. Bindung und Aufnahme von Lipoplexen sind abhängig von der Zeit, den Zelltypen und der Art der Lipoplexe.

3.4.5. Veränderung der Lipidstruktur

Lipoplexe veränderten ihre Morphologie nach längerer Verweildauer in den Endosomen. In Abhängigkeit von den eingesetzten Lipiden konnten verschiedene Strukturen beobachtet werden.

In DAC-Lipoplexen schien sich Gold-markierte DNA vom Lipoplex zu lösen. Lipide bildeten unterschiedliche, teils konzentrische, teils netzartige Lipidstrukturen aus (Abb. 40). Möglicherweise zeigt dies die Dissoziation zwischen dem kationischen Lipid und der DNA.

In DOCSPER-Lipoplexen erschien die Bilayerstruktur nach 3-48 Stunden deutlicher, außerdem schien sich die Lage der Gold-markierten DNA zu ändern. Während das Gold anfangs am Rand der Lipoplexe gebunden war, wurde es nach 48 Stunden zwischen einzelnen Lipidschichten beobachtet (Abb. 40). Strukturänderungen dieser Art sind sicher auf den saureren pH-Wert und die Enzymtätigkeit in den Endosomen zurückzuführen.

3.4.6. Freisetzung aus dem Endosom

Nach der Aufnahme und Verteilung der Lipoplexe in den Endosomen müssen die Komplexe bzw. die DNA das Endosom verlassen, um in den Kern zu gelangen (Capecchi, 1980). In den untersuchten Schnitten konnte die Freilassung von DNA aus den Endosomen nicht direkt beobachtet werden. Trotzdem wurden einzelne Goldpartikel im Zytoplasma meist in der Nähe der Gold-gefüllten Endosomen beobachtet. Da die Schnitte ohne zusätzliche Blei- und Uranylacetatkontrastierung ausgewertet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Goldpartikel von zarten Membranen umgeben waren, die schlecht oder unzureichend sichtbar waren. Nach 48 Stunden konnten in den ausgewerteten Schnitten zwar keine Lipoplexe oder Gold-markierte DNA im Zellkern nachgewiesen werden, jedoch konnten in 2-4 % der untersuchten Zellen mit Gold gefüllte Endosomen in unmittelbarer Nähe der Kernmembran beobachtet werden.

Möglicherweise existieren parallele Wege, die der DNA die Aufnahme in den Kern ermöglichen:

1. Freisetzung aus dem Endosom und
2. Vesikeltransfer zum Kern.

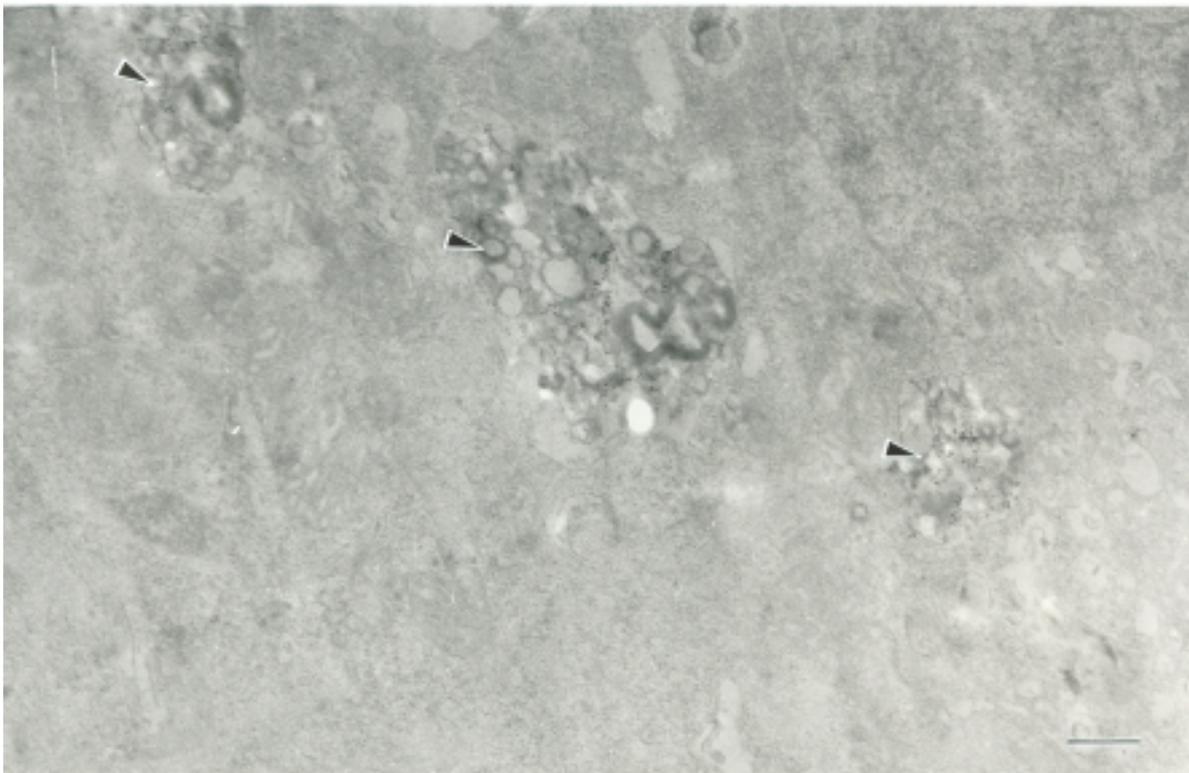


Abb. 39a: N64-Zellen mit DAC-Lipoplexen im Endosom. 3 Stunden nach der Inkubation sind die Lipoplexe von der Zelle aufgenommen. Im Endosom ist die Zusammensetzung der Komplexe aus einzelnen Liposomen zu erkennen. 30.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 300 nm.

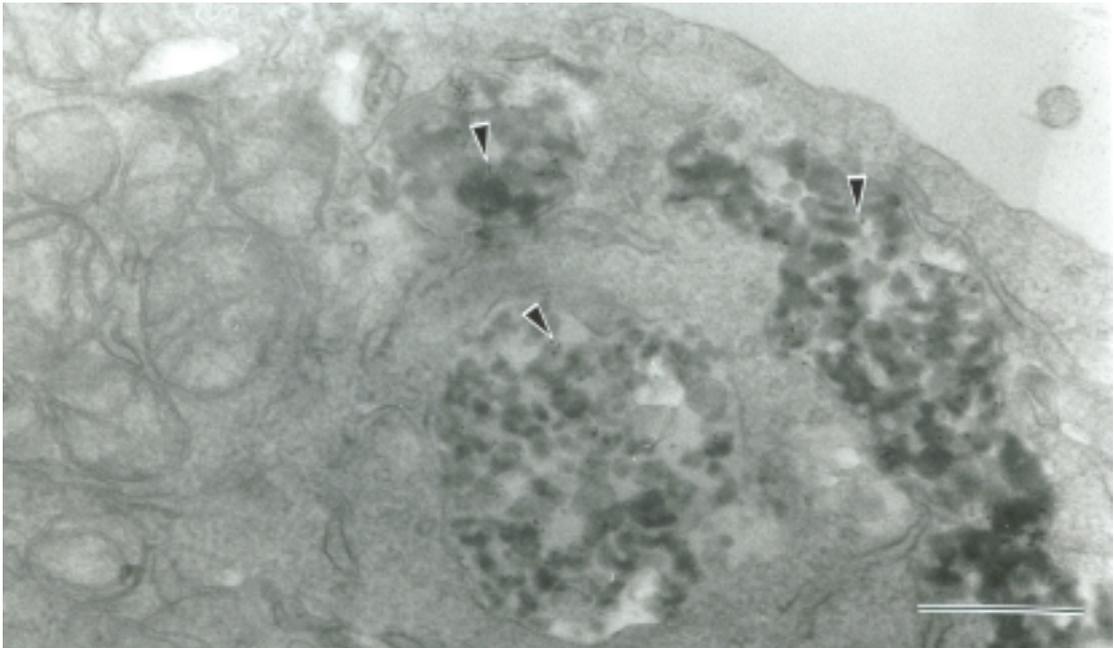


Abb. 39b: N64-Zellen nach Transfektion mit DOCSPER-Lipoplexen. Nach 3 Stunden befinden sich die Lipoplexe eingeschlossen in Endosomen. Die Struktur der Lipoplexe entspricht den Ergebnissen der Negativkontrastierung (vgl. auch Abb. 29 d). 45.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 500 nm.

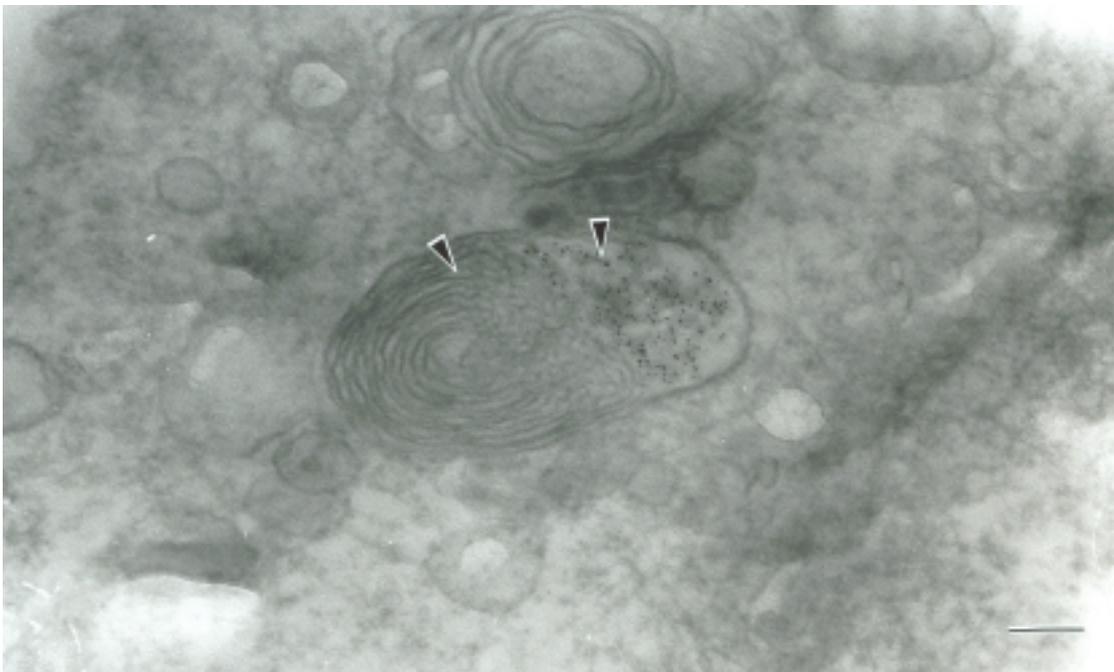


Abb. 40a: 48 Stunden nach Transfektion mit DAC30-Lipoplexen werden Veränderungen in den Lipoplexen sichtbar. Gold-markierte DNA scheint nicht länger an Lipidstrukturen gebunden und aus den konzentrisch angeordneten Lipidschichten der Liposomen entstehen neue Lipidstrukturen. 100.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

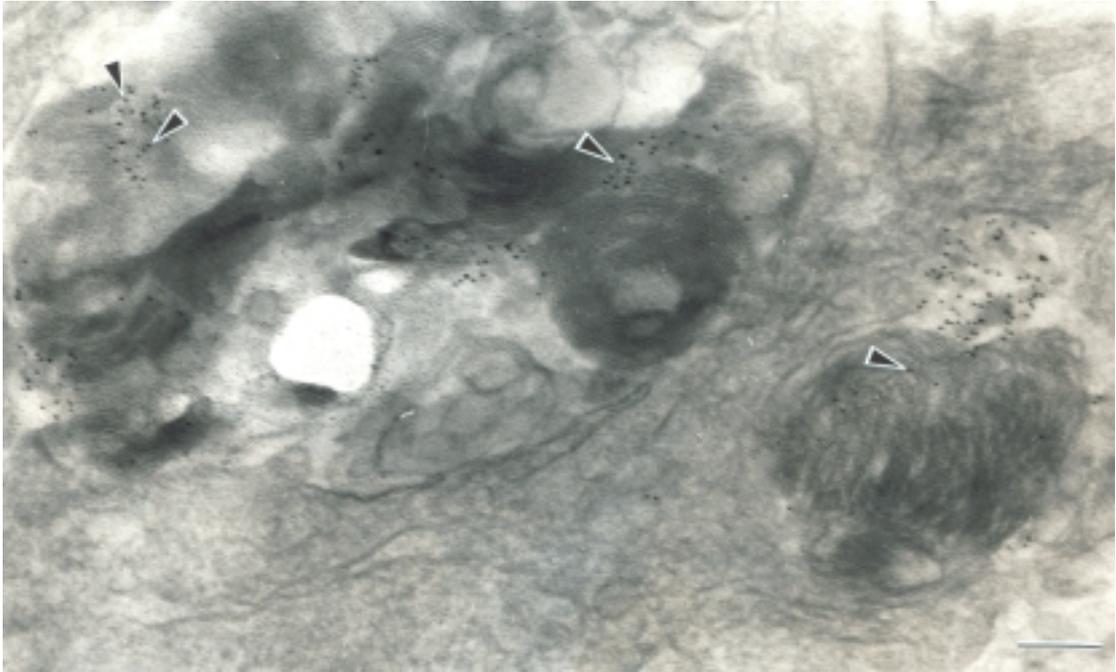


Abb. 40b: DOCSPER-Lipoplexe 48 h nach der Transfektion in N64-Zellen. Aus den kleinen Liposomen haben sich große und kompakte Strukturen entwickelt. Im Gegensatz zu den DAC-Liposomen scheint Gold-markierte DNA an Lipidstrukturen gebunden. Teilweise sind Goldpartikel deutlich zwischen den Lipidschichten eingeschlossen. 100.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

3.4.7. Intrazelluläre Verteilung von DAC-Chol-Protaminsulfat-Lipopolyplexen (DAC-PS)

30 Minuten nach der Applikation waren auf mind. 95 % der Zellen Lipopolyplexe nachweisbar, wobei auf N64-Zellen mehr als doppelt so viele Gold- bzw. Silbersignale detektiert wurden als auf F98-Zellen. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Auswertungen der Dünnschnitte. So ließen sich auf 40 % der N64 Zellen im Vergleich zu 10 % der F98 Zellen Lipopolyplexe nachweisen.

Die zelluläre Aufnahme der DNA wurde meist nur mit Protaminsulfat-DNA-Partikeln beobachtet. Sie erfolgte in Vesikeln unterschiedlicher Größe. DAC-Chol-Liposomen wurden an der Zellmembran nicht detektiert.

Die komplexierte DNA ließ sich auf Grund der Goldmarkierung in den Endosomen verfolgen. Nach 30 Minuten wurden in 13-20 % der Zellen Polyplexe mit durchschnittlich 4-7 Goldmarkierungen in Endosomen von etwa 150 nm Größe beobachtet.

Nach 48 Stunden wurden die Komplexe in größeren Endosomen (250-450 nm) beobachtet sowie eine Erhöhung der Zahl der Goldpartikel. Auf Grund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die aufgenommenen Komplexe in der Zelle transportiert werden und miteinander oder mit anderen Endosomen fusionieren.

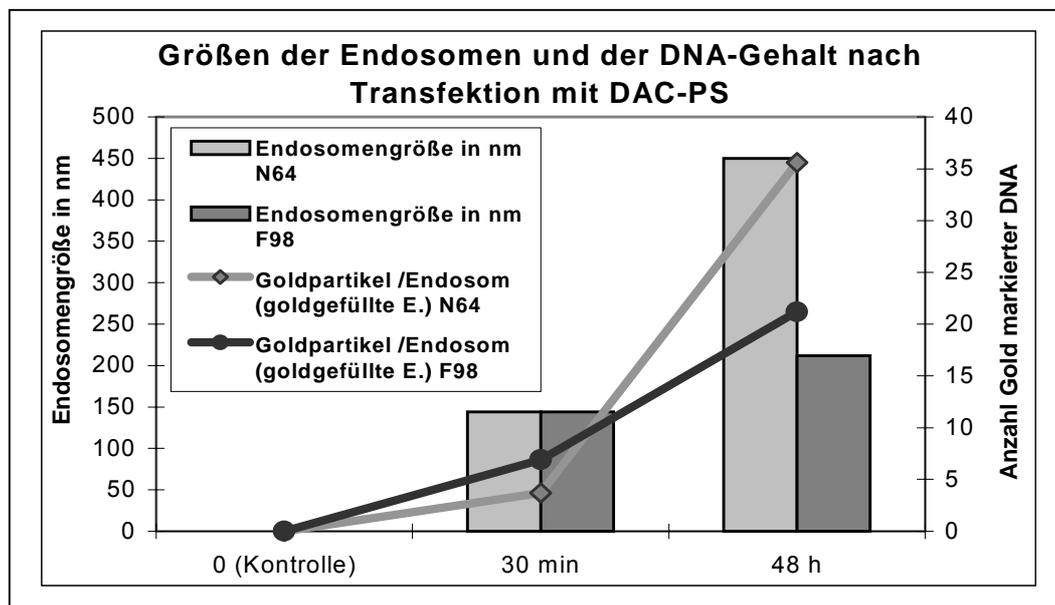


Abb. 41: Größen der Endosomen und der DNA-Gehalt nach Transfektion mit DAC-PS. Nach 48

Stunden ist Gold-markierte DNA überwiegend in größeren Endosomen lokalisiert. Gleichzeitig erhöht sich auch die DNA-Konzentration gemessen an den Goldmarkierungen in den Endosomen, unabhängig von der untersuchten Zelllinie.

