

Aus dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Kationische Copolymere für den rezeptorvermittelten Gentransfer

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

M. Sc. Nathalie Sieverling

aus Ilsede/Niedersachsen

Potsdam, den 22.02.2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2002 bis Februar 2005 am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung und dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm.

Gutachter: Prof. Dr. Helmuth Möhwald
Priv. Doz. Dr. habil. Andreas Thünemann
Dr. habil. Christian Plank

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2005

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Möhwald danke ich für die interessante Themenstellung sowie sein Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. habil. A. Thünemann möchte ich mich für die gute Betreuung und Unterstützung sowie für sein entgegengebrachtes Interesse am Fortschritt der Arbeit danken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dipl. Ing. (FH) M. Niclasen, die mit ihrem Engagement einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rudolph und Frau Dipl. Biolog. Weiss für die Durchführung und Auswertung der Untersuchungen bezüglich der Transfereffizienzen der Vektoren.

Herrn Dr. Bruzzano, Herrn M. Sc. Wieland und Frau Stegmann danke ich für die Durchführung und Auswertung der SEC-MALLS-Untersuchungen sowie für die Hilfe bei deren Diskussion.

Bei Herrn Dipl. Phys. Kubowicz und Dr. E. Görnitz möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der Sedimentations- und Gleichgewichtsläufe der AUZ bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Niemeyer für die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren.

Frau V. Jentzen, Frau Apothekerin D. Schütt, Frau Dr. A. Lieske und Herrn Dr. J. Bohrich danke ich für die vielen interessanten Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

Allen Mitgliedern der Nachwuchsgruppe Nanotechnology for Life Science und des FB 4 sei recht herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die tägliche Unterstützung gedankt.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Für seine vielen Anregungen, seine Geduld und seine Hilfe während der gesamten Promotionszeit möchte ich mich besonders herzlich bei Stefano Bruzzano bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung und Grundlagen	1
1.1	Somatische Gentherapie	1
1.2	Erfolge und Niederlagen der Gentherapie	2
1.3	Barrieren des Gentransfers	3
1.4	Gentransfer-Vektoren	5
1.4.1	Virale Vektoren	6
1.4.1.1	Retroviren	6
1.4.1.2	Adenoviren	7
1.4.1.3	Adeno-assoziierte Viren	7
1.4.1.4	Herpesviren	8
1.4.2	Nicht-virale Vektoren	8
1.4.2.1	Physikalische Systeme	8
1.4.2.1.1	Elektroporation	8
1.4.2.1.2	Partikelbombardement mit der „Gene Gun“	9
1.4.2.2	Transfer nackter DNA	9
1.4.2.3	Lipide	10
1.4.2.4	Kationische Polymere	13
1.4.2.5	Rezeptorvermittelter Gentransfer	15
1.5	Erhöhung der Transfektion durch Kernlokalisationssequenzen oder Fusionsproteine	16
1.6	Genexpression mittels Reportergenen	17
2	Motivation und Ziele der Arbeit	18
3	Ergebnisse und Diskussion	20
3.1	Synthese und Charakterisierung der kationischen Gerüstpolymere	20
3.1.1	Ausgangspolymer Poly(ethylenimin) (PEI)	20
3.1.2	Pfropfcopolymere Poly(ethylenimin)- <i>graft</i> -Poly(ethylenoxid) (PEI- <i>g</i> -PEO)	20
3.1.3	Physikochemische Charakterisierung der kationischen Ausgangspolymere	21
3.1.3.1	Copolymerzusammensetzung	21
3.1.3.2	Hydrodynamischer Durchmesser der Pfropfcopolymere	22
3.1.3.3	Molekulargewichtsbestimmung der Precursor-Polymere	23
3.1.4	<i>In vitro</i> Transfereffizienz der kationischen Ausgangspolymere	29
3.2	Nicht-virale Genvektoren mit Folsäure-Liganden	32
3.2.1	Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit Folsäure-Liganden	33
3.2.1.1	Durchschnittliche Anzahl der Folsäure-Liganden je Molekül	33
3.2.1.2	Hydrodynamischer Durchmesser der Folsäure-Polymere	33

3.2.1.3	Molmasse der kationischen Folsäure-Copolymere	34
3.2.2	Transfereffizienz der Folsäure-Copolymere	35
3.3	<i>Nicht-virale Genvektoren mit Triiod-L-thyronin-Liganden (T3)</i>	37
3.3.1	Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit T3-Liganden.....	38
3.3.1.1	Durchschnittliche Anzahl der T3-Liganden je Molekül	38
3.3.1.2	Hydrodynamischer Durchmesser der T3-Polymere	38
3.3.1.3	Molmasse der kationischen T3-Copolymere	38
3.3.2	Transfereffizienz der T3-Vektoren.....	40
3.3.3	Fluoreszenzmikroskopie von T3-Aminodextranen an HepG2.....	41
3.4	<i>Nicht-virale Genvektoren mit Uronsäure-Liganden</i>	43
3.4.1	Oxidation der Mannose zu Mannuronsäure.....	43
3.4.2	Kationische Polymere mit Uronsäure-Liganden	44
3.4.3	Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit Uronsäure-Liganden....	45
3.4.3.1	Durchschnittliche Anzahl der Uronsäure-Liganden je Molekül	45
3.4.3.2	Hydrodynamischer Durchmesser der Uronsäure-Polymere	46
3.4.3.3	Molmassencharakterisierung der Uronsäure-Copolymere.....	46
3.4.4	Polykation-DNA-Komplexe mit Man-Liganden	48
3.4.5	<i>In vitro</i> Versuche mit Uronsäure-Vektoren	49
3.4.6	Fluoreszenzmikroskopie von Man-Aminodextranen	55
3.5	<i>Genvektoren auf Basis von kationischen Stärkepfropfcopolymeren</i>	59
3.5.1	Charakterisierung der Stärkemakroinitiatoren.....	60
3.5.2	Physikochemische Charakterisierung der kationischen Stärkepfropfcopolymere	60
3.5.3	Stärkepfropfcopolymere mit Ligand.....	61
3.5.4	Transfereffizienz der Stärkepfropfcopolymere.....	61
3.6	<i>Genvektoren mit der Kernlokalisationssequenz des TAT-Peptids</i>	63
3.6.1	Synthese der dimeren TAT-Sequenz mittels Peptidsynthesizer	63
3.6.2	Synthese des Genvektors PEI-g-(TAT) ₂	64
3.6.3	Charakterisierung des (TAT) ₂ -Peptides	65
3.6.4	<i>In vitro</i> Transfektion der (TAT) ₂ -Vektoren	66
3.7	<i>In vivo Transfektionen</i>	67
3.7.1	Triiod-L-thyronin-Genvektoren	67
3.7.2	Vernebelung der Mannuronsäure-Genvektoren.....	68
4	Schlussfolgerung und Ausblick	70
5	Experimenteller Teil	72
5.1	<i>Poly(ethylenimin)</i>	72
5.2	<i>Pfropfcopolymer Poly(ethylenimin)-graft-Poly(ethylenoxid)</i>	72

5.3	Synthese der kationischen Copolymere mit Liganden	73
5.3.1	Folsäure-Ligand (Fol)	73
5.3.2	Triiod-L-thyronin-Ligand (T3)	74
5.3.3	Zucker-Liganden (Glucose, Galactose, Lactobionsäure, Mannose).....	74
5.3.3.1	Synthese von Mannuronsäure durch selektive Oxidation von Methyl- α -D-Mannopyranosid	74
5.3.3.2	Synthese der Copolymere mit Uronsäure-Ligand.....	75
5.3.4	Pfropfpolymerisation mittels Stärkemakroinitiator.....	76
5.3.4.1	4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurestärkeeester (t-BACVS-St).....	76
5.3.4.2	Pfropfpolymerisation von Stärke	77
5.3.5	Fluoreszenzmarkierung mit FLUOS	78
5.4	Charakterisierungsmethoden.....	79
5.4.1	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)	79
5.4.2	Photometrische Bestimmung der Anzahl an Liganden pro Polymer	79
5.4.2.1	Bestimmung der Anzahl an Folsäure und Triiod-L-thyronin.....	79
5.4.2.2	Bestimmung des Gehalts an Galacturon- und Mannuronsäure.....	79
5.4.2.3	Bestimmung des Lactobionsäure-Gehalts.....	80
5.4.2.4	Photometrische PEI-Bestimmung.....	80
5.4.3	Teilchengrößenmessung mittels Dynamischer Lichtstreuung	80
5.4.4	Interferometrisches Differentialrefraktometer ScanRef	80
5.4.5	Lösungviskosimetrie.....	80
5.4.6	Dichtebestimmung mittels Biegeschwinger.....	81
5.4.7	Analytische Ultrazentrifuge (AUZ).....	81
5.4.8	SEC-MALLS	81
5.4.9	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	82
5.4.10	Plasmid-DNA.....	84
5.4.11	Zelllinien	84
5.4.12	Zeta-Potential/Partikelgröße	84
5.4.13	Bestimmung der Tranfereffizienz.....	85
5.4.14	Fluoreszenzmikroskopie	85
5.4.15	Vernebelungsprozess der Genvektoren.....	85
6	Literatur	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Medizinische Anwendung der Gentherapie in verschiedenen Bereichen	1
Abb. 1.2: Modalitäten der somatischen Gentherapie	2
Abb. 1.3: DNA-Transport in den Zellkern mittels kationischen Polymeren.....	3
Abb. 1.4: Protonenschwamm-Hypothese	4
Abb. 1.5: Vektoren, die zur Zeit in insgesamt 918 klinischen Versuchen verwendet werden.....	5
Abb. 1.6: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden bezüglich der Transfereffektivität und der Toxizität	6
Abb. 1.7: Typischer Aufbau einer „Gene Gun“	9
Abb. 1.8: Mikroskopische Aufnahme des Transfers von nackter DNA in die Zielzelle.....	10
Abb. 1.9: DNA-Transportkapazitäten verschiedener Transfersysteme in Kilobasen (kb).....	10
Abb. 1.10: Typische kationische Polymere in gentherapeutischen Untersuchungen.....	13
Abb. 1.11: Luciferase-katalysierte Reaktion.....	17
Abb. 3.1: Herstellung von Methoxy-poly(ethylenoxid) ₈ -glycidylether.....	21
Abb. 3.2: Synthese von Poly(ethylenimin)- <i>graft</i> -Poly(ethylenoxid) ₈	21
Abb. 3.3: Größenverteilungen der Pfropfcopolymere PEI- <i>g</i> -PEO entsprechend der Intensitätsverteilung der dynamischen Lichtstreuung.....	22
Abb. 3.4: Konzentrationsverlauf in der Sektorzelle der AUZ und Approximation	25
Abb. 3.5: Bestimmung der „absoluten“ gewichtsgemittelten Molmasse M_w in der AUZ	26
Abb. 3.6: Elugramme der Pfropfcopolymere und von PEI	28
Abb. 3.7: logM- V_E -Beziehung zweier unterschiedlich substituierter Pfropfcopolymere.....	29
Abb. 3.8: Transfereffizienz der Pfropfcopolymere PEI- <i>g</i> -PEO und PEI an HeLa-Zellen und HepG2-Zellen ..	30
Abb. 3.9: Bradford-Assay der Pfropfcopolymere PEI- <i>g</i> -PEO und PEI an HeLa-Zellen und HepG2-Zellen	31
Abb. 3.10: Folsäure.....	32
Abb. 3.11: Synthese von Folsäure-Poly(ethylenoxid) ₃₂ -Folsäure.....	32
Abb. 3.12: Synthese von Poly(ethylenimin)- <i>g</i> -[Poly(ethylenoxid) ₃₂ -Folsäure]	33
Abb. 3.13: Transfektionsergebnisse der Folsäure-Copolymere an HeLa-Zellen	35
Abb. 3.14: Transfektion an HeLa-Zellen mit und ohne Überschuss an Folsäure.....	36
Abb. 3.15: Triiod-L-thyronin.....	37
Abb. 3.16: Synthese von Poly(ethylenoxid) ₁₃ -T3.....	37
Abb. 3.17: Synthese von Poly(ethylenimin)- <i>g</i> -[Poly(ethylenoxid) ₁₃ -T3]	38
Abb. 3.18: Transfektionsergebnisse der T3-Vektoren an HepG2-Zellen	40
Abb. 3.19: Transfektion an HepG2 mit und ohne Überschuss an T3.....	40
Abb. 3.20: Fluoreszenzmarkiertes Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-T3).....	41
Abb. 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-T3)]-FLUOS und (Aminodextran- <i>g</i> -PEO)-FLUOS an HepG2-Zellen	42
Abb. 3.22: Uronsäure-Liganden	43
Abb. 3.23: Vorgeschlagerener Mechanismus für die Oxidation von primären Hydroxyl-Gruppen.....	43
Abb. 3.24: Mechanismus der Kopplungsreaktion zwischen Carboxyl- und Amino-Gruppe.....	44
Abb. 3.25: Synthese von Poly(ethylenimin)- <i>g</i> -[Poly(ethylenoxid) ₃₂ -Mannuronsäure]	45
Abb. 3.26: Größe der Polymer-DNA-Komplexe	48
Abb. 3.27: Zeta-Potential der Polymer-DNA-Komplexe.....	48
Abb. 3.28: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an HepG2-Zellen	49
Abb. 3.29: Transfereffizienz der LB-Vektoren an HepG2-Zellen	49

Abb. 3.30: Transfereffizienz der Man-Vektoren an HepG2-Zellen nach und vor der Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe.....	49
Abb. 3.31: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an HeLa-Zellen.....	50
Abb. 3.32: Transfereffizienz der LB-Vektoren an HeLa-Zellen	50
Abb. 3.33: Transfereffizienz der Man-Vektoren an HeLa-Zellen.....	50
Abb. 3.34: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an 16HBE-Zellen	51
Abb. 3.35: Transfereffizienz der LB-Vektoren an 16HBE-Zellen.....	51
Abb. 3.36: Transfereffizienz der Glu-Vektoren an 16HBE-Zellen.....	51
Abb. 3.37: Transfereffizienz der Man-Vektoren an 16HBE-Zellen	51
Abb. 3.38: Transfereffizienz der Gal _{ox} -Vektoren an HepG2-Zellen	53
Abb. 3.39: Transfereffizienz der Gal _{ox} -Vektoren an 16HBE-Zellen.....	53
Abb. 3.40: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an HepG2	54
Abb. 3.41: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an HeLa	54
Abb. 3.42: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an 16HBE.....	54
Abb. 3.43: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran- <i>g</i> -Man)-FLUOS-Vektoren an HepG2-Zellen.....	55
Abb. 3.44: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an HepG2-Zellen.....	55
Abb. 3.45: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran- <i>g</i> -Man)-FLUOS-Vektoren an HeLa-Zellen	56
Abb. 3.46: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an HeLa-Zellen	56
Abb. 3.47: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran- <i>g</i> -Man)-FLUOS-Vektoren an 16HBE-Zellen	56
Abb. 3.48: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an 16HBE-Zellen	57
Abb. 3.49: Reaktion von 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurechlorid mit Stärke	59
Abb. 3.50: Pfropfpolymerisation von Stärke mit DMAPMam	59
Abb. 3.51: Transfektion der Vektoren auf Stärkebasis an HepG2-Zellen.....	61
Abb. 3.52: Transfektion der Vektoren auf Stärkebasis an 16HBE-Zellen.....	61
Abb. 3.53: Schematischer Ablauf der Peptidsynthese (1 Zyklus)	63
Abb. 3.54: Syntheseweg vom (TAT) ₂ zum (TAT) ₂ -SH.....	64
Abb. 3.55: Entschütztes (TAT) ₂ -SH mit einer reaktiven Thiol-Endgruppe	64
Abb. 3.56: Reaktion von Poly(ethylenimin) mit SPDP und Ankopplung von (TAT) ₂ -PEO-SH	65
Abb. 3.57: MALDI-TOF-Spektrum des (TAT) ₂	65
Abb. 3.58: Transfektionsraten der (TAT) ₂ -Vektoren und der Ausgangspolymere.....	66
Abb. 3.59: <i>in vivo</i> Experiment von T3-Vektoren an Mäusen	67
Abb. 3.60: Integritätsprüfung der DNA nach Vernebelung der Vektoren.....	68
Abb. 3.61: Vernebelungsergebnisse der Vektoren an Mäusen im Vergleich zu den Partikelgrößen der Vektoren.....	69
Abb. 5.1: Oxidation von Methyl- α -D-Mannopyranosid.....	74
Abb. 5.2: Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe	75
Abb. 5.3: Synthese von 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurechlorid (t-BACVSC)	76
Abb. 5.4: Fluoreszenzmarkierung von Aminodextran- <i>g</i> -(PEO-T3) mit FLUOS	78
Abb. 5.5: DSC-Thermogramm des Zerfalls von t-BACVS	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Häufig eingesetzte Lipide in der somatischen Gentherapie	11
Tabelle 1.2: Liganden für den Gentransfer an spezifischen Zielzellen	15
Tabelle 3.1: DLS-Ergebnisse der Pffropfcopolymere	22
Tabelle 3.2: Molmassen der Precursor-Polymere aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der AUZ	24
Tabelle 3.3: Molmassenbestimmung der Pffropfcopolymere mittels unterschiedlicher Auswertemethoden in der SEC	27
Tabelle 3.4: Hydrodynamische Durchmesser der kationischen Folsäure-Copolymeren	34
Tabelle 3.5: Molmasse und Molmassenverteilung der Folsäure-Copolymere	34
Tabelle 3.6: Hydrodynamische Durchmesser der kationischen T3-Copolymere	38
Tabelle 3.7: Molmassenbestimmung der T3-Copolymere mittels Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der AUZ	39
Tabelle 3.8: Molmasse und Molmassenverteilung der T3-Copolymere mittels SEC und Sedimentationsgleichgewichtslauf	39
Tabelle 3.9: Hydrodynamische Durchmesser und Anzahl der Uronsäure-Liganden pro Polymer	46
Tabelle 3.10: Molmassen und -verteilung der Uronsäure-Copolymere	47
Tabelle 3.11: Charakterisierung der kationischen Stärkepfropfcopolymere	61

Symbole und Abkürzungen

16HBE	Atemwegsepithelzellen
A ₂	2. Virialkoeffizient
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AB	Penicilin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)
Arg	Arginin
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge
<i>b</i>	block
B	2. Virialkoeffizient der AUZ
BNL CL.2	Embryonale Leberzellen der Maus
BOC	tert.-Butoxycarbonyl-
BSA	Bovin Serum Albumin
<i>c</i>	Konzentration [mol/l]
CF	Zelllinie der Zystischen Fibrose
<i>d</i>	optische Weglänge
D	Polydispersität
DCC	Dicylohexylcarbodiimid
DEAE-Dextran	2-Diethylaminoetherdextran
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMA	Dimethylacetamid
DMAPMAm	3-Dimethylaminopropylmethacrylamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DNSS	Dinitrosalicylsäure
DSC	Differential Scanning Calorimetry
δ	chemische Verschiebung [ppm]
E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient [ml/mg·cm]
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetales Kälber-Serum
FLUOS	Carboxy-fluorescein-N-succinimidylester
Fmoc	9-Fluorenmethoxycarbonyl-
Fol	Folsäure
<i>g</i>	graft
Gal	Galacturonsäure
Gal _{ox}	Galacturonsäure aus Methyl- α -D-Galactopyranosid oxidiert
Gln	Glutamin
Glu	Glucuronsäure
Gly	Glycin
HAc	Essigsäure
HBS	HEPES-buffered Saline

HELA	Gebärmutterhalskrebszellen
HepG2	Leberkrebszellen
HSV	Herpes Simplex Virus
$[\eta]$	Viskosität des Lösemittels [g/cm ³ s]
η_0	spezifische Viskosität
η_{sp}	spezifische Viskosität
η_{red}	reduzierte Viskosität [cm ³ /g]
k_B	Boltzmann-Konstante
k_H	Huggins-Konstante
kb	kilobasen pro DNA/Plasmid
KB	Orale Epithelkrebszellen
kD	kiloDalton $\equiv 10^3$ g/mol
KK	Konventionelle Kalibrierung
k_{SB}	Schulz-Blaschke-Konstante
λ	Wellenlänge [nm]
LB	Lactobionsäure
LS	Lichtstreuung
Lys	Lysin
MADAM-BQ	Methacryloyloxyethylbenzyltrimethylammoniumchlorid
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
Man	Mannuronsäure
M_n	Zahlenmittel der Molmasse [g/mol]
M_p	Molmasse am Peakmaximum [g/mol]
M_w	Massenmittel der Molmasse [g/mol]
M_z	Zentrifugenmittel der Molmasse [g/mol]
Pd	Polydispersität (SEC)
N/P-Verhältnis	Verhältnis von Stickstoffatomen des kationischen Polymers zu Phosphoratomen der DNA
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLS	Kernlokalisationssequenz
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PBS	0,05 M Kaliumphosphat-Puffer; 0,05 M Natriumchlorid; pH 7,5
pCMVluc	<i>Photinus Pyralis Luciferase-DNA</i> (7,4 kB) aus <i>Cytomegalovirus</i> (CMV)
PDI	Polydispersitätsindex (DLS)
PDMAEMA	Poly[(dimethylamino)ethylmethacrylat]
PEI	Poly(ethylenimin)
PEO	Poly(ethylenoxid)
PG	Partikelgröße [nm]
PLL	Poly-L-lysin
ppm	parts per million
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PVP	Poly(4-vinylpyridin)
ρ	Dichte der Lösung [g/cm ³]
ρ_0	Dichte des Lösemittels [g/cm ³]

R	molare Gaskonstante [J/K/mol]
r_b	Abstand am Boden der Messzelle in der AUZ
r_h	hydrodynamischer Radius
r_m	Abstand am Meniskus der Messzelle in der AUZ
RI	Brechungsindex
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minutes
RT	Raumtemperatur [°C]
S_0	Sedimentationskoeffizient
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SPDP	Succinimidyl-3-(2-pyridylthiopropionat)
St	Stärke
St- <i>g</i> -PDMAPMAM	Stärke- <i>g</i> -Poly(dimethylaminopropylmethacrylamid)
T_3	Triiod-L-thyronin
t-BACVS	tert.-Butylazocyanovaleriansäure
t-BACVS-St	tert.-Butylazocyanovaleriansäurestärkeester
TEA	Triethylamin
TEMPO	Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Radikal
Tf	Transferin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
Trt	Triphenylmethyl-
Tyr	Tyrosin
UK	Universelle Kalibrierung
UV	Ultraviolett
\bar{v}	partielles, spezifisches Volumen [cm ³ /g]
V_E	Elutionsvolumen der SEC
ω	Winkelgeschwindigkeit des Rotors [RAD/s]
W	Massenanteil PEG [%]
Well	Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte
X	Rotorkonstante
ξ	Zeta-Potential [mV]
z-Mittelwert	mittlerer intensitätsgewichteter Durchmesser [nm]

Abstract

The goal of this work was the development of new non-viral gene transfer systems for the somatic gene therapy. For these non-viral gene vectors (polycation-DNA-complexes) on the base of ligand-functionalized polycations were synthesized, characterized and tested in transfection trials on different cell cultures (HepG2, HeLa, 16HBE).

In preliminary investigations PEI-g-PEO copolymers with different grafting densities of poly(ethylene oxide) PEO₈ were synthesized and characterized. This was followed by modification of PEI and the copolymer PEI-g-PEO(20) with specific receptor ligands for transfection studies to the cell lines mentioned above. Folic acid (transfection at HeLa cells), triiodo-L-thyronine (HepG2 cells) and the uronic acids of galactose, mannose, glucose as well as the lactobionic acid (HeLa, HepG2 and 16HBE cells) were used as ligands. The coupling of the ligands was performed either without a spacer or via PEO side chains and was realized by carbodiimids.

The PEI and the grafted copolymers PEI-g-PEO as well as the ligand-functionalized copolymers were characterized regarding to their chemical composition and molecular parameters. Molar masses from sedimentation rate experiments of the AUC were obtained within the range of 35000 to 70000 g/mol. The molar mass investigations by means of SEC-MALLS revealed that after the grafting process both copolymers with heterogeneous chemical composition and unmodified PEI were present. The polydispersity of all PEI-g-PEO(20) based copolymers increased significantly compared with unmodified PEI. The molar masses increased with higher conversion degree as expected. The highly-substituted products exhibited an increasingly more compact structure in aqueous solution.

The following transfection studies were accomplished with the help of a luciferase reporter genes at the cultures HepG2 (liver cancer cells), HeLa (cervix cancer cells) and 16HBE (lung epithelium cells). The grafted copolymers PEI-g-PEO were compared to the unmodified PEI vector in transfection experiments. Here an almost identical transfer efficiency compared to the unmodified PEI vector could be maintained accompanied by reduced toxicity up to a PEO content of 17% w/w.

Folic acid copolymers were tested on HeLa cells in further vector studies. All folic acid vectors showed a maximum in the transfection at a N/P ratio (complex of polycation with DNA) of 2.5 and/or 5.0, which refers to a receptor-mediated endocytosis. However, no receptor-mediated endocytosis was observed in transfection.

A similar transfection behavior was observed with the T3 vectors on HepG2 cells dependent on the N/P ratio. The hypothetical receptor-mediated endocytosis could be confirmed within the T3-functionalized vectors by appropriate T3 excess experiments. Herein the transfer efficiency of the T3 gene vectors decreased significantly while adding free low-molecular weight triiodo-L-thyronine. In contrast to this the transfer efficiency of the unmodified PEI vector decreased only negligibly. A receptor-mediated endocytosis was also confirmed by fluorescence microscopy investigation of T3-functionalized aminodextranes at transfection of HepG2 cells. Subsequently, the T3 vectors were tested at mice *in vivo*. Here high transfer efficiencies in comparison to the unmodified PEI vector were determined particularly in the spleen as well as in the kidneys and thyroid. The T3 vectors should be suitable for a gene transfer into hepatocytes.

The vectors with uronic acid conjugates as ligands (galacturonic-, glucuronic and lactobionic acid) did not show significant deviations in the transfer efficiencies compared with the PEI vector. In contrast to this the vectors with mannuronic acid exhibit a constant high transfer efficiency at the three cell cultures HepG2, HeLa and 16HBE. They are more efficient than the PEI vector over the examined N/P range. Here the transfection proceeds independently of the charge of the complex (N/P ratio). This transfection behavior could be prevented by blocking the glycosidic OH groups of the Man vector. A receptor-mediated endocytosis of the Man vectors at the three examined cell lines (HepG2, HeLa, 16HBE) could be verified by means of transfection experiments with an excess of free mannuronic acid and fluorescence microscopic investigations.

In continuing studies new gene vectors on the base of cationic starch graft copolymers were synthesized and tested in transfection studies at HepG2 and 16HBE cells. Beyond that peptide-functionalized PEI vectors, which exhibit a nuclear localization sequence (TAT), were established and their transfection *in vitro* was determined. Compared to the PEI vector lower transfections of the vectors on the base of cationic starch graft copolymers was observed. However, an increase is expected by coupling with T3 and mannuronic acid ligands.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer nicht-viraler Gentransfersysteme für die somatische Gentherapie. Hierfür wurden neue Polykation-DNA-Komplexe auf Basis Ligand-funktionalisierter Polymere hergestellt, charakterisiert und nachfolgend in Transfektionsversuchen an verschiedenen Zelllinien (HepG2, HeLa, 16HBE) eingesetzt.

In Voruntersuchungen wurden Poly(ethylenimin)-*g*-Poly(ethylenoxid)-Copolymere (PEI-*g*-PEO) mit unterschiedlichen Pfropfdichten an kurzkettingen Poly(ethylenoxiden) (PEO₈) synthetisiert und charakterisiert.

In anschließenden Untersuchungen wurden sowohl das kationische Poly(ethylenimin) (PEI) als auch das Pfropfcopolymer PEI-*g*-PEO(20) für Transfektionsstudien an den o.g. Zelllinien mit spezifischen Rezeptorliganden modifiziert. Als Liganden wurden Folsäure (Transfektion an HeLa-Zellen), Triiod-L-thyronin (HepG2-Zellen) und die Uronsäuren der Galactose, Mannose, Glucose sowie die Lactobionsäure (HeLa-, HepG2- und 16HBE-Zellen) verwendet. Die Anbindung der Liganden erfolgte entweder direkt oder über weitere PEO-Seitenketten und wurde mit Hilfe von Carbodiimiden realisiert.

Das PEI, die Pfropfcopolymere PEI-*g*-PEO und die Ligand-funktionalisierten Copolymere wurden hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und molekularen Parameter charakterisiert. Aus Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten der AUZ wurden Molmassen im Bereich von $35 \cdot 10^3$ bis $70 \cdot 10^3$ g/mol erhalten. Die Molmassenuntersuchungen mittels SEC-MALLS zeigten, dass nach dem Pfropfprozess unterschiedliche Pfropfcopolymerfraktionen mit nicht einheitlicher chemischer Zusammensetzung vorlagen. Die Polydispersitäten, vor allem der Copolymere auf Basis von PEI-*g*-PEO(20), erhöhten sich signifikant im Vergleich zum Pfropfsubstrat PEI. Die Molmassen nahmen erwartungsgemäß mit höherem Umsetzungsgrad zu. Die höhersubstituierten Produkte wiesen dabei eine zunehmend kompaktere Struktur in wässriger Lösung auf. Die Molmassenbestimmung mittels universeller Kalibrierung der SEC lieferte die sichersten Werte. Es wurden Molmassen im Bereich von $50 \cdot 10^3$ - $130 \cdot 10^3$ g/mol ermittelt. Einige Ligand-Copolymere (Fol, Gal, LB) auf Basis von PEI-*g*-PEO wiesen höhere Molmassen als erwartet auf, vermutlich hervorgerufen durch Vernetzungsreaktionen. Die hydrodynamischen Durchmesser dieser Polymere zeigten gleichfalls deutlich zu hohe Werte.

Aus Molmassenbestimmungen (PEI, PEI-*g*-PEO(20), PEI-*g*-(PEO-T3)(7)) mittels Sedimentationsgleichgewicht der AUZ (M_w^{AUZ}) wurde durchschnittlich eine etwa 10-20% kleinere Molmasse im Vergleich zu M_w der SEC erhalten.

Die nachfolgenden Transfektionsversuche wurden mit Hilfe eines Luciferase-Reportergens an den Zelllinien HepG2 (Leberkrebszellen), HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen) und 16HBE (Atemwegsepithelzellen) durchgeführt.

Die Pfropfcopolymere PEI-*g*-PEO wurden im Vergleich zu dem unmodifizierten PEI-Vektor in Transfektionsversuchen getestet. Hierbei konnte bis zu einem PEO-Gehalt von 17% w/w eine nahezu identische Transfereffizienz bei gleichzeitiger Verminderung der Toxizität im Vergleich zum unmodifizierten PEI-Vektor aufrechterhalten werden.

In weiteren Studien wurden Folsäure-Copolymere an HeLa-Zellen getestet. Bei allen Folsäure-Vektoren konnte ein Maximum in der Transfektion bei N/P-Verhältnissen (Verhältnis von Polykation und DNA im Komplex) von 2,5 bzw. 5,0 ermittelt werden, das auf eine rezeptorvermittelte Endozytose hinweist. In anschließenden Transfektionsversuchen mit einem Überschuss an niedermolekularer Folsäure konnte eine rezeptorvermittelte Endozytose jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Transfektionsverhalten in Abhängigkeit vom eingesetzten N/P-Verhältnis zeigten auch die T3-Vektoren (Triiod-L-thyronin) an HepG2-Zellen. Die Hypothese der rezeptorvermittelten Endozytose ließ sich bei diesen Vektoren durch entsprechende T3-Überschuss-Experimente bestätigen. Die Transfereffizienz der T3-Genvektoren nahm bei einem Zusatz von freiem, niedermolekularem Triiod-L-thyronin signifikant ab. Im Gegensatz dazu sank die Transfereffizienz des unmodifizierten PEI-Vektors nur unerheblich. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Transfektion von T3-funktionalisierten Aminodextranen an HepG2-Zellen bestätigten gleichfalls eine rezeptorvermittelte Endozytose.