Mit zunehmender Inkubationszeit veränderten sich die Strukturen in den Endosomen. Goldmarkierungen wurden in multivesikulären Strukturen und in Endosomen mit stark kontrastierten Lipidstrukturen beobachtet, wobei die Goldpartikel dann meist randständig gruppiert waren. Nach 48 Stunden wurden Lipopolyplexe sowohl an der Zellmembran (bei ca. 40 % der N64-Zellen) als auch in Endosomen nachgewiesen, wobei 9 % der mit Gold gefüllten Endosomen in unmittelbarer Kernnähe beobachtet wurden. Im Zytoplasma in Kernnähe wurden in Einzelfällen wenige Goldpartikel nachgewiesen.

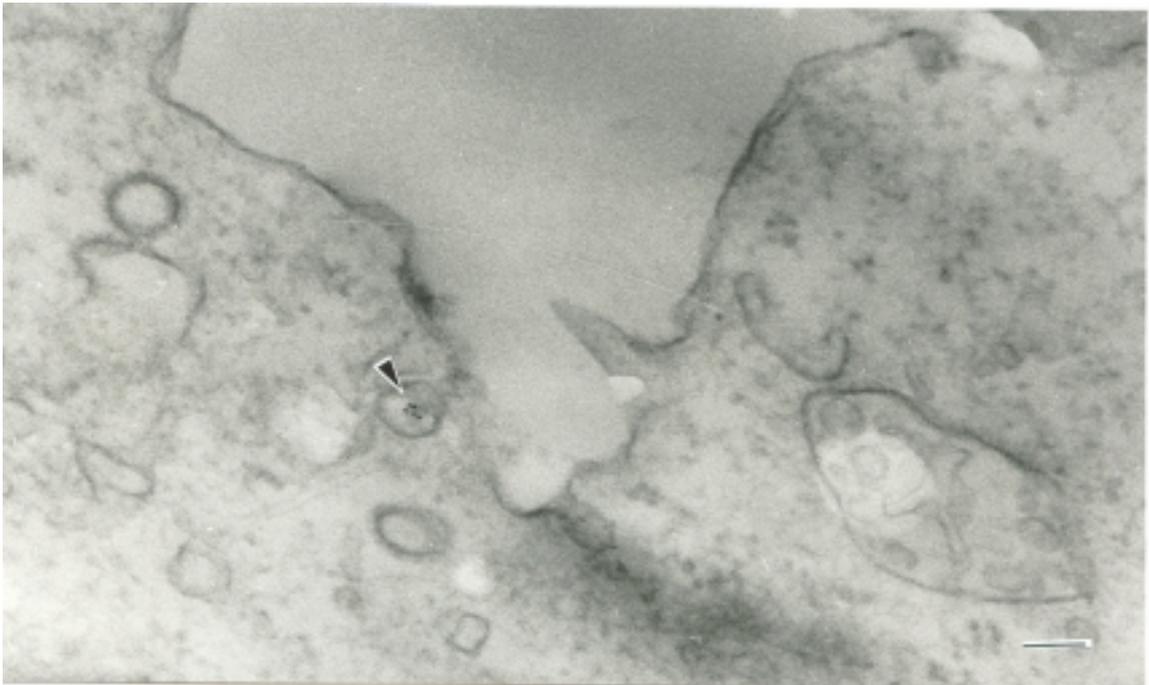


Abb. 42a: Aufnahme von DAC-PS-Lipopolyplexen (Pfeil) in N64-Zellen durch kleine Vesikel. 90.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

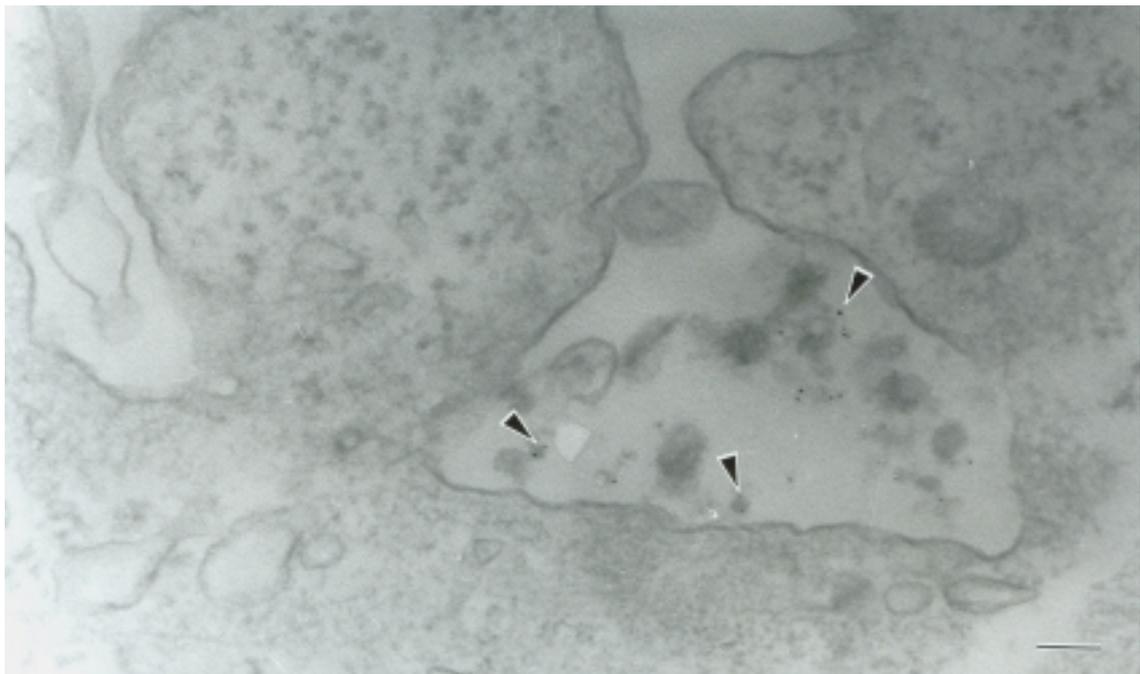


Abb. 42b: Aufnahme von DAC-PS-Lipopolyplexen (Pfeil) in N64-Zellen durch Einschluss in Pseudopodien. 80.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

In F98-Zellen wurden zu allen untersuchten Zeiten bzw. Probenahmen im TEM und REM weniger Goldmarkierungen sowohl auf als auch in der Zelle detektiert.

DAC-Chol-Liposomen konnten zu keiner Zeit mit Sicherheit in der Zelle nachgewiesen werden, möglicherweise auf Grund der fehlenden (Gold-)Markierung. Es ist daher aus den

elektronenmikroskopischen Daten nicht ersichtlich, welche Rolle kationische Liposomen bei der Transfektion mit Lipopolyplexen spielen. Transfektionskontrollen haben aber gezeigt, dass Komplexe aus Protaminsulfat und DNA ohne Liposomen nicht in der Lage sind, Zellen zu transfizieren (Groth, 2000).

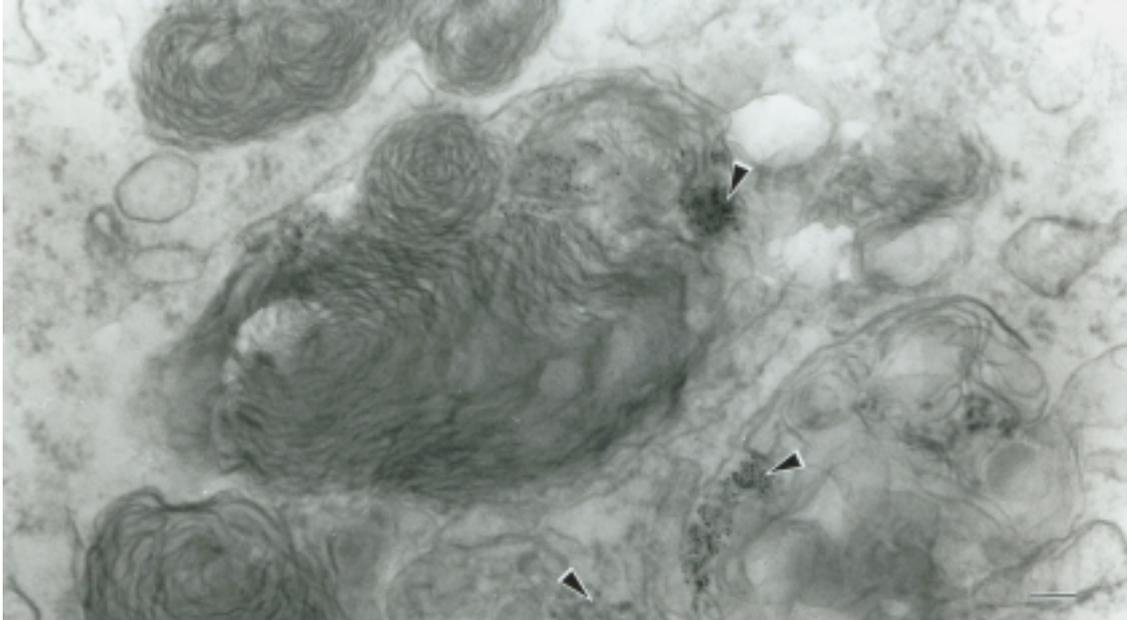


Abb. 43: Veränderung der DAC-PS-Strukturen in den Endosomen. Nach 48 Stunden wurden Goldpartikel (Pfeil) zusammen mit unterschiedlichen Lipidstrukturen in Endosomen beobachtet. 60.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

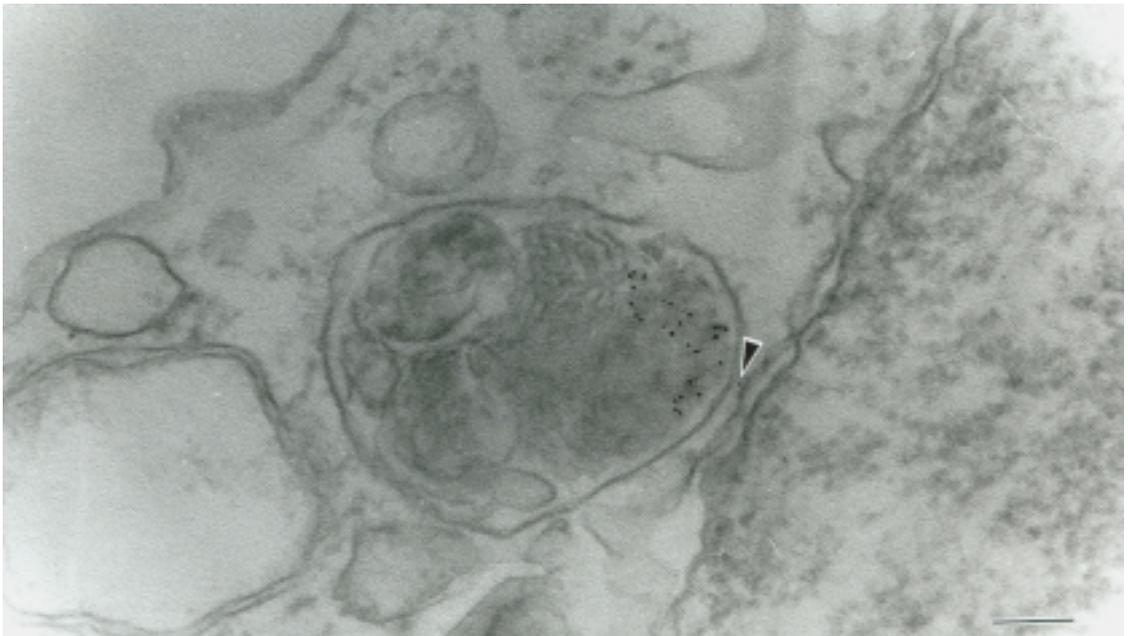


Abb. 44: 48 Stunden nach der Transfektion mit DAC30-PS-Lipopolyplexen wurden Gold-gefüllte Endosomen in Zellkernnähe beobachtet. Einzelne Goldpartikel (Pfeil) sind auch im Zytoplasma sichtbar. 100.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

3.4.8. Vergleichende Betrachtung von Lipoplexen und Lipopolyplexe

Lipo- und Lipopolyplexe unterscheiden sich zum Teil recht deutlich in ihrem Verhalten. So zeichnen sich Lipopolyplexe durch ihre schnellere Bindung an die Zellmembran aus. Weiterhin werden sie in kürzerer Zeit von der Zelle aufgenommen. Außerdem konnten mehr Endosomen in Kernnähe nachgewiesen werden als bei Verwendung von Lipoplexen (s. Tab. 5). Möglicherweise werden kleinere Endosomen auch schneller in der Zelle transportiert.

Transfektionsuntersuchungen, die von D. Groth (2000) im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt wurden, zeigten, dass die Transfektion von F98-Zellen um das 2-3fache gesteigert wird, wenn die DNA mit Protaminsulfat und DAC-Liposomen komplexiert wird.

Parameter	Lipoplexe	Lipopolyplexe
Goldmarkierungen / Zelle im REM	40-100	200-700
regelmäßiger Nachweis in Endosomen nach ...	3 Stunden	30 Minuten
Zellen mit Gold gefüllten Endosomen	15 % (40 %)	40 %
Größe Gold gefüllter Endosomen	300-2000 nm	150-450 nm
Anzahl der Goldpartikel im Endosom	40-75	20-35
Zellen mit Gold haltigen Endosomen in Kernnähe	2-3 %	9 %

Tab 5: Vergleich des in-vitro Verhaltens der untersuchten Lipoplexe und Lipopolyplexe

3.4.9. Kontrollversuche mit kationischem Gold und Gold-markierter DNA

F98-Zellen wurden zur Kontrolle mit kationischem Gold (5 nm) und der verwendeten Gold markierten DNA inkubiert (0,5, 3 und 48 Stunden) und nach Einbettung und Anfertigung von Ultradünnschnitten ausgewertet und die Transfektion mit Hilfe der β -Gal-Färbung getestet.

Nach 30 Minuten ließen sich Goldpartikel nur an der Zellmembran beobachten, nach 3 Stunden wurden sie auch in Endosomen verschiedener Morphologie detektiert (Abb. 45). In einigen Fällen scheint es, dass Gold-beladene Vesikel mit größeren Endosomen fusionieren. Zum Zeitpunkt der β -Gal-Färbung konnte kein Gold in den Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme und Verteilung der Goldpartikel und unkomplexierten DNA erschien ebenfalls abhängig von der Zeit. Trotzdem die DNA

nicht kondensiert und verpackt wurde, wurde sie von der Zelle aufgenommen. Nach der β -Gal-Färbung zeigte sich allerdings, dass die unkomplexierte DNA nicht in der Lage ist, die Zellen zu transfizieren.

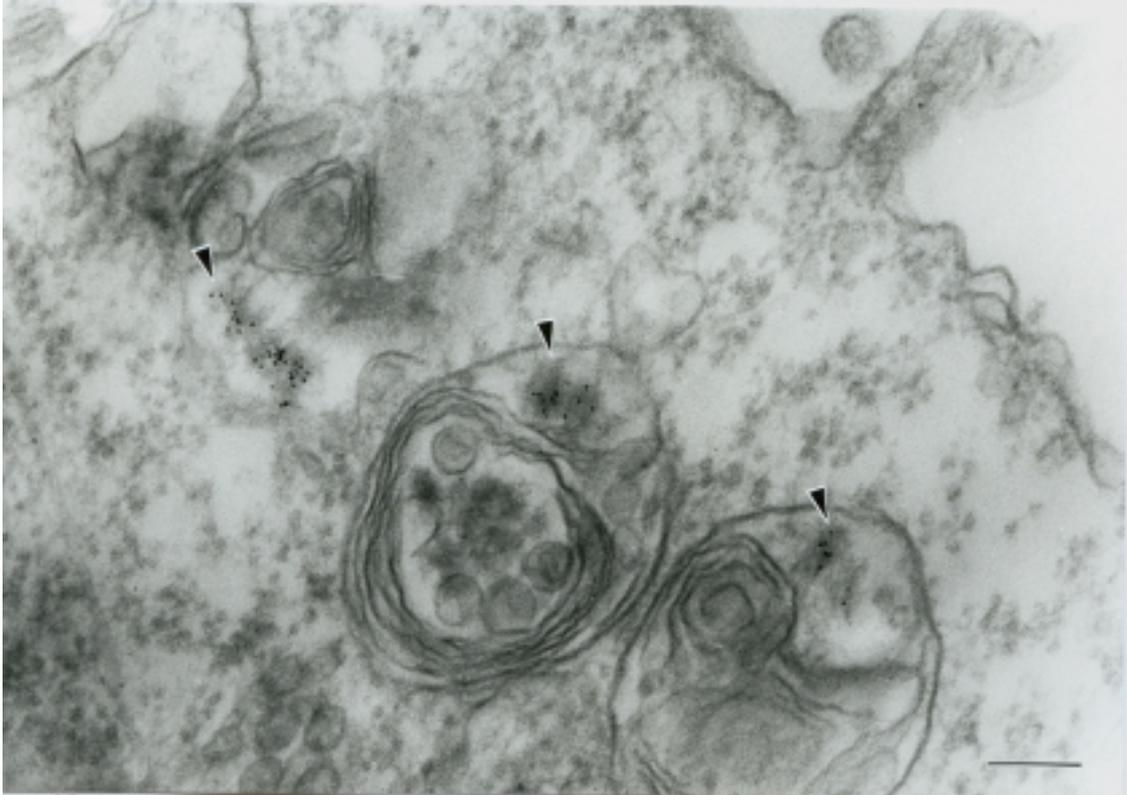


Abb. 45: Kationisches Gold (Pfeil) in verschiedenen Endosomen. 120.000fache Vergrößerung
Der Balken entspricht 100 nm.