Anschließend wurden die T3-Vektoren *in vivo* an Mäusen getestet. Hierbei wurden hohe Transfereffizienzen im Vergleich zum unmodifizierten PEI-Vektor vor allem in der Milz sowie in der Niere und Schilddrüse ermittelt. Die T3-Vektoren eigneten sich somit prinzipiell für einen Gentransfer an Hepatozyten.

Bei den Uronsäure-Konjugaten zeigten die Vektoren mit Galacturon-, Glucuron- und Lactobionensäure-Liganden keine signifikanten Abweichungen in den Transfereffizienzen im Vergleich zum PEI-Vektor. Im Gegensatz dazu wiesen die Vektoren mit Mannuronsäure (Man) an allen drei Zelllinien HepG2, HeLa und 16HBE eine konstante, hohe Transfereffizienz auf. Sie waren über den gesamten untersuchten N/P-Bereich effizienter als der Vergleichsvektor PEI. Die Transfektion ist hierbei unabhängig von der Ladung des Komplexes (N/P-Verhältnis). Dieses Transfektionsverhalten ließ sich durch Blockierung der glykosidischen OH-Gruppen des Man-Vektors unterbinden. In Transfektionsexperimenten mit einem Überschuss an freier Mannuronsäure und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine rezeptorvermittelte Endozytose der Man-Vektoren an HepG2-, HeLa- und 16HBE-Zellen verifiziert werden.

Darüber hinaus wurden Vernebelungsexperimente der Man-Vektoren an Mäusen durchgeführt. Hierbei wurden deutlich schlechtere Transfektionen im Vergleich zum unmodifizierten PEI-Vektor gefunden. Diese Ineffizienz resultierte aus der Aggregatbildung (hohe Partikeldurchmesser) der Man-Vektoren.

Erstmalig wurden in weiterführenden Studien neue Genvektoren auf Basis kationischer Stärkepfropfcopolymere synthetisiert und in Transfektionen an HepG2- und 16HBE-Zellen getestet. Hierbei wurden niedrigere Transfektionen der Vektoren auf Basis kationischer Stärkepfropfcopolymere im Vergleich zu dem PEI-Vektor erhalten. Diese konnten aber mit Hilfe der Ankopplung von T3- und Mannuronsäure-Liganden deutlich erhöht werden.

1 Einleitung und Grundlagen

In den letzten Jahren ist die Gentherapie ein wichtiger Forschungsschwerpunkt in Biologie, Chemie und Medizin geworden. Sie ist eine neue medizinische Technologie, in der DNA selbst als pharmazeutischer Wirkstoff verwendet wird. Sie beinhaltet die Behebung von genetisch bedingten oder erworbenen Erkrankungen wie z.B. Mukoviszidose, Sichelzellenanämie, aber auch AIDS und Tumoren. Diese neuen gentherapeutischen Ansätze könnten revolutionäre Verbesserungen im Kampf gegen verschiedenste Krankheiten bieten, bei denen traditionelle Behandlungsmethoden oft nur eine unzureichende Wirksamkeit zeigen.

Anwendungsmöglichkeiten der Gentherapie (Abb. 1.1) ergeben sich vor allem bei den klassischen Erbkrankheiten mit isoliertem Einzeldefekt, aber auch bei den erworbenen genetischen (z.B. HIV, chronische Infektionskrankheiten) und den multifaktoriellen genetischen Erkrankungen (z.B. Tumore, Herz- und Kreislaufkrankheiten).

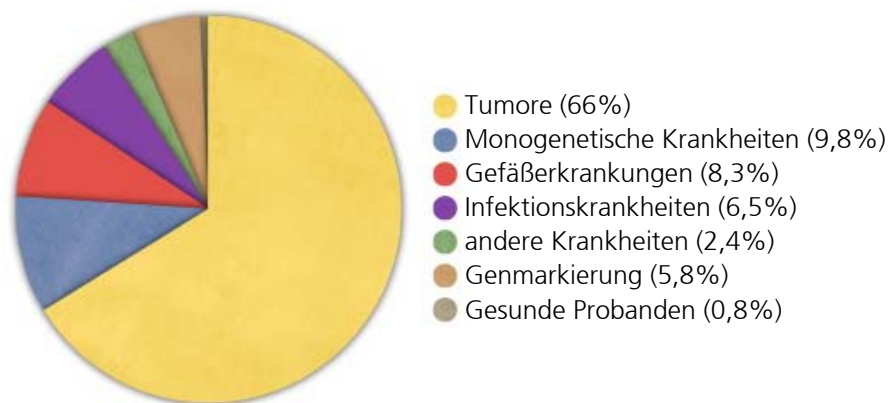


Abb. 1.1: Medizinische Anwendung der Gentherapie in verschiedenen Bereichen [1]

1.1 Somatische Gentherapie

Die grundlegende Idee der somatischen Gentherapie ist sehr einfach. Ein therapeutisches Gen wird in die Körperzellen eingeführt und das Genprodukt soll den Krankheitsverlauf aufhalten oder zumindest verlangsamen. Die Veränderung des Erbgutes bleibt hierbei nur auf den behandelten Patienten beschränkt.

Die gentherapeutischen Verfahren werden prinzipiell in drei unterschiedliche Methoden des Gentransfers (Abb. 1.2) unterteilt. Hierbei ist die Übertragung der genetischen Informationen in die Zielzellen des Organismus von besonderer Bedeutung. Dieser Prozess wird als Transfektion oder Transduktion bezeichnet.

Der *in vitro* Gentransfer wird in Zellkultur durchgeführt. Die Zielzellen werden vom Organismus isoliert und die Transfektion des genetischen Materials sowie deren Analyse werden in der Zellkultur untersucht.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist das *ex vivo* Verfahren. Aus dem kranken Organ des Organismus werden zunächst teilungsfähige Zellen entnommen, im Labor transfiziert und

multipliziert und anschließend dem Ursprungsorganismus wieder zugeführt. Dort sollen sich die transfizierten Zellen vervielfältigen und die gewünschte Funktion ausüben. Ein limitierender Faktor des Therapieerfolges ist die Reimplantation der transgenen Zellen in den Organismus und die anschließende Vermehrung.

Die *in vivo* Therapie beruht auf dem Einbau des genetischen Materials direkt in die Zielzellen des Körpers. Dies wird durch einen viralen oder nicht-viralen Transportvektor realisiert. Der Therapieerfolg ist hier direkt von der Spezifität der Transfektion sowie der Lebenserwartung der Zielzellen abhängig.

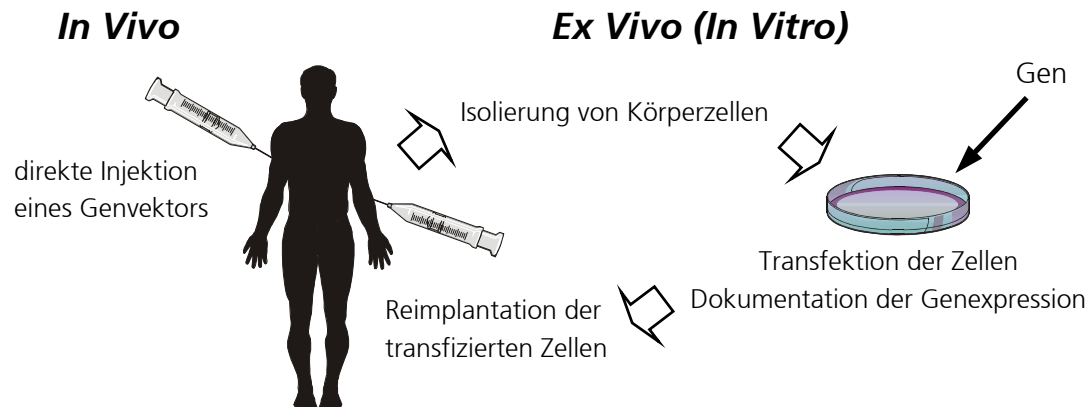


Abb. 1.2: Modalitäten der somatischen Gentherapie

1.2 Erfolge und Niederlagen der Gentherapie

Offiziell wurden genterapeutische klinische Versuche erstmals 1990 durchgeführt. Damals wurde ein heroischer Versuch zur Heilung eines Enzymdefekts, der eine schwere Immunschwäche bewirkt, durch French Anderson und seine Kollegen durchgeführt. Der 14. September 1990 gilt seitdem weltweit als Geburtstag der Gentherapie am Menschen. Mittlerweile ist bekannt, dass der dabei verwendete Vektor keine dauerhafte Expression des übertragenen Gens gewährleisten kann. Dies scheint eine vernünftige Erklärung für jenes erstmalige Scheitern zu sein.

Mittlerweile sind neue und verbesserte Vektoren erschaffen worden und eine gewisse Anzahl klinischer Versuche ist vollbracht. Die meisten davon betreffen die Phase I, wobei das Ziel nicht die Feststellung eines therapeutischen Effekts sondern die Bestimmung der allgemeinen Toxizität ist.

Im September 1999 geriet die Gentherapie in die öffentliche Kritik. In den USA starb der 18-jährige Jesse Gelsinger, der unter der monogenen erblichen Stoffwechselkrankheit Ornithin-Transcarbamylase (OTC) litt, bei einer Gentherapie. Die Todesursache blieb ungeklärt, die Wissenschaftler vermuten eine Reaktion auf die Infusion mit abgeschwächten und mit Genen beladenen Adenoviren. Es wird angenommen, dass eine Immunreaktion für seinen Tod verantwortlich war [2,3].

Trotz strenger Überwachung sind in den USA 1998 und 1999 insgesamt sechs Tote zu beklagen, die bei Studien am Herzen verstarben. Das größte Gefahrenpotenzial beziehungsweise die Todesursache wird den Adenoviren zugeschrieben. Nach der Bestätigung der sechs Todesfälle

wurden ein weiterer Todesfall und zwei ernsthafte Komplikationen während einer Behandlung von der amerikanischen Gesundheitsbehörde bekannt gegeben. Dies verstärkte die vorhandene Skepsis gegenüber dieser neuen medizinischen Behandlungsform.

Im Jahr 2000 wurde erstmalig eine erfolgreiche Gentherapie durchgeführt, bei der neun Kinder, die unter der angeborenen Immunschwäche SCID-X1 litten, wirksam behandelt werden konnten [4]. Der Gendefekt wurde durch retroviralen *ex vivo* Gentransfer und anschließende Reimplantation der modifizierten Blutstammzellen über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr korrigiert. Der Rückschlag kam Anfang 2003. Zwei der elf behandelten Kinder waren an Leukämie erkrankt. Der Genvektor, der die Gene in den Körper einschleust, hatte sich an einer Stelle des Körpers eingebaut, an der die Zellteilung reguliert wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die somatische Gentherapie im Experimentalstadium befindet. Sie ist zur Zeit keine Therapie für eine routinemäßige Anwendung. Es ist viel Grundlagenforschung im Bereich der Sicherheit und auf dem Gebiet der Einschleusung von Genen notwendig. Danach können die Erfolgchancen der Gentherapie für die einzelnen Krankheiten bewertet werden. Erst dann wird die Gentherapie als routinemäßiges Verfahren in der medizinischen Behandlung eingesetzt werden können.

1.3 Barrieren des Gentransfers

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die effiziente und reproduzierbare Einschleusung und Expression eines gewünschten Gens in geeignete Zielzellen. Dieser Transfer von genetischem Material in die eukaryotischen Zellen erfolgt über bestimmte Barrieren (Abb. 1.3).

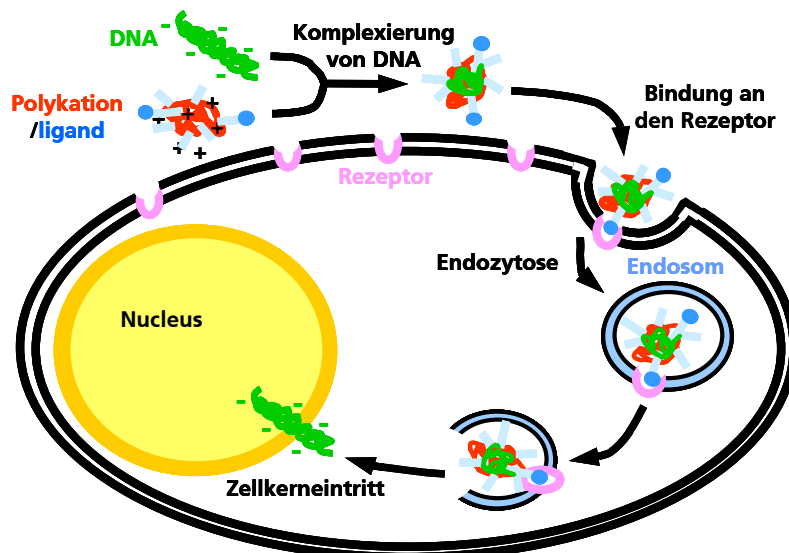


Abb. 1.3: DNA-Transport in den Zellkern mittels kationischen Polymeren

Wird ein *in vivo* Gentransfer durchgeführt, so muss zunächst der Vektor vom Applikationsort zum Wirkort gelangen. Nach der intravenösen Applikation gelangt der Vektor in die Blutbahn, die auf Grund der negativ geladenen Zellen des Blutes eine entscheidende Hürde darstellt. Es

kann zu einer Inaktivierung durch das Immunsystem kommen. Hat der Vektor diesen Schritt überwunden, ist die nächste Barriere die ebenfalls negativ geladene Membran der Zielzelle. Die meisten nicht-viralen Vektoren nutzen ihre kationische Überschussladung (nach der Komplexbildung mit DNA) für einen erfolgreichen Membrantransfer aus. Die Vektorkomplexe werden durch Endozytose von der Zelle aufgenommen.

Es gibt zwei unterschiedliche Formen der Endozytose. Die Pinozytose beinhaltet die kontinuierliche, unspezifische Aufnahme von Extrazellulärflüssigkeit und darin gelösten Molekülen über relativ kleine Vesikel. Die zweite Form der Endozytose verläuft über spezifische Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran, die endozytischen Vesikel sind hierbei vorübergehend von Clathrin umhüllt. Diese rezeptorvermittelte Endozytose ist spezifisch, da die Rezeptoren nur ganz bestimmte Stoffe erkennen und ausschließlich diese endozytiert werden. Sie verläuft viel schneller als die Pinozytose.

Die Endozytose ist ein Multischrittprozess, der die Bindung an die Zellmembran, den Zelleintritt, die Formation der Endosomen, die Fusion mit Lysosomen und die Lysis beinhaltet.

Der endosomale Austritt des Polymer/DNA-Vektors ist bislang noch ungeklärt. Eine Hypothese basiert auf der Idee der physikalischen Zersetzung der negativ geladenen Membran der Endosomen durch direkte Wechselwirkung mit dem kationischen Polymer [5].

Eine alternative Erklärung beruht auf den ionisationsfähigen Amino-Gruppen der kationischen Polymere und wird im Allgemeinen „Protonenschwamm-Hypothese“ [6,7] genannt. Die Endosomenmembran besitzt eine durch V-ATPase ausgelöste Protonenpumpe, die gegen den Gradienten in den Endosomen, resultierend aus dem Donnan-Effekt des Polymers, einen Protonentransport auslöst. Chlorid-Ionen und Wasser werden ebenfalls in die Endosomen gepumpt. Die „Protonenschwamm-Hypothese“ nimmt hierbei an, dass Poly(ethylenimin), welches bei einem pH von 7,3 nur zu etwa 11% protoniert ist [5], den pH in den Endosomen effektiv abpuffert. Es erfolgt eine Erhöhung der Protonen-, Ionen- und Wasser-Einschleusung in die Endosomen. Die Endosomen schwellen stark an; es tritt eine osmotische Lysis ein.

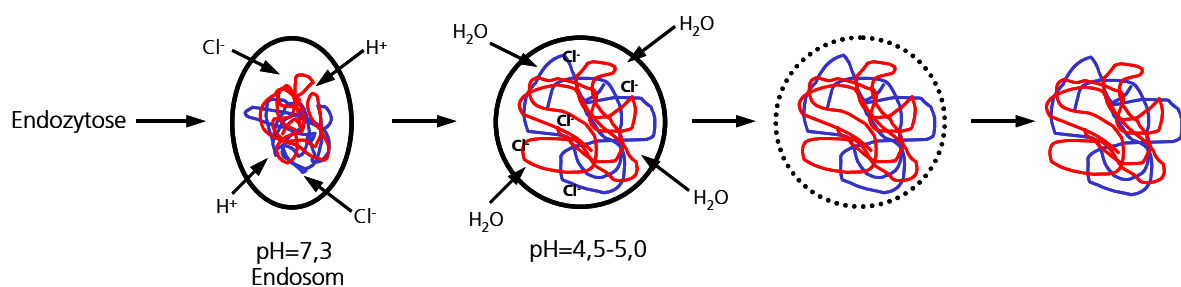


Abb. 1.4: Protonenschwamm-Hypothese [7]

Nach dem Übergang in das Zytoplasma muss die DNA in den Zellkern gelangen, um transkribiert zu werden. Der Eintritt in den Zellkern verläuft über die Zellkernporen (~10 nm Durchmesser) oder während der Zellteilung. Nach Überbrücken dieser Hürde kann die transferierte DNA entweder als Episom verbleiben, womit meistens nur eine begrenzte Verweilzeit (*transiente* Genexpression) verbunden ist, oder aber in das zelluläre Genom integrieren (*stabile* Genexpression).

Die natürliche Konsequenz dieses Multischrittprozesses ist eine relativ geringere Effektivität des Gentransfers in den Zellkern [8]. Bei der Entwicklung eines effizienten Vektorsystems muss daher jeder einzelne Schritt optimiert werden.

1.4 Gentransfer-Vektoren

Über 30 Jahre Forschung und Entwicklung haben eine Vielzahl verschiedener Techniken und Methoden des Gentransfers hervorgebracht. Die einzelnen Techniken werden klassischerweise in virale und nicht-virale Techniken unterteilt [9]. In Abb. 1.5 sind die derzeit in klinischen Studien verwendeten Vektoren je nach Anteil an Protokollen aufgelistet. Die viralen Vektoren sind die bisher am weitesten entwickelten und beforschten Transfersysteme; dies ist eindeutig an einem Protokoll-Anteil von 68% zu erkennen.

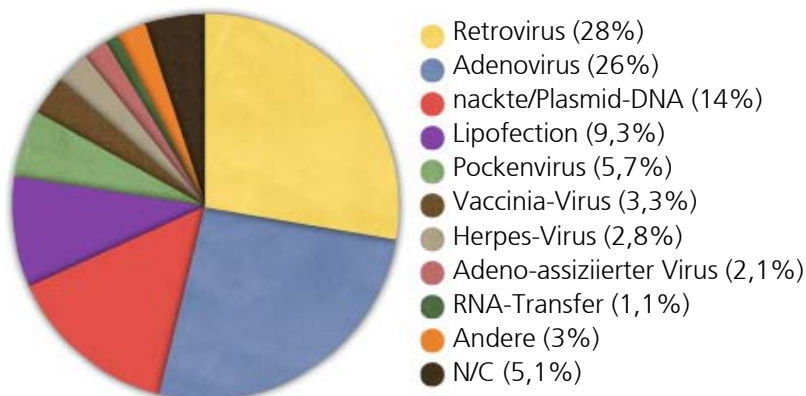


Abb. 1.5: Vektoren, die zur Zeit in insgesamt 918 klinischen Versuchen verwendet werden [1]

Leider gibt es bisher kein universell einsetzbares Vektorsystem. Die Abb. 1.6 gibt den Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden bezüglich der Transfereffektivität und der Toxizität wieder. Die Viren sind momentan die effektivsten DNA-Transfersysteme, sie erreichen sowohl hohe Transferausbeuten (>90%) als auch hohe Genexpressionsraten. Dem gegenüber stehen die hohe Zytotoxizität, sowie Produktions- und Verpackungsprobleme der DNA und die extrem hohen Kosten des viral-vermittelten Gentransports.

In diesen offensichtlichen Problemen der heutigen DNA-Transfer-Methodik liegen die Chancen neuer Transfersysteme. Die nicht-viralen Systeme, besonders die synthetischen DNA-Transfersysteme, erlangen immer größere Bedeutung in Grundlagenforschung und klinischen Studien.

Die folgenden Kapitel geben einen kurzen Überblick über die wichtigsten Transfersysteme, ihre Vor- und Nachteile und fassen den aktuellen Stand der Technik zusammen.

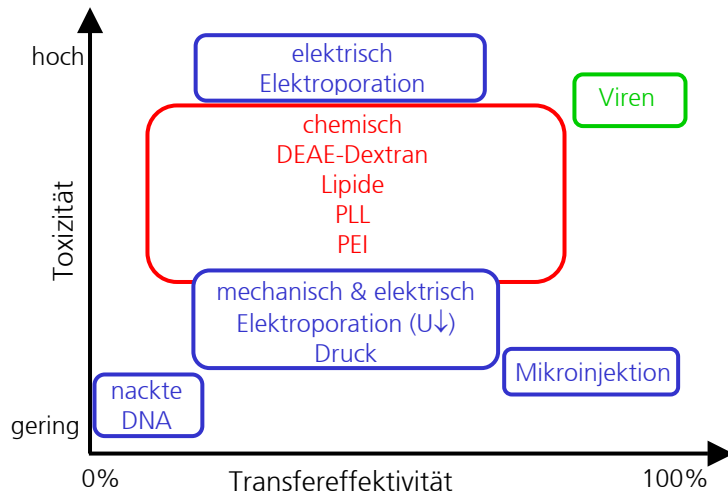


Abb. 1.6: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden bezüglich der Transfereffektivität und der Toxizität [8]

1.4.1 Virale Vektoren

Virale Vektoren sind reproduktions-defekte Viren, bei denen Teile oder ganze Sequenzen des Virencodes durch das therapeutische Gen ersetzt wurden ist. Das Interesse an Viren für die Gentherapie ist beträchtlich, da sie im Transfer der Gene extrem leistungsfähig sind [10]. Sie besitzen jedoch einige Nachteile, die hauptsächlich mit dem praktischen Gebrauch verbunden sind und von der Art des Vektors abhängen. Die Probleme schließen unzulängliche pharmazeutische Quantitäten (Titer), Toxizität und die mögliche Reproduktion der kompetenten Viren ein.

1.4.1.1 Retroviren

Das Retrovirus ist ein eukaryotisches RNA-Virus der Familie Retroviridae, das die RNA als Genom besitzt. Es gehört zu den membranumhüllten Viren. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist das HIV. Bei der Infektion einer Zelle durch ein Retrovirus wird die RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in virale DNA umgeschrieben. Durch die Integrase integriert die DNA in das Genom der Wirtszelle. Die Vorteile der retroviralen Vektoren sind hohe Übertragungseffizienzen [11], die eine dauerhafte Expression der übertragenen Gene gewährleisten. Ein Transfer bis zu 8 kb (kilobasen) großer Fremd-DNA-Abschnitte ist möglich. Klinische Versuche mit Retroviren als Vektorsystem sind aber weitgehend erfolglos geblieben, denn Retroviren sind nur in niedrigem Titer züchtbar. Sie können im Allgemeinen nur Zellen infizieren, die sich gerade im Stadium der Teilung befinden [12], weshalb sie vor allem für die *ex vivo* Therapie [4] geeignet sind. Die Integration der DNA kann hierbei nahezu an jedem beliebigen Ort in das Genom der Wirtszelle erfolgen, Folgeschäden können hervorgerufen werden. Sich selten oder gar nicht teilende Zellen (z.B. Neuronen) sind als therapeutisches Ziel ausgeschlossen. Diese Eigenschaft kann beim Einsatz in der Tumor-Gentherapie vorteilhaft sein, da das dem Tumor umgebende nicht transformierte Gewebe auch nicht infiziert wird. Bei neueren Untersuchungen mit lentiviralen Vektoren, einer Untergruppe der komplexen Retroviren, zeigte sich jedoch, dass ein Transfer auch in nicht teilende Zellen möglich ist [13]. Auf Grund dieser Eigenschaft wurden lentivirale

Vektoren auf der Basis von HIV-1 entwickelt. Leider ist derzeit das Risiko einer replikationskompetenten Rekombination dieser Vektoren für den Einsatz in klinischen Studien zu hoch.

1.4.1.2 Adenoviren

Eine häufig eingesetzte Alternative zu retroviralen Systemen beruht auf adenoviralen Vektoren. Adenoviren sind icosaedrische Viren, die lange DNA-Genome beinhalten. Im Gegensatz zu den Retroviren sind die Adenoviren von einer Proteinhülle mit einem Durchmesser von 140 nm umgeben. Im Inneren (Kapsid) befindet sich eine doppelsträngige, lineare DNA mit einer Länge von 30-40 kb. Adenoviren besitzen einige Vorteile gegenüber Retroviren, die sie als alternatives Therapeutikum attraktiv erscheinen lassen. Adenoviren infizieren sowohl sich teilende als auch bereits völlig ausdifferenzierte Zellen, dadurch ist eine hohe Effizienz des Gentransfers in verschiedenen Geweben möglich [14]. Die DNA integriert hierbei nicht in die Chromosomen der Wirtszelle, sondern sie verbleibt episomal. Mutagene Wirkungen können somit ausgeschlossen werden. Das Genom ist zudem leicht manipulierbar und der adenovirale Vektor lässt sich in hoher Konzentration (Titer bis zu 10^{11} /ml) produzieren. Gegenüber anderen Viren besitzen die Adenoviren viele Applikationsmöglichkeiten. Sie können z.B. als Aerosol appliziert werden, wodurch der Einsatz bei Atemwegserkrankungen vereinfacht wird.

Eine Schwäche des Adenovirus ist die durch ihn hervorgerufene heftige Immunantwort des Organismus, die zu verschiedenen Infekten führen kann. Die Dauer und Wiederholung der Verabreichung der adenoviralen Vektoren ist somit stark limitiert. Die transferierte DNA wird nur vorübergehend exprimiert, es liegt ein *transienter* Gentransfer vor. Zudem kann auch bei den Adenoviren nicht ausgeschlossen werden, dass sie sich mit ihrem Wildtyp kreuzen und anschließend wieder reproduzieren können.

1.4.1.3 Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind kleine nicht-pathogene DNA-Viren, die eine einsträngige DNA besitzen. Sie können nur mit Hilfe von Helferviren repliziert oder in das menschliche Genom eingebaut werden. Als Helferviren werden Adenoviren oder Herpesviren genutzt. Adeno-assoziierte Viren können sowohl sich teilende als auch vollständig ausdifferenzierte Zellen infizieren und erreichen hohe Effizienzen. Sie sind besonders gut geeignet für Langzeitexpressionen [15]. Bei Abwesenheit von Helferviren besitzen sie die Fähigkeit, in eine Latenzphase überzugehen. Das virale Genom liegt dabei als Episom oder in das Wirtsgenom integriert vor. Befällt ein Adenovirus diese Zelle, so werden auch die AAV produziert, die für die Gentherapie interessant sind. Leider besitzt der Virus nur eine begrenzte Packungsgröße von etwa 5 kb und es treten Probleme bei der Produktion der AAV zu hohen Titern auf. Das größte Problem der AAV-Produktion ist die Kontamination durch die Helferviren, zu deren Entfernung unterschiedliche Methoden angewendet werden. Die Forschung konzentriert sich daher vorwiegend auf die Erhöhung der Reinheit und die damit verbundene Erhöhung der Konzentration der AAV. Die bisher erzielten Erfolge sind aber vielversprechend, so wurde AAV beispielsweise zur Gentherapie bei Zystischer Fibrose [16] eingesetzt.

1.4.1.4 Herpesviren

Das Herpes Simplex Virus (HSV) hat in letzter Zeit einige Aufmerksamkeit erregt. Es ist ein doppelsträngiger DNA-Virus mit einem Genom von über 150 kb. Von Vorteil für die therapeutische Verwendung des HSV sind vor allem seine interessanten Eigenschaften. Das Herpesvirus kann in zwei Zuständen vorliegen. Im *lytischen* Zyklus werden neue Viren produziert. In bestimmten Zellen wie z.B. Neuronen geht das Virus jedoch in einen *latenten* Zustand über. In diesem bleibt es für das ganze Leben in der Wirtszelle, ohne in deren Genom zu integrieren oder sie zu schädigen. Unter Umständen kann das HSV reaktiviert werden und wieder in den *lytischen* Zustand übergehen. Für die therapeutische Verwendung werden die *lytischen* Gene des Vektors durch die Transgene ersetzt, wodurch das Virus seine Replikationsfähigkeit verliert und aus seinem *latenten* Zustand nicht mehr ausbrechen kann. Das Potential für eine lebenslange Expression in die Nervenzellen ohne gefährliche Integration in das Wirtsgenom ist ebenfalls gegeben. Das Herpesvirus kann eine Vielzahl von sich teilenden und nicht teilenden Zellen infizieren. Es ist in einem sehr hohen viralen Titer herstellbar. Dem gegenüber steht eine nicht zu vernachlässigende Zytotoxizität und eine geringe Transduktionseffektivität sowie eine *transiente* Genexpression. Die bisherigen Ergebnissen der Herpesvirenforschung machen einen Routineeinsatz in gentherapeutischen Studien schwierig.

1.4.2 Nicht-virale Vektoren

Transiente Genexpression kann auch mit einer Reihe von *nicht-viralen* Transfermethoden erreicht werden. Die Vektoren sind im Allgemeinen kationisch und beinhalten kationische Polymere wie Poly-L-lysin (PLL) und Poly(ethylenimin) (PEI), kationische Peptide und Liposomen sowie physikalische Systeme. Obwohl nicht-virale Systeme bisher weniger effektiv in der Transfektion und der Genexpression sind als die viralen Vektoren, bieten sie doch Vorteile in der Herstellung, im sicheren Umgang und in der hohen Fähigkeit, die Transgene einzukapseln [17]. Die Grenzen der viralen Systeme machen die nicht-viralen Vektoren zu einer attraktiven Alternative in der Gentherapie.

1.4.2.1 Physikalische Systeme

Der Einsatz von physikalischen Systemen in gentherapeutischen Studien beruht auf dem induzierten Transfer von Genen durch Druck, elektrische Felder oder beschleunigte Partikel.

1.4.2.1.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation (Elektrotransformation) kann die Zellmembran für Makromoleküle durch einen elektrischen Puls definierter Länge und Stärke permeabilisiert werden. Das Phänomen einer vorübergehenden Veränderung der Zellmembran mit Ausbildung von Mikroporen durch elektrische Pulse wurde erstmals von Zimmermann [18] beobachtet. Neumann et al. [19] übertrugen diese Beobachtung, um sie für die Elektropermeabilisierung der Membran zum Transfer von DNA in Säugerzellen zu nutzen. Die Elektroporation ist eine einfach

durchzuführende Methode. Sie wird sowohl für *stabile* als auch für *transiente* Transfektion benutzt. Die Zielzellen und die zu transferierende DNA werden in einer Lösung *in vitro* vermischt und einem Hochspannungspuls definierter Länge und Stärke ausgesetzt. Die Zellmembran wird angeregt und die Zellporen öffnen sich, so dass die DNA in die Zelle gelangen kann. Leider ist eine hohe Transfektionsrate auch häufig von einer hohen Sterberate begleitet. Nachteilig ist auch, dass die optimalen Elektroporationseigenschaften wie Spannung, Kapazität, Dauer und Anzahl der Pulse von Zelllinie zu Zelllinie variieren. Eine Optimierung des Elektroporationsprotokolls ist aber für einzelne Zelllinien gut möglich.

1.4.2.1.2 Partikelbombardement mit der „Gene Gun“

Diese Methode basiert auf der Überwindung der zellulären Barrieren wie Zell- und Kernmembran mit Hilfe von biologisch inerten ballistischen Partikeln. DNA-beschichtete Goldpartikel werden mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen geschossen. Während die meisten Partikel die Zellen durchschlagen, wird die DNA in den Zellen durch starke Reibung abgestreift und verbleibt dort. Nicht selten gelangt die DNA direkt in den Zellkern. Abhängig von der verwendeten Apparatur kann der ballistische Gentransfer *in vivo* [20,21] oder *ex vivo* eingesetzt werden. Wegen ihrer kleinen Größe (1-3 μm) dringen diese DNA-beschichteten Goldpartikel ohne Unannehmlichkeit in die Haut ein und transfizieren den DNA-Impfstoff in das Zielgewebe.

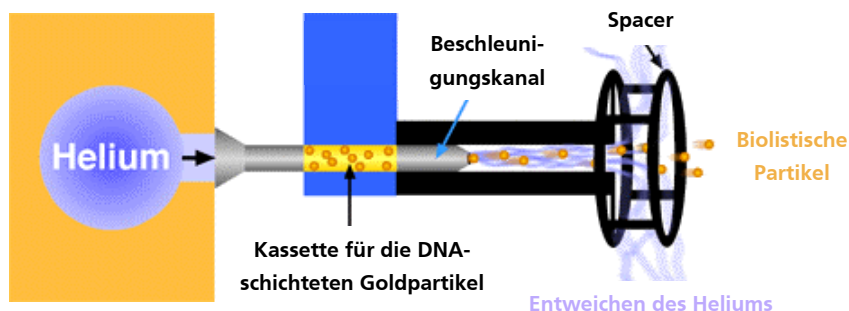


Abb. 1.7: Typischer Aufbau einer „Gene Gun“ [22]

Die Hauptbeeinträchtigung dieses Systems ist, dass das Zielgewebe oft chirurgisch exponiert werden muss. Die anschließende DNA-Übertragung ist dagegen verhältnismäßig leistungsfähig.

1.4.2.2 Transfer nackter DNA

Bei dieser Methode wird die DNA mit Hilfe einer Mikropipette (Durchmesser etwa 0,2 μm) direkt in einzelne Zellen injiziert. Dem Patienten werden hierfür die Zellen des betroffenen Gewebes entnommen und *in vitro* kultiviert. Die DNA wird in die Zellen injiziert und anschließend werden diese zurück in den Körper implantiert. Dieses System besticht durch seine Einfachheit und das Fehlen von potenziell toxischen Komponenten. Interessanterweise findet dieser Gentransfer effizient nur *in vivo* in Muskelgeweben statt [23]. Für eine systematische Applikation muss die Plasmid-DNA jedoch vor dem Abbau durch endogene Nucleasen [24] während des Transfers vom Applikationsort bis zur Genexpression im Zellkern geschützt werden. Eine Verminderung

dieses Abbaus würde hierbei eine erhebliche Effizienzsteigerung bedeuten. Für den Transfer von nackter DNA werden derzeit sehr hohe Dosen (10-50 µg pro Injektion) eingesetzt, damit eine effiziente Genexpression trotz eines Abbaus erhalten werden kann.

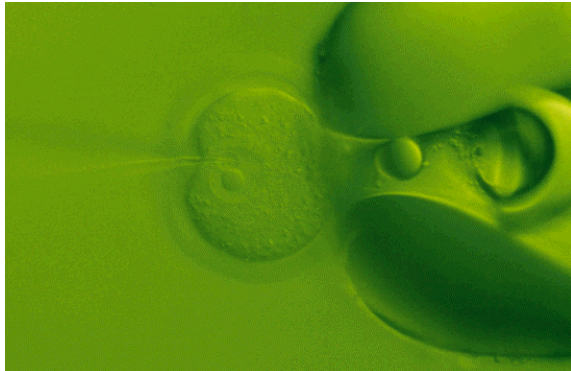


Abb. 1.8: Mikroskopische Aufnahme des Transfers von nackter DNA in die Zielzelle [25]
Die Zielzelle, gehalten von einer optischen Pipette, wird mittels einer Injektionsnadel (links) mit nackter DNA transfiziert.

Die meisten gentherapeutischen Studien konzentrieren sich auf das Muskelgewebe, obwohl ähnliche Experimente auch in Leber [26], Haut [27] und Tumoren [28] durchgeführt wurden. Die Anwendung der Mikroinjektion für therapeutische Zwecke ist bisher durch die geringe Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit transferiert werden können, limitiert. Eine neue Automatisierung dieser Methode hat jedoch mittlerweile zu Transfektionen von 5000 Zellen pro Tag geführt. Ein Routineeinsatz in Gentherapien ist bislang mit dieser Methode nicht möglich.

1.4.2.3 Lipide

Die synthetischen Gentransfersysteme werden seit einigen Jahren sehr intensiv untersucht. Mitte der achtziger Jahre wurden die ersten Vektoren auf Basis von Lipiden entwickelt; folglich wurde der Gentransfer *Lipofektion* [29] genannt. Das kationische Lipid DOTMA, welches spontan mit DNA zu Komplexen aggregieren kann, diente als Ausgangspunkt für die heute verwendeten Lipide in der somatischen Gentherapie, die teilweise in Tabelle 1.1 aufgelistet sind.

Diese Plasmid-Liposomen-Komplexe verfügen über viele Vorteile gegenüber viralen Vektoren. Sie sind relativ untoxisch, können sich nicht replizieren und nehmen im Prinzip eine unbegrenzte Menge externen DNA-Materials auf (Abb. 1.9).

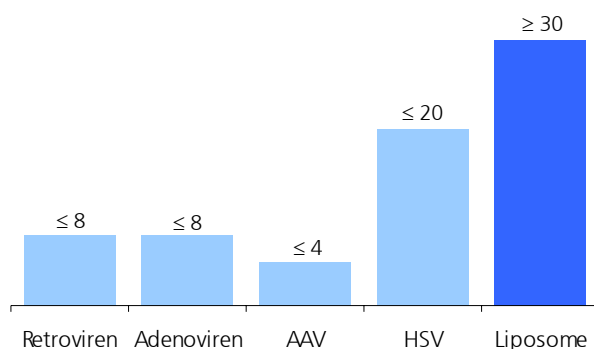


Abb. 1.9: DNA-Transportkapazitäten verschiedener Transfersysteme in Kilobasen (kb)
Die Zahl über den Balken gibt die maximale Kapazität an DNA in kb für das jeweilige Transfektionssystem an.

Tabelle 1.1: Häufig eingesetzte Lipide in der somatischen Gentherapie

Lipid	Abk.	Struktur	Lit.
N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid	DOTMA		29,30, 31,32, 33,34
1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropanchlorid	DOTAP		31,32, 35,36, 43
1,2-Dioleoyl-3-(4'-trimethylammonium)butanoylglycerolchlorid	DOTB		33,43
N-(Trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutaminchlorid	TMAG		33
1,2-(Dimyristyloxypropyl)-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid	DMRIE		31,35, 37,38
1,2-Dioleoylglycero-3-phosphoethanolamin	DOPE		30,31, 32,33, 34,39, 38
3b-[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol	DC-Chol		31,34, 35,47
Dioctadecylamido-glycylspermin	DOGS		32,33, 40,41
Dipalmitoylphosphatidyl-ethanolamidosperrin	DPPEs		33,40, 41

Das Mischen von DOTMA mit Plasmid-DNA führt spontan zu unilamellaren Liposomen. Die DNA wird hierbei effizient und quantitativ in die Komplexe eingebunden, der positive Ladungsüberschuss der Lipid-DNA-Komplexe resultiert in einer Anreicherung an der negativ geladenen Zellmembran, die größtenteils aus Phospholipiden besteht. Die Fusion der liposomalen Vektoren mit der Membran führt zu einem effizienten Transfer ins Zytoplasma. Diese neue Technik ergibt eine bis zu hundertfach höhere Transfereffizienz als die Transfektion mit Calciumphosphat oder DEAE-Dextran. Hierbei kann sowohl eine *transiente* als auch eine *stabile* Expression erreicht werden. Die Mischung aus DOTMA/DOPE (1:1) ist unter dem Namen Lipofectin™ der Fa. GIBCO BRL erhältlich. Zusätzlich zu einer höheren Transfereffizienz im Vergleich zu der DEAE-Dextran-Methode kann eine niedrige Toxizität festgestellt werden. Das neutrale Lipid DOPE ist nicht nur Strukturbildner für die kationischen Liposomen, ihm wird auch eine aktive Rolle bei der Aufnahme in die Zelle zugeschrieben [42].

Leventis et al. [43] synthetisierten eine Reihe neuer quaternärer Ammoniumlipide (z.B. DOTB, DOTAP), die vergleichbare Transfektionsergebnisse in Mischungen mit DOPE erzielen, aber geringere Toxizitäten als DOTMA aufweisen. Die Lipide CTAB, DEBDA und DDAB wurden erstmals von Rose et al. verwendet und erzielen hohe Transfektionen in unterschiedlichen Zelllinien [44]. Lipide kombiniert mit Spermin als kationischer Kopfgruppe (Lipopolyamine) wurden von Behr et al. entwickelt [45]. Sie kondensieren DNA quantitativ zu Ringsystemen und Stäbchen von 70-100 nm. Die Transfektionseffizienzen übertreffen bei gleichen Bedingungen die Ergebnisse von Lipofectin™. Das Lipopolyamin DOGS wurde daraufhin von Behr et al. unter dem Namen Transfectam™ patentiert [46].

Neben den schon genannten Lipiden werden häufig auch positiv geladene Cholesterolderivate wie DC-Chol eingesetzt. Diese wurden von Huang et al. synthetisiert [47] und in 1:1-Mischung mit DOPE eingesetzt. Transfektionserfolge mit höheren Effektivitäten als Lipofectin™ konnten an Hand mehrerer Zelllinien festgestellt werden. Das Problem der Immunreaktion entfällt bei der Applikation von Lipoplexen, da die eingesetzten Lipide meist einen natürlichen Ursprung besitzen.

Kationische Liposomen werden, wie virale Vektoren auch, entweder mittels Spritze oder in Form eines Aerosols bei Mukoviszidosepatienten [48] verabreicht.

Trotz dieser positiven Eigenschaften gibt es auch im liposomalen Gentransfer Engpässe. Die Freisetzung aus den Endosomen hängt stark von der Zusammensetzung der Liposomen ab. Die intrazelluläre Steuerung, insbesondere der Transfer in den Zellkern, erweist sich als große Barriere im liposomalen Gentransfer. Ein weiterer Nachteil von kationischen Lipiden ist deren hohe Toxizität.

1.4.2.4 Kationische Polymere

Analog zu den kationischen Lipiden werden synthetische kationische Polymere zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Der Gentransfer der Polykation-DNA-Komplexe wird im Allgemeinen *Polyfektion* genannt. Die Polykationen kondensieren mit DNA zu kleinen Partikeln. Eines der ersten und einfachsten kationischen Polymere, die für den Gentransfer verwendet wurden, ist Poly-L-lysin [49]. Dieses System kann eine hohe Transfektion in die Zellen induzieren. Eine Reihe neuer Gentransfersysteme wurde daraus entwickelt [50,51,40]. Während die Forschung sich zuerst auf das Polypeptid Poly-L-lysin (PLL) konzentrierte, gewannen in den letzten Jahren die synthetischen Polykationen immer mehr an Bedeutung in der gentherapeutischen Grundlagenforschung. Einige dieser kationischen Polymere sind in Abb. 1.10 dargestellt.

Neue Transfersysteme auf Basis von Poly(4-vinylpyridin) (PVP) wurden von Kabanov et al. [52] untersucht. Im Gegensatz zu 2-Diethylaminoetherdextran (DEAE-Dextran) oder Polybren (Hexadimethrindibromid) [53] konnte gezeigt werden, dass PVP stabile, lösliche Komplexe mit DNA formt. Eine signifikante Transfektion wird ohne eine zusätzliche Schockbehandlung erreicht. Weitere relevante Beispiele für synthetische Transfersysteme sind intakte und zum Teil abgebaute Polyamidoamin-Dendrimere [54], die eine ähnliche chemische Struktur wie PLL aufwiesen, sich aber deutlich bezüglich ihrer Konformation (hochverzweigte, definierte Polymere) unterschieden. Diese Systeme erzielen 100- bis 1000fach höhere Transfektionen als die PLL-DNA-Komplexe [55]. Die guten Transfektionsergebnisse werden der Konformation und Komplexbildungseigenschaft dieser Dendrimere zugeschrieben.

Andere Studien beinhalten Untersuchungen zu kationischen Polyacrylaten und -methacrylaten wie das Poly[(dimethylamino)ethylmethacrylat] (PDMAEMA) [56,57]. PDMAEMA komplexiert DNA zu stabilen, homogenen Partikeln von etwa 150 nm, die hohe Transfektionen erzielen. Leider werden diese Systeme mit zunehmendem Polymeranteil toxischer. Ein vielversprechendes Transferreagenz ist das Poly(ethylenimin) (PEI) [58]. PEI erreicht hohe Transfereffizienzen in verschiedenen Zelllinien, wobei vor allem das hochverzweigte PEI gute Ergebnisse *in vitro* zeigt [59]. Die Effektivität von PEI erhöht sich dabei mit zunehmender Molmasse [60]. Ein kommerzielles PEI ist als ExGen 500™ erhältlich. Dieser effektive Vektor zeigt gute Transfektionseigenschaften *in vitro* und *in vivo* an z.B. Lungenepithelzellen [61,62]. Hochmolekulares PEI weist leider eine erhöhte Toxizität auf, die durch hohe Bindungsaffinität an die Zellmembranen hervorgerufen wird. Diese Toxizität variiert mit der Größe und Struktur des Polymers.

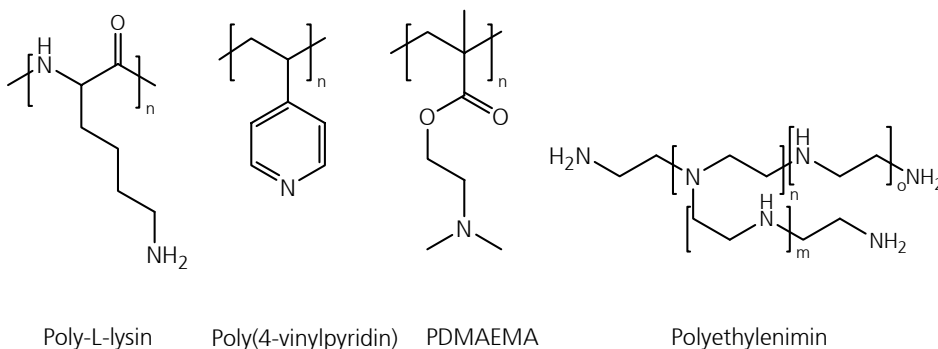


Abb. 1.10: Typische kationische Polymere in gentherapeutischen Untersuchungen

Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Transfektion stark von dem Ladungsverhältnis (N/P-Verhältnis) des Polymer-DNA-Komplexes abhängig ist [40,52]. Dieses N/P-Verhältnis (Anzahl der Stickstoffatome des Polykations im Verhältnis zu den Phosphoraten der DNA) beeinflusst auch Größe, Ladung, Löslichkeit und Dimension des Komplexes. Dies wird durch unterschiedliche Polymersysteme bestätigt [56,63]. Die Transfektion korreliert mit der Bildung von löslichen Komplexen mit kleiner Größe und positiver Ladung. Hohe Transfektionen werden nur mit Überschuss an kationischem Polymer erreicht [58]. Die Zunahme der Ladung ist hierbei immer mit einer Erhöhung der Zytotoxizität verbunden.

In neueren Studien werden die oben genannten Polykationen mit hydrophilen Polymeren zu Block- und Pfropfcopolymeren modifiziert. Diese Polymere bilden mit DNA Komplexe von erhöhter Stabilität, die gleichzeitig eine Abschirmung der Ladung durch die hydrophilen Seitenketten aufweisen. Diese Systeme repräsentieren kombinierte Eigenschaften von amphiphilen Blockcopolymeren (Mizellbildung, gute Lösungseigenschaften) und Polyelektrolyt-Komplexen (pH- und Salz-Sensitivität). Die Copolymer-DNA-Komplexe besitzen einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Schale. Die Löslichkeit wird direkt von der Kettenlänge des nichtionischen, hydrophilen Segmentes beeinflusst. In den meisten Fällen entstehen Komplexe von unter 100 nm Durchmesser, deren Ladung von der Copolymerzusammensetzung abhängt [64].

Blockcopolymere vom Typ A-B werden vielfältig synthetisiert [65,66]. In diesen Studien erzielen die Blockcopolymere Poly-L-lysin-*b*-Poly(ethylenoxid) (PLL-*b*-PEO) höhere Transfektionen *in vitro* im Vergleich mit unmodifiziertem PLL [67,68]. Es kann eine Abschirmung der Ladung durch Modifizierung mit Poly(ethylenoxid), die gleichzeitig Schutz vor Nukleasen gewährt, erreicht werden [69]. Neben Blockcopolymeren werden auch Pfropfcopolymere aus Poly-L-lysin-*g*-Poly(ethylenoxid) (PLL-*g*-PEO) synthetisiert, indem eine Pfropfung von monofunktionalisiertem PEO auf PLL durchgeführt wird. Diese Copolymere sind in der Regel polydispers. Pfropfcopolymer-DNA-Komplexe bilden kleine Partikel mit höherer Stabilität als die unmodifizierten Polymere. Die *in vitro* Transfektion der Komplexe nimmt mit längeren PEO-Segmenten und höherem Pfropfanteil zu [70,71].

Copolymere auf Basis von DMAEMA wurden ebenfalls entwickelt. Diese kationischen Block- und Pfropfcopolymere (PDMAEMA-*b*-PEO, PDMAEMA-*g*-PEO) zeigen eine höhere Transfektion und Stabilität in Lösung im Vergleich zum unmodifizierten PDMAEMA. Es wird eine Abschirmung der Ladung erzielt, die Toxizität erniedrigt sich mit zunehmendem Anteil an PEO [72,73].

In neueren Gentransferansätzen werden Pfropfcopolymere aus Poly(ethylenimin) (PEI) und Poly(ethylenoxid) in verschiedenen Copolymerzusammensetzungen hergestellt. Hierbei wird sowohl die Segmentlänge des PEO als auch der Pfropfanteil variiert. Diese PEI-*g*-PEO-Systeme weisen ein geringeres Zetapotential gegenüber unmodifiziertem PEI auf, eine niedrigere Toxizität stellte sich ein. Die Modifikation mit PEO ermöglicht eine Abschirmung vor Proteinen speziell in *in vivo* Transfektionsversuchen [74,75]. Die Lösungseigenschaften der Komplexe mit DNA verbessern sich signifikant. Es werden höhere Transfereffizienzen beobachtet. Lange PEO-Segmente verhindern auf Grund sterischer Effekte gute Transfektionen [76]. Ein Pfropfcopolymer aus PEI und vielen kurzen PEO-Ketten erwies sich dagegen als ein effektives Gentransfersystem [77].

1.4.2.5 Rezeptorvermittelter Gentransfer

Große Erwartungen werden in Verfahren gesetzt, die auf der rezeptorvermittelten Endozytose beruhen und sowohl eine hohe Effizienz als auch eine Spezifität des zellulären *targeting* versprechen. Eukaryotische Zellen nutzen die rezeptorvermittelte Endozytose, um verschiedene Makromoleküle (Proteine, Polynucleotide, Polysaccharide, Hormone und Cytokine) aus dem extrazellulären Milieu aufzunehmen.

Die ersten Modellexperimente zum rezeptorvermittelten Gentransfer verwendeten Poly-L-lysin als DNA-Bindungsmolekül sowie Asialoorosomuroid als Liganden. Mit diesen Konjugaten gelingt ein effizienter Transfer in Leberzellen, die den Asialoglykoproteinrezeptor überexprimieren [49,78].

Weitere Versuche wurden mit Transferin (Tf) als Ligand durchgeführt, um den überexprimierten Transferin-Rezeptor auf Tumorzellen anzusteuern. Diese Tf-PLL-Konjugate erreichen einen hohen Grad an Transfektion in eukaryotischen Zellen [79,80]. Leider können die Ergebnisse nicht auf *in vivo* Studien übertragen werden, da die kationischen Partikel sofort eine Wechselwirkung mit den Bestandteilen des Blutplasmas eingingen. Wagner et al. untersuchten daraufhin Tf-PEI-DNA-Partikel mit einer Zumischung des hydrophilen Polymers PEO nach der Komplexierung (post-PEGylation). Es wird sowohl eine Abschirmung der Ladung als auch ein direkter Schutz vor Proteinen erreicht [81]. Die Effizienz der Transfektion erhöht sich signifikant gegenüber dem unmodifizierten PEI. *In vivo* lässt sich vor allem ein Transfer in die Tumorzellen der Maus nachweisen [82,83].

Andere Gentherapieuntersuchungen setzen Folsäure als Ligand ein. Die Folsäure wird bei diesen Studien meist über einen PEO-Seitenarm an das PEI gebunden. Es wird ein effizienter Gentransfer in Tumorzellen erreicht, der durch freie Folsäure blockiert werden kann [84]. Große Beachtung finden in letzter Zeit Zucker-Liganden (Galactose, Mannose, Lactose), die sowohl in Transfektionsstudien an Hepatozyten als auch an Lungenepithelzellen getestet werden [85,86]. Letztere erregen besonderes Interesse in der Erforschung an der Zystischen Fibrose. In Tabelle 1.2 sind weitere Liganden dargestellt, die in Transfektionsstudien an spezifischen Zellen untersucht wurden.

Tabelle 1.2: Liganden für den Gentransfer an spezifischen Zielzellen

Ligand	Rezeptor	Zielzelle	Lit.
Transferin (Tf)	Transferin-Rezeptor	Tumorzellen	87,88,89
Folsäure	Folsäure-Rezeptor	unterschiedliche Tumorzellen	90,91,92
Galactose Lactose	Asialoglykoprotein-Rezeptor	Hepatozyten	93,94,95,96
Mannose	Mannose-Rezeptor	Dendritische Zellen (Hepatozyten) Makrophagen	97,98 99,100,101,102
Epidermal Growth Factor (EGF)	EGF-Rezeptor	Tumorzellen	103,104
RGD-Peptide	Integrins	Epithelzellen	105,106

1.5 Erhöhung der Transfektion durch Kernlokalisationssequenzen oder Fusionsproteine

Die Kernlokalisationssequenzen (NLS: nuclear localisation sequence) sind zumeist basische Peptidsequenzen, die endogenen Proteinen und Nucleinsäuren den Transport in den Zellkern ermöglichen. Der Transport vom Zytosol in den Zellkern findet über die Zellkernporen statt. Die Kernporen bilden einen Kanal von etwa 9 nm Durchmesser, durch den eine passive Diffusion von DNA-Fragmenten bis zu 200 Basenpaaren und von Proteinen, die kleiner als $60 \cdot 10^3$ g/mol sind, stattfindet. Größere Moleküle werden durch einen aktiven und selektiven Mechanismus aufgenommen, der mittels Bindung einer Kernlokalisationssequenz an den Kerntransporter induziert wird. Durch den Einsatz solcher Kernlokalisationssequenzen in Gentransfersystemen könnte eine der größten Barrieren des nicht-viralen Gentransfers, die Überwindung der Kernmembran, bewältigt werden.

Das aus 11 Aminosäuren bestehende Arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Proteins vereinigt zwei bemerkenswerte Eigenschaften, die zur Überwindung der Barrieren beitragen könnten. Die basische Peptidsequenz (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) repräsentiert einerseits eine Proteintransduktionsdomäne (PTD) und andererseits eine Kernlokalisationssequenz (NLS) [107]. Frankel et al. beobachteten die Aktivierung eines Reportergens nach der Zugabe des HIV-1 TAT-Proteins zum Zellkulturmedium. Diese beobachtete Aktivität kann nur im Zellkern ausgelöst werden, so dass das HIV-1 TAT-Protein zuvor die Zell- und Kernmembran überwunden haben musste [108]. Neuerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Kombination von nicht-viralen Transfektionsreagenzien mit der TAT-Sequenz zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz führte [109]. Dabei wurde beobachtet, dass die dimere TAT-Sequenz (TAT)₂ am effektivsten war.

Die wichtigste Strategie, die vom Virus kopiert werden sollte, ist eine Methode, die das Verlassen der Endosomen und den sicheren Transfer der genetischen Informationen in den Zellkern sichert. Eine Annäherung an dieses Ziel ist der Gebrauch einer kurzen Aminosäuresequenz, die vom N-Terminus des Haemophilus Influenza Haemagglutinin-2 abgeleitet ist. Diese Aminosäuresequenz ist verantwortlich für das endosomale Entkommen während der Ansäuerung in den späten Endosomen. Der Lysis der therapeutischen DNA aus den Genvektoren könnte so entgegengewirkt werden.

Große Beachtung finden seit kurzem die pH-abhängigen Fusionsproteine, die nach ähnlichen Strukturprinzipien synthetisiert wurden. Eines dieser synthetischen Fusionsproteine ist KALA. KALA ist ein amphipathisches (amphiphiles) Peptid mit einer Wiederholungssequenz von Lys-Ala-Leu-Ala, das eine pH-abhängige Konformationsänderung vom random coil zur α -Helix bei Erhöhung des pH-Wertes von 5,0 auf 7,5 durchläuft [110]. KALA kann mit der Endosomenmembran reagieren, sie stören und die DNA ins Zytoplasma transferieren, wodurch eine Steigerung der Transfektion erzielt wird [111,112]. Die Nachteile der Fusionspeptide sind ihre geringe Stabilität, die hohen Kosten der Synthese und das immunogene Potenzial der Strukturen.

1.6 Genexpression mittels Reportergenen

Der Einsatz von Reportergenen bietet die Möglichkeit zur Untersuchung der Genexpression. Reportergene kodieren Proteine, die durch enzymatische Aktivität oder biochemische Methoden leicht quantifizierbar sind [113]. Idealerweise werden sie nicht oder nur in geringem Umfang in eukaryotische Zellen endogen exprimiert. Häufig verwendete Reporter sind das β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aus *Escherichia coli*, das Gen für menschliches Wachstumshormon (*hGH*) und das Luciferase-Gen (*luc*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* [113].

Die Aktivität des Reporterprodukts ist im Allgemeinen direkt proportional der Transkriptionsaktivität in der Zelle.

Das Reportergen Luciferase wurde für alle Transfektionsversuche in dieser Arbeit herangezogen. Es wurde erstmalig von de Wet et al. sequenziert und kloniert [114]. Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (firefly luciferase) ist ein monomeres Protein (62 kD).

Luciferase katalysiert die Anreicherung von Sauerstoff am Luciferin in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} und erzeugt ein energiereiches Peroxy-Zwischenprodukt. Dieses zerfällt spontan wieder und erzeugt dabei elektronisch angeregte Singulett-Übergänge ($<10^{-9}$ s), die ein Photon mit hoher Effizienz im sichtbaren Bereich ($\lambda=530-590$ nm) emittieren. Die Quantenausbeute der Lumineszenz ist sehr hoch ($\sim 100\%$).

Die Luciferase-katalysierte Reaktion verläuft nach dem in Abb. 1.11 dargestellten Mechanismus.

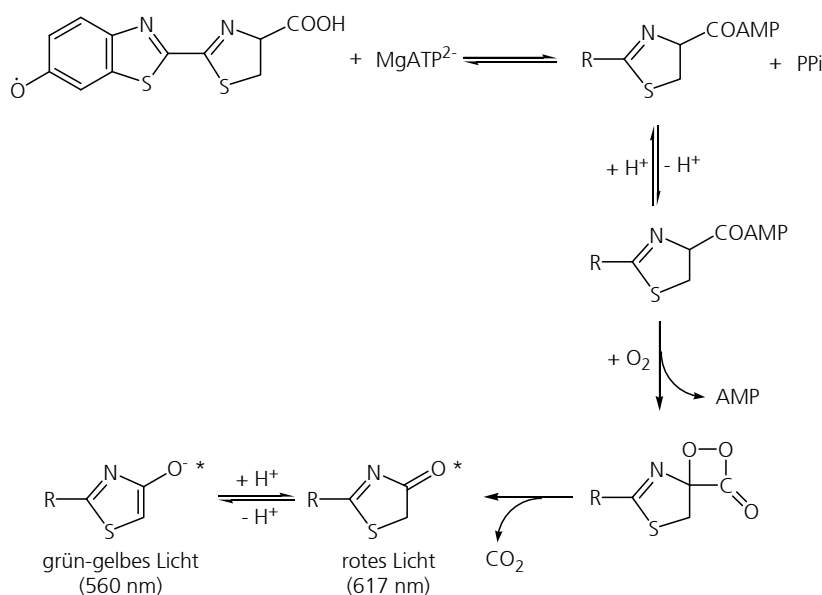


Abb. 1.11: Luciferase-katalysierte Reaktion [115]

Die Luciferase katalysiert die ATP-abhängige Oxidation von Benzothiazol-Luciferin und erzeugt durch den Zerfall eines Peroxy-Zwischenproduktes Licht im gelb-grünen ($\lambda=530-590$ nm) bzw. im roten (610-630 nm) Bereich.

Liegt ein Substratüberschuss vor, so ist die Stärke des emittierten Lichtblitzes proportional der Luciferase-Aktivität. Zur Detektion dieses Lichtes wird meist ein Luminometer verwendet, in dem eine Linearität des Assays über acht Größenordnungen im Konzentrationsbereich von 10 pg/l bis 1 mg/l erzielt werden kann.

2 Motivation und Ziele der Arbeit

Das Konzept der somatischen Gentherapie ist zweifellos revolutionär und wird zu einem völlig neuen Verständnis der Therapie von Krankheiten führen. Während mit traditionellen Arzneimitteln in vielen Fällen nur eine symptomatische Behandlung erfolgen kann, hat die somatische Gentherapie das Potential, viele Krankheiten zu heilen. Insbesondere werden hierfür effiziente Gentransfer-Methoden gebraucht. Bei den nicht-viralen Genvektoren (auf Basis von kationischen Polymeren, Peptiden, Lipiden) wird derzeit nur eine unzureichende Genexpression erzielt. Für den effizienten Gentransfer in *in vivo* Therapien sind darüber hinaus selektive Vektoren erforderlich, die beispielsweise bei Mucoviszidose-Patienten das gentherapeutische Material ausschließlich in die erkrankten Atemwegszellen transfizieren.

Ziele dieser Arbeit sind die Synthese und Charakterisierung neuer nicht-viraler Genvektoren (Polykation-DNA-Komplexe) sowie erste Applikationsuntersuchungen zur Eignung dieser Systeme für die somatische Gentherapie. Dabei soll eine höhere Transfektionseffizienz und -selektivität der neu synthetisierten Genvektoren im Vergleich zu herkömmlichen nicht-viralen Vektorsystemen erreicht werden. Derzeit werden bereits derartige Vektoren auf Basis von Poly(ethylenimin) (PEI) für die Gentherapie eingesetzt. Deren hohes Transfektionsvermögen ist jedoch stets an eine erhöhte Zelltoxizität sowie geringe Zellselektivität gebunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher durch eine gezielte chemische Modifizierung von PEI sowohl die Biokompatibilität als auch die Selektivität der entsprechenden PEI-Vektoren verbessert werden.