Probe	Zeit	Zellen mit Gold
F98- Kontrolle	0	0 %
F98- kationisches Gold	0,5 h	7 %
F98- kationisches Gold	3 h	52 %
F98- Gold markierte DNA	0,5 h	4 %
F98- Gold markierte DNA	3 h	38 %
F98- Gold markierte DNA	48 h	0 %

Tab. 6: Verteilung der Goldmarkierung in F98-Zellen

3.4.10. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus

Ferner war es von Interesse den Aufnahmemechanismus näher zu charakterisieren. Dazu wurden die Zellen während der Transfektion mit Cytochalasin B behandelt. Cytochalasin B hemmt die Polymerisation von Aktin-Molekülen. Membranbewegungen der Zellmembran werden unterdrückt und in dessen Folge wird auch die Phagozytose unterbunden (Stanton and Reaven, 1974). Der Effekt beruht auf der Blockierung der Aufnahme. Mit Hilfe dieses Ergebnisses sollte es dann möglich sein, den konkreten Aufnahmemechanismus zu bestimmen.

Zellen der Linien F98 und N64 wurden vor und während der gesamten Inkubation im Kulturmedium mit 5µg/ml Cytochalasin kultiviert. Als Gencarrier dienten DAC-30-Lipoplexe. Kontrollzellen wurden mit DAC-30-Lipoplexen normal transfiziert oder mit dem 0,1 % DMSO behandelt, dem Lösungsmittel für Cytochalasin B und ebenfalls transfiziert.

Nach Auswertung der β-Gal-Färbung ergab sich folgendes Bild: Keine der untersuchten Zelllinien zeigte eine Hemmung. Die Transfektionseffizienz der behandelten Zellen war in keinem Fall schlechter als die der Kontrollgruppen. Unterschiede traten nur zwischen den Zelllinien auf (Tab. 7).

Zelle	Behandlung		β-Gal Expression
F98	-----	DAC-30-Lipoplexe	2 %
F98	Cytochalasin B	DAC-30-Lipoplexe	5 %
F98	DMSO	DAC-30-Lipoplexe	5 %
N64	-----	DAC-30-Lipoplexe	10 %
N64	Cytochalasin B	DAC-30-Lipoplexe	10-15 %
N64	DMSO	DAC-30-Lipoplexe	10-15 %

Tab. 7: Einfluss von Cytochalasin B auf die β-Gal-Expression

Parallel zur Bestimmung der Transfektion wurden die Zellen für Raster- und Transmissions-EM präpariert. Untersucht wurde das Bindungsverhalten, Aufnahme und Verteilung in der Zelle in Abhängigkeit von der Behandlung.

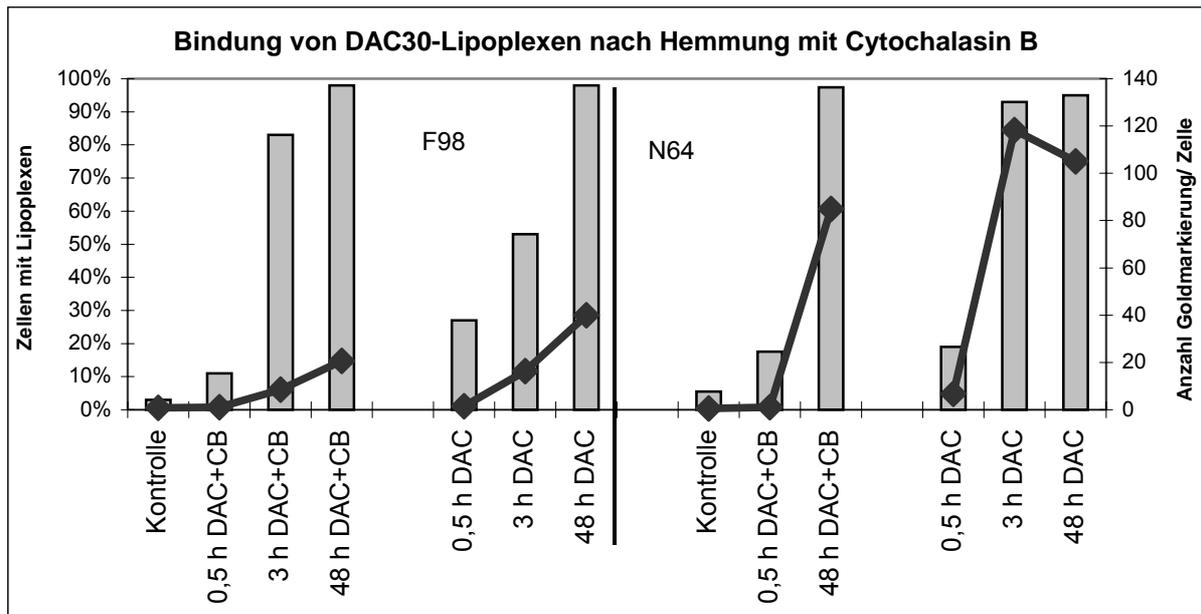


Abb. 46: Einfluss von Cytochalasin B (CB) auf Bindung und Verteilung der Lipoplexe nach Auswertung im REM. Bei der Transfektion von N64- und F98-Zellen mit DAC30-Lipoplexen hatte Cytochalasin B keinen Einfluss auf Bindung und Aufnahme der Lipoplexe.

Wie aus Abb. 46 hervorgeht, erfolgte keine Hemmung der Bindung der Lipoplexe, weder nach 30 Minuten noch nach 48 Stunden. Es wurden in allen untersuchten Fällen ähnliche Ergebnisse bei Behandlung und Kontrolle festgestellt. Das betrifft die relative Anzahl von Zellen mit Lipoplexen und auch die Verteilung der Goldmarkierung auf einzelnen Zellen.

Nach Auswertung der Ultradünnschnitte konnte ebenfalls keine Hemmung bei der Aufnahme nachgewiesen werden. Der Eintritt der Lipoplexe mit Hilfe von Pseudopodien erschien unverändert abzulaufen. Nach 3-48 Stunden wurden - im Vergleich zu den Kontrollzellen - in den mit Cytochalasin B behandelten Proben geringfügig mehr Zellen mit Gold gefüllten Endosomen detektiert.

Dies entspricht nicht den in der Literatur gefundenen Angaben, in denen von einer Hemmung von 50 % für Lipoplexe und bis zu 93 % für Partikel mit 2 μm Größe berichtet wird (Matsui et al., 1996). Weder in der Größe noch in der DNA-Konzentration in den Endosomen konnten wesentliche Unterschiede festgestellt werden. Allerdings wurden mit Hilfe des REM morphologische Veränderungen wie teils abgerundete Zellen, verdickte Filopodien oder teilweise Löcher in der Zellmembran beobachtet. Bei der Auswertung der Schnittbilder konnten morphologische Veränderungen nur unregelmäßig in den Zellen detektiert werden.

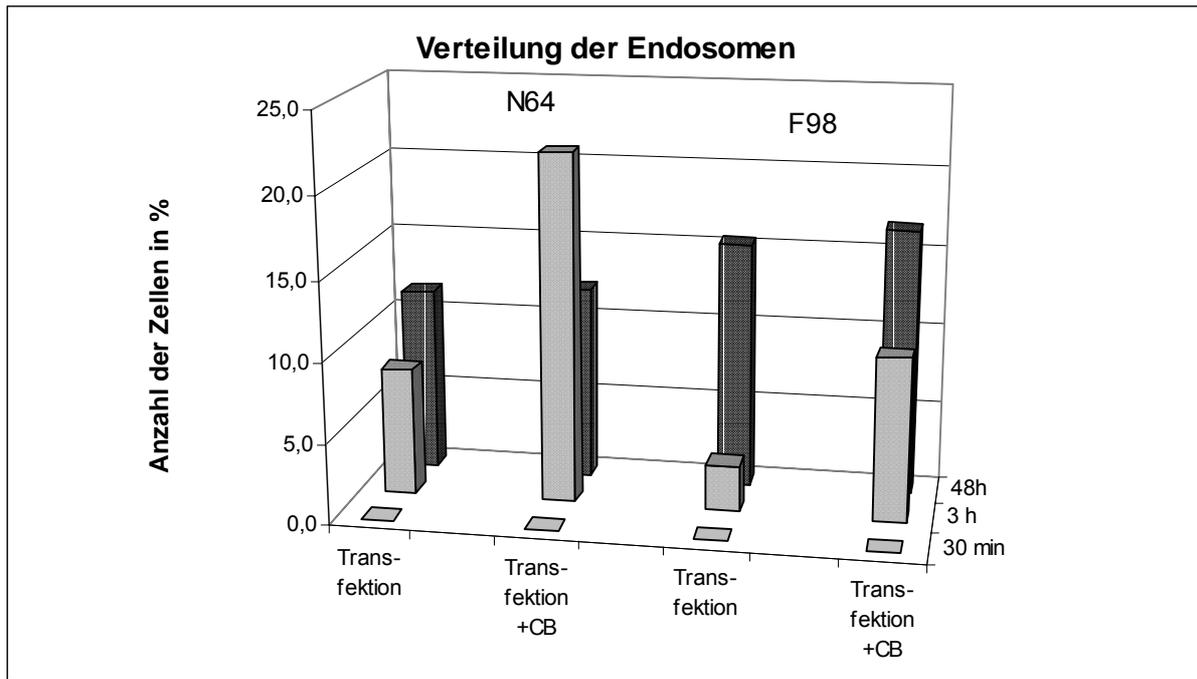


Abb. 47: Die Detektion Gold-gefüllter Endosomen nach Hemmung mit Cytochalasin B (Transfektion +CB) im Vergleich zu normal transfizierten Zellen zeigt, dass auch die Aufnahme der Lipoplexe nicht durch Cytochalasin B beeinträchtigt wurde.

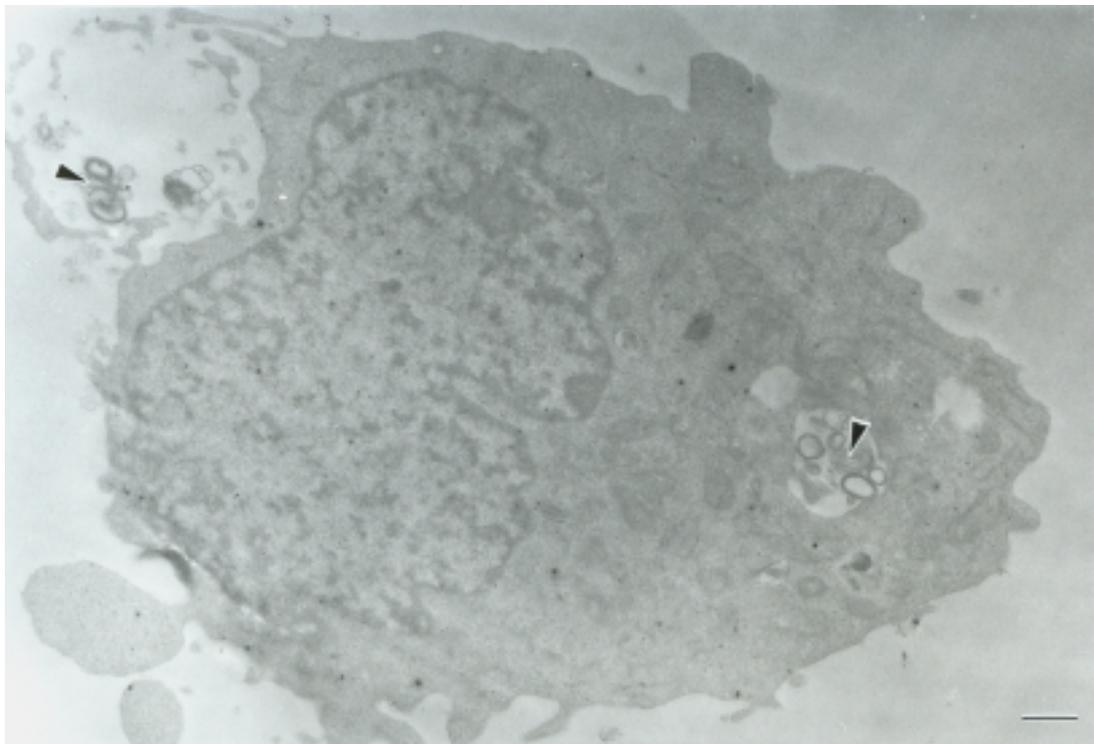


Abb.48: Aufnahme von DAC-30-Lipoplexen (Pfeil) nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B. 8.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 1µm.

3.4.11. Überwindung zellulärer Barrieren - Zusammenfassung

Der erste wichtige Schritt der Transfektion ist die Bindung an die Zellmembran. Wir konnten im Rahmen unserer Untersuchungen nachweisen, dass 30 Minuten nach Applikation bereits ein Teil der Zellen Lipoplexe gebunden hatten. Die Zahl der gebundenen Komplexe erhöht sich mit der Länge der Inkubationszeit. Weiterhin ist die Bindung von der Zelllinie und der Art der Liposomen abhängig. DAC-PS-Lipopolyplexe binden schneller an der Zellmembran als die untersuchten DAC- und DOCSPER-Lipoplexe. Sie werden auch schneller von den Zellen aufgenommen. Außerdem wurden mehr Gold-gefüllte Endosomen in Kernnähe nach Inkubation mit DAC-PS beobachtet. Um zu untersuchen, ob unterschiedlich stark ausgeprägte negative Ladungen an der Zellmembran die Ursache für unterschiedliches Bindungsverhalten darstellen, wurden die Zellen verschiedener Linien mit kationischem Gold bei 4 °C inkubiert und die Signale mit Silber verstärkt. Auf allen Zellen wurde das Gold gebunden. Die gefundenen Unterschiede waren sehr gering. Sie erklären das bessere Bindungsverhalten von N64-Zellen nicht.

In Kontrollversuchen, durchgeführt mit kationischem Gold und Gold-markierter DNA, konnte die Aufnahme der DNA zwar verfolgt werden, aber die Zellen wurden mit der unkomplexierten DNA nicht transfiziert.

Nach morphologischen Beobachtungen scheint die Aufnahme durch Phagozytose zu erfolgen. Um dies zu bestätigen, wurden die Zellen während der Transfektion mit Cytochalasin B behandelt. Allerdings konnte weder eine Hemmung der Bindung noch der Aufnahme oder der Transfektion beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1. HVJ-Liposomen und Virosomen

Viruspartikel erscheinen nach Negativkontrastierung pleomorph, d.h. sie variieren sowohl in der Größe als auch in der Form. Hosaka und Mitarbeiter (1966) fanden nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen Virionen zwischen 180-800 nm. Des Weiteren sind aus der Literatur verschiedene Formen bekannt, die teilweise auf das Alter der Virionen und auf Artefakte während der elektronenmikroskopischen Präparation zurückzuführen sind.

Die in den eigenen Versuchen eingesetzten Sendai Viren erschienen mit durchschnittlich 150 nm etwas kleiner als die von Hosaka et al. (1966) und Kim et al. (1979) beschriebenen Virionen.

Ausgehend von den Arbeiten zur Fusion von Sendai Viren und Liposomen (Haywood, 1981, 1991) und den Resultaten von Kaneda und Mitarbeitern (1989, 1994) zum Gentransfer mit HVJ-Liposomen wurden ähnliche Ergebnisse in den eigenen Arbeiten erwartet.

In den von uns durchgeführten Versuchen konnten die Bindung der Sendai Viren an Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzungen dokumentiert werden. Die Fusionen waren jedoch seltene Ereignisse. So lag die Ausbeute an HVJ-Liposomen mit 5 % auch unter dem von Haywood ermittelten Wert. Die Ergebnisse von Kaneda, Dzau und Mitarbeitern (1995, 1996), die mit negativ geladenen HVJ-Liposomen und Plasmid-DNA ähnlicher Größe von erfolgreichem Gentransfer (bis zu 35 Tagen) *in vitro* und *in vivo* berichten, konnten nicht reproduziert werden.