Die Lösung dieser Aufgabenstellung erfolgt durch folgende Vorgehensweise:

- (a) Synthese und Charakterisierung der kationischen Gerüstpolymere
 - Auswahl und Charakterisierung des geeigneten PEI-Substrates und Modifizierungsreagenzes (PEO) zur Verbesserung der Biokompatibilität
 - Synthese und Charakterisierung (NMR-Spektroskopie, Analytische Ultrazentrifugation, Lösungsviskosimetrie, Densimetrie, SEC mit Multidetektion) von PEI-Derivaten mit variablen Poly(ethylenoxid)-Gehalten
 - Testung der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität dieser Pfropfcopolymere
- (b) Herstellung nicht-viraler Genvektoren mit spezifischen Liganden (Rezeptorliganden)
 - Auswahl der Liganden (Folsäure, Triiod-L-thyronin, Uronsäuren der Galactose, Mannose, Glucose und die Lactobionsäure) in Abstimmung mit den eingesetzten Zellkulturen
 - Funktionalisierung der kationischen Copolymere mit den Rezeptorliganden und Charakterisierung der neuen kationischen Ligand-Copolymere

- Komplexierung der Ligand-funktionalisierten Polykationen mit einem Reporter-gen (pCMVluc) in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen und Untersuchung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials.
- Transfektionsversuche dieser Ligand-Vektoren an spezifischen Zellkulturen wie z.B. Leberkrebs- (HepG2), Gebärmutterhalskrebs- (HeLa) und Atemwegsepithelzellen (16HBE)
- *In vitro* Experimente der geeigneten Ligand-Vektoren mit Überschuss an freien Liganden zur Aufklärung eines rezeptorvermittelten Gentransfers
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der *in vitro* Transfektion
- *In vivo* Testung der Ligand-funktionalisierten Vektoren an Mäusen

(c) Herstellung von neuartigen Genvektoren auf Basis natürlicher Polymere

- Synthese und Charakterisierung von kationischen Stärkepfropfcopolymeren mit T3- und Mannuronsäure-Liganden
- Synthese von Vektoren mit speziellen Peptiden, die sich durch Kernlokalisationssequenzen auszeichnen (z.B. TAT)
- Applikationen in Transfektionsexperimenten

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese und Charakterisierung der kationischen Gerüstpolymere

Poly(ethylenimin) (PEI) wird oft in der somatischen Gentherapie als Gerüstpolymer für synthetische kationische Polymervektoren eingesetzt. Es ist bekannt, dass PEI hohe Transfektionsraten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erzielt [58,59,116,117]. Grundsätzlich besitzt hochverzweigtes PEI gegenüber linearem PEI eine höhere Transfektionseffektivität. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hochverzweigtes PEI sowohl primäre und sekundäre als auch tertiäre Amino-Gruppen enthält; das Molekül erreicht eine höhere Pufferkapazität, die bei dem Prozess des endosomalen Austritts in der Zelle (s. Kapitel 1.2) eine entscheidende Rolle spielt.

PEI weist eine hohe Kationen-Ladungsdichte auf, da bei diesem Polymer jedes dritte Atom in wässriger Lösung protoniert werden kann. Auf Grund dieser Eigenschaften findet PEI seit über 30 Jahren verbreitete Anwendung in der Kosmetik- und Papierindustrie sowie als Fällungsmittel in wässrigen Systemen. Es wird als harmlos und nicht toxisch eingestuft.

3.1.1 Ausgangspolymer Poly(ethylenimin) (PEI)

Das hochverzweigte, breitverteilte, wasserfreie Poly(ethylenimin) (PEI) ($M_w=25\ 000$ g/mol) der Fa. BASF (Lupasol WF) mit einem Amino-Gruppen-Verhältnis (prim : sek : tert) von etwa 1:2:1 wurde als Precursor-Polymer eingesetzt. Durch die Fraktionierung des PEI mit Hilfe der Ultrafiltration (10 kD-Membran, regenerierte Cellulose) konnte eine engere Molmassenverteilung erzielt werden. Hierbei wurden gleichzeitig niedermolekulare Verunreinigungen abgetrennt.

3.1.2 Pfropfcopolymere Poly(ethylenimin)-graft-Poly(ethylenoxid) (PEI-g-PEO)

Beim Gen-Targeting in Zellkultur werden Vektoren, bestehend aus DNA und kationischem Polymer (PEI), eingesetzt. Hierbei wird die Wechselwirkung der positiven Ladung des PEI und der anionischen Ladung der DNA zur Bildung eines kompakten Komplexes genutzt, in dem sich die DNA verdichtet und durch das Polymer geschützt wird. Die Transfektion in die Zelle ist hierbei stark von dem Ladungsverhältnis (N/P-Verhältnis) des Polymer-DNA-Komplexes abhängig [40,52]. Sie korreliert mit der Bildung von löslichen Komplexen mit kleiner Größe und positiver Ladung. Hohe Transfektionsraten werden nur mit Überschuss an kationischem Polymer (PEI) erreicht [58]. Die Zunahme der Vektor-Ladung (Nanopartikel gebildet aus Polykation und DNA) ist bei der Verwendung von PEI immer mit einer Erhöhung der Zytotoxizität verbunden. Die kationische Ladung des Genvektors ist aber auch für eine *in vivo* Therapie problematisch, da die zirkulierenden Proteine im Blutplasma leicht an die kationischen Polymer-DNA-Komplexe binden (unspezifische Adsorption) und der Vektor seine Zielzelle nicht erreichen kann.

Eine Oberflächenmodifizierung des Vektors mit z.B. Poly(ethylenoxid) (PEO) erhöht die Biokompatibilität, da die kationische Ladung des PEI durch die PEO-Ketten abgeschirmt werden kann. Hierdurch kann die Zirkulationszeit der Vektoren in der *in vivo* Therapie deutlich erhöht werden. Ein Block- oder Pfropfcopolymer aus PEI und dem hydrophilen Polymer PEO sollte demnach eine Verbesserung der Löslichkeit des Komplexes in wässrigen Systemen und eine Erniedrigung der Toxizität erzielen. Für Transfektionsstudien an geeigneten Zellen wurden Pfropfcopolymere aus PEI mit einer unterschiedlichen Zahl an PEO-Seitenketten der Molmasse 400 g/mol hergestellt. Die Synthese von Poly(ethylenimin)-*graft*-Poly(ethylenoxid) (PEI-*g*-PEO) wurde wie von Sedlák und Cölfen beschrieben durchgeführt [118]. In einem ersten Schritt wurde der Poly(ethylenoxid)₈-monomethylether (8 Ethylenoxid-Einheiten) mit Epichlorhydrin umgesetzt (Abb. 3.1). Hierbei reagiert das endständige, nucleophile O-Atom des Poly(ethylenoxid)₈-monomethylethers in einer nucleophilen Substitution mit dem elektrophilen C-Atom des Epichlorhydrins in stark alkalischer Lösung. Die Öffnung des Epoxid-Rings wird unter den angewandten Synthesebedingungen vermieden.

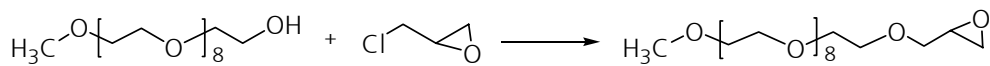


Abb. 3.1: Herstellung von Methoxy-poly(ethylenoxid)₈-glycidylether

In einem weiteren Schritt wurde der Glycidylether unter Öffnung des Epoxidringes mit PEI zum Pfropfcopolymer Poly(ethylenimin)-*graft*-Poly(ethylenoxid)₈ (PEI-*g*-PEO) umgesetzt (Abb. 3.2).

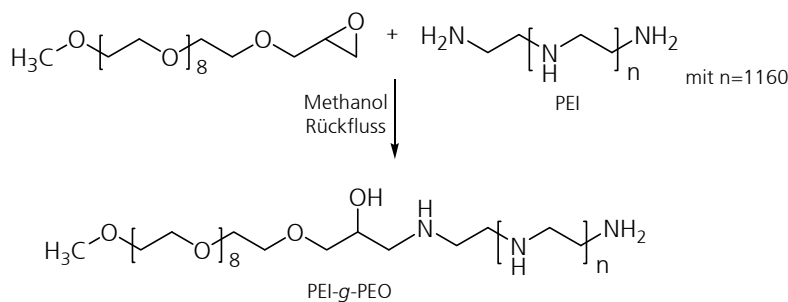


Abb. 3.2: Synthese von Poly(ethylenimin)-*graft*-Poly(ethylenoxid)₈

3.1.3 Physikochemische Charakterisierung der kationischen Ausgangspolymere

3.1.3.1 Copolymerzusammensetzung

Die Copolymerzusammensetzung der Pfropfcopolymere wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die chemischen Verschiebungen δ wurden an Hand des Signals von H₂O (δ(¹H)=4,72 ppm) normiert und entsprechend den angegebenen Werten in der Literatur [118] zugeordnet. Aus dem Vergleich der Integralfächen des Multipletts bei 2,2-2,8 ppm für PEI und des Multipletts bei 3,5-3,9 ppm für PEO lässt sich die Anzahl der aufgepfropften Seitenketten errechnen.

3.1.3.2 Hydrodynamischer Durchmesser der Pfropfcopolymere

Die Partikelgröße der polymeren Genvektoren stellt einen wichtigen Parameter für einen Erfolg in der Gentherapie dar. Sie sollte bei einer *in vivo* Anwendung der Polymer-DNA-Komplexe kleiner als 200 nm sein, da kleine Partikeldurchmesser essenziell für eine effektive *Extravasation* sind - den Prozess des Ausscheidens oder Überwechselns aus dem Blutkreislaufsystem in die umliegenden Gewebe. Ein weiterer Vorteil von geringen Partikelgrößen besteht in einer Verlängerung der Verweildauer im Blutkreislaufsystem, da u.a. die Wechselwirkungen der Partikel mit dem RES (Retikuloendotheliales System) erniedrigt werden und somit der Erfolg einer Transfektion in die Zielzellen erhöht werden kann.

Die Molekülgröße der kationischen Polymere in wässrigen Systemen gibt daher einen ersten Anhaltspunkt, ob die synthetisierten Polymere erfolgreich in der Gentherapie eingesetzt werden können. Eine stabile, monomodale Verteilung mit Durchmessern unter 50 nm ist wünschenswert für alle Polykationen.

Der hydrodynamische Durchmesser d_h der Pfropfcopolymere und dessen Verteilung (PDI) in Lösung wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Alle kationischen Ausgangspolymere (PEI, PEI-*g*-PEO) weisen monomodale, breite Verteilungen der Durchmesser auf; dies ist darauf zurückzuführen, dass das hochverzweigte PEI bereits in einer breiten Molekulargewichtsverteilung vorliegt (PDI=0,22). Die hydrodynamischen Durchmesser steigen geringfügig mit steigendem Umsetzungsgrad an und liegen bei allen Precursor-Polymeren im Bereich von 10-16 nm (Abb. 3.3, Tabelle 3.1).

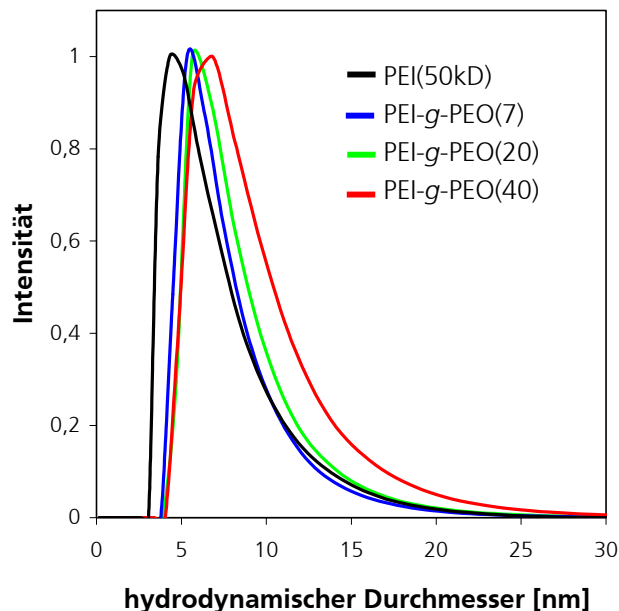


Abb. 3.3: Größenverteilungen der Pfropfcopolymere PEI-*g*-PEO entsprechend der Intensitätsverteilung der dynamischen Lichtstreuung

Tabelle 3.1: DLS-Ergebnisse der Pfropfcopolymere

	d_h [nm]	PDI
PEI(50kD)	10,6	0,22
PEI- <i>g</i> -PEO(7)	11,9	0,28
PEI- <i>g</i> -PEO(20)	12,9	0,30
PEI- <i>g</i> -PEO(40)	15,7	0,34

d_h : hydrodynamischer Durchmesser

PDI: Polydispersitätsindex

3.1.3.3 Molekulargewichtsbestimmung der Precursor-Polymere

(1) Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der Analytischen Ultrazentrifuge

In der Analytischen Ultrazentrifuge (AUZ) wird die Molmasse von sedimentierenden Teilchen im Zentrifugalfeld bestimmt. Durch die Zentrifugalkraft werden die gelösten Moleküle je nach Größe und Form verschieden schnell zum Zellboden sedimentieren. Um Polymere von Molmassen zwischen 10^4 und 10^6 g/mol zur Sedimentation zu bringen, ist eine hohe Radialbeschleunigung, resultierend aus hohen Drehzahlen des Rotors, notwendig; diese liegen zwischen 5000 rpm und 50000 rpm.

Aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf lassen sich die Sedimentationskoeffizientenverteilungen der Polymere ermitteln. Diese wurden mittels einer Gaussfunktion angepasst. Die am Peakmaximum ermittelten Sedimentationskonstanten wurden den Svedbergkonstanten S_0 bei $c=0$ g/l gleichgesetzt. Für die Berechnung der relativen Molmasse M_p^{AUZ} wurde die Gleichung 3.1 nach Linow und Philipp [119] herangezogen. Durch diese Gleichung ist es möglich, die Molmasse des Polymers nur durch eine einzige Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit abzuschätzen.

$$\text{Gleichung 3.1} \quad M_p^{AUZ} = 2,406 \cdot 10^{25} \cdot \left(\frac{S_0 \cdot \eta_0}{1 - \bar{v} \cdot \rho_0} \right)^{3/2} \cdot ([\eta] \cdot k_{SB})^{1/2}$$

mit	S_0	Svedbergkonstante [s]
	$[\eta]$	Intrinsische Viskosität des Polymers [cm^3/g]
	k_{SB}	Schulz-Blaschke-Konstante
	η_0	Viskosität des Lösemittels [$\text{g}/\text{cm} \cdot \text{s}$]
	\bar{v}	partiell, spezifisches Volumen des Polymers [cm^3/g]
	ρ_0	Dichte des Lösemittels [g/cm^3]

Die erforderlichen Grenzviskositäten und Schulz-Blaschke-Konstanten wurden mittels Lösungsviskosimetrie ermittelt; das partielle, spezifische Volumen wurde durch Verwendung eines Biegeschwingers bestimmt.

Geknäuelte Polymere, die einen guten Lösungszustand im Lösemedium aufweisen, besitzen Schulz-Blaschke-Konstanten k_{SB} zwischen 0,3 und 0,5. Da aber ein hochverzweigtes Poly(ethylenimin) als Ausgangsprodukt eingesetzt wurde, wurde bereits für das PEI eine hohe k_{SB} von 1,3 ermittelt [120]. Ein Vergleich der berechneten Molmassen aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf kann in diesem Fall nur stattfinden, wenn die Schulz-Blaschke-Konstanten aller Precursor-Polymere ähnliche Werte aufweisen.

In Tabelle 3.2 sind die aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der AUZ ermittelten Molmassen der Pfropfcopolymere, die Grenzviskositätszahlen und Schulz-Blaschke-Konstanten sowie das partielle, spezifische Volumen der Polymere aufgelistet. Die Grenzviskositätszahlen weisen einen systematischen geringfügigen Anstieg mit zunehmendem Umsetzungsgrad auf. Die Schulz-Blaschke-Konstanten variieren hierbei in einem Bereich von 1,1 bis 1,4. Die Schulz-Blaschke-Konstante von PEI-g-PEO(7) liegt mit $k_{SB}=1,90$ nicht in diesem Bereich. Möglicherweise

lag bei dieser Polymerlösung kein optimaler Lösungszustand während der Messung der intrinsischen Viskosität vor. Die spezifischen Volumina der Pfropfcopolymere sinken mit zunehmendem Umsetzungsgrad. Eine Ausnahme bildet hierbei das höchstmodifizierte PEI-g-PEO(40). Bei diesem Polymer könnte auf Grund des hohen Modifizierungsgrades (ca. 40 PEO-Ketten pro PEI-Molekül) eine aufgeweitete Struktur (durchspültes Knäuel) vorliegen, die ein höheres spezifisches Volumen besitzt. Die Molmassen M_p^{AUZ} der Pfropfcopolymere nehmen, unter Einbeziehung der Werte $[\eta]$, k_{SB} und \bar{v}_0 , mit steigendem Umsetzungsgrad zu (ausgenommen PEI-g-PEO(40)).

Tabelle 3.2: Molmassen der Precursor-Polymere aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der AUZ

	$[\eta]$ [cm ³ /g]	k_{SB}	\bar{v}_0 [cm ³ /g]	M_p^{AUZ} [g/mol]
PEI	13,3	1,33	0,161	38900
PEI-g-PEO(7)	14,9	1,90	0,152	39900
PEI-g-PEO(20)	15,1	1,21	0,144	46500
PEI-g-PEO(40)	15,6	1,12	0,155	(37500)

(2) Sedimentationsgleichgewichtslauf in der Analytischen Ultrazentrifuge

Der Sedimentationsgleichgewichtslauf wird im Allgemeinen bei geringerer Geschwindigkeit durchgeführt. Der Sedimentation wirkt die durch die Brown'sche Molekularbewegung hervorgerufene Rückdiffusion entgegen. Bei genügend geringen Zentrifugalgeschwindigkeiten wird die Sedimentationsgeschwindigkeit gleich der Diffusionsgeschwindigkeit und es stellt sich ein Sedimentationsgleichgewicht ein. Die Konzentration der Probe an jeder Stelle der Ultrazentrifugezelle ändert sich nicht mehr mit der Zeit. Es bildet sich ein Konzentrationsprofil in der Messzelle aus.

Für die Auswertung des Gleichgewichtslaufes wurde zuerst die Meniskuskonzentration c_m unter Erhaltung der Zellkonzentration ermittelt (Gleichung 3.2).

$$\text{Gleichung 3.2} \quad c_m = c_0 - \frac{1}{r_b - r_m} \int_{r_m}^{r_b} c_{rel}(r) dr$$

mit c_0 Anfangskonzentration des Polymers [mg/g]
 c_{rel} relative Konzentration
 r_m Abstand am Meniskus der Messzelle
 r_b Abstand am Boden der Messzelle

Anschließend wurde die radiale Position r in eine dimensionslose Rotorkonstante X mittels der Meniskus- und Bodenposition umgewandelt (Gleichung 3.3).

$$\text{Gleichung 3.3} \quad X = \frac{r^2 - r_m^2}{r_b^2 - r_m^2}$$

Der Konzentrationsverlauf der Probe in der Sektorzelle wurde gegen die Rotorkonstante X dargestellt und der Kurvenverlauf durch eine Summe positiver Exponentialfunktionen approximiert,

in der eine Anzahl von $n=2$ (Gleichung 3.4) als ausreichend gefunden wurde [121]. Die Abb. 3.4 zeigt einen typischen Kurvenverlauf des PEI bei einer Konzentration von 2,1075 g/l.

Gleichung 3.4
$$c(x) = \sum_{i=1}^n k_i \cdot \exp(a_i \cdot X), \text{ mit } a_i > 0, k_i > 0$$

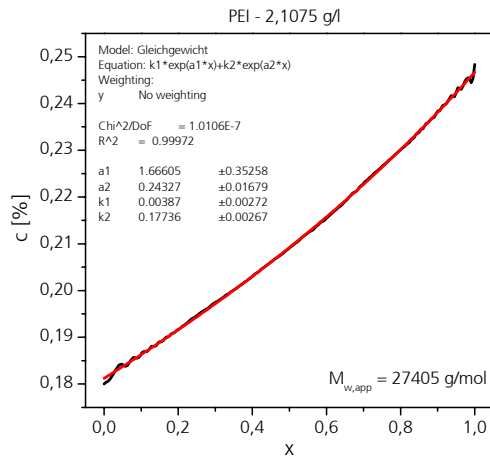


Abb. 3.4: Konzentrationsverlauf in der Sektorzelle der AUZ (schwarze Kurve) und Approximation (rote Kurve)

Die gewichtsgemittelte Molmasse $M_{w,app}$ wurde anschließend nach Gleichung 3.5 berechnet. Diese Berechnung hat sich allgemein für Polyelektrolyte bewährt [121,122].

Gleichung 3.5
$$M_{w,app} = \frac{1}{\lambda} \cdot \frac{(\exp a_1 - 1) \cdot k_1 + (\exp a_2 - 1) \cdot k_2}{c_0}, \text{ mit } \frac{1}{\lambda} = \frac{2 \cdot R \cdot T}{(1 - \bar{v} \cdot \rho_0) \cdot \omega^2 \cdot (r_b^2 - r_m^2)}$$

- mit
- ρ_0 Dichte des Lösemittels [g/cm^3]
 - \bar{v} partielles, spezifisches Volumen des Polymers [cm^3/g]
 - ω Winkelgeschwindigkeit [RAD/s] (hier: $\omega = 2\pi f$, mit $f = 12000 \text{ rpm}/60 \text{ s} = 200 \text{ s}^{-1}$)
 - R molare Gaskonstante [J/K/mol]
 - T Temperatur [K]

Für jede Konzentration des Polymers wurde eine gewichtsgemittelte Molmasse $M_{w,app}$ erhalten. Durch Auftragung von $1/M_{w,app}$ gegen die Anfangskonzentration c_0 und anschließender Extrapolation nach $c=0$ konnte eine „absolute“ gewichtsgemittelte Molmasse M_w in Übereinstimmung mit Gleichung 3.6 ermittelt werden (Abb. 3.5).

Gleichung 3.6
$$\frac{1}{M_{w,app}} = \frac{1}{M_w} + B \cdot c_0$$

- mit B 2. Virialkoeffizient der AUZ [$\text{l} \cdot \text{mol}/\text{g}^2$]

Der 2. Virialkoeffizient der AUZ (B) kann hierbei über folgende Beziehung (Gleichung 3.7) mit dem 2. Virialkoeffizient der Statischen Lichtstreuung (A_2) verglichen werden. Er lässt eine Aussage über den Lösungszustand des Polymers im verwendeten Lösungsmittel zu.

Gleichung 3.7 $B=2 \cdot A_2$

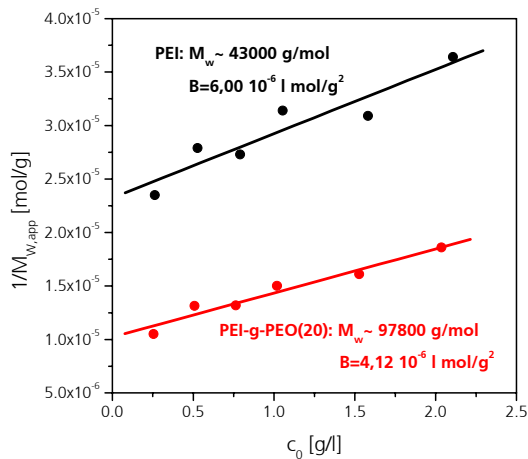


Abb. 3.5: Bestimmung der „absoluten“ gewichtsgemittelten Molmasse M_w in der AUZ

Für PEI wurde ein M_w von 43000 g/mol ermittelt; dies stimmt mit dem zuvor ermittelten M_p^{AUZ} aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf gut überein. Bei dem Pfropfcopolymer PEI-g-PEO(20) wurde ein höheres M_w (97800 g/mol) gegenüber dem M_p (46500 g/mol) aus dem Sedimentationslauf berechnet. Dies könnte zum einen daran liegen, dass bei dem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment eine Konzentration von 5 g/l verwendet und diese nicht auf $c=0$ extrapoliert wurde, denn aus Abb. 3.5 ist eindeutig zu erkennen, dass die Molmasse M_w des PEI-g-PEO(20) eine starke Abhängigkeit von der Konzentration aufweist. Zum anderen gibt das M_p die Molmasse am Peakmaximum und das M_w die gewichtsgemittelte Molmasse an. M_w liegt auf Grund der zur Berechnung verwendeten Wichtung stets höher als M_n und M_p , so dass beide Werte nicht direkt miteinander verglichen werden können. Nur bei sehr engverteilten Polymeren liegen ähnliche Werte von M_n , M_p und M_w vor. Ein deutlich höheres M_w gegenüber M_p könnte hier darauf hindeuten, dass die Pfropfung des PEI mit PEO-Ketten nicht optimal verlaufen und die Molmasse des Polymer breitverteilt ist.

3) Größenausschlusschromatographie mit Multidetektion (SEC-MALLS)

In der Größenausschlusschromatographie werden für die Trennung von Molekülen keine speziellen Wechselwirkungen zum Trägermaterial, sondern im Idealfall rein geometrische Poreneffekte verwendet. Gelöste Makromoleküle werden entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens getrennt. Das Trennprinzip der SEC beruht auf den unterschiedlichen Verweilzeiten der Makromoleküle in der stationären Phase; größere Moleküle dringen hierbei schlechter in die Poren des Trenngels ein als kleinere Moleküle. In homologen Reihen von Molekülen gleicher Gestalt eluieren daher die Polymere mit der größten Molmasse zuerst.

Die Bestimmung der Molmasse erfolgt durch eine Kalibrierung mit engverteilten polymeren Standards mit bekannter gewichts- und zahlenmittlerer Molmasse. Bei dieser Methode muss die Struktur und Geometrie des Analyten nahezu identisch mit der des Referenzmaterials sein, um im direkten Vergleich des Elutionsverhaltens von Standard und Analyt die tatsächliche Molmasse zu ermitteln.

Ausgehend von theoretischen Überlegungen zum Trennmechanismus in der SEC entwickelte Benoit ein universelles Kalibrierprinzip [123]. Dieses Prinzip ermöglicht eine SEC-Kalibrierung mit polymeren Standards zur Berechnung der Molmasse von beliebigen Polymeren, indem die intrinsischen Viskositäten der Referenzmaterialien und der Analyten als zusätzliche Kalibrierparameter verwendet werden.

Die Bestimmung von Molmassen in der SEC kann auch mittels molmassensensitiver Detektoren erfolgen. Ein weit verbreitetes Detektionsprinzip ist die Statische Lichtstreuung mit Vielwinkel-detektion (MALLS: Multi Angle Laser Light Scattering). In Kombination mit einem Konzentrationsdetektor kann die Molmasse an jeder Stelle des Elugramms absolut bestimmt werden.

Das Poly(ethylenimin) konnte nur unter weiteren Salzzusatz zum Eluenten ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + 1\% \text{HAc}$) in der SEC-MALLS vermessen werden. Das Elugramm des PEI weist hierbei ein *tailing* (Verschiebung des Peakmaximums zu kleinen Elutionsvolumina) auf, welches auf Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial schließen lässt. Zudem wurde eine niedrige Wiederfindung für den reinen PEI-Analyten beobachtet, das RI-Signal war um eine Größenordnung geringer als die entsprechenden Signale von niedrig-modifizierten Pfropfcopolymeren (<10%) bei gleicher Einwaage an PEI.

Die Auswertung der Molmasse sowohl mittels universeller Kalibrierung (UK) mit Poly(2-vinylpyridin)-Standards als auch mittels Lichtstreuung (LS) ergab für das PEI ein mittleres M_w von 50000 g/mol (Tabelle 3.3). Die konventionelle Kalibrierung (KK) lieferte dagegen einen viel zu geringen Wert von $M_w=16400$ g/mol, da mit Poly(2-vinylpyridin)-Standards kalibriert wurde. PVP besitzt sowohl eine andere chemische Struktur als auch eine andere Geometrie (linear) als das hochverzweigte und somit kompakte PEI in Lösung. Dementsprechend wurden bei dieser Auswertemethode nur apparente Molmassen und stets zu niedrige Werte bestimmt.

Das M_w^{AUZ} weist dagegen einen um etwa 14% abweichenden Wert auf. Diese Größenunterschiede in den Molmassen $M_{w,LS}$ und M_w^{AUZ} von etwa 10-20% wurden bereits bei Dautzenberg et al. [122] gefunden. Hierbei wurden mittels AUZ stets kleinere Molmassen als bei der SEC-MALLS erhalten. Diese Diskrepanz entsteht vermutlich durch die Abscheidung der hochmolekularen Polymer-Anteile (bzw. Aggregate) am Zellboden, die somit in der Berechnung von M_w^{AUZ} nicht berücksichtigt werden.

Für alle weiteren Berechnungen wurde für das ultrafiltrierte PEI eine Molmasse von 50000 g/mol angenommen.

Tabelle 3.3: Molmassenbestimmung der Pfropfcopolymere mittels unterschiedlicher Auswertemethoden in der SEC

	W_{PEG} [%]	M^{NMR} [10^3 g/mol]	$M_{w,KK}$ [10^3 g/mol]	$M_{w,UK}$ [10^3 g/mol]	$M_{w,LS,100\%}$ [10^3 g/mol]	$M_{w,LS,dn/dc}$ [10^3 g/mol]	D	M_w^{AUZ} [10^3 g/mol]
PEI(50kD)	0	50,0	16,4	50,1	-	49,8	1,49	43,0
PEI-g-PEO(7)	5	52,8	25,0	55,9	51,9	86,1	1,77	n.a.
PEI-g-PEO(20)	14	58,0	27,9	74,0	60,8	102,7	1,90	97,8
PEI-g-PEO(40)	24	66,0	32,0	89,9	83,0	126,3	2,33	n.a.

KK: konventionelle Kalibrierung, UK: universelle Kalibrierung, LS: Lichtstreuung

Die Elugramme der Pfropfcopolymere PEI-*g*-PEO weisen im Gegensatz zu PEI ein *heading* (Verschiebung des Peakmaximums zu hohen Elutionsvolumina) auf. Die Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial sind hier selbst bei kleinem Modifizierungsgrad (PEI-*g*-PEO(3); nicht abgebildet) deutlich geringer als bei unmodifiziertem PEI, was vorzugsweise auf eine Oberflächenmodifizierung schließen lässt. Aus Abb. 3.6 lässt sich erkennen, dass die Copolymere mit steigendem Umsetzungsgrad von PEO eine breitere Molmassenverteilung aufweisen und somit die Polydispersität *D* ansteigt. Das Elugramm des PEI-*g*-PEO(40) mit einem durchschnittlichen PEO-Anteil von 24% zeigte die ausgeprägteste Schulter im Bereich kleinerer Elutionsvolumina.

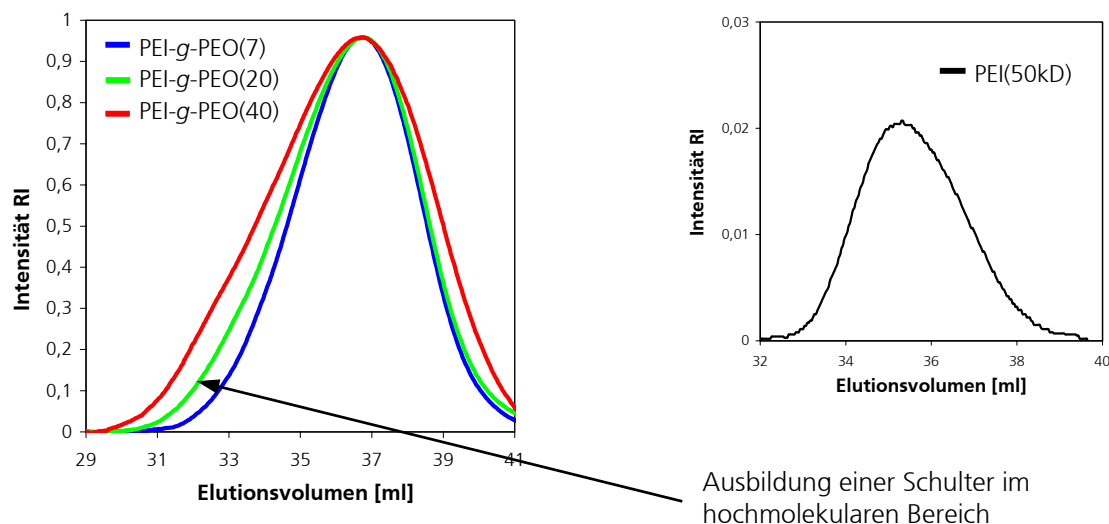


Abb. 3.6: Elugramme der Pfropfcopolymere und von PEI (kleine Abb.)

Bei idealer d.h. gleichmäßiger Pfropfung, sollte sich die Verteilung des Pfropfsubstrates entsprechend dem Modifizierungsgrad zu höheren Molmassen verschieben, ohne dass eine signifikante Verbreiterung der Polydispersität eintritt. Die Elugramme der Pfropfcopolymere (PEI-*g*-PEO) weisen jedoch ein feststehendes Peakmaximum bei zunehmender Peakverbreiterung auf. Diese Erscheinung ist aber nur dann zu erklären, wenn einerseits durch die Pfropfung bzw. Massenzunahme keine wesentliche Änderung im hydrodynamischen Volumen der entstehenden Pfropfcopolymere auftritt und ihre Struktur gegenüber dem Pfropfsubstrat PEI kompakter wird. Die gemessenen Grenzviskositäten der Pfropfprodukte (Tabelle 3.2) sind nahezu unabhängig vom Modifizierungsgrad des PEI, sie verifizieren demzufolge diese erste Annahme. Die o.g. Peakverbreiterung lässt andererseits auf eine uneinheitliche Pfropfung und/oder intermolekulare Verbrückungsreaktionen (Vernetzung durch Epichlorhydrin-Reste) schließen. Speziell der erste Fall - die chemische Uneinheitlichkeit der Molmassenfraktionen im Pfropfprodukt - erscheint durch die Ergebnisse der SEC-MALLS-Messung wahrscheinlich. In Abb. 3.7 ist die Auftragung der Molmassen aus der MALLS-Messung gegen das Elutionsvolumen (V_E) dargestellt. Dabei wurde zur Berechnung aller Molmassenfraktionen stets ein konstantes, extern gemessenes mittleres Brechungsindexinkrement dn/dc verwendet. Bei dem höher substituierten PEI (31% PEO) war kein konstanter Abfall von $\log M$ über V_E zu beobachten. Die im höhermolekularen Bereich des Elugramms (Schulter) abknickende Kurve (Vergleich mit gestrichelter Linie) weist entweder auf einen Wechsel der Molekülstruktur oder Änderung der

chemischen Zusammensetzung hin. Da die berechneten M_w -Werte der MALLS-Messung deutlich von den entsprechenden Molmassen der universellen Kalibrierung abweichen (bei reinem PEI stimmen die beiden ermittelten Werte gut überein), ist von einem chemisch uneinheitlichem Pfropfprodukt auszugehen. Weiterführende Aussagen zur spezifischen Pfropfdichte und Pfropfgrad der Copolymerfraktionen erfordern allerdings neben der RI-Detektion eine zusätzliche selektive Detektionsmöglichkeit, um das Pfropfsubstrat bzw. die Pfropfketten erfassen zu können. Beispielsweise wäre eine Komplexierung des PEI-Substrates mit Cu(II)SO_4 ($\lambda_{\text{max}} \sim 280 \text{ nm}$) für diese Untersuchung denkbar.

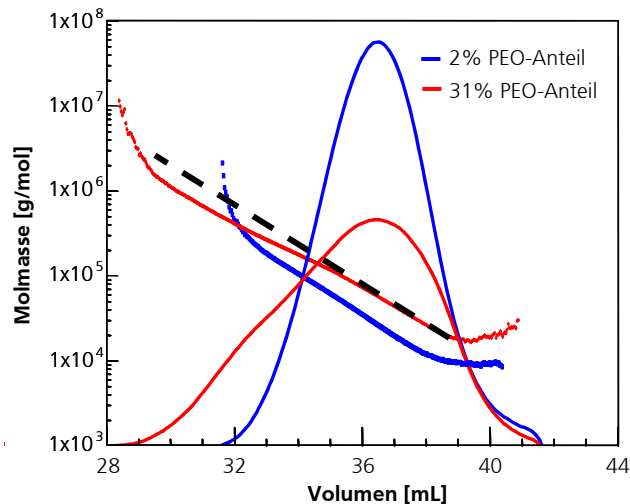


Abb. 3.7: $\log M$ - V_E -Beziehung zweier unterschiedlich substituierter Pfropfcopolymerer

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Molmassenbestimmung mittels universeller Kalibrierung die sichersten Werte liefert. Hierbei wurden Molmassen im Bereich von 50000-90000 g/mol ermittelt.

3.1.4 *In vitro* Transfereffizienz der kationischen Ausgangspolymerer

Die Transfektionsversuche wurden in der Gruppe von Dr. Rudolph am Dr. von Haunerschem Kinderspital in München mit einem Luciferase-Reportergen (pCMVluc) an Kulturen von zwei verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien bestanden aus Leberkrebs- (HepG2) und Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa). Die HeLa-Zellen sind seit über 50 Jahren im Einsatz. Sie stammen von Henrietta Lacks, die 1952 an Gebärmutterhalskrebs verstarb. Seitdem sind diese Zellen ein fester Bestandteil in der Krebsforschung und der Gentherapie.

Das Luciferase-Assay quantifiziert die eukaryontische Genexpression durch die Messung der Lumineszenz [124]. Die Messung der Transfektion basiert auf der durch das Enzym Luciferase katalysierten oxidativen Decarboxylierung von Luciferin zu Oxiluciferin. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches in einem Luminometer gemessen werden kann. Die Enzymaktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben und auf den Gesamtproteingehalt im Lysat bezogen (RLU pro 10 s pro mg Protein).

Der Gesamtproteingehalt der Zelle wird hier als Maß für die Toxizität mittels der Bradford-Methode bestimmt. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie

Brillant Blue von 465 nach 595 nm, welches bei der Anbindung des Triphenylmethanfarbstoffes an Proteine auftritt [124]. Ein niedriger Proteingehalt bedeutet eine geringe Zellvitalität. Wenn die Zellen durch die hohe Toxizität der Vektoren sterben, lösen sie sich von der Zellkulturschale ab und werden bei den anschließenden Waschschritten entfernt. Der Gesamtproteingehalt in der Zellkulturschale (bei Annahme einer einheitlichen Zellenbelegung vor dem Transfektionsversuch) ist dadurch niedriger.

Die Abb. 3.8 zeigt die gemessene Lumineszenz (RLU) des Luciferase-Assays an den Zelllinien HeLa und HepG2. Hierbei wurden ~20000 Zellen pro Well (Vertiefung) der Mikrotiterplatte ausgesät und diese mit 0,5 µg Plasmid pro Vektor transfiziert. Typischerweise wird die Lumineszenz in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses zwischen DNA und kationischem Polymer bestimmt.

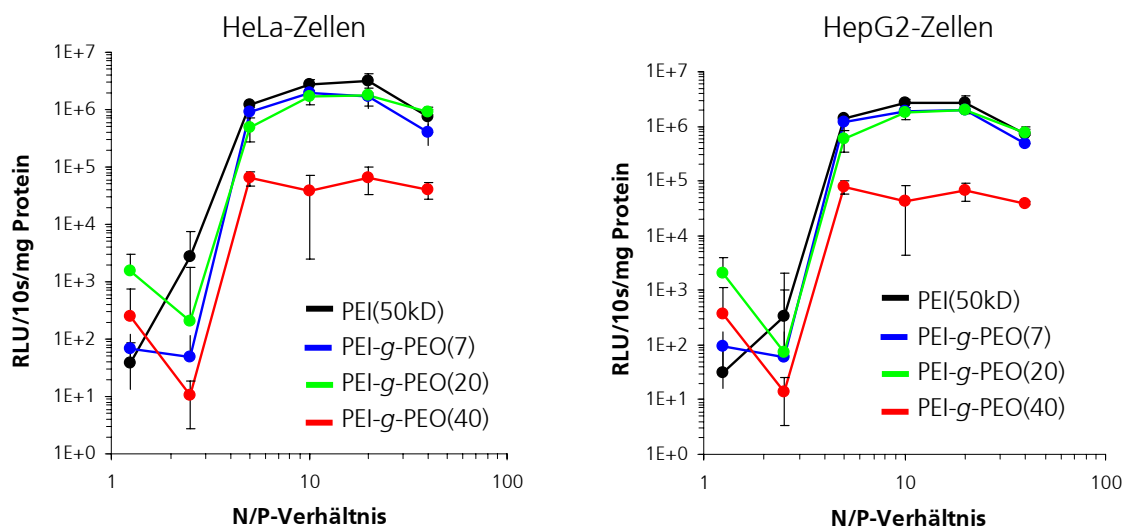


Abb. 3.8: Transfereffizienz der Pfropfcopolymere PEI-g-PEO und PEI an HeLa-Zellen (links) und HepG2-Zellen (rechts)

Der Abb. 3.8 ist zu entnehmen, dass alle Pfropfcopolymere außer PEI-g-PEO(40) ähnliche Kurvenverläufe wie das Ausgangspolymer PEI aufweisen. Die Transfereffizienz der PEI-DNA-Komplexe erreichte ein Maximum bei einem N/P-Verhältnis von 10-20. Die hohe Transfektion bei diesen N/P-Verhältnissen ist durch die kationische Überschussladung des Komplexes zu erklären, da der kationische Vektor mit der negativen Zellmembran gut wechselwirkte und durch unspezifische Pinozytose aufgenommen wurde. Beim PEI-g-PEO(40) entsteht vermutlich durch die hohe Anzahl der PEO-Ketten eine zu hohe Abschirmung der kationischen Ladung des Polymers, so dass die Komplexierung mit der DNA und die Transfektion in die Zellen verschlechtert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass die Wechselwirkung zwischen Vektor und Zellmembran durch diese Abschirmung gestört ist.

Diese Ergebnisse decken sich mit den allgemeinen Erkenntnissen in der Literatur. Bei Sung et al. [76] und Peterson et al. [77] wurde z.B. eine Erhöhung der Transfereffektivität bei Vektoren mit vielen kurzen PEO-Ketten pro PEI-Molekül gefunden, während vermutlich durch die sterische Hinderung langer PEO-Ketten die Transfereffektivität verschlechtert wird.

Die hohe Überschussladung des Vektors bewirkt hier zwar eine gute Zellaufnahme, aber die negative Zellmembran wird durch die Ladung stark angegriffen und zerstört, erkennbar an den

Ergebnissen des Bradford-Assays. Die Abb. 3.9 zeigt den Proteingehalt der Zellen (HepG2, HeLa) pro Well (Zellvitalität) in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis und somit von der Höhe der kationischen Ladung des Vektors. Der Proteingehalt der Zellen mit PEI-DNA-Komplexen nimmt stetig mit steigendem N/P ab. Die Toxizität des Vektors steigt demzufolge erwartungsgemäß mit der kationischen Überschussladung. Diese Überschussladung sollte durch die Modifizierung des PEI mit PEO-Seitenketten abgeschirmt werden. Aus der Abb. 3.9 ist zu erkennen, dass bei hohen N/P-Verhältnissen eine höhere Zellvitalität der PEI-g-PEO-Vektoren im Vergleich zum PEI-Vektor ermittelt wurde. Es ist somit anzunehmen, dass eine Abschirmung der Ladung mit PEO hierbei stattgefunden hat. PEO-modifizierte PEI-Vektoren sollten daher speziell für *in vivo* Transfektionen geeignet sein. Bei gleicher Transfereffizienz wirkt das Pfropfcopolymer PEI-g-PEO(20) vor allem bei hohen N/P-Verhältnissen weniger toxisch als das unmodifizierte PEI.

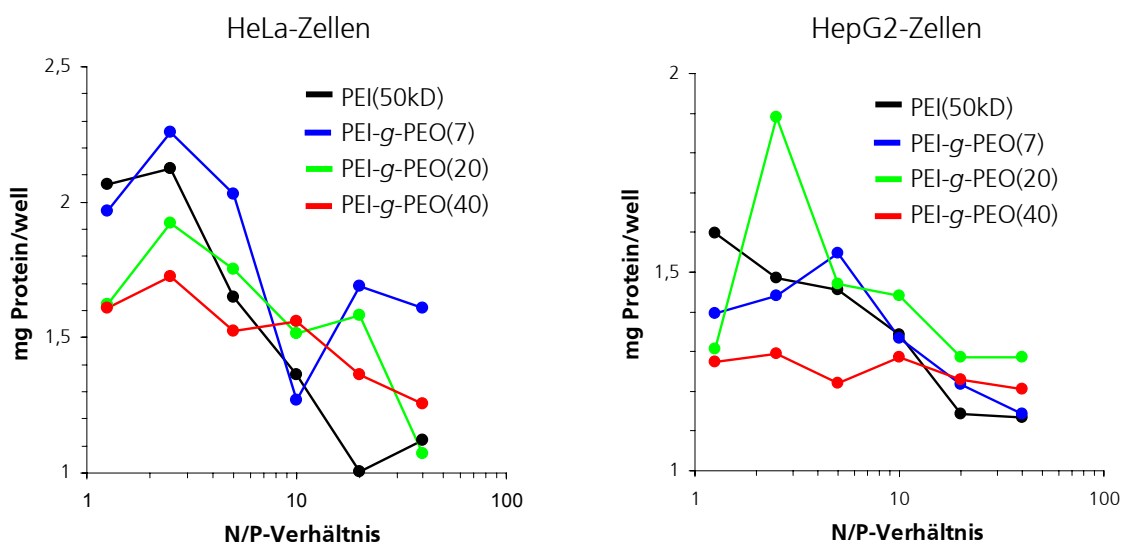


Abb. 3.9: Bradford-Assay der Pfropfcopolymere PEI-g-PEO und PEI an HeLa-Zellen (links) und HepG2-Zellen (rechts)

Neben PEI(50kD) wurde PEI-g-PEO(20) als zweites Ausgangspolymer für die weitere Modifizierung mit spezifischen Liganden für den rezeptorvermittelten Gentransfer ausgewählt. Beide Polymere (PEI und PEI-g-PEO(20)) weisen ähnliche Kurvenverläufe der Transfektionseffektivität als Funktion des N/P-Verhältnisses auf. Damit ist die direkte Vergleichbarkeit der aus diesen Polymeren hergestellten - nachfolgend beschriebenen - Ligand-Polymere gegeben.

3.2 Nicht-virale Genvektoren mit Folsäure-Liganden

Viele Krebszellen brauchen Folsäure (Abb. 3.10) für die Zellteilung und -vermehrung und besitzen eine bis zu 500000-fach höhere Affinität zu diesem Vitamin als normale Zellen [125]. Diese Affinität der Krebszellen gegenüber Folsäure wird in der Forschung ausgenutzt, um Folsäure z.B. als Träger für chemotherapeutische Medikamente oder Gentherapien einzusetzen. Gute Erfolge sind vor allem bei gynäkologischen-, Brust- und Gehirn-Karzinomen sowie Karzinomen der Niere, Lunge und des Darms zu erwarten, da diese Tumore oft resistent gegenüber der Standard-Chemotherapie sind, aber einen hohen Anteil an Folsäure aufweisen. Viele Tumorzellen besitzen einen Folsäure-Rezeptor.

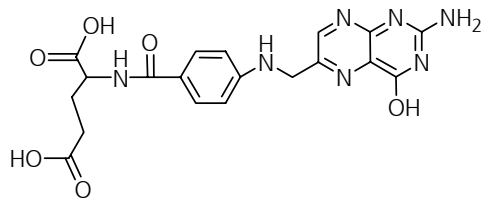
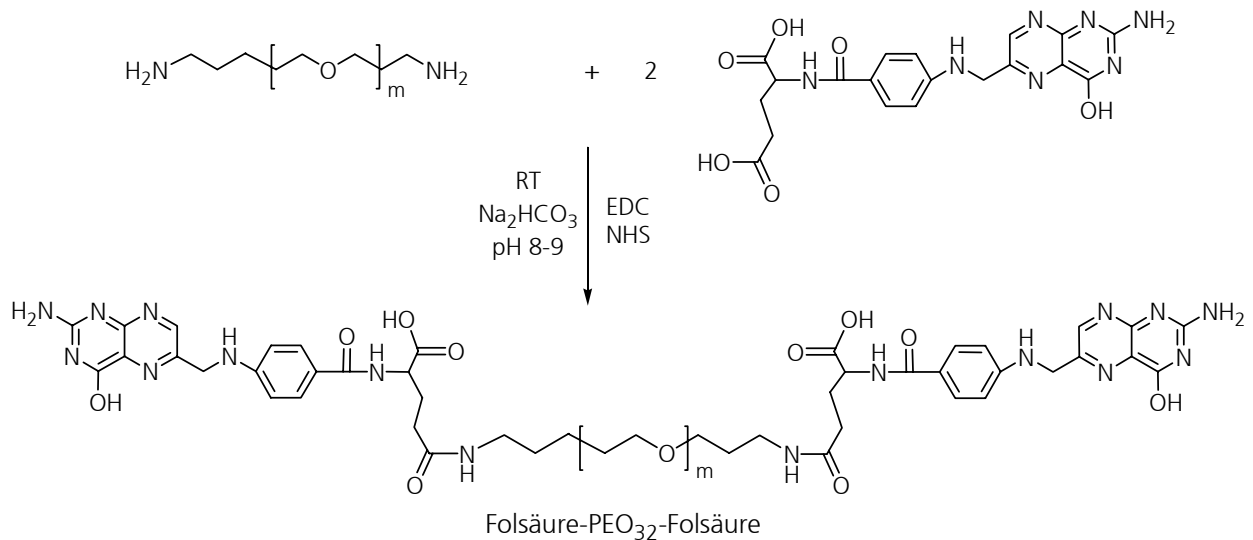


Abb. 3.10: Folsäure

Folsäure wurde bereits Anfang der 90er Jahre als Ligand für ein Targeting an Tumorzellen eingesetzt [90,126]. Auch für diese Arbeit wurde sie für erste Untersuchungen ausgesucht. Hierbei wurde die Synthese von Bennis et al. [84] von organischen auf wässrige Bedingungen



übertragen.

Abb. 3.11: Synthese von Folsäure-Poly(ethylenoxid)₃₂-Folsäure

Die Reaktion wurde in NaHCO₃-Lsg. mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) als Kopplungsreagenzien bei pH ~8,5 durchgeführt. Hierbei wurde die Folsäure entweder als Einzelmolekül an das kationische Ausgangspolymer gebunden oder ein zusätzlicher PEO-Seitenarm eingeführt. Bei einer Reaktion mit PEO-Seitenarm wurde die Folsäure im 10fachen Überschuss mit PEO₃₂(bisamin) umgesetzt, so dass beide Amino-Gruppen

des PEO₃₂ mit Folsäure reagierten. Es wurde ein Folsäure-PEO₃₂-Folsäure-Molekül (Abb. 3.11) erhalten, an dessen Folsäureenden sich weitere Carboxyl-Gruppen befanden, die mit den Amino-Gruppen des PEI weiterreagieren sollten. Dies wurde durch eine erneute Amidierung mit Hilfe von EDC und NHS erreicht. In Abb. 3.12 ist die Synthese des Copolymers Poly(ethylenimin)-*g*-[Poly(ethylenoxid)₃₂-Folsäure] (PEI-*g*-(PEO-Fol)) dargestellt.

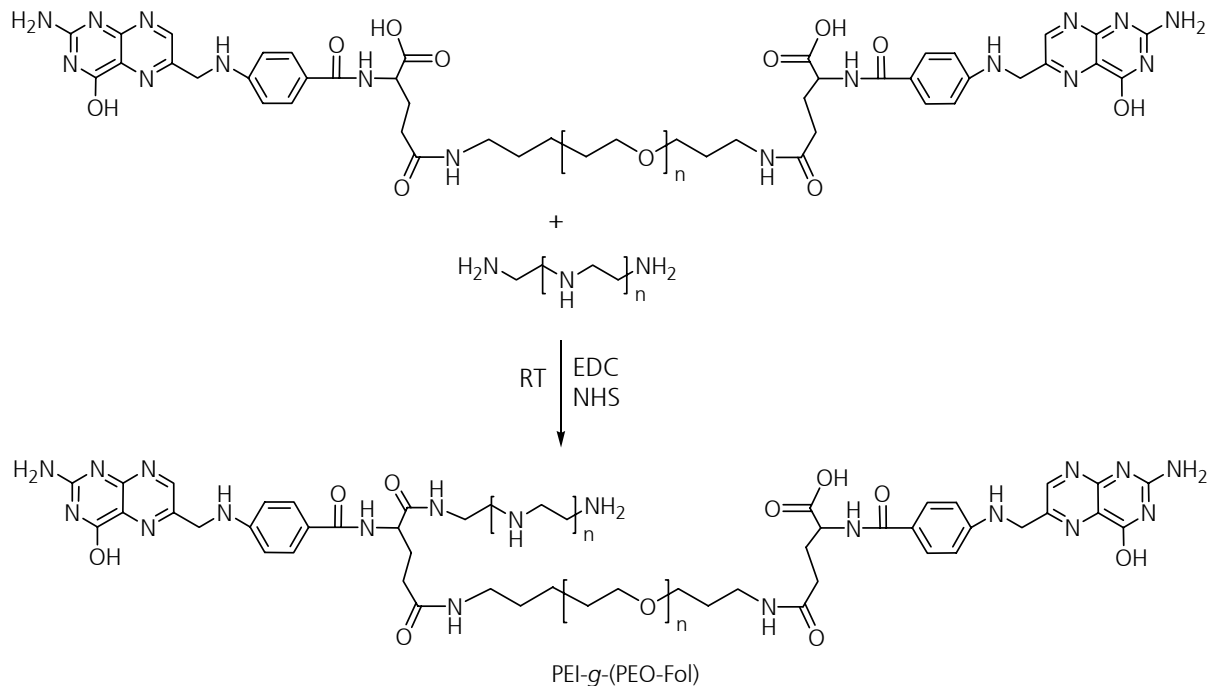


Abb. 3.12: Synthese von Poly(ethylenimin)-*g*-[Poly(ethylenoxid)₃₂-Folsäure]

3.2.1 Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit Folsäure-Liganden

3.2.1.1 Durchschnittliche Anzahl der Folsäure-Liganden je Molekül

Die mittlere Anzahl der Folsäure-Liganden pro Ausgangspolymer wurde photometrisch ($\lambda_{\text{Fol}}=361 \text{ nm}$) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte durch Vermessung unterschiedlicher Folsäure-Konzentrationen.

3.2.1.2 Hydrodynamischer Durchmesser der Folsäure-Polymere

Der hydrodynamische Durchmesser (Molekülgröße) der kationischen Folsäure-Polymere wurde mittels DLS bestimmt. In Tabelle 3.4 sind die ermittelten Teilchendurchmesser und der dazugehörige Polydispersitätsindex PDI der Folsäure-Polymere dargestellt. Die Polymere zeigen mit zunehmendem Modifizierungsgrad eine höhere Teilchengröße und eine breitere Verteilung. Die Durchmesser bei PEI-*g*-(PEO-Fol) (62,6 nm) und PEI-*g*-(PEO-Fol)-Fol (64,5 nm) sind im Verhältnis zu denen der anderen Folsäure-Copolymeren in Tabelle 3.4 stark erhöht, was möglicherweise durch eine Verbrückung einzelner Polymerketten hervorgerufen wurde. Hierbei könnten die beiden Carboxyl-Gruppen eines Folsäure- bzw. Fol-PEO₃₂-Fol-Moleküls mit den

Amino-Gruppen zweier PEI-Polymere reagiert haben, da die Reaktion mit einem Überschuss der Kopplungsreagenzien EDC und NHS durchgeführt wurde. Moleküle mit hohen Molmassen und Polydispersitäten wären die Folge. Die Anzahl der Folsäure-Gruppen pro Molekül wurde auf die durchschnittliche Molmasse eines Ausgangspolymers bezogen.

Tabelle 3.4: Hydrodynamische Durchmesser der kationischen Folsäure-Copolymeren

	Folsäure-Liganden	d_h [nm]	PDI
PEI(50kD)	-	10,6	0,22
PEI- <i>g</i> -Fol	3	11,8	0,44
PEI- <i>g</i> -(PEO-Fol)	4	62,6	0,47
PEI- <i>g</i> -(PEO-Fol)-Fol	9	64,5	0,44
PEI- <i>g</i> -PEO(20)	-	12,9	0,30
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Fol	4	18,1	0,64
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Fol)	5	25,9	0,66

3.2.1.3 Molmasse der kationischen Folsäure-Copolymere

Die Folsäure-Copolymere wurden bezüglich ihrer Molmasse und Molmassenverteilung mittels Sedimentationsgeschwindigkeitslauf und Größenausschlusschromatographie SEC untersucht. Der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der AUZ wurde wie in Kapitel 3.1.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Viskositätsdaten ($[\eta]$, k_{SB}), die daraus ermittelten Molmassen M_p^{AUZ} und die Molmassen der universellen Kalibrierung der SEC sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Molmasse und Molmassenverteilung der Folsäure-Copolymere

	$[\eta]$ [cm ³ /g]	k_{SB}	M_p^{AUZ} [10 ³ g/mol]	$M_{w,UK}$ [10 ³ g/mol]	D
PEI(50kD)	13,3	1,33	38,9	50,1	1,49
PEI- <i>g</i> -Fol(3)	12,2	1,65	44,0	71,0	1,62
PEI- <i>g</i> -(PEO-Fol)(4)	19,0	3,12	74,0	111,0	1,83
PEI- <i>g</i> -(PEO-Fol)(5)-Fol(4)	15,8	4,77	111,0	n.a.	n.a.
PEI- <i>g</i> -PEO(20)	15,1	1,21	46,5	74,0	1,90
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Fol(4)	13,8	1,28	42,5	189,1	2,80
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Fol)(5)	21,8	1,40	61,2	311,6	2,89

Die Folsäure-Polymere besitzen in wässriger NaCl-Lsg. z.T. einen guten Lösungszustand, erkennbar an den relativ niedrigen k_{SB} . Dagegen weisen die Polymere PEI-*g*-(PEO-Fol)(4) und PEI-*g*-(PEO-Fol)(5)-Fol(4) eine hohe k_{SB} (> 3) auf. Es liegt ein schlechter Lösungszustand vor, hervorgerufen vermutlich durch die Vernetzungsreaktion der Folsäure-Liganden. Die Molmassen M_p^{AUZ} dieser beiden Polymere sind im Verhältnis zu den anderen Polymermolmassen mit Fol-Liganden, die im Bereich von 40000 bis 60000 g/mol liegen, zu hoch.

Die Molmassen aller Folsäure-Copolymere aus der SEC liegen oberhalb der ermittelten Werte aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der AUZ. Die Polymere liegen breitverteilt vor. Dies gilt besonders für alle Polymere auf Basis des Pfropfcopolymers PEI-*g*-PEO, da bei diesen Polymeren schon vor der Weitermodifizierung mit Folsäure eine nicht ideale Pfropfung vorlag. Der MALLS-Detektor konnte bei diesen Polymeren nicht eingesetzt werden, da die Molmassen wegen der inhomogenen Pfropfung falsch ermittelt würden (siehe Kapitel 3.1.3.3).

3.2.2 Transfereffizienz der Folsäure-Copolymere

Da Folsäure eine hohe Affinität zu Krebszellen besitzt, ist anzunehmen, dass dies auch für die Folsäure-modifizierten PEI-Vektoren gilt. *In vitro* Versuche mit Folsäure-Copolymeren und dem Reporter gen Luciferase als Genvektoren wurden daher auf HeLa-Krebszellen durchgeführt.

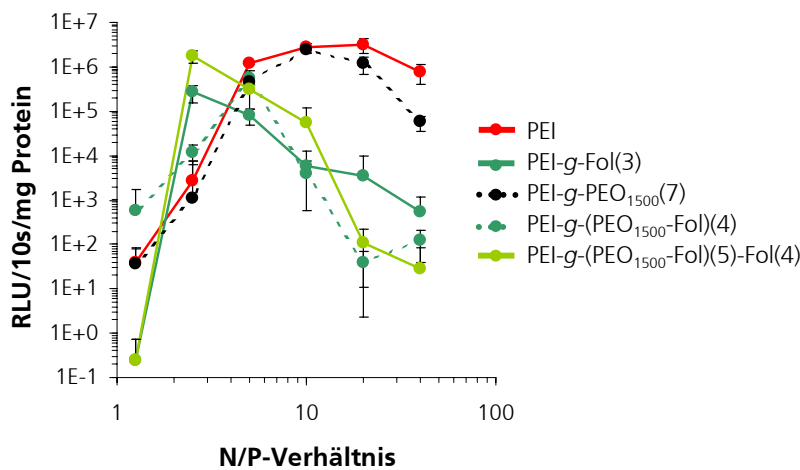
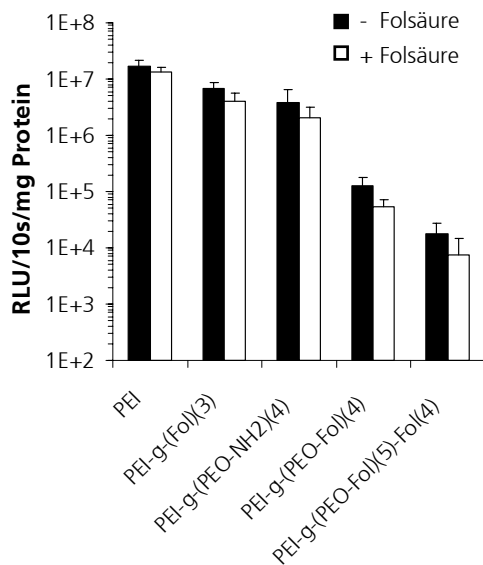


Abb. 3.13: Transfektionsergebnisse der Folsäure-Copolymere an HeLa-Zellen

Die Transfektionsergebnisse der Folsäure-Genvektoren an HeLa-Zellen sind in Abb. 3.13 dargestellt. Es wurden ~20000 Zellen pro Well ausgesät und diese mit 0,5 µg Plasmid pro Vektor transfiziert. Bei den Folsäure-Konjugaten PEI-*g*-Fol(3) und PEI-*g*-(PEO-Fol)(5)-Fol(4) ist eindeutig zu erkennen, dass diese bei einem N/P-Verhältnis von 2,5 ein Maximum (100fach höher als PEI) in der Transfektion ausbilden. Bei PEI-*g*-(PEO-Fol)(4) liegt das Maximum bei N/P=5. Anschließend sinken die Transfereffizienzen stark ab. Die Vergleichssubstanzen PEI und PEI-*g*-(PEO₃₂) zeigen dagegen mit zunehmendem N/P-Verhältnis eine höhere Transfereffizienz und erreichen bei höherem N/P-Verhältnis von ca. 10 die maximale Transfektionseffizienz.