Mit den präparierten HVJ-Liposomen konnte kein effizienter Gentransfer durchgeführt werden. Dabei zählen die relativ geringe Verkapselung von DNA in negativ geladene Liposomen und vor allem die geringe Fusionsrate bei der Bildung der HVJ-Liposomen zu den limitierenden Faktoren.

Wir wandten uns daher der Präparation von Virosomen zu, deren Vorteil in der Rekonstitution von viralen Fusionsproteinen in der Liposomenmembran begründet ist. Ein weiterer Vorzug ist die genaue Charakterisierung der Partikel und der Ausschluss des viralen Genoms.

Die Untersuchungen der Virosomen zeigten, dass die Morphologie von der Herstellungsprozedur beeinflusst wird. Nach elektronenmikroskopischer Untersuchung waren Virosomen mit externer Lipidzugabe mehr als doppelt so groß wie jene, die ohne zusätzliche Lipide präpariert wurden. Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Teil der Lipide bei der Solubilisierung und bei der anschließenden Entfernung des Detergenz verloren geht (Ponimaskin et al., 2000). Die Lipidzusätze wirken auch auf die biologischen Eigenschaften. In den optimierten Virosomen konnte Fusionsaktivität mit Hilfe von Antikörpern und Protein-A-Gold-Technik nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen zur Messung der Fusionsrate und Hämolyse von Ponimaskin und Mitarbeiter (2000) sowie den Befunden anderer Autoren (Inoue et al., 1985).

Eine weiterer Aspekt ist die Verkapselung der DNA in die Virosomen. Zwar wird in der Literatur vom Einschluss nackter Plasmide in Sendai-Virosomen berichtet (Ramani et al., 1998), eine Kondensation

mit Polymeren wie Poly-L-Lysin ist jedoch von Vorteil, weil neben der Volumenreduzierung der DNA gleichzeitig Schutz vor DNAsen besteht.

Nach Einsatz Gold-markierter DNA konnten die Polyplexe in größeren Virosomen (>200nm) lokalisiert werden. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die mit Poly-L-Lysin komplexierte DNA vollständig in die optimierten Virosomen eingeschlossen wird, während DNA ohne Komplexierung auf der Virosomenoberfläche anhaftet. Virosomen ohne Lipidzugabe erwiesen sich als ungeeignet, um DNA einzuschließen (Ponimaskin et al., 2000).

Zur Transfektion ist es erforderlich, dass die Virosomen von der Zelle aufgenommen werden.

Virosomen aus Sendai-Virus-Proteinen sollen dabei mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA ins Zytoplasma entlassen. Die Inkubation der Zellen mit Virosomen resultiert dann in der Expression der transfizierten DNA. Ponimaskin und Kollegen (2000) fanden bei Transfektionsuntersuchungen von F98-Zellen mit Virosomen ein ebenso gutes Ergebnis wie nach Transfektion mit kationischen Lipiden.

Um zu untersuchen, wie Virosomen von der Zelle aufgenommen werden, nutzten Ponimaskin und Mitarbeiter (2000) Hitze-behandelte oder mit Antikörpern (gegen Sendai-Virus-Protein) inkubierte Virosomen zur Transfektion. Die so vorbehandelten Virosomen transfizierten kultivierte Zellen kaum, so dass die Autoren davon ausgehen, dass Virosomen zum Zelleintritt und zur Fusion ein intaktes Fusionsprotein benötigen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei in vivo Studien von anderen Autoren (Ramani et al., 1998) beschrieben, die nach 2 Stunden die DNA im Zytoplasma, jedoch nicht in Endosomen nachwiesen.

Im Gegensatz dazu wurde bei eigenen Untersuchungen mit dem Transmissions- und auch Rasterelektronenmikroskop Zelleintritt durch Endozytose beobachtet.

Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie wurden auch Spikeproteine auf der Zellmembran detektiert. Dies könnte sowohl auf angehefteten als auch mit der Zellmembran fusionierten Virosomen beruhen. Möglicherweise verlaufen Fusionen schneller, und waren daher mit elektronenmikroskopischen Methoden nicht detektierbar. Andererseits müssten Gold-markierte DNA oder Gold-markierte Poly-L-Lysin-DNA-Komplexe nach Fusion mit der Zellmembran im Zytoplasma präsent sein. Goldpartikel wurden aber nur selten im Zytoplasma beobachtet. Meistens wurde Gold-markierte DNA in der Zelle in den Endosomen lokalisiert. Dieser Befund spricht für eine Aufnahme durch Endozytose.

Ein anderer Erklärungsansatz ist die Existenz verschiedener Aufnahmemechanismen für die präparierten Virosomen. Es ist nicht auszuschließen, dass Endozytose und Fusion parallel ablaufen oder kleinere Virosomen mit der Zellmembran fusionieren, während große Komplexe (>500 nm) durch Endozytose in die Zelle gelangen.

Dies würde auch die Ergebnisse der Immunelektronenmikroskopie erklären, bei der Fusionsproteine auf der Zellmembran nachgewiesen und in Einzelfällen Gold im Zytoplasma detektiert wurde.

Bei Untersuchungen zur Transfektion zeigten die optimierten Virosomen je nach Zelllinie eine Effizienz von bis zu 30 % bei Verwendung des GFP-Plasmids.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde nur 1-3 % der Zellen transfiziert. Diese Differenz lässt sich unter anderem damit erklären, dass in den eigenen Versuchen DNA mit Goldmarkierung eingesetzt wurde, die die Mobilität der DNA einschränkt und so die Transfektion hemmt.

4.2. Kationische Liposomen

4.2.1. Charakterisierung der Struktur und Größe von Liposomen

Ziel der in diesem Teil durchgeführten Untersuchungen war es, den Einfluss verschiedener Lipidzusammensetzungen auf die Morphologie kationischer Liposomen zu untersuchen.

Dazu wurden verschiedene Cholesterolderivate und doppelkettige Lipide nach Negativkontrastierung analysiert. Die gefundenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Liposomenbildung und die Größe der Vesikel von den eingesetzten Lipiden abhängig ist.

So waren reine Cholesterolderivate nicht in der Lage, Liposomen auszubilden. Weiterhin wurde, in Abhängigkeit von der Menge der Cholesterolderivate in der Mischung, eine Größenzunahme der Liposomen beobachtet.

Mit einem Anteil von 25 % DOPE wurden Liposomen beobachtet, meist kleiner als 100 nm. Steigender Gehalt an DOPE führte dazu, dass die Liposomen gleichmäßiger und größer wurden. Wahrscheinlich bewirkt der Einbau des Helferlipids einen weniger gekrümmten Radius bei der Liposomenbildung, so dass die Liposomen größer werden (Groth, 2000). Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Transfektionsversuche zeigten, dass Cholesterolpräparationen ohne Helferlipid kultivierte Zellen nicht transfizieren. Gute Ergebnisse wurden mit Lipidmischungen aus 30-60 % DAC-Chol und 60-30 % Helferlipid auf verschiedenen Zelllinien erreicht (Groth, 2000). Das bedeutet, dass zur Transfektion mit DAC-Chol Präparationen Liposomen nötig sind.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Farhood und Huang (1995) und Kisoan et al. (2002) beschrieben. Nach ihren Untersuchungen ist ein Anteil von 30-50 % DOPE in den Liposomen notwendig, um Zellen zu transfizieren. Arbeiten von Fasbender et al. (1997) mit dem Strukturanalogen DC-Chol zeigten, dass das Helferlipid DOPE in die Liposomen integriert sein muss, um zu einer Verbesserung der Transfektion zu führen.

Bei dem untersuchten doppelkettigen Lipid DOCSPER ist der DOPE-Einfluss auf die Liposomengröße weniger deutlich ausgeprägt, da diese Lipide bereits ohne Helferlipid Liposomen bilden. Allerdings werden DOPE als Helferlipid fusogene Eigenschaften zugeschrieben, die zur Verbesserung der Transfektionseffizienz führen. Ergebnisse von Fasbender und Mitarbeiter (1997) lassen vermuten, dass das Helferlipid DOPE bereits Einfluss auf die Aufnahme der Lipoplexe hat und in der Zelle die Freilassung aus dem Endosom sowie die Dissoziation der DNA vom Lipid bewirkt. Die Wirkung des DOPE beruht auf der Eigenschaft hexagonale Phasen oder zusammen mit kationischen Lipiden Bilayer-Strukturen zu formen (Farhood and Huang, 1995; Koltover et al., 1998; Simberg et al., 2001).

In den eigenen Untersuchungen konnten mit den dargestellten Methoden keine unterschiedlichen Lipidstrukturen beobachtet werden. Außerdem ist es schwierig die korrekte Form der geladenen Liposomen zu ermitteln, da die eingesetzten Kontrastmittel dramatische Milieuveränderung der

Partikel bedingen. So kann nicht außer Acht gelassen werden, dass Uranylacetat einen sauren pH-Wert aufweist. Außerdem kann es beim Trocknen der Präparate zu weiteren Artefakten kommen. Oder bereits beim Absaugen der überschüssigen Lösung vom Netzchen könnten bestimmte Größenfraktionen bevorzugt abgesaugt werden, die nicht fest auf dem Netzchen adsorbiert waren. Dies könnte sich dann auf die Größenmessungen auswirken.

4.2.2. Lipoplexe

Da DAC-Chol- und DOCSPER-Liposomen in Transfektionsstudien unserer Gruppe gute Ergebnisse zeigten, wurden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit diesen beiden Lipiden weitergeführt, wobei in einem nächsten Schritt die Struktur der Lipoplexe analysiert wurde.

Lipoplexe transportieren DNA in die Zelle. Die Untersuchung ihrer Strukturen war daher von besonderem Interesse.

Lipoplexe wurden präpariert, indem DNA mit Liposomen gemischt wurden. Dabei wurde unabhängig vom eingesetzten Lipid, eine deutliche Größenzunahme festgestellt. Dies entspricht auch den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Thierry et al., 1997; Mok and Cullis, 1997; Hui et al., 1996; Lee et al., 2003).

Nach Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparationen unserer DAC- und DOCSPER-Lipoplexe scheint die Größenzunahme auf der Zusammenlagerung einzelner Liposomen zu beruhen. Mit Hilfe der eingesetzten Gold-markierten DNA lässt sich weiterhin feststellen, dass die DNA auf und zwischen Liposomen lokalisiert ist (Abb. 29 c). Um einen Teil der Artefakte auszuschließen, die durch elektronenmikroskopische Präparation hervorgerufen werden können, wurden verschiedene Kontrastmittel eingesetzt und Liposomen (ohne Negativkontrastierung) mit Platin/Iridium schräg bedampft. Auch nach der Schrägbedampfung waren einzelne Liposomen innerhalb der Lipoplexe gut sichtbar, zusätzlich konnten Goldpartikel auf der Oberfläche detektiert werden (nicht gezeigt).

Das bedeutet für die Komplexbildung, dass die negativ geladene DNA auf der Oberfläche kationischer Liposomen bindet und dadurch eine weitere Adsorption von Liposomen ermöglicht. Das wiederum erklärt auch, dass größere Lipoplexe aus einer größeren Anzahl von Liposomen bestehen und auch mehr DNA aufnehmen können (s. Abb. 28). Parallel zu den elektronenmikroskopischen Arbeiten wurde in unserer Arbeitsgruppe die Packungsdichte der DNA in Lipoplexen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die DNA in DAC-30-Lipoplexen nur lose an die Liposomen gebunden ist (Groth, 2000). Diese Aussage korreliert gut mit den elektronenmikroskopischen Befunden, bei denen DNA meist auf den Liposomen und am Rand der Lipoplexe detektiert wurde.

Untersuchungen von Gustafsson et al. (1995) sowie Rädler und Mitarbeitern (1997) zufolge beruht der Größenzuwachs der Lipoplexe darauf, dass die Oberflächenladung der Liposomen durch Bindung der

DNA reduziert wird. Dadurch wird gleichzeitig die Abstoßung zwischen den Liposomen herabgesetzt, was wiederum zur Vergrößerung der Komplexe führt.

Der Aufbau der Lipoplexe wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Methoden untersucht. Felgner (1989) postulierte, dass kationische Liposomen wie Perlen auf einer Kette aufgefädelt sind. Nach Gefrierbruch von DC-Chol-Lipoplexen wurden von Sternberg und Mitarbeitern (1994) Spaghetti-ähnliche Strukturen beobachtet. Obwohl in den eigenen Versuchen ähnliche Cholesterolderivate verwendet wurden, konnten diese Strukturen nicht nachgewiesen werden. Nach Kryo-EM von Gustafsson und Kollegen (1995) wurden Komplexe mit oligolamellarem Aufbau beobachtet. Weiterhin zeigten Arbeiten verschiedener Autoren (Gershon et al., 1993 und Barthel et al., 1993), dass die eingesetzte DNA von einer Lipidschicht ummantelt ist.

Die abweichenden Ergebnisse könnten durch die Untersuchungstechniken und die verschiedenen Lipidpräparationen bedingt sein. Um die molekularen Strukturen in Lipoplexen zu analysieren, nutzten Rädler und Mitarbeiter (1997) die Röntgenkleinwinkelstreuung und dokumentierten neue Strukturen, die alternierend aus DNA und Lipidbilayern bestehen. Diese Beobachtungen bestätigen das theoretische Modell von Dan (1997) über multilamellare Strukturen in Lipoplexen. Untersuchungen von Koltover et al. (2000) und Simberg et al. (2001) zeigen, dass thermodynamisch instabile Komplexe die DNA schnell freisetzen und zu besseren Transfektionsergebnissen führen.

In den eigenen Versuchen konnten keine molekularen Strukturen beobachtet werden. Goldmarkierungen wurden nicht oder nur selten zwischen den Lipidschichten nachgewiesen. Möglicherweise war nicht markierte DNA zwischen den Lipidschichten verpackt und nur mit Goldmarkierte Plasmide waren am Rand und zwischen den Liposomen vorhanden. Die Größe der Goldkolloide von 5 nm verhindert wahrscheinlich den Einbau zwischen den Lipidschichten.

Andererseits waren Lipoplexpräparationen mit und ohne Goldmarkierung von ähnlicher Morphologie und der Aufbau aus einzelnen Liposomen ließ sich in allen Komplexen gut erkennen. Lediglich in der Mitte großer Komplexe waren Lipidstrukturen teilweise unregelmäßig, was auf Strukturveränderungen schließen lässt.

Als Schlussfolgerung aus den Ergebnissen ist festzustellen, dass Lipoplexe aus Liposomen und DNA bestehen, wobei die Komplexe sehr heterogen sein können. Die Feinstruktur der Lipoplexe - multilamellare Strukturen bestehend aus DNA und Lipidschichten - wie sie von Rädler und Mitarbeitern beschrieben wurden, konnte mit elektronenmikroskopischen Techniken nicht dokumentiert werden.

4.2.3. Polyplexe und Lipopolyplexe

Die Transfektion lässt sich steigern, indem DNA mit Polykationen vorkomplexiert und anschließend mit Liposomen inkubiert wird (Groth, 2000). Deswegen wurden Polyplexe, bestehend aus DNA und Protaminsulfat oder Poly-L-Lysin sowie Lipopolyplexe (Liposomen und Polyplexe) in die elektronenmikroskopischen Untersuchungen einbezogen.

Protamin ist ein stark basisches Peptid (es besteht zu zwei Dritteln aus Arginin) und sorgt im Zellkern von Fischesperma für Verpackung und Schutz der DNA (Ando et al., 1973). Poly-L-Lysin ist ein synthetisches kationisches Lysin-reiches Polymer, das ebenfalls an DNA bindet, diese kondensiert und wie Protaminsulfat zur Verbesserung des Gentransfers führt. Beide Substanzen scheinen zudem ein nukleäres Erkennungssignal zu besitzen (Sorgi et al., 1997), dass den Durchtritt der DNA durch Kernporen katalysiert.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte für PS und PLL ähnliche Befunde. Der Grad der Komplexierung wurde in erster Linie vom Verhältnis DNA/Polykation bestimmt. Erst bei einem Verhältnis von 2 µg Polykation/1µg DNA wurden keine DNA-ähnlichen Strukturen mehr lokalisiert. Die gemessenen Größen der Komplexe von 78 nm für PLL und 116 nm für PS entsprechen etwa den in der Literatur gefundenen Angaben von Sorgi und Mitarbeitern (1997), die 111 bzw. 118 nm für Polyplexe aus PLL bzw. aus PS ermittelten.

Mit Hilfe der beobachteten Goldpartikel lässt sich die DNA-Menge auf ca. 75 Plasmide/Polyplex schätzen. Gold-markierte DNA wurde am Rand der Komplexe detektiert. Dies könnte durch die sperrige Struktur der Goldkolloide bedingt sein, die sich störend auf die Komplexierung auswirkt.