Da die Folsäure-Konjugate PEI-*g*-Fol(3) und PEI-*g*-(PEO-Fol)(5)-Fol(4) ein Maximum bei N/P<10 (niedrigere Vektor-Ladung) aufweisen und bei diesem N/P deutlich über der Transfereffizienz von PEI liegen, ist die Transfektion des Vektors vermutlich über eine rezeptorvermittelte Endozytose verlaufen. Dies könnte auch den deutlichen Abfall der Effizienz bei höheren N/P-Verhältnissen erklären. Bei einem Überschuss an kationischem Polymer ist nicht mehr an jede Polymerkette ein Gen gebunden. Ein Teil der Rezeptoren wird dann durch Polymere belegt, die kein Gen tragen, so dass die rezeptorvermittelte Endozytose des Genvektors absinkt.

Ein weiteres *in vitro* Experiment, in dem niedermolekulare Folsäure zusätzlich zu der Transfektion des Folsäure-Genvektors an HeLa-Zellen gegeben wird, sollte Aufschluss über den Prozess der rezeptorvermittelten Endozytose liefern. Wenn die Folsäure-Partikel rezeptorvermittelt



endozytiert werden, dann muss die Transfereffizienz bei Zusatz von niedermolekularer Folsäure stark absinken, da die Folsäure-spezifischen Rezeptoren auf der HeLa-Zellmembran zuerst von der Folsäure belegt werden.

Abb. 3.14: Transfektion an HeLa-Zellen mit und ohne Überschuss an Folsäure

Abb. 3.14 zeigt die Transfektion der Folsäure-Genvektoren an HeLa-Zellen mit und ohne Überschuss an Folsäure bei einem N/P-Verhältnis von 5. Bei allen Polymeren, sogar bei PEI, ist bei Zugabe von niedermolekularer Folsäure ein geringfügiges Absinken in der Transfereffizienz zu beobachten. Diese Unterschiede der Transfereffizienzen mit und ohne Folsäure sind nicht signifikant, so dass nicht eindeutig auf eine rezeptorvermittelte Endozytose geschlossen werden kann.

Transfektionseffektivitäten von Folsäure-Vektoren wurden bereits von anderen Gruppen sowohl an HeLa- als auch KB-, CT26-Colon- und SMC-Zellen untersucht. Die Folsäure wurde in diesen Studien vorwiegend an Poly-L-lysin (PLL) gekoppelt.

Leamon et al. [127] konnten eine rezeptorvermittelte Endozytose von BSA-*g*-Fol an KB-Zellen durch Fluoreszenz- und Isotopenmarkierung nachweisen. Hierbei beobachteten sie eine Aufnahme der Folsäure-Partikel, während das reine BSA und eine Mischung aus Folsäure-BSA mit niedermolekularer Folsäure ineffizient in der Transfektion waren. Dies konnte von Guo et al. [128] bestätigt werden. Er wies eine Blockierung der Transfektionsaktivität durch freie Folsäure nach. In anderen Studien wurde festgestellt, dass die DNA-Aufnahme mittels Folsäure-Rezeptor signifikant von der Kettenlänge des PEO-Spacers abhängig ist. Die besten Erfolge wurden sowohl bei Ward et al. [129] als auch bei Leamon et al. [92] mit Polymeren, deren Fol-Ligand über eine PEO-Seitenkette von 3400 g/mol (77 PEO-Einheiten) gebunden war, erzielt. Die Transfereffizienzen waren je nach Zellkultur signifikant höher oder analog zu den PEI- bzw. PLL-

Vergleichsvektoren. Hierbei war die Anzahl der Folsäure-Moleküle pro Polymer im Allgemeinen höher als bei den in dieser Arbeit synthetisierten kationischen Folsäure-Copolymeren.

3.3 Nicht-virale Genvektoren mit Triiod-L-thyronin-Liganden (T3)

Das Triiod-L-thyronin (T3) (Abb. 3.15) ist ein Hormon der Schilddrüse; es besitzt eine anregende Wirkung auf den Stoffwechsel. Die biologische Halbwertszeit von T3 beträgt nur 24 h. Der Abbau des Thyroid-Hormons erfolgt in der Leber und in der Niere. T3 durchdringt die Zellmembran von Hepatozyten, während es von den Kupfer-Zellen der Leber nicht endozytiert wird. Hierdurch erscheint ein spezifisches Targeting an Hepatozyten bei einer Leberkrebserkrankung mittels des Liganden T3 möglich.

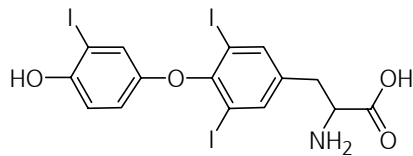


Abb. 3.15: Triiod-L-thyronin

Die Reaktion wurde, analog zu der Kopplungsreaktion von Folsäure an PEI in Wasser, mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Pyridin als Kopplungsreagenzien in DMSO durchgeführt. (Abb. 3.16 und Abb. 3.17) Hierbei wurde das T3 über einen PEO-Seitenarm (13 PEO-Einheiten) oder direkt an das kationische Ausgangspolymer gebunden.

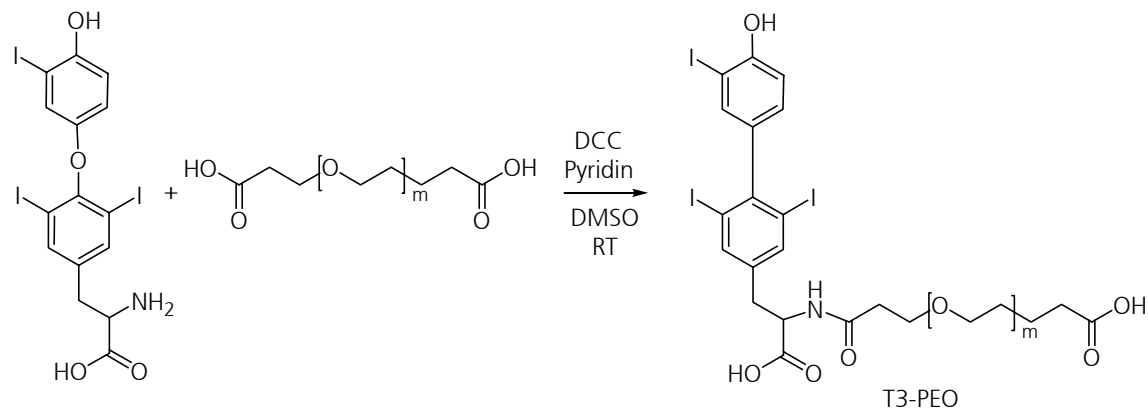
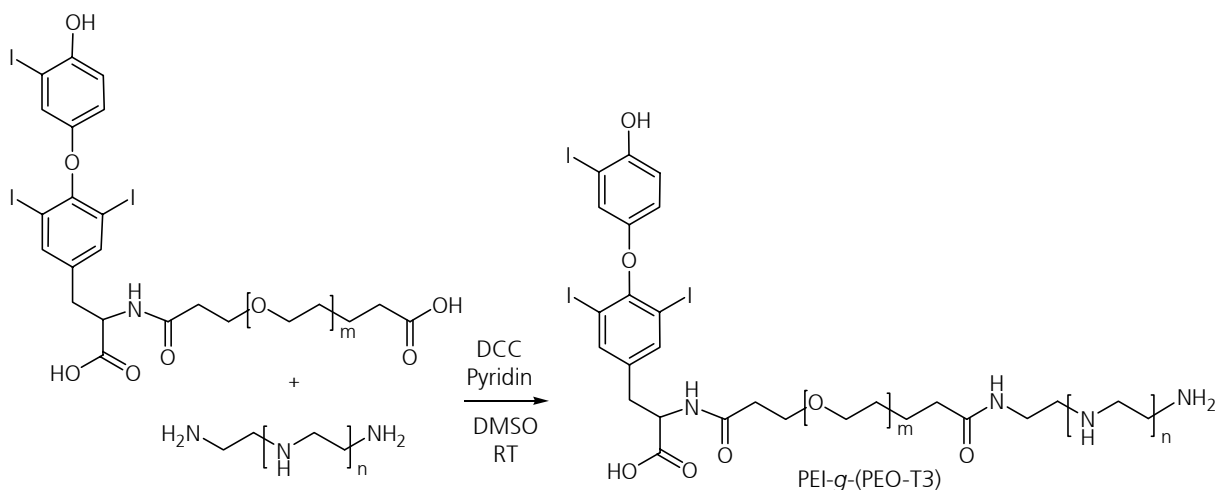


Abb. 3.16: Synthese von Poly(ethylenoxid)₁₃-T3



3.3.1 Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit T3-Liganden

3.3.1.1 Durchschnittliche Anzahl der T3-Liganden je Molekül

Die mittlere Anzahl an T3-Molekülen pro Precursor-Polymer wurde photometrisch ($\lambda_{T3}=320$ nm) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte durch Vermessung unterschiedlicher T3-Konzentrationen in NaOH-Lsg. Es wurde bei allen kationischen Copolymeren eine Modifizierung mit 7-10 T3-Liganden pro Molekül ermittelt.

3.3.1.2 Hydrodynamischer Durchmesser der T3-Polymere

Die hydrodynamischen Durchmesser der T3-Copolymere wurden mittels DLS bestimmt und liegen zwischen 15 nm und 27 nm. Sie erhöhen sich im Vergleich zu PEI (10,6 nm) mit Steigerung des Umsetzungsgrades. Für die T3-modifizierten Polymere auf Basis von PEI wurde eine starke Erhöhung des PDI im Vergleich zum Ausgangspolymer gefunden. Die Polymere PEI-g-T3(7) und PEI-g-T3(9) zeigen mit 27 nm bzw. 21 nm zu hohe Durchmesser, die durch eine Mehrfachreaktion des T3 untereinander und danach mit PEI entstanden sein könnten. Im Gegensatz dazu weisen die Polymere, deren T3-Ligand über eine PEO-Seitenkette gebunden ist, niedrigere hydrodynamische Durchmesser auf. Sie sind im Vergleich zum unmodifizierten PEI erwartungsgemäß mit dem Umsetzungsgrad gestiegen.

Tabelle 3.6: Hydrodynamische Durchmesser der kationischen T3-Copolymere

	T3-Liganden	d_h [nm]	PDI
PEI(50kD)	-	10,6	0,22
PEI-g-T3	9	21,1	0,42
PEI-g-T3	7	27,3	0,47
PEI-g-(PEO-T3)	7	16,9	0,45
PEI-g-PEO(20)	-	12,9	0,30
(PEI-g-PEO)-g-T3	10	13,3	0,31
(PEI-g-PEO)-g-(PEO-T3)	10	21,3	0,31

3.3.1.3 Molmasse der kationischen T3-Copolymere

Die Molmassen der kationischen T3-Copolymere wurden mittels Sedimentationsgleichgewichts- und Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der AUZ sowie mit Hilfe der SEC-MALLS ermittelt. In der SEC wurden lediglich die beiden Polymere PEI-g-(PEO-T3)(7) und (PEI-g-PEO)-g-(PEO-T3)(10) vermessen, da nur diese in dem SEC-Eluenten ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{HAc}$) gelöst werden konnten. Der Sedimentationsgleichgewichtslauf wurde exemplarisch für die in Kapitel 3.1.3.3 beschriebenen Ausgangspolymere PEI und PEI-g-PEO(20) sowie für PEI-g-(PEO-T3)(7) durchgeführt.

In Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 sind die Molmassen und Molmassenverteilungen der T3-Copolymere aus den unterschiedlichen Charakterisierungsmethoden dargestellt. Die intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ aller T3-funktionalisierten Polykationen sind im Vergleich zu ihren Ausgangspolymeren (PEI, PEI-g-PEO) deutlich gesunken, obwohl mit höherem Umsetzungsgrad eine höhere intrinsische Viskosität zu erwarten wäre. Da der T3-Ligand ein starres, hydrophobes Molekül mit Iod-Atomen ist, wird der Ligand vermutlich so in dem hochverzweigten PEI eingebettet, dass die erhaltenen T3-Polymere niedrigere bzw. ähnliche intrinsische Viskositäten im Vergleich zum unmodifizierten PEI aufweisen. Hierbei wurden extrem hohe k_{SB} erhalten. Die leicht hydrophoben T3-Copolymere besitzen demnach einen schlechten Lösungszustand in dem eingesetzten Lösemittel. Die spezifischen Volumina der T3-funktionalisierten Polymere ($>0,21 \text{ cm}^3/\text{g}$) zeigen gegenüber dem unmodifizierten PEI ($0,161 \text{ cm}^3/\text{g}$) deutlich höhere Werte. Die T3-Polymere liegen wahrscheinlich in einer aufgeweiteten Form vor.

Tabelle 3.7: Molmassenbestimmung der T3-Copolymere mittels Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der AUZ

	$[\eta]$ [cm^3/g]	k_{SB}	\bar{v}_0 [cm^3/g]	M_p^{AUZ} [10^3 g/mol]
PEI(50kD)	13,3	1,33	0,161	38,9
PEI-g-T3(9)	9,7	4,72	0,278	58,2
PEI-g-T3(7)	10,2	2,36	0,218	57,7
PEI-g-(PEO-T3)(7)	11,0	1,98	0,223	47,2
PEI-g-PEO(20)	15,1	1,21	0,144	46,5
(PEI-g-PEO)-g-T3(10)	10,7	4,57	0,254	65,3
(PEI-g-PEO)-g-(PEO-T3)(10)	12,7	1,50	0,230	50,0

Tabelle 3.8: Molmasse und Molmassenverteilung der T3-Copolymere mittels SEC und Sedimentationsgleichgewichtslauf

	$M_{w,UK}$ [10^3 g/mol]	$M_{w,LS}$ [10^3 g/mol]	D	M_p^{AUZ} [10^3 g/mol]	M_w^{AUZ} [10^3 g/mol]
PEI(50kD)	50,1	49,8	1,49	38,9	43,0
PEI-g-(PEO-T3)(7)	79,9	120,2	2,00	47,2	60,9
PEI-g-PEO(20)	74,0	102,7	1,90	46,5	97,8
(PEI-g-PEO)-g-(PEO-T3)(10)	86,4	230,7	2,36	50,0	n.a.

Die ermittelten Molmassen aus den unterschiedlichen Charakterisierungsmethoden variieren nicht signifikant. Die Unterschiede sind auf die verschiedenen Messprinzipien der Methoden zurückzuführen. Die absoluten Molmassen M_w^{AUZ} aus dem Sedimentationsgleichgewichtslauf liegen im erwarteten Bereich. Sie sind im Allgemeinen etwa 10-20% niedriger als die Molmassen $M_{w,LS}$ aus der SEC-MALLS. Die einzige Molmasse, deren Wert deutlich über dem erwarteten Wert liegt, ist das $M_{w,LS}$ von (PEI-g-PEO)-g-(PEO-T3)(10). Wie bereits in Kapitel 3.1.3.3 erläutert, ermittelt der MALLS-Detektor die Molmassen auf Grund der inhomogenen Pfropfung falsch (speziell die der Polymere auf Basis von PEI-g-PEO).

3.3.2 Transfereffizienz der T3-Vektoren

Die *in vitro* Experimente der kationischen Polymeren mit T3-Liganden wurden an HepG2-Kulturen durchgeführt. HepG2-Zellen sind eine humane Karzinomzelllinie, die aus der Leber stammt. Die Gentransfereffizienz der T3-Genvektoren wurde in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis untersucht. Die Abb. 3.18 zeigt die Transfereffizienzen der T3-Vektoren an HepG2-Zellen nach 24 h. Wie schon bei dem Liganden Folsäure zu erkennen war, besitzen auch die T3-Vektoren ein Maximum in der Transfektion bei N/P-Verhältnissen von 2,5 bzw. 5. Die RLU liegen bei N/P=2,5 über dem Wert von Poly(ethylenimin). Das PEI-g-(PEO-T3) weist bei diesem N/P-Verhältnis eine 5000fach höhere Transfektion im Vergleich zu PEI auf; demgegenüber besitzt das PEI-g-T3(10) noch eine 350fach höhere Transfereffizienz als PEI.

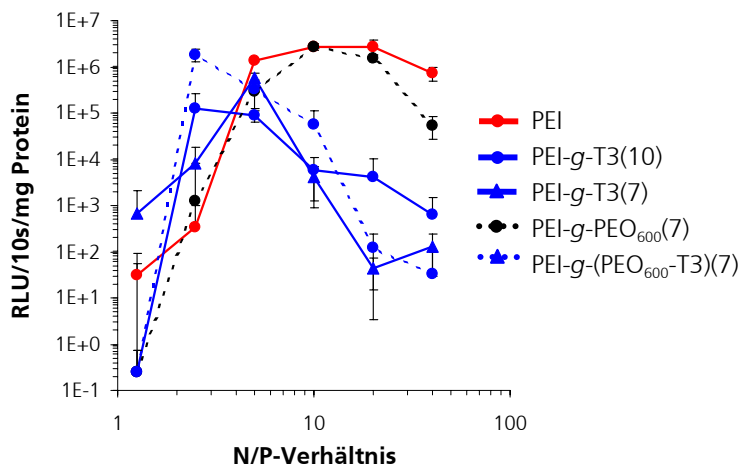


Abb. 3.18: Transfektionsergebnisse der T3-Vektoren an HepG2-Zellen

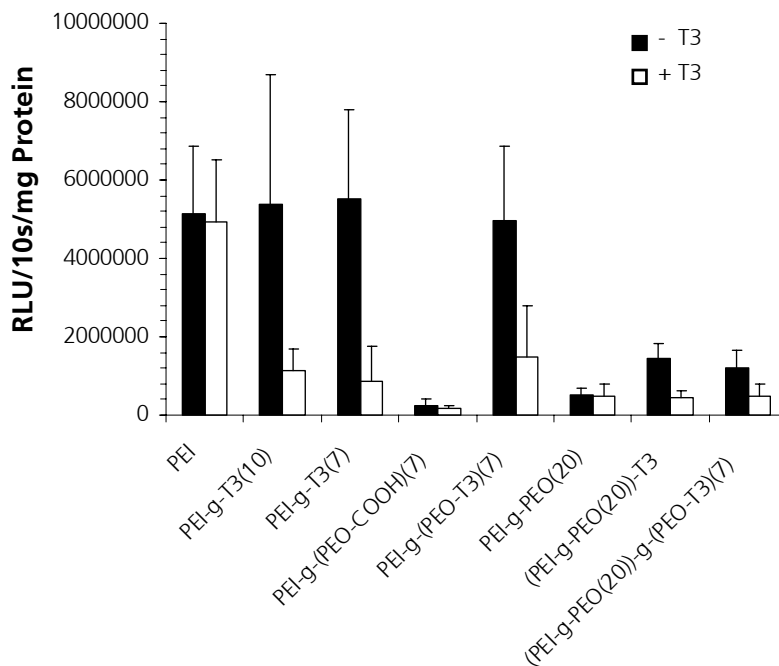


Abb. 3.19: Transfektion an HepG2 mit und ohne Überschuss an T3

Eine mögliche rezeptorvermittelte Endozytose der T3-Vektoren an HepG2-Zellen wurde mittels eines Transfektionsversuches mit und ohne Überschuss an freiem Triiod-L-thyronin (T3) untersucht. Bei rezeptorvermittelter Endozytose sollte die Transfereffizienz der Vektoren bei Zusatz von niedermolekularem T3 niedriger sein, da dieses die Rezeptoren auf der Zellmembran belegen und so die Aufnahme der T3-Vektoren blockieren sollte.

Die Ergebnisse der Transfektion mit und ohne Überschuss an T3 sind in Abb. 3.19 dargestellt. Es wurden ~20000 Zellen pro Well ausgesät und diese mit 0,5 µg Plasmid pro Vektor bei einem N/P-Verhältnis von 5 transfiziert. Aus Abb. 3.19 ist eindeutig erkennbar, dass die Transfereffizienz der T3-Genvektoren (speziell PEI-g-T3(10), PEI-g-T3(7), PEI-g-(PEO-T3)(7)) bei einem Zusatz an freiem T3 signifikant (um etwa das 5fache) sinkt. Im Gegensatz dazu nimmt die Transfereffizienz bei den Ausgangspolymeren PEI und PEI-g-PEO nur unerheblich ab. Die T3-Vektoren werden demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit entsprechend dieser Resultate in die HepG2-Zellen rezeptorvermittelt endozytiert.

In der Literatur sind bisher keine Studien über den Einsatz von Triiod-L-thyronin als Ligand in Gentransfer-Experimenten bekannt.

3.3.3 Fluoreszenzmikroskopie von T3-Aminodextranen an HepG2

Die bisherigen Ergebnisse der T3-funktionalisierten Vektoren weisen auf eine rezeptorvermittelte Endozytose hin. Einen weiteren Beweis soll eine Untersuchung der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop erbringen. Hierzu wurde ein Aminodextran ($M_w=70000$ g/mol) mit dem Liganden T3 (mit und ohne PEO-Seitenarm) modifiziert und anschließend mit dem Fluoreszenzmarker Carboxy-fluorescein-N-succinimidylester (FLUOS) umgesetzt. Aminodextran wurde als kationisches Polymer eingesetzt, da es über eine rezeptorvermittelte Endozytose an humanen Zelllinien nicht internalisiert wird, sondern nur über eine unspezifische Pinozytose aufgenommen werden kann. Als Negativkontrolle wurde ein fluoreszenzmarkiertes Aminodextran mit PEO-Seitenketten eingesetzt.

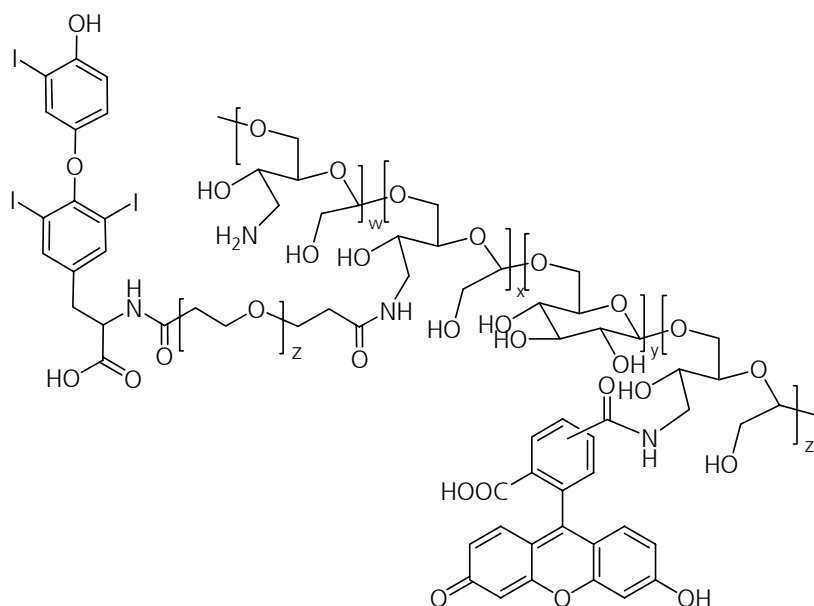
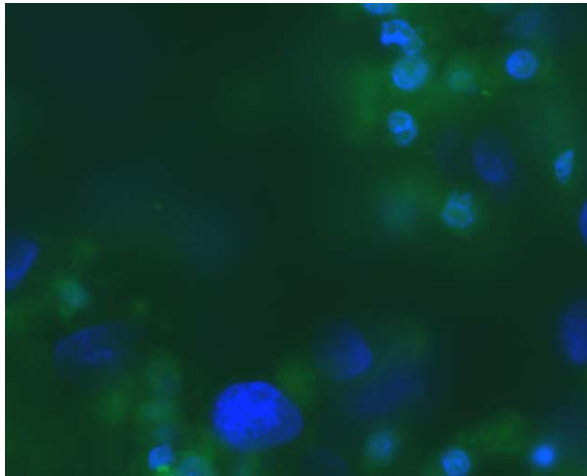
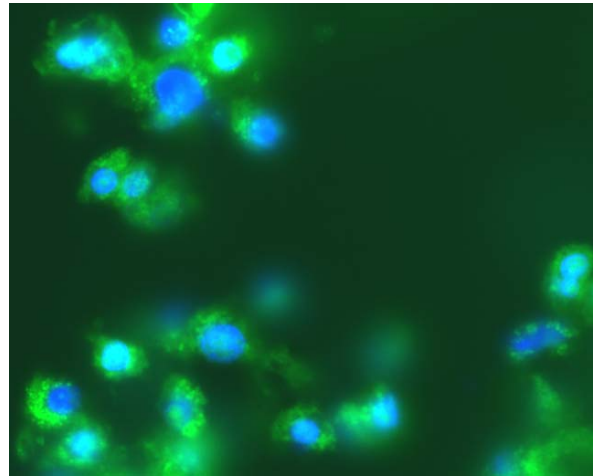


Abb. 3.20: Fluoreszenzmarkiertes Aminodextran-g-(PEO-T3)



Negativkontrolle mittels (Aminodextran-g-PEO)-FLUOS



[Aminodextran-g-(PEO-T3)]-FLUOS

Abb. 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran-g-(PEO-T3)]-FLUOS und (Aminodextran-g-PEO)-FLUOS an HepG2-Zellen

Das fluoreszenzmarkierte Aminodextran-g-PEO ohne und mit T3 (über eine PEO-Seitenkette gebunden) wurde in einem N/P-Verhältnis von 5 mit der Plasmid-DNA komplexiert und auf HepG2-Zellen gegeben. Die Zelltransfektionslösung wurde im Inkubationsschrank (37°C; 5% CO₂) kultiviert. Durch anschließendes Waschen wurde das nicht eingeschleuste Polymer entfernt und die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenyl-indol) blau angefärbt.

Im linken Bild der Abb. 3.21 ist die Transfektion von Aminodextran-g-PEO (Negativkontrolle) an HepG2-Zellen fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Es ist keine Fluoreszenzintensität in den Zellen erkennbar. Das Aminodextran-g-PEO wurde innerhalb der 45 min Inkubationszeit nicht in die Zelle aufgenommen. Diese kurze Inkubationszeit wurde gewählt, da die rezeptorvermittelte Endozytose schnell, d.h. schon innerhalb von 45 min, erfolgt. Die unspezifische Pinozytose benötigt im Allgemeinen eine längere Inkubationszeit.

Demgegenüber ist im rechten Bild die Transfektion von Aminodextran-g-(PEO-T3) in HepG2-Zellen dargestellt. Um die blaugefärbten Zellkerne sind eindeutig grünliche, fluoreszierende kleine Vesikel (Endosome) zu erkennen. Die T3-Vektoren können bei der hier angewendeten kurzen Inkubationszeit von 45 min ausschließlich über eine rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert wurden sein.

Unter Einbeziehung aller Transfektionsergebnisse (*in vitro*, ohne und mit Überschuss an Triiod-L-thyronin, Fluoreszenzmikroskopie) kann eindeutig gefolgert werden, dass die T3-funktionalisierten Vektoren über eine rezeptorvermittelte Endozytose die Zellmembran der HepG2-Kulturen passieren. Noch nicht aufgeklärt sind dagegen die weiteren Schritte der Vektoren über die endosomale Stufe in den Zellkern.

3.4 Nicht-virale Genvektoren mit Uronsäure-Liganden

Die Galactose ist der meiststudierte Ligand aller Genvektoren. Er wird vom Asialoglycoprotein-Rezeptor der Hepatozyten erkannt. Dieser Rezeptor besitzt eine hohe Affinität zu Zucker-Liganden. Verschiedene Uronsäure-Ligand-Polymere (Aufrechterhaltung des Zucker-Ringes) wurden daher synthetisiert und bezüglich ihrer Transfektionseigenschaften *in vitro* an drei Zelllinien untersucht. Hierfür wurden Galacturon- (Gal), Lactobion- (LB), Mannuron- (Man) und Glucuronsäure (Glu) als Liganden (Abb. 3.22) gewählt.

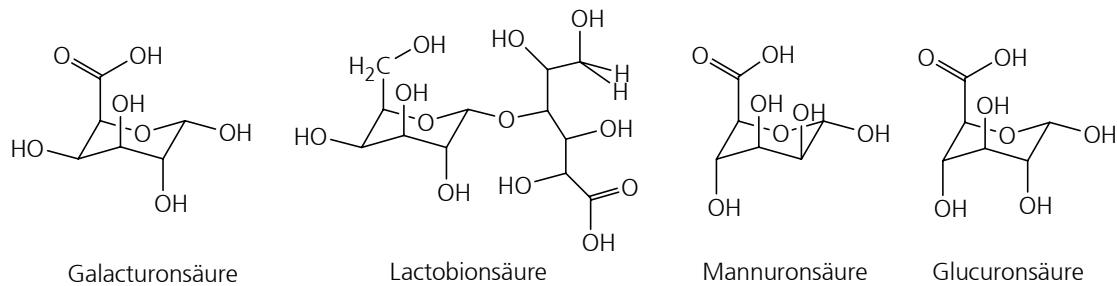


Abb. 3.22: Uronsäure-Liganden

3.4.1 Oxidation der Mannose zu Mannuronsäure

Aldohexosen sind aus einem über ein Acetal verknüpften Ring mit mehreren Hydroxyl-Gruppen aufgebaut. Durch Oxidation einer Aldohehexose können Aldon-, Aldar- und Uronsäuren hergestellt werden. Die gezielte Oxidation einer OH-Gruppe des Zuckers ist hierbei erst durch die Einführung bestimmter Schutzgruppen möglich, die nach erfolgter Oxidation wieder entfernt werden müssen. De Nooy und Besemer gelang die selektive Oxidation von primären Alkohol-Gruppen mit Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) als Katalysator ohne Einführung von Schutzgruppen [130].

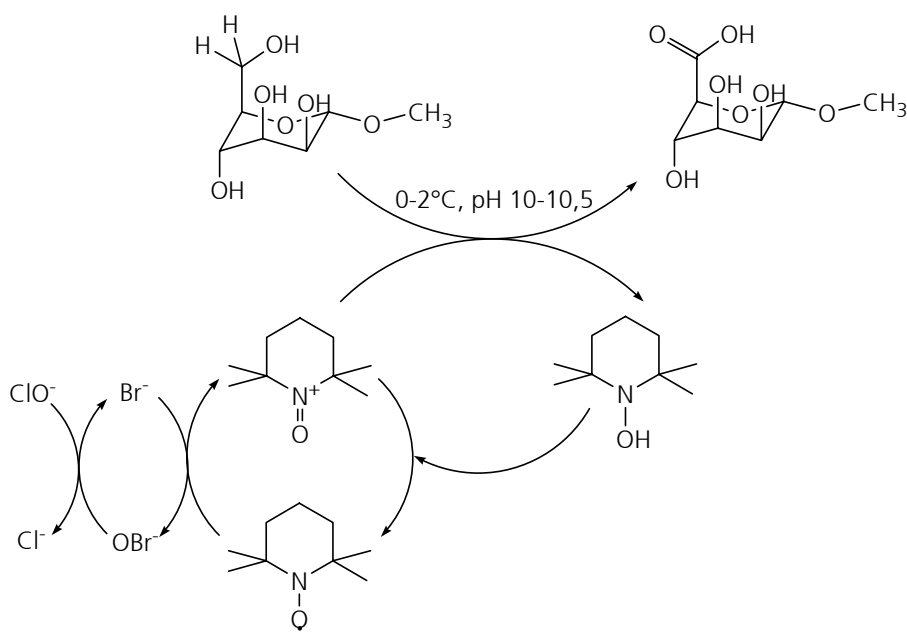


Abb. 3.23: Vorgeschlagener Mechanismus für die Oxidation von primären Hydroxyl-Gruppen [131]

Die Oxidation des glycosidisch geschützten Methyl- α -D-Mannopyranosid zu Mannuronsäure wurde wie von de Nooy und Besemer beschrieben durchgeführt; auf den Schutz der OH-Gruppen der Mannose konnte verzichtet werden. Der Reaktionsmechanismus ist bislang noch nicht geklärt. Ein von de Nooy und Besemer vorgeschlagener Mechanismus ist in Abb. 3.23 dargestellt.

Die glycosidische Schutzgruppe wird durch anschließende Säurehydrolyse abgetrennt. Die Abspaltung der Schutzgruppe muss hierbei vor der Verknüpfung der Mannuronsäure mit den Ausgangspolymeren (PEI, PEI-*g*-PEO) erfolgen. Der Versuch zur Schutzgruppenabspaltung nach Umsetzung mit den Polymeren scheiterte, vermutlich da der „Protonenschwammeffekt“ des PEI die Protonen der Säure abpuffert.

3.4.2 Kationische Polymere mit Uronsäure-Liganden

Kationische Zucker-Copolymere werden vielfach in gentherapeutischen Experimenten eingesetzt. Die Zucker wurden hierbei meist über 4-Isothiocyanatophenyl oder mittels Cyanoborhydrid mit den kationischen Precursor-Polymeren wie PEI verknüpft [85,86,132], was eine aufwändige Aufarbeitung in Anschluss an die Synthese notwendig machte.

Aus der Peptid-Chemie ist bekannt, dass die Amino-Gruppe und die Carboxyl-Gruppe der Aminosäuren in einer Kondensationsreaktion direkt miteinander reagieren können, wenn diese durch einen Aktivator vermittelt wird. Diese Kenntnis wurde ausgenutzt, um die Carboxyl-Gruppe von Uronsäuren mit der primären Amino-Gruppe des PEI unter Ausbildung einer Amid-Bindung zu verknüpfen. Als Kopplungs-Reagenz wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) in Kombination mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) eingesetzt. In Abb. 3.24 ist die Amidierung einer Uronsäure mit der Amino-Gruppe des PEI schematisch dargestellt [133].

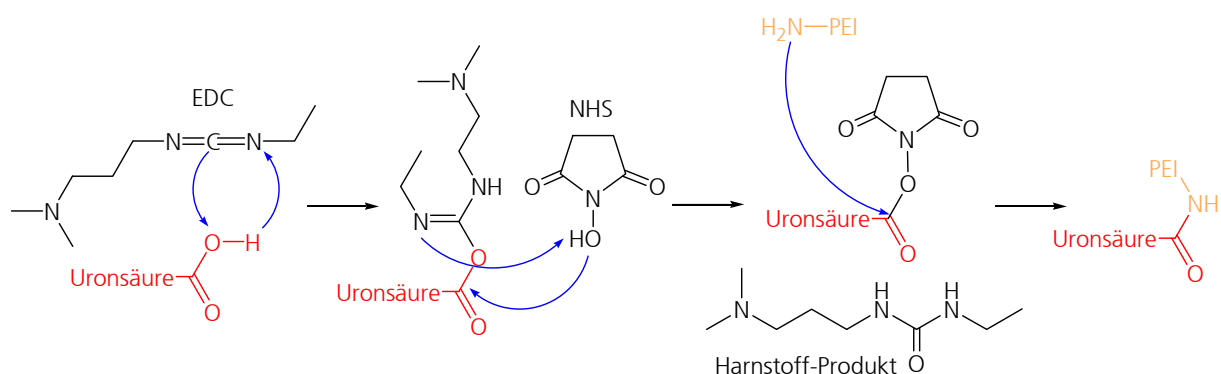


Abb. 3.24: Mechanismus der Kopplungsreaktion zwischen Carboxyl- und Amino-Gruppe

Die Synthese wurde in Wasser durchgeführt, da das verwendete Carbodiimid sowie alle weiteren Reaktanden wasserlöslich waren und die Aufarbeitung mittels wässriger Dialyse wesentlich vereinfacht wurde. In Abb. 3.25 ist die Synthese von PEI-*g*-(PEO-Man) dargestellt. Alle Uronsäure-Copolymere wurden analog hergestellt. Als Ausgangspolymere wurden PEI und PEI-*g*-PEO(20) eingesetzt. Die Uronsäuren wurden hierbei direkt oder über eine PEO-Seitenkette (32 PEO-Einheiten) mit dem kationischen Polymer verbunden. Zusätzlich wurde die Anzahl der Liganden pro Polymer variiert.

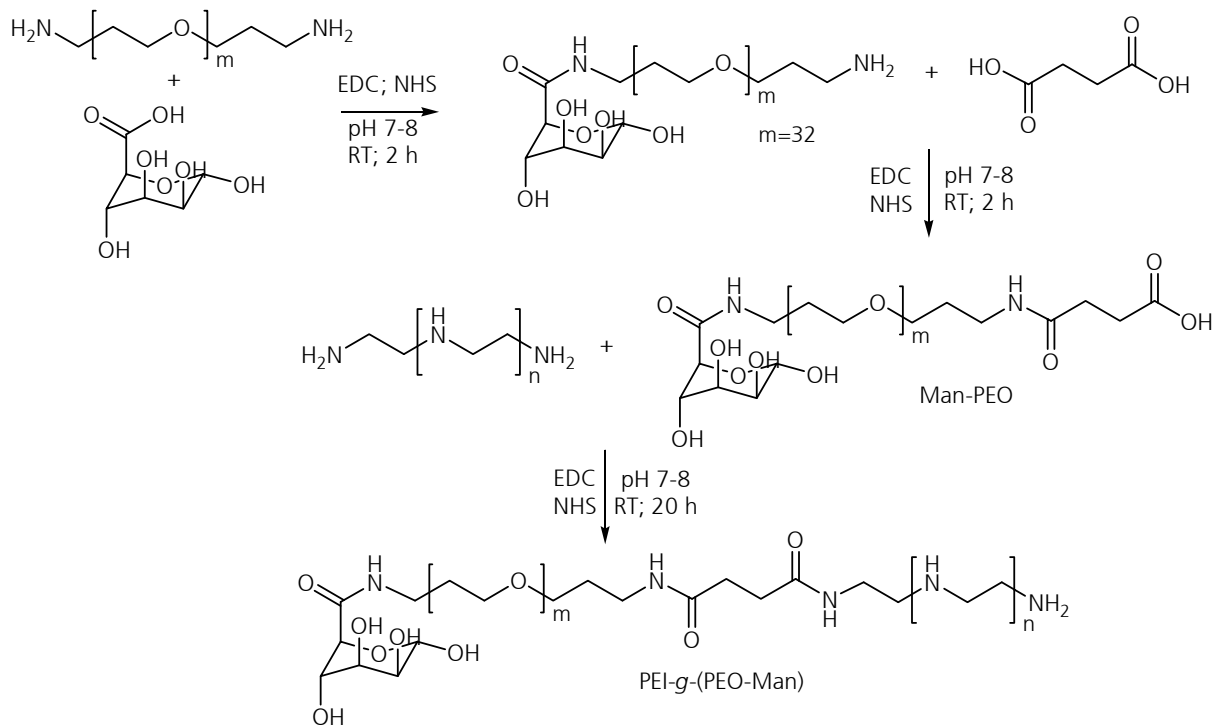


Abb. 3.25: Synthese von Poly(ethylenimin)-g-[Poly(ethylenoxid)₃₂-Mannuronsäure]

3.4.3 Physikochemische Charakterisierung der Genvektoren mit Uronsäure-Liganden

3.4.3.1 Durchschnittliche Anzahl der Uronsäure-Liganden je Molekül

Die Anzahl an Galacturon- und Mannuronsäure-Gruppen pro Polymer wurde photometrisch nach der Dinitrosalicylsäure-Methode [134] bestimmt. Das Prinzip beruht darauf, dass Aldosen in alkalischen Lösungen 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSS) zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduzieren; dies führt zu einem Farbumschlag von gelb nach rot. Der Farbkomplex wurde bei 560 nm im UV/VIS-Spektrometer vermessen. Bei dieser Methode müssen die Zucker als Halbacetale vorliegen, da die freie Carbonyl-Gruppe der offenkettigen Form nur bei Halbacetalen über die oxo-cyclo-Tautomerie gebildet werden kann.

Aus diesem Grund ist diese Bestimmung nicht für Lactobionsäure geeignet. Es liegt ein Vollacetal ohne reduzierende Gruppe vor. Bei Lactobionsäure wurde daher die Anthron-Methode [135] angewandt. Aldosen, Ketosen und Polysaccharide bilden mit Anthron in konzentrierter Schwefelsäure einen blauen Farbstoff, der bei 630 nm photometrisch vermessen wird. Die Schwefelsäure spaltet hierbei zunächst das Vollacetal.

Die photometrisch bestimmte Anzahl an Liganden ist in Tabelle 3.9 aufgelistet. Die Ligandenanzahl der Lactobionsäure-Copolymere liegt im Bereich des theoretisch möglichen Modifizierungsgrades (9-11 LB-Liganden pro Polymer), während die Polymere mit Mannuron- und Galacturonsäure bei gleichen Synthesebedingungen weniger Liganden aufweisen (3-4 Man- bzw. 5-7 Gal-Liganden pro Polymer). Diese reduzierte Anzahl an Man- und Gal-Liganden ist vermutlich auf eine sterische Hinderung zurückzuführen. Die Carboxyl-Gruppe der Lactobionsäure (LB) sitzt im Gegensatz zu der Mannuron- und Galacturonsäure an der Seitenkette und sollte dadurch flexibler sein.

3.4.3.2 Hydrodynamischer Durchmesser der Uronsäure-Polymere

Der hydrodynamische Durchmesser d_h und der Polydispersitätsindex PDI der kationischen Polymere wurde mittels DLS bestimmt. Die Durchmesser der Uronsäure-Polymere auf PEI-Basis liegen im Bereich von 9 nm bis 13 nm. Sie weisen trotz steigender Molmasse, resultierend aus dem Modifizierungsgrad, keine signifikante Änderung zum unmodifizierten PEI (10 nm) auf. Es liegt vermutlich eine zunehmend kompaktere Struktur mit Erhöhung der Ligandenanzahl vor. Vergleichend hierzu werden bei den Ligand-funktionalisierten PEI-*g*-PEO-Copolymeren sowohl signifikant höhere hydrodynamische Durchmesser wie bei (PEI-*g*-PEO)-Gal (25,8 nm) und (PEI-*g*-PEO)-LB (22,2 nm) als auch geringere Durchmesser von 14 nm bei (PEI-*g*-PEO)-*g*-Man gefunden. Die Durchmesser der Polymere, deren Ligand über eine PEO-Seitenkette gebunden ist, weisen ebenfalls geringere Werte auf, bedingt durch die Flexibilität der PEO-Seitenkette. Die hydrodynamischen Durchmesser aus den DLS-Messungen sowie die Anzahl der Uronsäure-Liganden aus der UV/VIS-Spektroskopie sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Hydrodynamische Durchmesser und Anzahl der Uronsäure-Liganden pro Polymer

	Uronsäure-Liganden	d_h [nm]	PDI
PEI	-	9,9	0,25
PEI- <i>g</i> -Gal	7	10,7	0,30
PEI- <i>g</i> -(PEO-Gal)	5	10,2	0,31
PEI- <i>g</i> -LB	9	9,0	0,34
PEI- <i>g</i> -LB	20	9,8	0,36
PEI- <i>g</i> -(PEO-LB)	11	9,8	0,36
PEI- <i>g</i> -Man	4	11,1	0,43
PEI- <i>g</i> -(PEO-Man)	4	12,7	0,37
PEI- <i>g</i> -PEO(20)*	-	17,4	0,40
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Gal	5	25,8	0,42
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Gal)	5	18,5	0,41
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -LB	9	22,2	0,44
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-LB)	10	16,9	0,44
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Man	4	13,5	0,38
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Man)	3	14,9	0,43

*Ausgangspolymere, synthetisiert und verwendet von Dipl. Ing. (FH) Maren Niclasen

3.4.3.3 Molmassencharakterisierung der Uronsäure-Copolymere

Die Molmassen und -massenverteilungen wurden wie schon bei den zuvor beschriebenen kationischen Copolymeren mittels Sedimentationsgeschwindigkeitslauf und verschiedener Auswertetechniken in der SEC-MALLS untersucht.

Die Ergebnisse dieser Molmassencharakterisierung sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: Molmassen und -verteilung der Uronsäure-Copolymere

	$[\eta]$ [cm ³ /g]	k_{SB}	M_p^{AUZ} [10 ³ g/mol]	$M_{w,UK}$ [10 ³ g/mol]	D	$M_{w,LS}$ [10 ³ g/mol]
PEI*	11,5	1,40	35,8	50,1	1,49	49,8
PEI- <i>g</i> -Gal(7)	12,4	1,23	35,9	56,6	2,25	70,4
PEI- <i>g</i> -(PEO-Gal)(5)	17,5	1,07	43,4	88,5	2,36	88,1
PEI- <i>g</i> -LB(9)	12,8	1,21	36,7	38,9	1,92	34,4
PEI- <i>g</i> -LB(20)	13,6	1,12	40,8	133,9	2,13	105,9
PEI- <i>g</i> -(PEO-LB)(11)	16,3	1,14	40,3	195,4	2,17	81,8
PEI- <i>g</i> -Man(4)	14,4	0,79	30,5	91,6	2,08	86,1
PEI- <i>g</i> -(PEO-Man)(4)	16,6	0,90	41,2	59,0	1,95	66,7
PEI- <i>g</i> -PEO(20)*	18,0	1,12	56,2	74,0	1,90	102,7
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Gal(5)	27,6	0,74	61,0	304,1	1,91	344,5
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Gal)(5)	21,1	1,10	59,3	212,5	3,24	200,0
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -LB(9)	23,5	0,89	60,4	195,4	3,44	154,6
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-LB)(10)	18,4	1,05	55,6	220,0	2,74	145,5
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -Man(4)	19,8	0,81	44,2	135,7	3,24	109,9
(PEI- <i>g</i> -PEO)- <i>g</i> -(PEO-Man)(3)	18,5	0,91	48,6	146,8	3,22	140,7

* Ausgangspolymere, verwendet von Dipl. Ing. (FH) Maren Niclasen

Die Molmassen M_p^{AUZ} der Uronsäure-funktionalisierten PEI- und PEI-*g*-PEO-Copolymere aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf ändern sich im Vergleich zu ihren Ausgangspolymeren nicht signifikant (36000-44000 g/mol bzw. 50000-60000 g/mol). Die Liganden sind hierbei direkt oder über einen PEO-Seitenarm an das PEI gebunden. Die PEO-Seitenketten des Pfropfcopolymers PEI-*g*-PEO sind hauptsächlich für die Molekülstruktur verantwortlich, die einen großen Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit besitzt. Durch die Modifizierung mit Liganden resultiert daher nur eine geringe Änderung der Molmassen bei dieser Messmethode.

Die SEC-Elugramme der Uronsäure-Copolymere weisen mit zunehmendem Umsetzungsgrad eine höhere Polydispersität auf. Dies zeigt sich besonders bei den Uronsäure-Pfropfcopolymeren auf Basis von PEI-*g*-PEO ($D > 2,5$). Durch die asymmetrische Pfropfung des PEI-*g*-PEO ist die Inhomogenität des Copolymers gegenüber PEI gestiegen. Es wurden Mischungen aus unmodifiziertem PEI und Pfropfcopolymerfraktionen mit uneinheitlicher chemischer Zusammensetzung erhalten. Die Polymere weisen hierbei eine kompakte Struktur auf. Die Polydispersitäten steigen stark an, z.T. zu sehen an der Bildung einer Schulter im hochmolekularen Molmassenbereich des Elugramms. Gleichzeitig erhöhen sich die gemessenen Molmassen der Uronsäure-Copolymere aus dem Lichtstredetektor und aus der universellen Kalibrierung deutlich (speziell die Molmassen der Uronsäure-funktionalisierten PEI-*g*-PEO-Copolymere, s. Tabelle 3.10).

3.4.4 Polykation-DNA-Komplexe mit Man-Liganden

Exemplarisch wurden die Partikelgrößen und die Zeta-Potentiale einiger Mannuronsäure-Vektoren, sowie der PEI und PEI-g-PEO-Vektoren bestimmt. Hierbei erfolgte eine Abschätzung der Größe und Stabilität der Vektoren, da Assoziate in den nachfolgenden Transfektionsstudien unerwünscht sind. Die Messung der Partikelgrößen und der Zeta-Potentiale wurde in H₂O mit einer Gesamtkonzentration der DNA von 30 µg/ml durchgeführt.

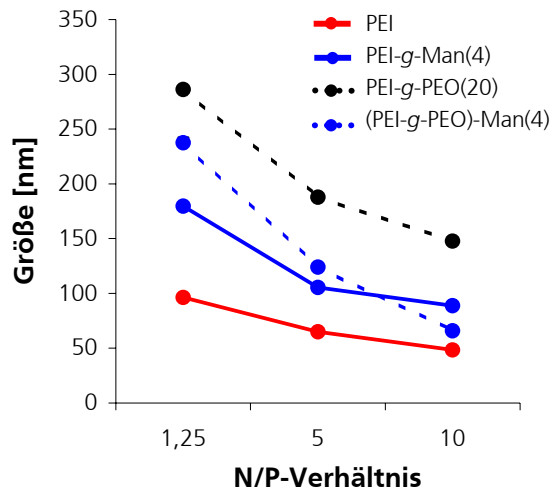


Abb. 3.26: Größe der Polymer-DNA-Komplexe

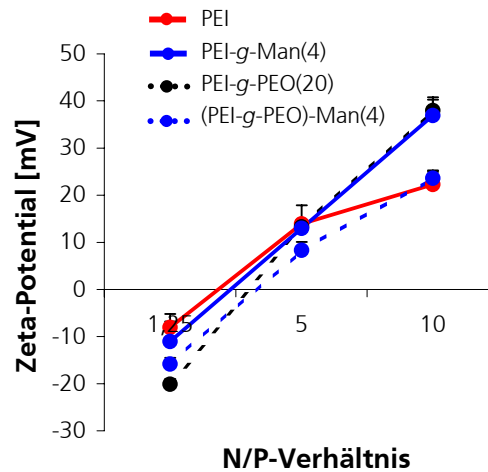


Abb. 3.27: Zeta-Potential der Polymer-DNA-Komplexe

In Abb. 3.26 sind die Partikelgrößen einiger Polymer-DNA-Komplexe mit Man-Liganden im Vergleich zu PEI- und PEI-g-PEO-Vektoren dargestellt. Bei allen Komplexen konnte beobachtet werden, dass die Partikelgröße mit Zunahme des Polykation-Anteils bzw. mit Erhöhung des N/P-Verhältnisses sinkt. Hierbei besitzen die PEI-Vektoren die kleinsten Partikelgrößen über den gemessenen N/P-Bereich (1,25 bis 10). Die Größe sinkt von etwa 100 nm auf 50 nm ab. Dagegen sind die Partikelgrößen beider Man-Vektoren (PEI-g-Man(4), PEI-g-PEO)-Man(4)) mit 180 nm bzw. 240 nm bei dem niedrigsten N/P höher, sinken aber bis auf 90 nm bzw. 65 nm ab. PEI-g-PEO(20) besitzt über den gesamten Messbereich hohe Partikelgrößen, die geringste Größe mit 150 nm liegt bei einem N/P-Verhältnis von 10 vor. Betrachtet man hierzu die Zeta-Potentiale der Polymer-DNA-Komplexe in Abb. 3.27, so findet man ausgehend von negativen Potentialen bei geringen N/P-Verhältnissen (Unterschuss an Polykationen, da nicht jedes Stickstoffatom des Polykations bei den Messbedingungen geladen ist) einen stetigen Verlauf hin zu positiven Potentialen bei hohen N/P-Verhältnissen (Überschuss an Polykationen). Der Nulldurchlauf bei einem $\xi=0$ liegt bei allen hier gemessenen Komplexen bei einem N/P-Verhältnis von 2,5 (Ausgleich der Ladungen im Komplex). Bei einer Gegenüberstellung von Zeta-Potential und Partikelgröße kann allgemein festgestellt werden, dass die Partikelgröße mit Zunahme des Zeta-Potentials erniedrigt wird.

Vergleichend zu den hydrodynamischen Durchmesser der Polykationen (~10-25 nm) und der Plasmid-DNA pCMVluc (~180 nm) muss betont werden, dass die Plasmid-DNA im Komplex stark verdichtet vorliegen muss, denn die Partikelgrößen liegen beim N/P-Verhältnis von 10 im Bereich von 50 nm bis 100 nm.

3.4.5 *In vitro* Versuche mit Uronsäure-Vektoren

Die Transfereffizienz der Uronsäure-Vektoren wurde an den Zellkulturen HepG2 (Leberkrebszellen), HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen) und 16HBE (Atemwegsepithelzellen) untersucht. Die Abb. 3.28 bis Abb. 3.30 zeigen die Transfektionsergebnisse der Uronsäure-Vektoren mit den Liganden Galacturon-, Lactobion- und Mannuronsäure an Leberkrebszellen im Vergleich zu PEI und PEI-g-PEO(20).

Die Vektoren mit Galacturon- und Lactobionsäure-Liganden beeinflussen die Transfektion bei HepG2-Zellen nicht. Die Kurven aller Vektoren zeigen einen ähnlichen Verlauf wie der unmodifizierte PEI-Vektor.

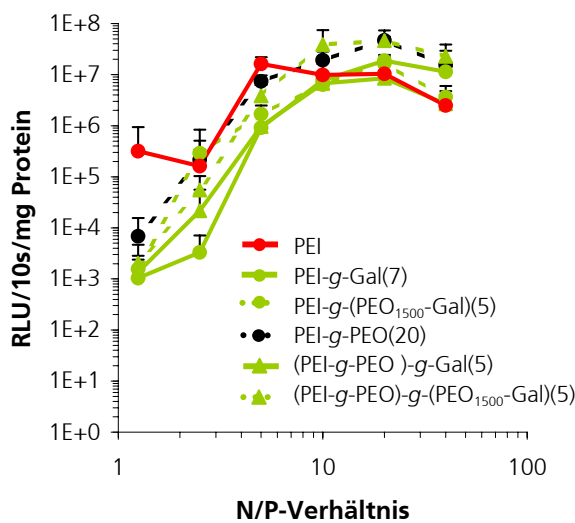


Abb. 3.28: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an HepG2-Zellen

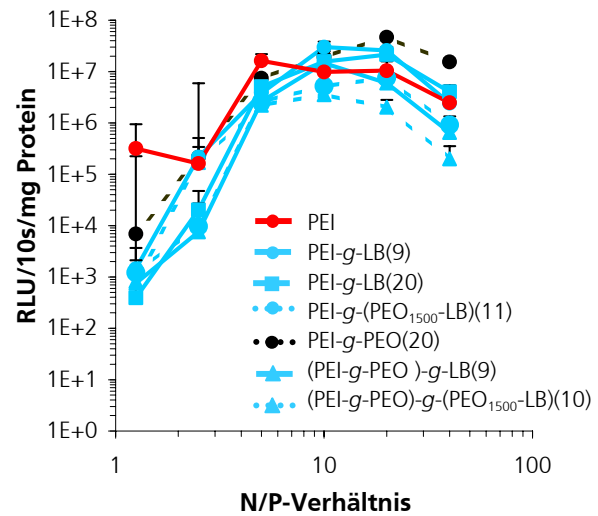


Abb. 3.29: Transfereffizienz der LB-Vektoren an HepG2-Zellen

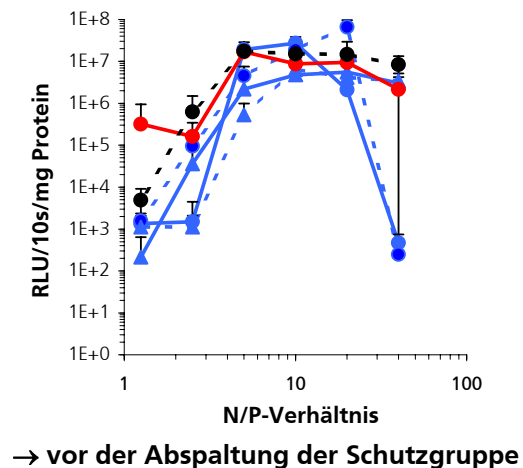
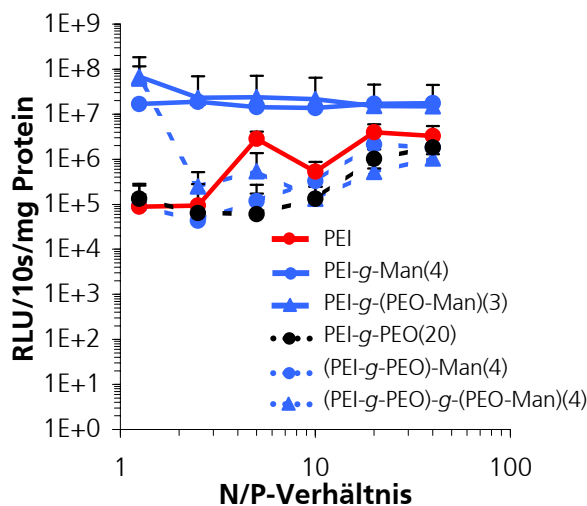


Abb. 3.30: Transfereffizienz der Man-Vektoren an HepG2-Zellen nach und vor der Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe

Die Mannuronsäure-PEI-Vektoren zeigen dagegen im Vergleich zu den PEI-Vektoren eine signifikant höhere Transfereffizienz. Diese konstante Transfereffizienz über alle N/P-Verhältnisse, insbesondere bei niedrigen N/P-Verhältnissen, deutet auf eine rezeptorvermittelte Endozytose hin, die unabhängig von der Ladung ist. Hierbei ist es notwendig, die glycosidische Schutz-

gruppe vor der Transfektion abzuspalten. Ohne Schutzgruppen-Abspaltung werden nur geringe Transferraten erzielt, wie in der kleinen, rechten Abb. 3.30 erkennbar ist. Die niedrigen Transfektionsergebnisse der Vektoren auf Basis des Pfropfcopolymers PEI-g-PEO sind vermutlich auf die kompakte Struktur des Copolymers und die Abschirmung durch die PEO-Pfropfketten zurückzuführen, die eine Wechselwirkung des Liganden mit dem Rezeptor verhindern.

Die Transfektionsergebnisse der Galacturon- (Abb. 3.31) und Lactobionsäure-Vektoren (Abb. 3.32) an HeLa-Zellen zeigen für einige auf PEI basierende Vektoren eine gegenüber dem unmodifizierten PEI-Vektor erhöhte Transfereffizienz bei niedrigen N/P, die bei hohen N/P-Verhältnissen wieder stark sinkt. Eine Abhängigkeit der Transfektion von der Anzahl der Liganden konnte nicht beobachtet werden.

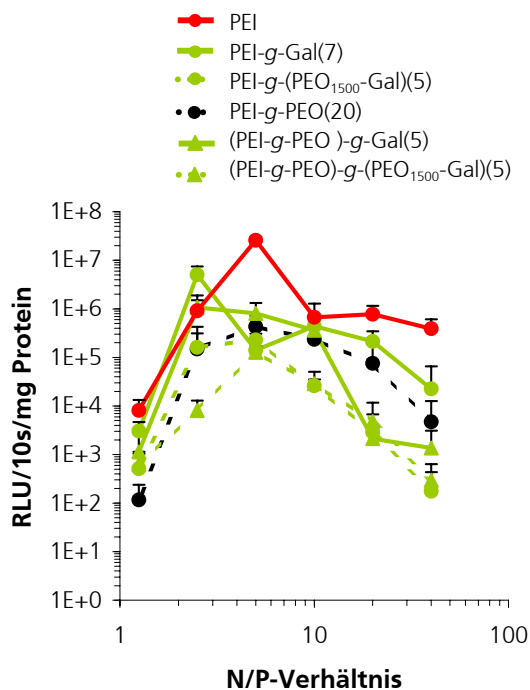


Abb. 3.31: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an HeLa-Zellen

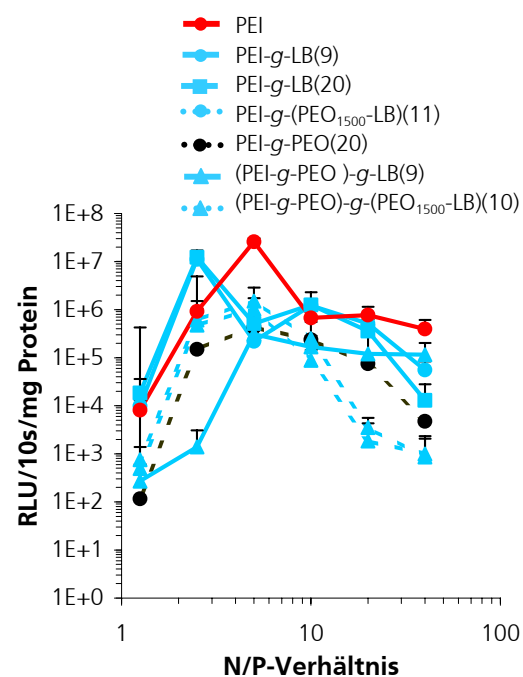


Abb. 3.32: Transfereffizienz der LB-Vektoren an HeLa-Zellen

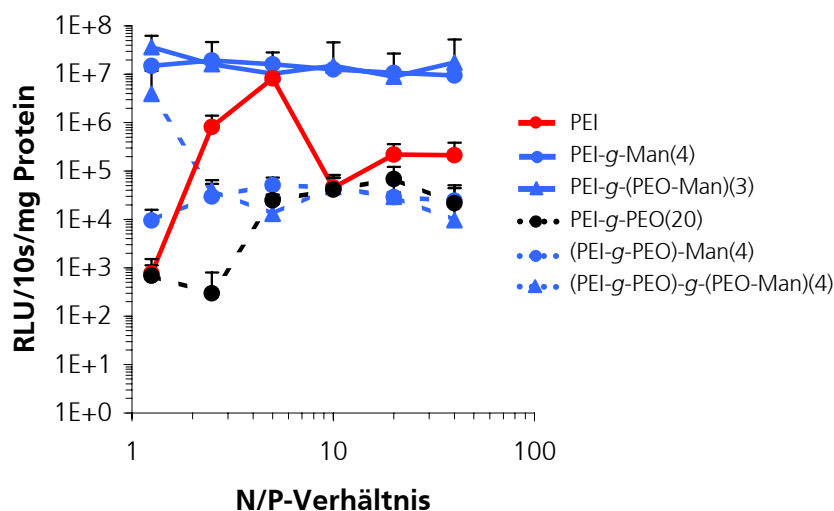


Abb. 3.33: Transfereffizienz der Man-Vektoren an HeLa-Zellen

Sowohl PEI-g-LB(9) als auch PEI-g-LB(20) weisen bei einem N/P von 2,5 eine etwa 10fach höhere Transfereffizienz als PEI auf. Dieses Maximum im Kurvenverlauf deutet daraufhin, dass die Aufnahme der LB-Vektoren in die HeLa-Zellen über eine rezeptorvermittelte Endozytose verlaufen sein könnte. Alle Uronsäure-Vektoren auf Basis des Ppropfcopolymers PEI-g-PEO zeigen dagegen an HeLa-Zellen keine signifikante Steigerung in der Transfektion gegenüber ihrem Precursor-Polymer. In Abb. 3.33 sind die Transfereffizienzen der Mannuronsäure-Vektoren an HeLa-Zellen dargestellt. Die Kurvenverläufe von PEI-g-Man(4) und PEI-g-(PEO-Man)(3) sind ähnlich zu den *in vitro* Ergebnissen an den HepG2-Zellen. Eine hohe N/P-unabhängige Transfektion liegt vor. Die Luciferase-Aktivität aller Uronsäure-Vektoren sind an den 16HBE-Zellen in Bezug zu den Krebszellkulturen signifikant geringer. In den 16HBE-Zellen sind eventuell andere zelluläre Barrieren vorhanden, da das Lungengewebe vermehrt Schadstoffen aus der Luft ausgesetzt ist. Das Eindringen von Fremdstoffen (wie z.B. die Vektoren) in Atemwegsepithelzellen sollte durch diese Barrieren erschwert sein; dies äußert sich in niedrigeren Transfektionsraten an diesen Zellen.