Poly-L-Lysin wurde bereits als Komplexierungsmittel und Gencarrier umfassend von Wagner und Mitarbeitern (1991) untersucht. Auch sie fanden (bei einem Verhältnis von PLL: DNA =3:1) 80-100 nm große Polyplexe. Aus der Literatur sind neben kompakten Strukturen auch "Doughnut"-Formen bekannt (Wagner et al., 1991; Kwoh et al., 1999).

Die unterschiedliche Morphologie der bisher charakterisierten Lipoplexe (DAC-Chol und DOCSPER) und Polyplexe (PS oder PLL) scheint in der Art der Komplexierung begründet zu sein. Protaminsulfat bindet an der großen Furche der DNA und führt zur Vernetzung, Stabilisierung und Kondensation der DNA in kompakte Strukturen (Warrant, R.W. and Kim, S.-H., 1978). Im Gegensatz dazu wird DNA in Lipoplexen zwischen Lipidschichten in Sandwich-Technik gebunden (Rädler et al., 1997) oder auf der Liposomenoberfläche assoziiert, wobei es auf Grund der Ladungsverhältnisse zur Anlagerung weiterer Liposomen kommt.

Nach Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe waren Polyplexe aus Protaminsulfat nicht Gentransfer-aktiv. Erst Lipopolyplexe, bestehend aus Protaminsulfat, DNA und DAC-Chol-Liposomen konnten die Transfektion auf das 2-10fache steigern (Groth, 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Sorgi und Mitarbeitern (1997) beschrieben. Die Autoren konnten mit PS und DC-Chol-Liposomen die Transfektion um das 12-87fache steigern. Als Gründe für eine Erhöhung der

Effizienz gelten die hohe Bindungsaffinität zwischen DNA und PS, wodurch weniger kationisches Lipid nötig ist, um negative Ladungen zu neutralisieren (Sorgi et al., 1997; Lesage et al., 2002).

Allerdings konnten der Literatur keine Angaben zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Art von Lipopolyplexen entnommen werden.

Die Analyse der von uns hergestellten Lipopolyplexe führte zu folgenden Ergebnissen: die Polyplexe änderten auch nach Zugabe geringer Mengen kationischer DAC-Chol Lipide (0,5-15 µg Lipid) ihre Größe und den DNA-Goldgehalt nicht. DAC-Chol-Liposomen behielten ihre ursprüngliche Größe und Morphologie. Das bedeutet, dass die DNA und das Protaminsulfat komplexiert bleiben. Erst hohe Mengen des kationischen Lipides führten zur Bildung großer Aggregate.

Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Transfektionsversuche zeigten, dass Lipopolyplexe bestehend aus 1µg DNA, 1µg Protaminsulfat und 10µg Lipid besonders gut transfizieren (Groth, 2000). Nach elektronenmikroskopischer Auswertung sind die Komplexe aus DNA und PS (1:1) teilweise kompakt, teilweise auch durch (verdickte) DNA-Strukturen gekennzeichnet. Möglicherweise sind bei dieser Mischung noch nicht alle negativen Ladungen der DNA durch Protaminsulfatmoleküle vollständig neutralisiert, so dass die Polyplexe an die positiv geladenen Liposomen binden können. Die Vorkomplexierung der DNA mit PS scheint auch der Anlagerung der Liposomen zu großen Lipoplexen entgegenzuwirken. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die negativen Ladungen der DNA durch PS größtenteils neutralisiert sind und eine Zusammenlagerung von Liposomen auf Grund der gleichen Ladungen nicht möglich ist.

Als Schlußfolgerungen aus den Versuchsergebnissen ist festzustellen, dass

- die Morphologie der Liposomen von der Lipidmischung bestimmt wird,
- die Größenzunahme der Lipoplexe auf Anlagerung von Liposomen und DNA basiert,
- die Bildung von Polyplexen auf der Kondensation der DNA mit Polykationen beruht und in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen zu kompakten sphärischen Strukturen führt und
- transfektionsaktive Lipopolyplexe kleiner sind als die entsprechenden Lipoplexe, da die DNA mit Protaminsulfat komplexiert ist und diese Polyplexe an Liposomen binden.

4.3. Untersuchung der Komplexe bei der Überwindung der zellulären Barrieren

Nach der morphologischen Charakterisierung der Liposomen, Polyplexe und Lipopolyplexe interessierte das *in vitro* Verhalten der Partikel, insbesondere Fragen zur Aufnahme und Verteilung der Komplexe. Schließlich sollte untersucht werden, ob und wie zelluläre Barrieren durch die verschiedenen Partikel überwunden werden.

4.3.1. Bindung

Der erste Schritt zur erfolgreichen Transfektion ist die Bindung der Komplexe an die Zellmembran. Die Bindung negativ geladener DNA an die ebenfalls negativ geladene Zellmembran wird durch die kationischen Lipide vermittelt (Hui et al., 1996).

Die Auswertung der Versuche mit DAC- und DOCSPER-Lipoplexen und DAC/PS-Lipopolyplexen zeigte, dass die Bindung abhängig ist von der eingesetzten Zelllinie, den verwendeten Komplexen und der Inkubationszeit. Während die Menge der detektierten Lipoplexe DAC und DOCSPER auch nach 3 Stunden noch zunahm, wurde für die untersuchten Polylipoplexe DAC-PS bereits nach 0,5-3 Stunden eine maximale Bindung auf der Zelloberfläche erreicht. Eine denkbare Erklärung dafür könnten die kleineren Partikelgrößen der Lipopolyplexe darstellen. Möglicherweise bewirken kleinere Partikel eine gleichmäßigere Verteilung im Inkubationsmedium, so dass die kultivierten Zellen schneller in Kontakt mit den Polyplexen gelangen.

Nach ca. 3 Stunden - zu diesem Zeitpunkt wird das Transfektionsmedium entfernt - haben zwischen 53 und 93 % der Zellen DAC- oder DOCSPER-Lipoplexe gebunden, wobei auf N64-Zellen mehr Lipoplexe detektiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass selbst wenn alle Komplexe aufgenommen und jeweils genügend DNA in den Kern gelangen würde, nicht alle Zellen transfiziert werden könnten.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit führt, wie in Abbildung 33 dargestellt, zur Verbesserung der Bindung, aber wie Untersuchungen von Groth (2000) zeigen, nicht automatisch zur Verbesserung der Transfektion. Als Ursache kommen Zelltoxizitäten der kationischen Lipide in Betracht (Groth, 2000).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Bindung der Komplexe unabhängig von zusätzlicher Energie stattfindet, während die nachfolgende Aufnahme in die Zelle energieabhängig ist (Chu et al., 1999). Die Autoren erklären unterschiedliches Bindungsverhalten mit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen, was wiederum das Vermögen der Zellen zur aktiven Aufnahme von Partikeln beeinflusst. Auch Matsui und Mitarbeiter (1997) beobachteten abweichendes Bindungsverhalten kationischer Lipoplexe an unterschiedlich differenzierten Lungenepithelzellen. Nach Prüfung der Oberflächenladung der Zellen mit Hilfe der Bindung von

kationischem Ferritin postulierten die Autoren, dass die Bindung der Lipoplexe auch von der Oberflächenladung der Zellen abhängig ist.

Um dies bei den eigenen Versuchen zu prüfen, wurde kationisches Gold eingesetzt. Bei der Auswertung im Rasterelektronenmikroskop konnten nur wenige Unterschiede detektiert werden. Die für die Versuche mit Lipoplexen und Lipopolyplexen eingesetzten Zellen binden kationisches Gold gleichmäßig gut, so dass aus diesem Ergebnis das unterschiedliche Bindungsverhalten der Lipoplexe und Lipopolyplexe nicht erklärt werden kann.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass bereits die Bindung der Komplexe an die Zellmembran ein erstes Hindernis auf dem Weg zum erfolgreichen Gentransfer darstellt.

4.3.2. Aufnahme

Nach der Bindung an die Zellmembran müssen die Partikel in die Zelle gelangen.

Wie in den eigenen Untersuchungen beobachtet, erfolgt der Eintritt der DAC- und DOCSPER-Lipoplexe in die Zelle über einen langen Zeitraum von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden.

Die Aufnahme der Komplexe ließ sich gut mit dem TEM verfolgen. Da einige Lipoplexe bereits nach 30 Minuten in den Endosomen lokalisiert wurden, scheint die Aufnahme der Lipoplexe kurz nach der Applikation der Lipoplexe zu beginnen. Nach 48 Stunden wurden noch Komplexe an der Zellmembran lokalisiert. Das bedeutet, dass nicht alle an der Zelle gebundenen Komplexe auch aufgenommen werden.

Die Auswertung der Ultradünnschnitte zeigte, dass Lipoplexe ähnlich der Phagozytose von Membranausstülpungen wie Pseudopodien oder Filopodien eingeschlossen und dann in die Zelle transportiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden DAC-PS-Partikel durch kleine, 150 nm große Vesikel aufgenommen. Diese Unterschiede scheinen durch die Partikelgröße der Komplexe bedingt zu sein. Die rasterelektronenmikroskopischen Befunde zeigen, dass 30 Minuten nach Inkubation mit DAC-PS-Komplexen (abhängig von der Zelllinie) durchschnittlich 700 und nach 48 Stunden nur noch 175 Goldpartikeln/Zelle detektiert wurden. Das entspricht einer Differenz von 525 Goldmarkierten Plasmiden/Zelle (und einer Gesamt-DNA-Menge von ca. 2625 Plasmiden), die mit Aufnahme der Partikel erklärt werden kann.

Da Zellen aus Gewebekulturen durch Pinozytose stündlich bis zu 30 % ihrer Plasmamembran in Form von Vesikeln ins Zellinnere verfrachten können (Evans und Graham, 1991), scheint dies ein Grund zu sein, warum DAC-PS-Komplexe schneller als DAC- oder DOCSPER-Lipoplexe in die Zelle gelangen. Demgegenüber erhöhte sich im Fall der DAC- und DOCSPER-Lipoplexe die Zahl der Goldpartikel bis zur Probenahme nach 48 Stunden. Da aber auch Lipoplexe nach 3 Stunden in den Zellen lokalisiert wurden, könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Bindung und Aufnahme parallel ablaufen.

Der zeitliche Verlauf der Aufnahme ist, wie wir zeigen konnten, von der verwendeten Zelllinie und den eingesetzten Komplexen abhängig. Im Falle der DAC-PS-Lipopolyplexe scheint die Endozytose kleinerer Vesikel schneller abzulaufen.

Im Vergleich dazu fanden Ross und andere (Ross and Hui, 1999; Escriou et al., 1998; Lee et al., 2003), dass große Lipoplexe (2000 nm) besser an kultivierte Zellen assoziieren, aufgenommen werden und schließlich effizienter transfizieren als kleinere.

Ähnliche Studien zur Aufnahme von Lipoplexen wurden bereits von anderen Autoren durchgeführt. Zabner und Mitarbeiter (1995) und Briane et al. (2002) beobachteten ebenfalls langsamen Zelleintritt nach Fluoreszenzmarkierung der DNA: während nach 30 Minuten weniger als 5 % der Zellen Fluoreszenz zeigten, schien nach 6 Stunden die Aufnahme der Komplexe überwiegend abgeschlossen zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten Labat-Moleur und Kollegen (1996), dass Lipopolyamin-DNA-Partikel bereits innerhalb von 10 Minuten von den Zellen aufgenommen werden. Nach Schätzungen der Autoren gelangen so ca. 500 Partikel mit ca. 50.000 Plasmiden in eine Zelle.

Als Aufnahmemechanismen werden in der Literatur Fusion (Felgner and Ringold, 1989; Almofti et al., 2003) und (rezeptorvermittelte) Endozytose (Friend et al., 1996; Labat-Moleur, et al. 1996; Zabner et al., 1995; Zhou and Huang, 1994) diskutiert.

Auf Grund der Größe der von uns eingesetzten Lipoplexe (mehrere hundert nm) sowie mikroskopischer Befunde - Einschluss der Lipoplexe durch Pseudo- oder Filopodien - schien es sich bei der Aufnahme um Phagozytose zu handeln. Um diese These zu prüfen, wurde Cytochalasin B, ein spezifisches Toxin, eingesetzt, das die Phagozytose hemmt. Dieses Toxin, hergestellt aus Pilzen der Gattung *Helminthosporium*, blockiert die Polymerisation von Aktinfilamenten aus globulärem Aktin, die zur Phagozytose notwendig sind (Plattner und Hentschel, 1997). Aktinfilamente sind in der Zelle an der Vergrößerung der Pseudopodien beteiligt, die gebundene Partikel einschließen und internalisieren (Greenberg, et al., 1991).

Arbeiten von Stanton und Reaven (1974) zeigten, dass Cytochalasin B bei Makrophagen zu einer 95 %igen Hemmung der Phagozytose führt. Auch andere Autoren berichten von einer 50-77 %igen Hemmung der Lipoplexaufnahme (Matsui, et al., 1996; Coonrod et al., 1997).

Im Gegensatz dazu fanden Zhou and Huang (1994) heraus, dass der Einsatz von Cytochalasin B zu einer Steigerung der Transfektion auf das Vierfache führte. Die Autoren spekulieren, dass dieses Toxin die Diffusion der aufgenommenen Komplexe im Zytoplasma erhöht und so zu einer Verbesserung der Transfektion führt.

Bei der Auswertung der eigenen Versuche konnte mit Cytochalasin B ebenfalls keine Hemmung der Bindung, Aufnahme (s. Abb. 46) oder der Transfektion dokumentiert werden. Allerdings wurden mit Hilfe des Raster-EM einige morphologische Veränderungen wie teilweise abgerundete Zellen, verdickte Filopodien oder auch "Löcher" in der Zellmembran beobachtet, wie sie zum Teil auch von Stanton und Reaven (1974) als Ergebnis der Cytochalasinbehandlung beschrieben wurden.

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte einerseits eine gewisse Resistenz der verwendeten Tumorzellen gegenüber dem Toxin darstellen. Dagegen sprechen jedoch die beobachteten morphologischen Veränderungen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Annahme, dass Makropinozytose bei der Aufnahme eine Rolle spielt, bei der pseudopodienähnliche Auswüchse große Bereiche von z.B. Flüssigkeiten o.ä. einschließen und in die Zellen transportieren. Nach Erkenntnissen von Mellmann (1996) ist an diesem Vorgang - im Gegensatz zur Phagozytose - kein Aktin beteiligt. Demzufolge könnte die Aufnahme auch nicht durch Cytochalasin B gehemmt werden.

Schließlich wäre es auch denkbar, dass verschiedene Aufnahmemechanismen parallel wirken.

Zwar werden in der Literatur auch die rezeptorvermittelte Aufnahme (Friend et al., 1996; Labat-Moleur, 1997) diskutiert, Kenntnisse über die Rezeptoren gibt es jedoch nicht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Aufnahme der Lipoplexe und Lipopolyplexe kurz nach der Applikation beginnt und auch nach 48 Stunden zu beobachten ist und von den verwendeten Zellen und den eingesetzten Komplexen abhängig ist. Weiterhin gelangen nicht alle gebunden Komplexe in die Zelle. Demzufolge stellt der Eintritt in die Zelle ein weiteres Hindernis für Lipoplexe und Lipopolyplexe dar.

4.3.3. Verteilung der Endosomen in den Zellen

In allen untersuchten Zelllinien wurden die Komplexe in Endosomen lokalisiert.

Die aufgenommen Lipoplexe befinden sich, wie wir zeigen konnten, kurz nach der Aufnahme in der Nähe der Zellmembran. Nach 3- und vor allem nach 48 Stunden wurden mit Gold gefüllte Vesikel auch in der Nähe des Zellkerns beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch Endosomen mit Lipoplexen oder Lipopolyplexen in der Zelle von der Peripherie bis zum Kern transportiert werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden gleichermaßen von anderen Arbeitsgruppen (Zabner et al., 1995; Thierry et al., 1997; Serafino, et al., 1999; Helbling-Leclerc et al., 1999) dokumentiert.

In Einzelfällen wurden von uns Gold-gefüllte Endosomen in der Nähe von Mikrotubuli beobachtet.

Dies könnte auf Transportvorgänge in der Zelle hinweisen. Nach derzeitigen Erkenntnissen erfolgt der Vesikeltransport in den Zellen an Mikrotubuli, die wie Schienen wirken und sich von der Peripherie der Zellen bis in das Zentrum in Zellkernnähe erstrecken (Alberts, 1995). Offenbar sind Vesikel über spezielle Motorproteine an die Mikrotubuli gebunden (Plattner und Hentschel, 1997), wobei das Protein Dynein frühe und späte Endosomen sowie Phagosomen in der Zelle verteilt und von der Peripherie der Zelle bis zum Kern transportiert (Hirokawa, 1998). Die Transportgeschwindigkeit kleinerer Endosomen (ca. 150 nm) beträgt nach Angaben von Hirokawa (1998) ca. 0,6 µm/s.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurden vereinzelt nach 3stündiger und längerer Inkubationszeit Endosomen in Kernnähe detektiert. Unter Annahme, dass in einer etwa 20 µm großen Zelle die Endosomen durch eine halbe Zelle zum Zellkern transportiert werden, ergibt sich eine

Geschwindigkeit von etwa 3 $\mu\text{m}/\text{h}$. Diese große Differenz könnte sicherlich mit der Endosomengröße erklärt werden.

Der Transport der Endosomen in der Zelle wurde bereits von Coonrod und Mitarbeitern (1997) genauer untersucht. Sie verwendeten einige Stunden nach der Transfektion Vinblastin, ein pflanzliches Alkaloid (gewonnen aus der Gattung *Vinca* - Immergrün), das Mikrotubuli zerstört (Plattner und Hentschel, 1997) und verhinderten damit die Anreicherung der Endosomen in Zellkernnähe. Außerdem wiesen sie mit fluoreszierendem Cathepsin-B-Antiserum nach, dass die Fusion von Endosomen mit Lysosomen durch Vinblastin blockiert wird. Die Autoren vermuten daher, dass die Fusion einen notwendigen Schritt bei der Transfektion darstellt. Allerdings konnten sie diese These nicht durch Gentransferdaten belegen.

Im Gegensatz dazu wiesen Zabner und Mitarbeiter (1995) mit Hilfe der sauren Phosphatase nach, dass 24 Stunden nach Transfektion (Gold-markierte) Lipoplexe nicht in Lysosomen lokalisiert waren. Diese gegensätzlichen Resultate könnten eventuell mit der unterschiedlichen Sensitivität der eingesetzten Techniken erklärt werden. Andererseits wurden auch unterschiedliche Zelllinien und verschiedene Lipoplexe eingesetzt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die aufgenommenen Lipoplexe und Lipopolyplexe in Endosomen befinden und von der Peripherie der Zelle in die Nähe des Zellkerns transportiert werden, wahrscheinlich mit Hilfe der Mikrotubuli.

4.3.4. Veränderungen der Lipoplexe in den Endosomen

In den eigenen Versuchen wurde nach Inkubation der Zellen mit Lipopolyplexen eine Größenzunahme der Endosomen von 150 auf 450 nm und gleichzeitig eine Erhöhung der Goldkonzentration von 4-7 auf 20-35 Goldpartikel beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die aufgenommenen Vesikel miteinander oder mit anderen Endosomen fusionieren. Diese Annahme wird durch ähnliche Resultate in Kontrollversuchen mit kationischem Gold gestützt. Bei diesen Kontrollversuchen wurde kationisches Gold ohne Liposomen eingesetzt. Nach 3 Stunden erschienen die Goldpartikel zusammen mit verschiedenen Membranstrukturen in Endosomen. Da diese Lipidstrukturen nicht von Liposomen stammen, handelt es sich möglicherweise um Reste abgebauter Organellen (Autophagosomen). Dies wiederum zeigt, dass die aufgenommenen Gold-haltigen Vesikel mit Endosomen fusionieren.

Nach 15-48 Stunden konnten weitere Veränderungen in den Endosomen beobachtet werden. In Abhängigkeit von den eingesetzten Lipiden veränderten sich die Strukturen der Komplexe.

Während die Gold-markierte DNA von DAC-Chol-Lipoplexen dissoziierte, wurden in DOCSPER-Lipoplexen Goldmarkierungen auch zwischen den Lipidschichten nachgewiesen.

Dabei scheinen die verschiedenen Lipide unterschiedlich auf das Endosomenmilieu zu reagieren.

Nach zellbiologischen Erkenntnissen verfügen Endosomen und Lysosomen über Protonenpumpen in der Membran, die das Vesikelinnere auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 5,5 halten (Alberts et al., 1995). Dieses leicht saure Milieu führt bereits zur Dissoziation eingeschleuster Liganden-Rezeptorenkomplexe (Evans and Graham, 1991).

Aus der Literatur sind ebenfalls Studien bekannt, in denen von Veränderungen in den Endosomen berichtet wird. Friend und Mitarbeiter (1996) beobachteten bereits eine Stunde nach Inkubation von Gold-markierter (DOTMA-) Lipoplexe verschiedene Veränderungen in den Endosomen von Alveolarzellen wie Bilayer- und Scheibchenstrukturen, die außerdem zum Platzen oder Reißen der Endosomenmembran führte.

Wie die Ausführungen zeigen, betreffen die Veränderungen in den Endosomen Lipidstrukturen sowie die Lage und Anzahl Gold-markierter DNA. Dies wird wahrscheinlich durch den sauren pH-Wert sowie die Enzymausstattung in den Endosomen hervorgerufen.

4.3.5. Freisetzung aus dem Endosom

Um in den Zellkern zu gelangen, müssen die Lipoplexe oder die DNA die Endosomenmembran überwinden. Die Tatsache, dass Lipoplexe, die direkt in den Zellkern injiziert wurden, kaum transfizierten, führten zu der These, dass die Plasmid-DNA vor Eintritt in den Zellkern vom Komplex dissoziieren muss (Zabner et al., 1995).

Für die Freisetzung aus Endosomen diskutiert man zur Zeit verschiedene Theorien.

Nach Vorstellungen von Xu und Szoka (1996) kommt es in Endosomen durch Flip-Flop-Mechanismen der Lipide zur Membrandestabilisierung, die letztlich dazu führt, dass die DNA vom Lipoplex dissoziiert und ins Zytoplasma gelangt.

In den eigenen Versuchen konnte die Freilassung der DNA oder einzelner Lipoplexe oder Lipopolyplexe aus dem Endosom mit den eingesetzten Lipoplexen und Zelllinien nicht beobachtet werden.

Allerdings wurden nach längerer Verweilzeit der Lipoplexe in den Endosomen Strukturveränderungen beobachtet.

Lipoplexe schienen in Kontakt mit der Endosomenmembran zu stehen. Nach dem Modell von Xu und Szoka (1996) kommt es nach Kontakt zwischen Lipoplex und Endosomenmembran durch Umklappen anionischer Lipide (Flip-Flop-Mechanismus) zu einer Destabilisierung der Endosomenmembran, wobei es in einem weiteren Schritt durch Diffusion der Lipide zur Bildung neutraler Ionenpaare kommt, in dessen Ergebnis die DNA freigesetzt wird. In ihrem Modell gehen die Autoren davon aus, dass die DNA so ins Zytoplasma gelangt. Arbeiten von Hafez et al. (2001) lassen vermuten, dass hexagonale Phasen der Helferlipide zusammen mit kationischen Lipiden die Endosomenmembran aufbrechen.

Wie unsere elektronenmikroskopischen Befunde zeigen, ist ein großer Teil der goldmarkierten DNA auch nach 48 Stunden in den Endosomen nachweisbar. In DAC-Lipoplexen scheint es zur Trennung von DNA und Lipiden zu kommen. Nach Transfektion mit DOCSPER-Lipoplexen erschienen Goldladungen zwischen den Lipidschichten und nicht vom Lipid getrennt, wie es nach Ergebnissen und Befunden von Xu und Szoka (1996) zu erwarten wäre. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen weiteren Mechanismus.

Außerdem wurden nur wenige Goldpartikel im Zytoplasma detektiert. Als mögliche Gründe für diese Diskrepanz kommen in Betracht:

1. Die Freisetzung der DNA ins Zytoplasma ist ein seltenes Ereignis
2. Die Goldladung wird teilweise im Endosom abgestreift, so dass die DNA im Zytoplasma nicht mehr nachweisbar ist
3. Es existiert ein weiterer Mechanismus, der es ermöglicht, DNA in den Zellkern zu bringen.

Allerdings wurden keine Gold-markierten Lipoplexe im Zytoplasma beobachtet. Das würde bedeuten, dass Liposomen in den Endosomen verbleiben.

Diese Beobachtungen stimmen teilweise mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Coonrod et al., 1997; Xu und Szoka, 1996; Zabner et al. 1995) überein. Im Gegensatz dazu wiesen einige Autoren (Labat-Moleur et al., 1996; Zhou and Huang, 1994; Friend et al., 1996) mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden ein Zerplatzen oder Zerreißen der Endosomenmembran sowie Lipoplexe im Zytoplasma nach. Schließlich zeigten Studien von Serafino und Mitarbeitern (1999) bereits 6 Stunden nach der Transfektion eine hohe Anreicherung von Fluoreszenz-markierter DNA im Zytoplasma und im Kern. Die Autoren vermuten daher, dass fast die gesamte DNA-Menge aus den Endosomen freigesetzt wird. Diese Differenz - im Vergleich zu anderen Arbeiten - lässt sich teilweise durch die größere Markierungsdichte nach Fluoreszenzmarkierung der DNA erklären. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass der Farbstoff eine Affinität zu zelleigenen Nukleinsäuren besitzt.

Schlußfolgernd kann festgestellt werden, dass die Überwindung der Endosomenmembran ein weiteres Hindernis für die beschriebenen Gencarrier darstellt. Mit elektronenmikroskopischen Techniken war es nicht möglich die Komplexe direkt beim Freisetzen aus den Endosomen zu beobachten. Möglicherweise gibt es einen weiteren Weg, um in den Zellkern zu gelangen.

4.3.6. Eintritt der DNA in den Kern

Eine erfolgreiche Transfektion ist nur möglich, wenn die eingeschleuste DNA in den Kern gelangt.

Die Kernmembran ist die letzte in der Zelle zu überwindende Membran. Auf Grund ihrer Morphologie - zwei konzentrischen Lipidschichten mit ca. 3000-4000 Kernporen sowie spezifischen Carrierproteinen - wird ein selektiver Stoffaustausch zwischen Zyto- und Karyoplasma ermöglicht (Alberts, 1995). Nach derzeitigen Modellvorstellungen z.B. von Xu und Szoka (1996) wird

angenommen, dass DNA vom Zytoplasma über die Kernporen in den Kern gelangt. Untersuchungen von Zhou und Huang (1994) führten zu dem Ergebnis, dass durch Chloroquin die Transfektion gesteigert wird. Nach Interpretation der Autoren führt Chloroquin zum Platzen der Endosomenmembran, wodurch eingeschlossene DNA bzw. Lipoplexe freigesetzt werden.

Um den Eintritt der DNA in den Zellkern zu beschleunigen, verfolgen viele Arbeitsgruppen die Strategie nukleäre Erkennungssequenzen an die DNA zu binden und dadurch - wie bei karyophilen Proteinen - die Importmaschinerie des Zellkerns zu nutzen, um speziell die aufgenommene DNA effizient in den Kern zu schleusen. Leider sind die dabei ermittelten Ergebnisse nicht in jedem Fall vergleichbar, da die DNA teilweise ins Zytoplasma injiziert wurde (Cartier and Reszka, 2002).

Mit den von uns durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen war es nicht möglich den Eintritt von DNA über Kernporen zu beobachten. Zwar konnten einige Goldpartikel in unmittelbarer Nähe der Kernmembran nachgewiesen werden, aber nicht in oder an Kernporen. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass der Eintritt von DNA durch die Kernporen ein seltenes Ereignis darstellt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zabner und Mitarbeitern (1995) zeigen ähnliche Resultate.

Andererseits weisen Arbeiten von Hagstrom sowie Dowty und Mitarbeitern (1997, 1995) darauf hin, dass die Aufnahme von DNA in den Zellkern vor allem von der Größe bestimmt wird. Während 1 kbp DNA im Zellkern akkumuliert, bleibt größere DNA (2-5 kbp) im Plasma. Dies begründen die Autoren damit, dass längere DNA an mehrere Kernporen gleichzeitig bindet und so die Aufnahme hemmt.

Da die in unseren Versuchen eingesetzte Plasmid-DNA (6 kbp) auch ohne nukleäre Erkennungssequenzen in den Zellkern gelangt, lässt vermuten, dass es weitere Wege in den Zellkern gibt.

Arbeiten verschiedener Autoren dokumentieren, dass Zellen während der Mitose (Auflösung der Kernmembran) leichter transfizierbar sind (Wilke et al., 1996; Fasbender et al., 1997; Zuber et al., 2001).

Schließlich berichten Orrantia und Chang (1990), dass - nach Kalziumphosphatpräzipitation - die DNA intakt bleibt, solange sie sich im Endosom befindet. Plasmid-DNA, die ins Zytoplasma gelangt, wird dagegen durch Nukleasen in kleinere Sequenzen abgebaut. Auf Grund dieser Ergebnisse postulieren die Autoren, dass ein Vesikeltransport vom Endosom zum Zellkern existiert. Diese Vesikel müssten dann mit der Kernmembran fusionieren.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen konnten goldgefüllte Vesikel in unmittelbarer Zellkernnähe beobachtet werden (Abb. 44, 49). Möglicherweise ist dies ein Beweis für einen vesikulären Transport zum Zellkern.

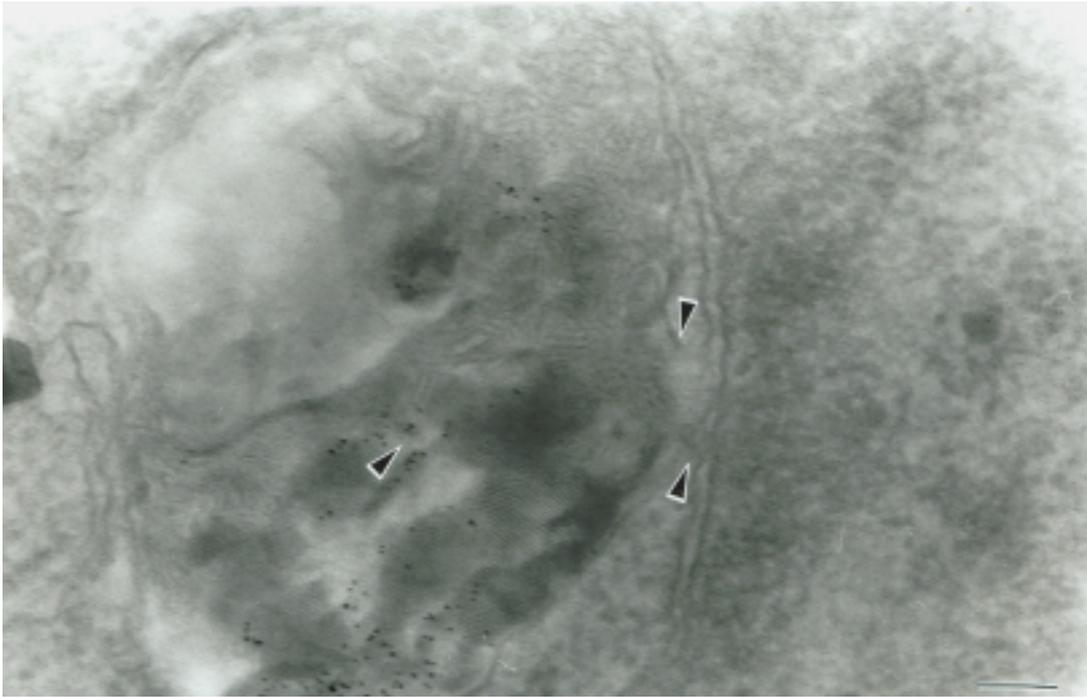


Abb. 49: Endosom mit DOCSPER-Lipoplexen in der Nähe des Zellkerns.

100.000fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 100 nm.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Lipoplexe und Lipopolyplexe zelluläre Hindernisse auf dem Weg zum Zellkern überwinden müssen. Die Zellmembran stellt bereits die erste Barriere dar. Je nach eingesetzten Partikeln konnten Lipoplexe (nach 3 Stunden) auf 50-90 % der Zellen und Lipopolyplexe auf allen Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme aller untersuchten Partikel erfolgt über endozytotische Mechanismen, wobei der genaue Mechanismus nicht näher charakterisiert werden konnte. Kleinere PS-Lipopolyplexe gelangten schneller in die Zelle. In den Schnittbildern ließen sich in 15-40 % der Zellen Endosomen mit Lipoplexen oder Lipopolyplexen nachweisen. Endosomen wurden in der Zelle von der Peripherie zum Kern wahrscheinlich mit Hilfe von Mikrotubuli und Motorproteinen transportiert. In den Endosomen kam es zu verschiedenen Strukturveränderungen. Die Freisetzung der DNA aus den Endosomen konnte nicht beobachtet werden. Der Nachweis der Gold-markierten DNA im Zytoplasma ist nicht gesichert, jedoch wurden in 2-9 % der Zellen DNA-haltige Endosomen in Zellkernnähe detektiert. Im Kern wurde kein Gold beobachtet. Alle untersuchten Vorgänge sind abhängig von den konkreten Untersuchungsbedingungen, von der Zeit, den Zelllinien, den Partikeln.

Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden verschiedene Liposomen-DNA-Komplexe zum Gentransfer charakterisiert sowie die Aufnahme und Verteilung in der Zellkultur untersucht werden. Dabei waren vor allem solche Präparationen von besonderem Interesse, die in unserer Arbeitsgruppe "Drug Targeting" getestet oder entwickelt und verwendet wurden, wie Sendai-Virus Liposomen (HVJ-Liposomen), Virosomen sowie DAC-Chol und DOCSPER-Liposomen als Vertreter der kationischen Lipide.

Im ersten Teil der Arbeit wurden fusogene Liposomen und Virosomen charakterisiert. Bei diesen Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Sendai-Viren fusionieren mit Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung.
- Die daraus resultierenden HVJ-Liposomen sind mit elektronenmikroskopischen Methoden identifizierbar.
- Die Spikes auf den HVJ-Liposomen besitzen fusogene Eigenschaften.
- HVJ-Liposomen eignen sich auf Grund der geringen Ausbeute sowie der geringen Transfektionseffizienz nicht zum in vitro Gentransfer.
- Virosomen stellen einen weiteren Typ fusogener Gentransfervesikel dar.
- Ihre Größe und fusogenen Eigenschaften sind abhängig von der externen Zugabe einer optimierten Lipidmischung.
- Im Innenraum der Virosomen kann mit Poly-L-Lysin vorkomplexierte DNA verkapselt werden.
- Die fusogenen Eigenschaften der Virosomen wurden mit Hilfe immunoelektronenmikroskopischer Techniken und monoklonaler Antikörper gegen Hämagglutinin/Neuraminidase und das Fusionsprotein sowie mit polyklonalen Antisera gezeigt.
- An Hand goldmarkierter DNA sind Virosomen nach der Transfektion in der Zelle nachweisbar.

Da in unserer Arbeitsgruppe bevorzugt kationische Liposomen zum Gentransfer verwendet werden, wurde auch die Struktur der Liposomen untersucht und folgende Ergebnisse dokumentiert:

- Die Struktur und die Größe kationischer Liposomen werden hauptsächlich durch die Lipidzusammensetzung bestimmt.
- Die Bildung von Liposomen-DNA-Komplexen ist mit einer Größenzunahme der Komplexe gekoppelt.
- Die Anzahl gebundener Plasmide steigt mit der Größe der Lipoplexe.

- Gentransferaktive Lipopolyplexe (mit Protaminsulfat komplexierte DNA und DAC-Chol-Liposomen) sind kleiner als Lipoplexe. Ihre Struktur wird von der Zusammensetzung bestimmt.

Eine weitere wichtige Frage betrifft den Weg der Gencarrier in der Zelle. Kenntnisse über diese Vorgänge sind vorteilhaft, um die einzelnen Schritte zu verstehen und möglichst gezielt zu verbessern. Bei der Untersuchung der Partikel im Hinblick auf zelluläre Barrieren beim Gentransfer konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Die Bindung der Partikel an die Zellmembran und Aufnahme sind abhängig von den eingesetzten Zellen und Komplexen sowie der Inkubationszeit.
- Die Aufnahme erfolgt über endozytotische Mechanismen, wobei Lipopolyplexe schneller als Lipoplexe in die Zellen gelangen. Nicht alle gebundenen Komplexe werden aufgenommen.
- Die aufgenommenen Partikel befinden sich in Endosomen und werden ins Innere der Zelle transportiert.
- Freisetzung der DNA und Eintritt in den Zellkern über Kernporen konnte nicht beobachtet werden.
- DNA-haltige Vesikel in Kernnähe deuten auf einen weiteren Mechanismus hin (Vesikeltransfer zum Zellkern).

Summary

The aim of this work is the characterisation of several liposome DNA complexes for *in vitro* gene transfer and uptake as well as their distribution in cultured cell lines using electron microscopy. The particles used were fusogenic liposomes made from Sendai virus, virosomes and cationic liposomes.

At first fusogenic liposomes and virosomes were characterised. The results obtained are summarised below:

- Sendai virus can fuse with liposomes made from different lipid composition.
- HVJ-liposomes are detectable using electron microscopy techniques.
- The spikes from HVJ-liposomes have fusogenic properties.
- HVJ-liposomes are not suitable for *in vitro* gene transfer due to the low amount of fusogenic liposomes leading to low transfection efficiency.
- Virosomes, reconstituted virus envelopes, are another type of fusogenic vesicles.
- Size and morphology of virosomes depends on the addition of an optimised lipid mixture.
- PLL treated DNA is entrapped into virosomes.
- Monoclonal and polyclonal antibodies and protein A gold technique can be used for the detection of viral glycoproteins on virosomes.
- Gold labelled DNA was used to show the distribution in cultured cells.

In order to characterise the structure of cationic liposomes following results were obtained:

- Size and structure depends on the lipid composition.
- The formation of liposomes leads to an increase of the size.
- Larger lipoplexes contain more DNA.
- Lipopolyplexes composed of DNA complexed with protamine sulphate and DAC- Chol liposomes are smaller than lipoplexes. Their structure depends on the composition.

To improve transfection ability examination of the cellular barriers is useful

With regard to the fate of lipoplexes following results were obtained.

- Binding depends on the cell line, kind of particles and incubation time.
- Uptake occurs through endocytosis. Lipopolyplexes enter the cells faster than larger lipoplexes.
- Lipoplexes are enclosed in endosomes and were carried into the centre of the cell.
- Escape of DNA from endosomes and entry into nucleus were not visible.
- Vesicles with DNA were observed near the nucleus. There is an opportunity for another pathway to the nucleus.

Literaturverzeichnis

Agutter, P.S. and Prochnov, D. (1994): Nucleocytoplasmic transport. *Biochemical Journal* 300, 609-618

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

Almofti, R. M., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y. and Kiwada, H. (2003): Cationic mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 410, 246-253

Anderson, W. (1997): *Gentherapie., Spektrum der Wissenschaft, Digest: Gene und Genome*, 2/98

Ando, T., Yamasaki, M., and Suzuki, K.: *Protamines: Isolation, characterization, structure and function.*, Springer Verlag New York, 1973, 3-87

Aoki, M., Morishita, R., Muraishi, A., Moriguchi, A., Sugimoto, T., Maeda, K., Dzau, V.J., Kaneda, Y., Higaki, J. and Ogihara, T. (1997): *J. Mol Cell Cardiol.* 29, 949-959

Apostolov, K. and Almeida, J.D. (1972): Interaction of Sendai (HVJ) virus with human erythrocytes: a morphological study of haemolysis and cell fusion. *J. Gen. Virology*, 227-334

Aroeti, B. and Henis, Y.I., (1991): Accumulation of Sendai Virus glycoproteins in cell-cell contact regions and its role in cell fusion. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 15845-49

Bagai, S. and Sakar, D.P. (1993): Targeted delivery of hygromycin B using reconstituted Sendai viral envelopes lacking hemagglutinin-neuraminidase. *FEBS Letters* 326, 183-188

Bailey, A.L. and Cullis, P.R., (1997): Membrane fusion with cationic liposomes: Effects of target membrane lipid composition. *Biochemistry* 36, 1628-1634

Bareesel, K.K.H. (1997): Verwendung von nativen viralen Glykoproteinen zur Herstellung fusogener Vesikel. Dissertation. Institut für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Barthel, F., Remy, J.S., Loeffler, J.P. and Behr, J.-P. (1993): Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol.*, 12, 553-560

Batard, P., Jordan, M. and Wurm, F. (2001): Transfer of high copy number into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* 270, 61-68

Behr, J.P. (1994): Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chem.* 5, 382-389

Blaese, R.M. (1997): Ansätze zur Gentherapie von Krebs. *Spektrum der Wissenschaft*, 12/97, 48-53

Boettger, M., Vogel, F., Platzer, M., Kiessling, V., Grade, K., Strauss, M. (1988): Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMG1 results in efficient transfection. *Biochim. Biophys. Acta* 950, 221-228

Bloomfield, V.A. (1996): DNA condensation. *Current opinion in Structural Biology* 6, 334-341

Bousse, T., Takimoto, T., Gormann, W.L., Takahashi, T. and Portner, A. (1994). Regions on the Hemagglutinin-Neuraminidase proteins of Human parainfluenza virus type 1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology* 204, 506-514

Boulikas, T. (1997): Nuclear localization signal peptides for the import of plasmid DNA in gene therapy. *Int. J. Oncol.* 10, 301-309

Brand, K. und Strauß, M. (1997): Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. In: *Handbuch der molekularen Medizin*, Band I, Herausgeber: D. Ganten und K. Ruckpaul, (1997) Springer-Verlag Berlin Heidelberg,

- Briane, D., Lesage, D., Cao, A., Coudert, R., Lievre, N., Salzmann, J.L. and Taillandier, E. (2002): Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50, 983-992
- Brown, K. (2000): Das Wettrennen um die Gene. *Spektrum der Wissenschaft* 9, 31-36
- Capecchi, M.R. (1980): High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured cells. *Cell* 22, 479-488
- Cartier, R., Reszka, R. (2002): Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Therapy* 9, 157-167
- Chan, Ch.K. and Jans, D.A. (1999): Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Human Gene Therapy* 10, 1695-1702
- Clark, P.R. and Hersh, E.M. (1999): Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 158-76
- Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Phillipps, S., Curiel, D. and Birnstiel, M.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6094-6098
- Chu, Q., Tousignant, J.D., Fang, S., Jiang, C., Chen, L.H., Cheng, S.H., Scheule, R.K. and Eastman, S.J. (1999): Binding and uptake of cationic lipid: pDNA complexes by polarized airway epithelial cells. *Human Gene Therapy* 10, 26-36
- Dileo, J., Miller, T.E. Jr, Chesnoy, S. and Huang, L. (2003): Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Human Gene Therapy* 14, 79-87
- Dowty, M.E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J.E. and Wolff, J.A. (1995): Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4572-4576
- Düzgünes, N., Goldstein, J.A., Friend, D.S., Felgner, P.L. (1989): Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: Induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *Biochemistry* 28, 9174-9184

- Dzau, V., Mann, M.J., Morishita, R. and Kaneda, Y. (1996): Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11421-11425
- Evans, W.H. und Graham, J.M. *Struktur und Funktion biologischer Membranen.* (1991), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Ezzel, C. (2000): Das Wettrennen um die Gene. *Spektrum der Wissenschaft* 9, 37-41
- Fasbender, A., Marshall, J., Moninger, T.O., Grunst, T., Cheng, S., and Welsh, M.J (1997): Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 4, 716-725
- Farhood, H., Bottega, R., Epand, R.M. and Huang, L. (1992): Effect of cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1111, 239- 246
- Farhood, H. and Huang, L.: Delivery of DNA, RNA and proteins by cationic liposomes. In: Lasic, D.D. and Barenholz, Y. (eds.): *Handbook of nonmedical applications of liposomes.* Vol. IV, (1995), CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo
- Felgner, P.L. and Ringold, G.M. (1989): Cationic liposome - mediated transfection. *Nature* 337, 387-388
- Felgner, P.L., Zelphati, O. and Liang, X.: *Advances in synthetic gene-delivery system technology.* In: *The development of human gene therapy.* (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Ferguson, J. and Davis, R.W.: Quantitative electron microscopy of nucleic acids. In: Koehler, J. (ed), *Advanced techniques in biological electron microscopy II.* 1978, Springer Verlag Berlin,
- Fraleigh, R., Fornari, C.S., and Kaplan, S. (1979): Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: potential for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3348
- Friend, D.S., Papahadjopoulos, D. and Debs, R.J. (1996): Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1278, 41-50
- Friedmann, T. and Motulsky, A.G.: Targets for gene therapy, In: *The development of Human gene therapy.* (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Friedmann, T. and Roblin, R. (1972): Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949-955
- Fritz, J.D., Herweijer, H., Zhang, G. and Wolff, J.A. (1996): Gene Transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Human Gene Therapy* 7, 1395-1404
- Gao, X. and Huang, L. (1995): Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Therapy* 2, 710-722
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S.B. and Minsky, A. (1993): Mode of formation and structural features of DNA - cationic liposomes complexes used for transfection. *Biochemistry* 32, 7143-7151
- Gitman, A.G. and Loyter, A. (1984): Construction of fusogenic vesicles bearing specific antibodies. Targeting of reconstituted Sendai virus envelopes towards neuraminidase-treated human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 9813-9820
- Gitman, A.G., Graessmann, A. and Loyter, A. (1985) Targeting of loaded Sendai virus envelopes by covalently attached insulin molecules to virus receptor-depleted cells: fusion-mediated microinjection of ricin A and simian virus SV40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7309-7313
- Greenberg, S., el Khoury, J., di Virgilio, F., Kapllan, EM., Silverstein, SC. (1991): Ca (2+)-dependent F-actin assembly and disassembly during Fc-receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* 113, 757-67
- Groth, D., Reszka, R. and Schenk, J.A. (1996): PEG mediated transformation of *E. coli* is increased by room temperature incubation. *Anal. Bioch.* 240, 302-304
- Groth, D., Keil, O., Lehmann, C., Schneider, M., Rudolph, M. and Reszka, R. (1998): Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *International Journal of Pharmacology* 162, 143-157
- Groth, D., Keil, O., Schneider, M. and Reszka, R. (1998): Transfection Assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal. Bioch.* 258, 141-143
- Groth, D. (2000): Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf der Grundlage optimierter kationischer Lipide. Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

- Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., and Almgren, M. (1995): Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochimica et Biophysica Acta* 1235, 305-312
- Hafez, I.M., Maurer, N. and Cullis, P.R. (2001): On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Therapy* 8, 1188-96
- Hagstrom, J.E, Ludtke, J.J., Bassik, M.C., Sebestyen, M.G., Adam, S.A. and Wolff, J.A. (1997): Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cell. *Journal of Cell Science*. 110, 2323-2331
- Hayat, M.A. and Miller, S.E. (1990): *Negative staining*. McGraw-Hill Publishing Company, New York
- Haywood, A.M. (1982), *Biochem.* 21, 6041-6046
- Haywood, A.M. and Boyer, B.B. (1986): Ficoll and dextran enhance adhesion of Sendai virus to liposomes containing receptor (Ganglioside G_{D1a}). *Biochemistry* 25, 3925- 3929
- Haywood, A.M.: In *Membrane Fusion*, Wilschut, J. and Hoekstra, D. (eds), Marcel Dekker Inc. (1991) New York, Hong Kong 1991
- Haywood, A.M. and Boyer, B.P. (1981): Initiation of fusion and disassembly of Sendai virus membrane into liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 646, 31-35
- Helbling-Leclerc, A., Schermann, D. and Wils, P.(1999): Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes. *Biophysica et Biochimica Acta* 1418, 165-175
- Herzzentrum Völklingen/Saar, 2001: <http://www.hzvck.de/Patienten/zukard.htm/Gentherapie>
- Hirokawa, N. (1998): Kinesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519- 526
- Homma, M., Shimizu, K., Shimizu, Y.K. and Ishida, N. (1976): On the study of Sendai virus hemolysis. I. Complete Sendai virus lacking in hemolytic activity. *Virology* 71, 41-47
- Horne, R.W. and Waterson, A.P. (1960): *J. Mol. Biol.* 2, 75-77

- Hosaka, Y. and Hosoi, J. (1983): Study of negatively stained images of Sendai virus nucleocapsids using minimum-dose system. *Journal of Ultrastructure Research* 84, 140-150
- Hosaka, Y, Kitano, H. and Ikeguchi, S. (1966): Studies on the pleomorphism of HVJ virions. *Virology* 29, 205-221
- Huard, J., Goins, W.F. and Glorioso, J.C. (1995): Herpes simplex virus type 1 vector mediated gene transfer to muscle. *Gene Therapy* 2, 385-392
- Hud, N.V., Allen, M.J., Downing, K.H., Lee, J. and Balhorn, R. (1993): Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 193, 1347-1354
- Hugh, R., Sleight, R.G., (1991): Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1097, 1-17
- Hui, S.W., Langner, M., Zhao, Y.L., Ross, P., Hurley, E. and Chan, K. (1996): The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophysical Journal* 71 (2), 590-599
- Hsu, M.-C., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1983): Fusion of Sendai virus with liposomes: Dependence on the viral fusion protein (F) and the lipid composition of liposomes. *Virology* 126, 361-369
- Jans, D.A., Chan, Ch.K. and Huebner, St. (1998): Signals mediating nuclear targeting and their regulation: application in drug delivery. *Inc. Med. Res. Rev.* 18, 189-223
- Jiang, C., Matsuo, H., Koyabu, N., Ohtani, H., Yonemitsu, Y., Kaneda, Y., Narro, M., Tsuruo, T. and Sawa, Y. (2002): Transluminal gene transfer into brain capillar endothelial cells in vivo with HVJ-liposomes. *J. Drug Target* 10, 345-52
- Kaneda, Y., Iwai, K. and Uchida, T. (1989): Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 243, 375-377
- Kaneda, Y., Saeki, Y. and Morishita, R. (1999): Gene Therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? *Molecular Medicine Today* 5, 298-303

Kaneda, Y., Uchida, T., Kim, J., Ishiura, M., and Okada, Y. (1987): *Experimental Cell Research* 173, 56-69

Kaneda, Y., Morishita, R. and Dzau, V.J. (1996): Prevention of restenosis by gene therapy. *Annals New York Academie of Sciences*, 299-310

Kaneda, Y.: Virus (Sendai virus envelopes) - mediated gene transfer. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. J.E. Celis (ed) 3: 50-57 (1994) Academic press, Inc., Orlando Florida

Kaneda, Y. Morishita, R., Tomita, N. (1995): Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *J. Mol. Med.* 73, 289-297

Kaneda Y. (2001): Improvements in gene therapy technologies. *Mol Urol Summer* 5 (2), 85-89

Kleinig, H. und Sitte, P.: *Zellbiologie*, 2., neubearbeitete Auflage, (1986) Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Kleinschmidt, A., Rüter, H., Hellmann, W., Zahn, R.K., Docter, A. und Zimmermann, E. (1959): Über Desoxyribonukleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen. *Zeitschrift für Naturforschung* 14

Kingsbury, D.W., Bratt, M.A., Choppin, P.W., Hanson, R.P., Hosaka, Y., ter Meulen, V., Norrby, E., Plowright, W., Rott, R. and Wunner, W.H. (1978): *Paramyxoviridae*. *Intervirology* 10, 137-152

Kim, J., Hama, K., Miyake, Y. and Okada, Y. (1979): Transformation of intramembrane particles of HVJ (Sendai virus) envelopes from an invisible to visible form on aging of virions. *Virology* 95, 523-535

Kisoon, N., Ariatti, M. and Moodley, T. (2002): A novel cationic cholesterol derivative, its formulation into liposomes, and the efficient transfection of the transformed human cell lines HepG2 and HeLa. *Drug Delivery* 9, 161-167

Knutton, S., (1977): Studies of Membran fusion. II. Fusion of human erythrocytes by Sendai virus. *J. Cell Sci.* 28, 189-210

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

- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K.M. and Artursson, P. (2001): Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Therapy* 8, 1108-21
- Labat-Moleur, F., Steffan, A.-M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E. and Behr, J.-P. (1996): An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Therapy* 3, 1010-1017
- Lasic, D.D., Strey, H., Stuart, M., Podgornik, R. and Frederik, P.M. (1997): The structure of DNA-liposomes complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 832-833
- Lasic, D.D.: *Liposomes: from physics to application.* (1993) Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam
- Lasic, D.D. (1996): Recent developments in medical applications of liposomes: Sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *Journal of Controlled release* 48, 203-222
- Lasic D.D. and Papahadjopoulos D. (1995): Liposomes revisited. *Science* 267, 1275-6
- Lam, A.M.I. and Cullis, P.R. (2000): Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA - cationic liposome complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1463, 279-290
- Lee, L.K., Siapati, E.K., Jenkins, R.G., McAnulty, R.J., Hart, S.L. and Shamlou, P.A. (2003): Biophysical characterization of an integrin-targeted non-viral vector. *Med Sci Monit* 9, 54-61
- Lehmann, S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 6753, 517-8
- Lenisson, J. (1985) *EMBO Journal* 4, 1041-1047
- Lesage, D., Cao, A., Briane, D., Lievre, N., Coudert, R., Raphael, M., Salzmann, J.L. and Taillandier, E. (2002): Evaluation and optimisation of DNA delivery into gliosarcoma 9L cells by a cholesterol-based cationic liposome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1564, 393-402
- Ma, Z., Mi, Z., Wilson, A., Alber, S., Robbins, P.D., Watkins, S., Pitt, B. and Li, S. (2002): Redirecting adenovirus to pulmonary endothelium by cationic liposomes. *Gene Therapy* 9, 176-82

- Mabuchi, E., Shimizu, K., Miyao, Y., Kaneda, Y., Kishima, H., Tamura, M., Ikenaka, K. and Hayakawa, T. (1997): Gene delivery by HVJ- liposome in the experimental therapy of murine glioma. *Gene Therapy* 4, 768-772
- Mann, M.J., Morishita, R., Gibbons, G.H., von-der-Leyen, H.E. and Dzau, V. (1997): DNA-transfer into vascular smooth muscle using fusigenic Sendai virus (HVJ)-liposomes. *Mol. Cell. Biochem.* 172, 3-12
- Matsui, H., Johnson, L.G., Randell, S.H. and Boucher, R.C. (1997): Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1117-1126
- Mellmann, I. (1996): Endocytosis and Molecular Sorting. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 575-625
- Megumi, T., Fujita, S.-I., Iwai, Y. and Ito, T. (1993): The effect of gamma-ray-induced radicals on activities and membrane structure of Sendai virus in aqueous solutions. *Radiation research* 134, 129-133
- Miura, N., Soe, G., Uchida, T. and Okada, Y. (1993): Assessment of membrane fusion efficiency and its use for distinguishing epitopes on the fusion protein (F) of Sendai virus (HVJ). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194, 1051- 1057
- Miyata, T., Yamamoto, S., Sakamoto, K., Morishita, R. and Kaneda, Y. (2001): Novel immunotherapy for peritoneal dissemination of murine colon cancer with macrophage inflammatory protein-1beta mediated by a tumor-specific vector, HVJ cationic liposomes. *Cancer Gene Ther* 8, 852-60
- Morgan, C. and Howe, C. (1968): Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. *Journal of Virology*, 1122-1132
- Mounkes, L.C., Zhong, W., Cipres-Palacin, G., Heath, T.D. and Debs, R.J. (1998): Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 26164-70
- Mountcastle, W.E, Compans, R.W., Caligiuri, L.A. and Choppin, P.W. (1970): Nucleocapsid protein subunits of simian virus 5, Newcastle disease virus and Sendai virus. *Journal of Virology* 6, 577-584

Nakanishi, M., Uchida, T., Ishiura, H.M. and Okada, Y. (1985): Efficient introduction of contents of liposomes into cells using HVJ (Sendai virus). *Experimental Cell Research* 159, 399-409

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

Nakamura, N., Horibe, S., Matsumoto, N., Tomita, T., Kaneda, Y., Shino, K. and Ochi, T. (1996): Transient introduction of a foreign gene into healing rat patellar ligament. *J Clin Invest.* 97, 226-31

Nermut, M.V.: Methoden der Negativkontrastierung. In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1973

Ohnsorge, J. und Holm, R.: Rasterelektronenmikroskopie, Georg Thieme Publishers Stuttgart, 1989

Okada, Y. and Tadokora, J. (1961): Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells I-III. *Experimental Cell Research* 26, 98-128

Orkin, St. H. and Motulsky, A.G.: (1995): Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. <http://www.nih.gov/news/panelrep.html>

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

Pennisi, E., (1998). The nucleus revolving door. *Science* 279, 1129-31

Plattner, J. und Zingsheim, H.,P.: Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, 1987

Ponimaskin, E., Bareesel, K.K.H., Markgraf, K., Reszka, R., Lehmann, C., Gelderblom, H.R., Gawaz, M., and Schmidt, M.F.G. (2000): Sendai Virosomes Revisited - Reconstitution with exogenous lipids leads to potent vehicles for gene transfer. *Virology* 269, 391-403

Portner, A., Murti, K.G., Morgan, E.M., and Kingsbury, D.W. (1988): Antibodies against Sendai virus L protein: distribution of the protein in nucleocapsids revealed by immunoelectron microscopy. *Virology* 163, 236-239

Qiagen Plasmid Handbook (1995) QIAGEN GmbH

Rabinovitch, M. (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology* 5, 85-87

Ramani, K., Bora, R.S., Kumar, M., Tyagi, S.K. and Sarkar, D.P. (1997): Novel gene delivery to liver cells using engineered virosomes. *FEBS Letters* 404, 164-168

Ramani, K., Hassan, Q., Venkaiah, B., Hasnain, S.E. and Sarkar, D.P. (1998): Site-specific delivery in vivo through engineered Sendai viral envelopes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11886-11890

Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T. and Safinya, C. (1997): Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275, 810-814

Reszka, R., Zhu, J., Weber, F. and Walther, W. (1995): Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J. Liposom Res.* 5, 149-167

Ross, P.C. and Hui, S.W. (1999): Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Therapy* 6, 651- 659

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

Ruononen, M., Rönkkö, S., Honkakoski, P., Pelkonen, J., Tammi, M. and Urtti, A. (2001): Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J. Biol. Chem.* 276, 33875-33880

Safinya, C.R. (2001): Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 440-448

Sakai, Y., Kiyotani, K., Fukumura, M., Asakawa, M., Kato, A., Shioda, T., Yoshida, T., Tanaka, A., Hasegawa, M. and Nagai, Y., (1999): Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Letters* 456, 221-226

- Saeki, Y., Matsumoto, N., Nakano, Y., Mori, M., Awai, K. and Kaneda, Y. (1997): Development and Characterization of cationic liposomes with HVJ (Sendai virus): Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Human Gene Therapy* 8, 2133-2141
- Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K. and Kaneda, Y. (1998): Sustained transgene expression in vitro and in vivo with an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ liposomes. *Gene Therapy* 5, 1031-1037
- Scheid, A. and Choppin, P.W. (1974): Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57, 475-490
- Schneider, M., Reszka, R., Groth, D., Keil, O. (1996): Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Gentransfer. *Deut Pat applik* 196.31.189.6., 1996
- Schwartz, B., Benoist, C., Abdallah, B., Scherman, D., Behr, J.-P. and Demeneix, B.A. (1995): Lipospermine-based gene transfer into the newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio. (1995): *Human Gene Therapy* 6, 1515- 1524
- Serafino, A.L., Novelli, G., Di Sario, S., Colosima, A., Amicucci, P., Sangiuolo, F., Mossa, G. and Dallapiccola, B. (1999): Cellular uptake and delivery monitoring of liposome / DNA complexes during in vitro transfection of CTRF–Gene. *Biochemistry and Molecular Biology International* 47, 337-344
- Shimizu, Y., Shimizu, K., Ishida, N., and Homma, M. (1976): On the study of Sendai virus hemolysis. II. Morphological study of envelop fusion and hemolysis. *Virology* 71, 48-60
- Shoji, F., Yonemitsu, Y., Okano, S., Yoshino, I., Nakashima, Y., Hasegawa, M., Sugimachi, K. and Sueis, K. (2003): Airway-directed gene transfer of interleukin-1 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplant fibrous airway obliteration in mice. *GeneTherapy* 10, 213-8
- Simberg, D., Danino, D., Talmon, Y., Minsky, A., Ferrari, M., Wheeler, C.J. and Barenholz, Y. (2001): Phase behavior, DNA ordering and size instability of cationic lipoplexes: Relevance to optimal transfection activity. *J. Biol. Chem.* 276, 47453-9
- Sorgi, F.L., Bhattacharya, S. and Huang, L. (1997): Protamin sulfates enhance lipid mediated gene transfer. *Gene Therapy* 4, 961-968

Stanton, G.A. and Reaven, E.P. (1974): Inhibition of Phagocytosis and plasma membran mobility of the cultivated macrophage by Cytochalasin B. *The journal of Cell Biology* 62, 647-659

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

Stone, H.O., Portner, A. and Kingsbury, D.W. (1971): Ribonucleic acid transcriptase in Sendai virions and infected cells. *Journal of Virology* 8, 174-180

Tanner, F.C., Largiadèr, T, Yang, Z. und Lüscher, T.F. (1999): Gentherapie bei Herzerkrankungen. *Schweiz Med Wochenschr* 129, 1784-91

Tatum, E.L. (1966): Molecular biology, nucleic acid and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* 10, 19-32

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

Tomita, N., Higaki, T., Morishita, R., Kato, K., Mikami, H., Kaneda, Y. and Ogihara, T. (1992): Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 129-134

Tsao, Y.S. and Huang, L. (1986): Kinetic studies of Sendai virus-target membrane interactions: independent analysis of binding and fusion. *Biochemistry* 25, 3971-3976

Tuting, T. (1999): The immunology of cutaneous DNA immunization. *Current opinion in molecular therapeutics* 1, 216-25

Umeda, M., Nojima, S., and Inoue, K. (1984): Activity of human erythrocyte gangliosides as a receptor to HVJ. *Virology* 133, 172-182

Vaheri, A. and Pagano, J.S. (1965): Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Virology* 27, 434-436

Walter, A.: Functional reconstitution of viral envelopes. in Membrane Fusion, Wilschut ,J. and Hoekstra, D. (eds), Marcel Dekker Inc.: New York, Hong Kong 1991, 395-418

Warrant, R.W. and Kim, S.-H. (1978): α -Helix - double helix interaction shown in the structure of a protamin-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. Nature 271, 130-135

Wattiaux, R., Jadot, M., Warner-Pirotte, M.-T., Wattiaux-De Coninck, S. (1997): Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro, FEBS Letters 417, 199-202

Weiss, R.A., Teich, N., Varmus, H. E. and Coffin, J.M. (1985): Molecular Biology of tumor viruses, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Wheeler, C.J., Sukhu, L., Yang, G., Tsai, Y., Bustamente, C., Felgner, Ph., Norman, J., and Manthorpe, M. (1996): Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA cytofectin complexes. Biochimica et Biophysica Acta 1280, 1-11

Wong, G. C. L., Tang, J. X., Lin, A., Li, Y., Janmey, P.A. and Safinya, C.R. (2000): Hierarchical self-assembly of F-Actin and cationic lipid complexes: stacked three- layer tubule networks. Science 288, 2035-2039

Wrobel, I. and Collins, D. (1995): Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. Biochimica Biophysica Acta 1235, 296-304

www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/diseases.html

Xu, Y. and Szoka, C. (1996): Mechanism of DNA release from cationic liposomes/DNA Complexes used in cell transfection. Biochemistry 199, 5616-5623

Yonemitsu, Y., Alton, E.W.F.W., Komori, K., Yoshizumi, T., Sugimachi, K., and Kaneda, Y. (1998): HVJ (Sendai virus) liposome - mediated gene transfer: current status and future perspectives (review). International Journal of Onkology 12, 1277- 1285

Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P.K., Kato, A., Hasan, M.K., Nagai, Y., Masaki, I., Fukumura, M., Hasegawa, M., Geddes, D.M. and Alton, E.W. (2000): Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. Nature Biotechnology 18, 970-3

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

Zelphati, O., Nguyen,C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y. and Felgner, P.L. (1998): Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Therapy* 5, 1272-1282

Zhou, X. and Huang, L. (1994): DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterisation and mechanism of action, *Biochimica et Biophysica Acta* 1189, 195-203

Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P. and Behr, J.-P. (2001): Towards synthetic viruses. *Advanced Delivery Reviews* 52, 245-253

Zuidam, N. and Barenholz, Y. (1998): Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368, 115-128

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden herzlich bedanken möchte.

Herrn Prof. D. Fürst vom Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam danke ich für das freundliche Interesse an dieser Arbeit und die bereitwillige Übernahme der Betreuung.

Mein Dank gilt besonders Frau Dr. R. Reszka vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin für das Thema und die Möglichkeit, die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen sowie die hilfreichen Anregungen und Diskussionen und vor allem für ihr Interesse an der Elektronenmikroskopie und ihrem Engagement gemeinsam mit Herrn Liebig zum Erhalt der Mikroskope.

Bei Herrn Dr. Rudolph bedanke ich mich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, die bereitwillige Weitergabe seines Wissens und die vermittelte Freude am Mikroskopieren. Nicht zu vergessen sind zahlreiche wertvolle Tipps, praktische Ratschläge und aufmunternde Worte und ab und zu leckerer Kuchen. Vielen Dank auch für das schnelle Lesen des Manuskripts.

Frau D. Viertel vom Institut für Zoo- und Wildtierforschung möchte ich besonders für die Hilfestellungen und Hinweise bei der Arbeit mit LR White danken und auch für die netten Gespräche außerhalb mikroskopischer Fragestellungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe "Drug Targeting" am Max-Delbrück-Centrum und auch jenen, die einmal dazugehört haben, gilt mein Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kooperative Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gebührt Frau Jana Richter und Dr. Detlef Groth für die Präparation von DNA, Liposomen, Lipoplexen und Lipopolyplexen und Frau Bärbel Pohl für die Kultivierung und Transfektion der Zellen. Dank an alle, die durch ihre freundliche Unterstützung geholfen haben. Besonders beeindruckend bleibt das herzliche Lachen von Antje Berndt, das stets Optimismus versprühte. Nicht zuletzt auf Grund erlebnisreicher Stunden auch außerhalb des MDC-Campus wird mir die Arbeitsgruppe in guter Erinnerung bleiben.

Für die Bereitstellung von Sendai Viren, Virosomen sowie der passenden mono- und polyklonalen Antikörper danke ich Herrn Prof. M.F.G. Schmidt und den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Insbesondere Frau E. Kinder sowie den Herren Dr. K.K.H. Bareesel und Dr. E. Ponimaskin gilt mein Dank für fachlichen Hinweise und Anmerkungen.

Ausdrücklich erwähnen möchte ich die Hilfe von Herrn Liebig, dem ich für die schnellen Reparaturen, die exzellente Pflege und Wartung der Mikroskope und aller anderen Geräte außerordentlich dankbar bin. Nicht zu vergessen sind auch zwei Umzüge, die die Mikroskope ohne Schaden überstanden haben. Schließlich danke ich Frau Sinaida Rink für die Unterstützung im Kampf mit der Rechtschreibung ganz herzlich.

Auch allen, die nicht namentlich erwähnt wurden, gilt mein herzlicher Dank für die moralische Unterstützung.