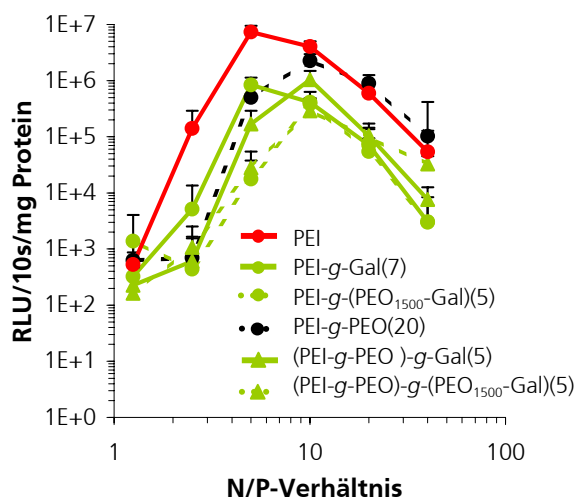


Abb. 3.34: Transfereffizienz der Gal-Vektoren an 16HBE-Zellen

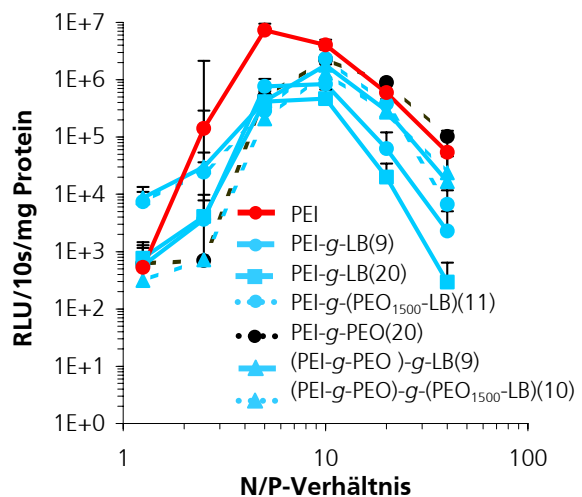


Abb. 3.35: Transfereffizienz der LB-Vektoren an 16HBE-Zellen

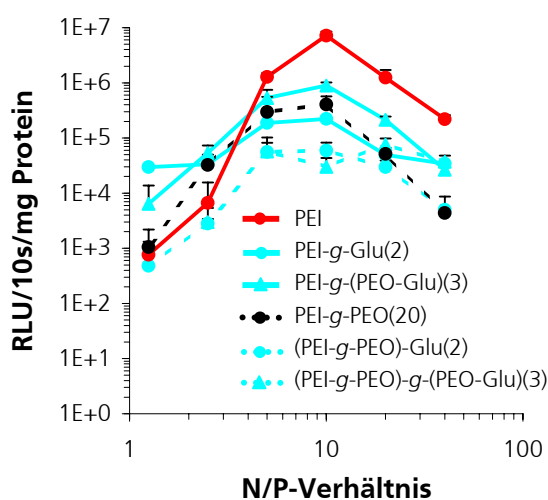


Abb. 3.36: Transfereffizienz der Glu-Vektoren an 16HBE-Zellen

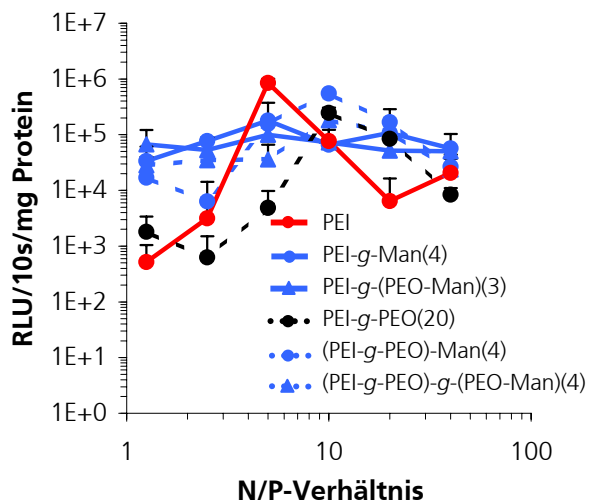


Abb. 3.37: Transfereffizienz der Man-Vektoren an 16HBE-Zellen

Die Vektoren mit Galacturon-, Glucuron- und Lactobionsäure zeigen ähnliche Kurvenverläufe an 16HBE-Zellen wie der PEI-Vektor (Abb. 3.34 bis Abb. 3.36). Die Luciferase-Aktivitäten liegen geringfügig unterhalb derer von PEI und erreichen ein Maximum bei einem N/P-Verhältnis von 5 bzw. 10. Die Internalisierung der Uronsäure-Vektoren in die Zelle verläuft vermutlich über die unspezifische Pinozytose, während die kationische Ladung des Polymers in Wechselwirkung mit der Zellmembran tritt und den Zelleintritt initiiert.

Die Mannuronsäure-Vektoren zeigen dagegen auch bei den 16HBE-Zellen eine nahezu hohe, konstante Transfereffizienz über den gesamten N/P-Bereich, wie aus Abb. 3.37 zu erkennen ist. Hierbei liegen die RLU-Werte unwesentlich höher als bei dem Vergleichsvektor PEI. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen sind die Man-Vektoren etwa um den Faktor 2 besser als PEI. Der PEI-Vektor besitzt ein Maximum bei einem N/P von 5 und ist hier etwa 10fach besser in der Transfereffizienz als die Man-Vektoren. Da die Transfereffizienzen der Man-Vektoren unabhängig von der Ladung des Komplexes sind, werden die Genpartikel auch hier mit hoher Wahrscheinlichkeit rezeptorvermittelt endozytiert.

Eine eindeutige Klärung des Internalisierungsprozesses sollen im Folgenden *in vitro* Versuche mit einem Überschuss an freier Mannuronsäure sowie Fluoreszenzmikroskopische Messungen mittels fluoreszenzmarkiertem Mannuronsäure-Aminodextran ergeben (siehe Kapitel 3.4.6).

Zusammenfassend ist zu betonen, dass die Vektoren mit Mannuronsäure bei allen drei Zelllinien HepG2, HeLa und 16HBE eine konstante, hohe Transfereffizienz zeigen. Sie sind über den hier untersuchten N/P-Bereich besser als der Vergleichsvektor PEI. Die Transfektion ist hierbei unabhängig von der Ladung des Komplexes (N/P-Verhältnis).

Einige Galacturonsäure- und Lactobionsäure-Vektoren auf Basis von PEI weisen im Vergleich zum unmodifizierten PEI-Vektor eine höhere Transfereffizienz bei N/P-Verhältnissen von 2,5-5 im Besonderen an HeLa-Zellen auf.

Im Gegensatz dazu wird in der Literatur beschrieben, dass Vektoren (auf Basis von PEI oder PLL) mit Mannose-Liganden im Vergleich zu Galactose- oder Lactose-Vektoren schlechtere Transfereffizienzen zeigen. Dies wurde im Besonderen von Midoux et al. [136] und Bennis et al. [137] an HepG2-Kulturen und von Fajac et al. [138] und Kollen et al. [139] an Atemwegsepithelzellen (16HBE, CF, non-CF) ermittelt. Hierbei wurde bei allen Zucker-Vektoren eine Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis gefunden. Vor allem Galactose-Vektoren an Hepatozyten (Kunath et al. [140], DeSmedt et al. [141]) und HeLa-Zellen (Bettinger et al. [142]) zeigen hohe Transfektionseffizienzen bei niedrigen N/P-Verhältnissen (bis $N/P=10$), die bei diesen N/P-Verhältnissen z.T. besser als die des unmodifizierten PEI-Vektors sind.

Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Literatur führte zu Überlegungen, wie die sehr guten Transfektionseigenschaften der Mannuronsäure-Vektoren erklärt werden könnten. Es sollten daher neue Uronsäure-Vektoren hergestellt werden, die in gleicher Weise wie die Mannuronsäure-Vektoren synthetisiert werden sollten. Deshalb wurde ein Methyl- α -D-Galactopyranosid zur Galacturonsäure oxidiert (wie zuvor für die Mannuronsäure bei der Herstellung der Man-modifizierten Polymere praktiziert) und an die kationischen Ausgangspolymere gebunden. Diese Gal_{ox}-Polymere sind mit den schon zuvor synthetisierten Gal-Copolymeren identisch, da sie sich nur in der Herstellung der Galacturonsäure unterscheiden. Die folgenden

Transfektionsversuche an Zellkulturen sollten Aufschluss darüber bringen, ob die guten Transfereffizienzen der Mannuronsäure an HepG2-, HeLa- und 16HBE-Zellen durch die zuerst durchgeführte Oxidation zur Uronsäure entstanden sind. In Abb. 3.38 und Abb. 3.39 sind die *in vitro* Ergebnisse der Gal_{ox}-Vektoren dargestellt.

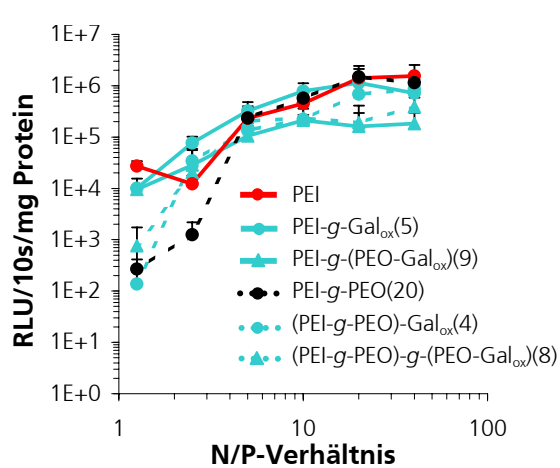


Abb. 3.38: Transfereffizienz der Gal_{ox}-Vektoren an HepG2-Zellen

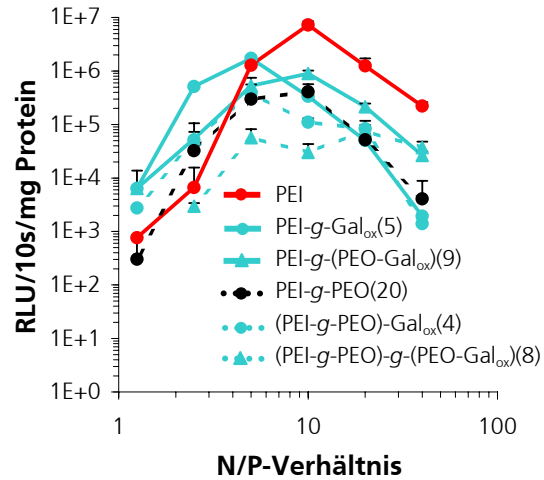


Abb. 3.39: Transfereffizienz der Gal_{ox}-Vektoren an 16HBE-Zellen

Die guten Transfektionsergebnisse der Man-Vektoren an HepG2 und 16HBE wurden von den Gal_{ox}-Vektoren nicht erreicht. Dies gilt besonders an den HepG2-Zellen. Die Gal_{ox}-Vektoren zeigen hier keine Transfektion unabhängig vom N/P-Verhältnis. Die Transfereffizienzen an 16HBE-Zellen (Abb. 3.39) erreichen ein Maximum bei N/P von 5 bzw. 10. Es liegen ähnliche Kurvenverläufe mit Effizienzen von etwa 1·10⁶ RLU wie bei den Vektoren mit Galacturonsäure-Liganden ohne Oxidationsschritt vor. Bei einem N/P von 2,5 besitzt das PEI-g-Gal_{ox}(5) eine etwa 75fach höhere Transfereffizienz im Vergleich zu PEI. Die Transfektionen der Gal_{ox}-Vektoren an HepG2 liegen im Bereich von PEI und zeigen keine signifikanten Abweichungen.

Die guten Transfektionseigenschaften der Man-Vektoren werden höchstwahrscheinlich durch ihre Struktur erreicht, da der Oxidationsschritt zu einer Uronsäure bei den Gal_{ox}-funktionalisierten Vektoren keine signifikanten Erhöhungen in den Transfereffizienzen erbrachte.

Mannuronsäure und Galacturonsäure unterscheiden sich in der Stellung von zwei OH-Gruppen am Zucker-Ring. Dieser geringe Unterschied hat offensichtlich entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz genommen, denn für eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist die Konstitution des signalübertragenden Moleküls von entscheidender Bedeutung.

Galacturon- und Lactobionsäure weisen ähnliche Transfektionsergebnisse auf. Dies ist durch die Ähnlichkeit ihrer Architektur zu erklären, da die Lactobionsäure strukturell eine Galactose ist, die eine glycosidisch gebundene Gluconsäure-Seitengruppe besitzt. Diese Seitengruppe zeigt keinen Einfluss auf die Transfektion.

In dem nachfolgenden Experiment wurden Transfektionen von Man-Vektoren an den Zelllinien HepG2, HeLa und 16HBE mit und ohne Zusatz an niedermolekularer Mannuronsäure durchgeführt. Die Transfereffizienz der Vektoren sollte bei Zusatz von freier Man deutlich niedriger sein, da diese die Rezeptoren auf der Zellmembran belegen und so die Aufnahme der Man-Vektoren

blockieren. In den Abb. 3.40 bis Abb. 3.42 sind die *in vitro* Versuche der Man-funktionalisierten Vektoren an HepG2-, HeLa- und 16HBE-Zellen dargestellt. Die blauen Balken zeigen die Transfektionen bei einem N/P-Verhältnis von 1,25 ohne Zusatz, während die dunkelroten Balken die Ergebnisse der Transfektionen mit einem 25fachen Überschuss an freier Mannuronsäure zeigen.

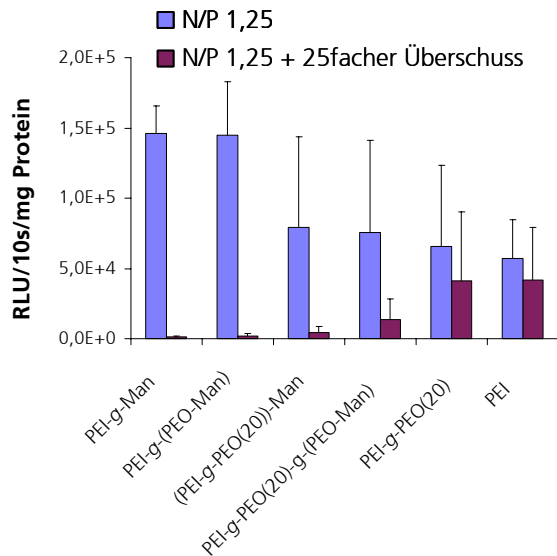


Abb. 3.40: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an HepG2

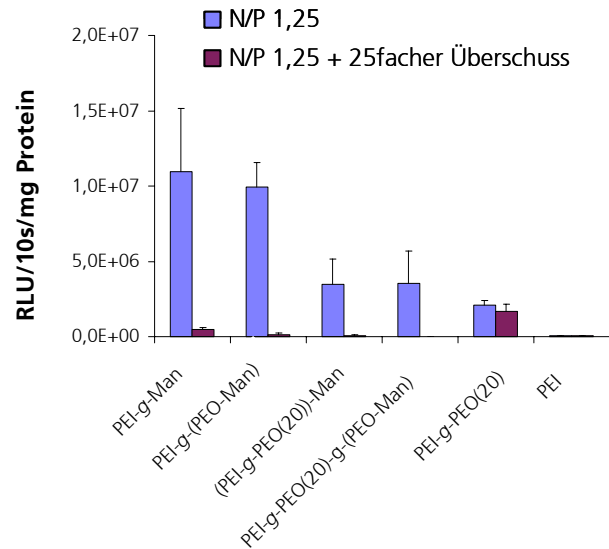


Abb. 3.41: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an HeLa

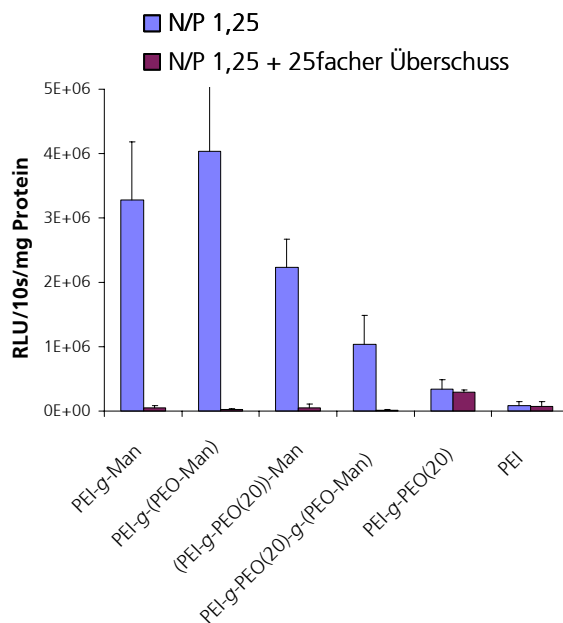


Abb. 3.42: Transfektion mit und ohne Überschuss von Man-Vektoren an 16HBE

In den drei Abb. ist eindeutig zu erkennen, dass bei allen Mannuronsäure-Vektoren [PEI-g-Man, PEI-g-(PEO-Man), (PEI-g-PEO)-Man, (PEI-g-PEO)-g-(PEO-Man)] signifikant niedrigere Transfereffizienzen mit Zusatz von freier Mannuronsäure erzielt wurden. Demgegenüber weisen die kationischen Ausgangspolymere PEI und PEI-g-PEO(20) auch mit Mannuronsäure-Überschuss nahezu identische Transfereffizienzen auf. Durch die Blockierung der Rezeptoren mit nieder-

molekularer Mannuronsäure konnten die Man-Vektoren nicht rezeptorvermittelt endozytiert werden. Die Transfektionsraten sind dadurch nahezu auf Null gesunken.

3.4.6 Fluoreszenzmikroskopie von Man-Aminodextranen

Im folgenden Kapitel ist die Untersuchung der Transfektion von Man-Aminodextran-Konjugaten unter dem Fluoreszenzmikroskop beschrieben. Hierzu wurde ein Aminodextran ($M_w=70000$ g/mol) mit dem Liganden Mannuronsäure (mit und ohne PEO-Seitenarm) modifiziert und anschließend mit dem Fluoreszenzmarker Carboxy-fluorescein-N-succinimidylester (FLUOS) umgesetzt. Als Negativkontrolle wurden fluoreszenzmarkierte Aminodextrane ohne Mannuronsäure als Ligand eingesetzt.

Die Zellkulturen wurden mit den Aminodextran-Konjugaten für etwa 45 min im Inkubationsschrank (37°C ; $5\% \text{CO}_2$) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau angefärbt.

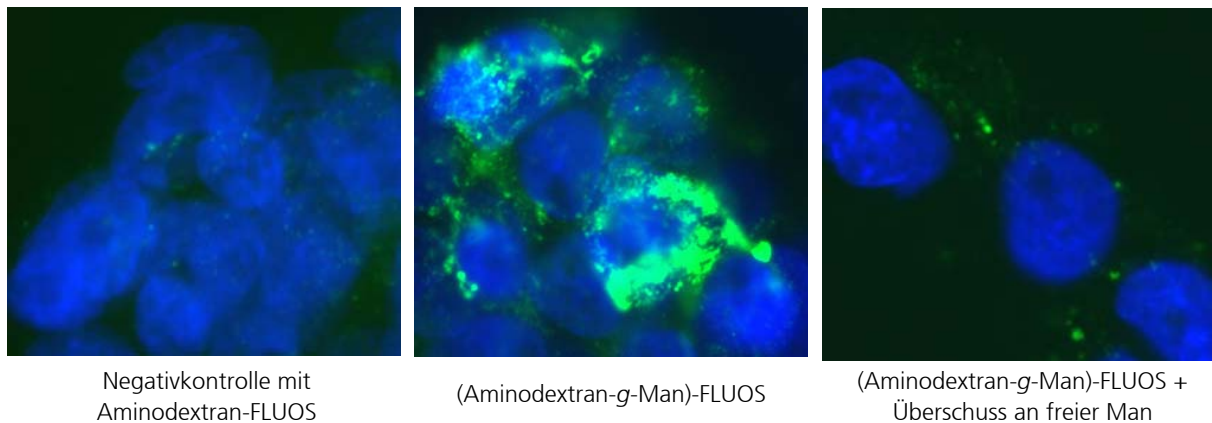


Abb. 3.43: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran-g-Man)-FLUOS-Vektoren an HepG2-Zellen

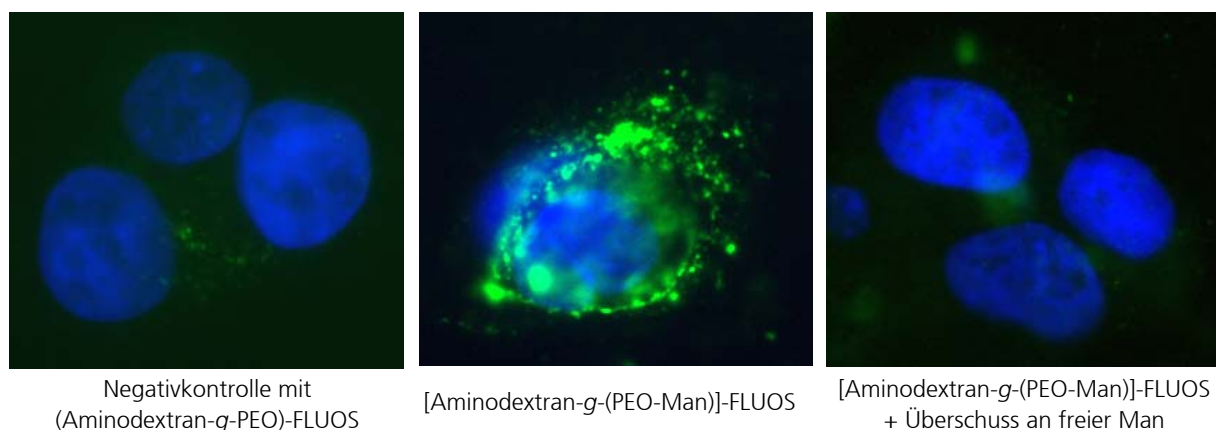


Abb. 3.44: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran-g-(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an HepG2-Zellen

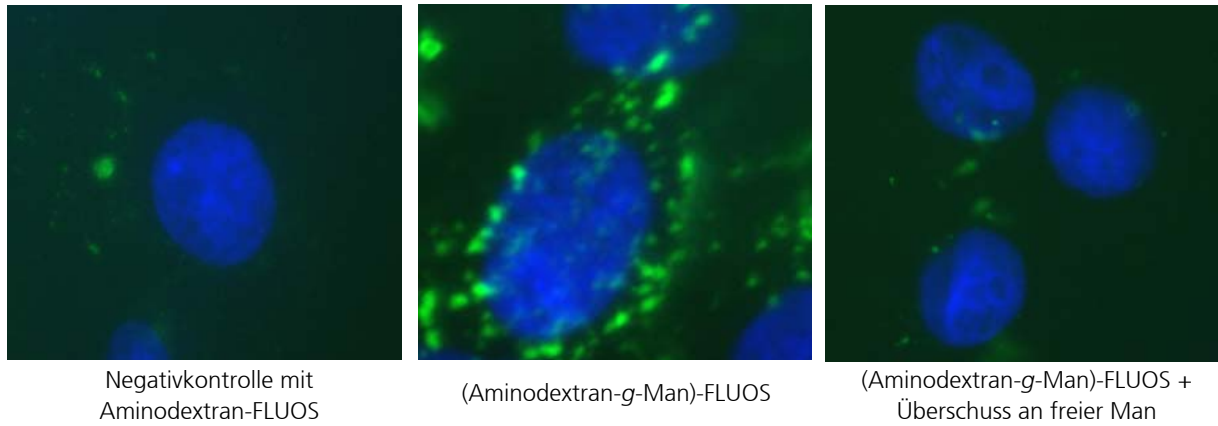


Abb. 3.45: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran-*g*-Man)-FLUOS-Vektoren an HeLa-Zellen

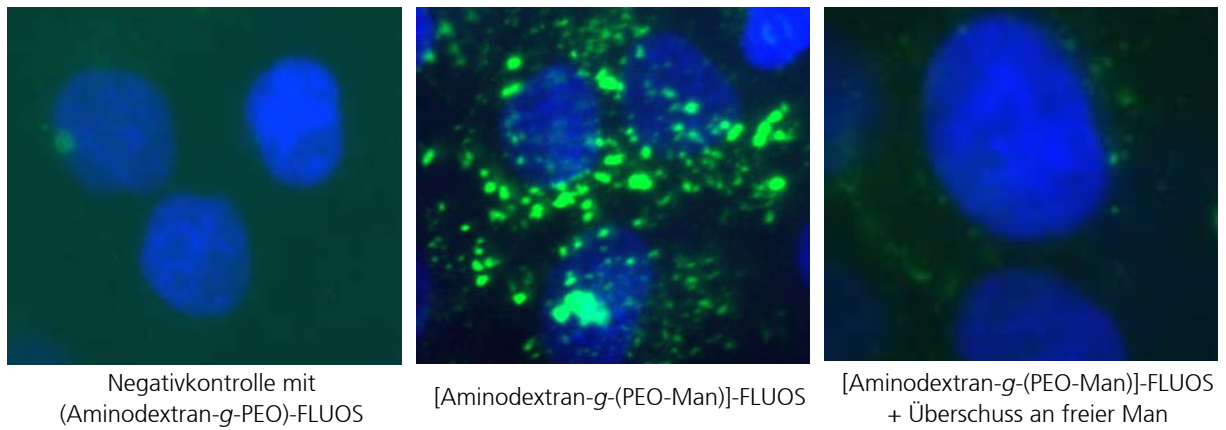


Abb. 3.46: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran-*g*-(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an HeLa-Zellen

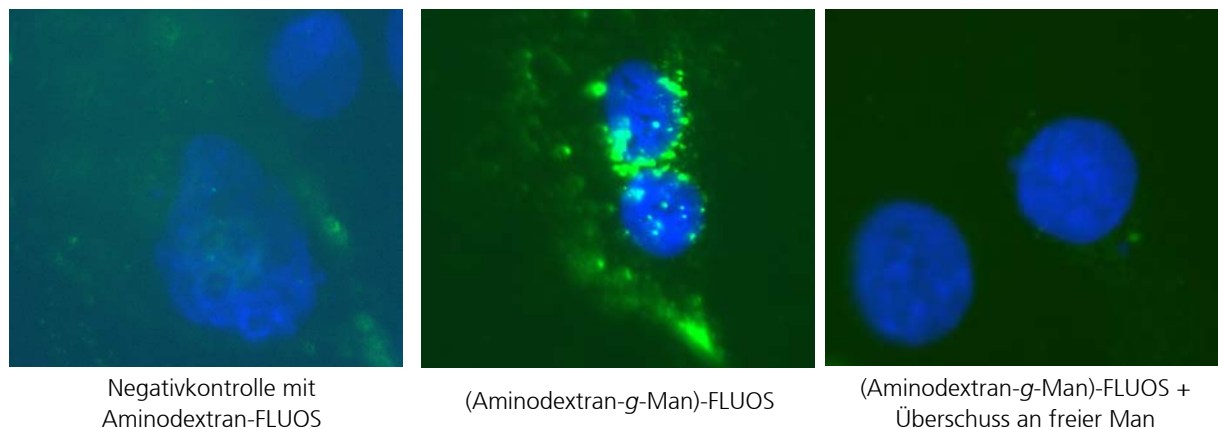


Abb. 3.47: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von (Aminodextran-*g*-Man)-FLUOS-Vektoren an 16HBE-Zellen

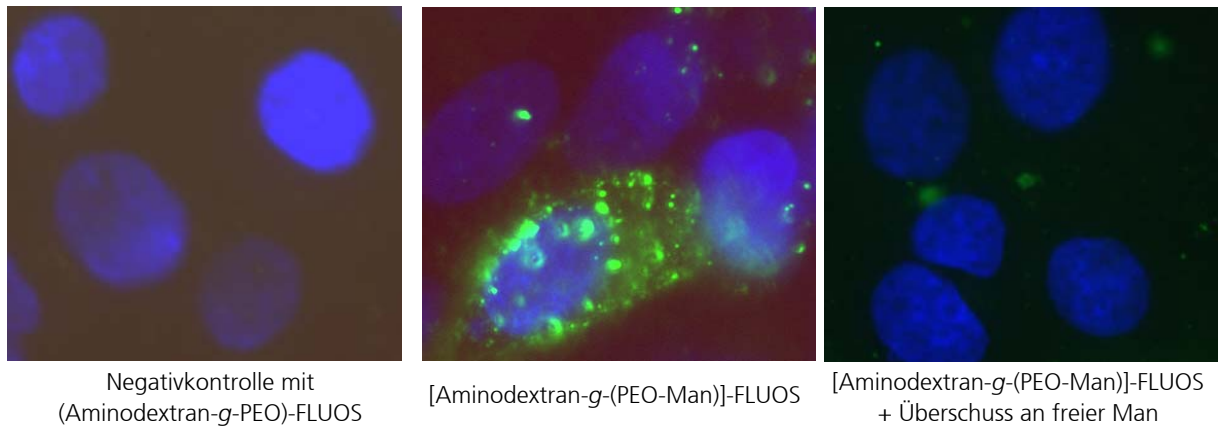


Abb. 3.48: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von [Aminodextran-g-(PEO-Man)]-FLUOS-Vektoren an 16HBE-Zellen

In den Abb. 3.43 bis Abb. 3.48 sind die Fluoreszenzmikroskopiebilder von (Aminodextran-g-Man(12))-FLUOS und [Aminodextran-g-(PEO-Man(11))]-FLUOS sowie die entsprechenden Aminodextrane ohne Man-Ligand dargestellt. Die Transfektionen wurden an den drei Zelllinien HepG2, HeLa und 16HBE durchgeführt.

Die Negativkontrollen der Aminodextrane ohne Mannuronsäure als Ligand sind jeweils im linken Bild dargestellt. In allen sechs Abbildungen ist zu erkennen, dass die grüne Fluoreszenz der Aminodextran-DNA-Konjugate in keiner Zelle vorhanden ist. Die Aminodextran-Vektoren sind innerhalb der Inkubationszeit von 45 min nicht in die Zellen (HepG2, HeLa und 16HBE) eingedrungen, da in dieser kurzen Zeit nur die rezeptorvermittelte Endozytose ablaufen kann. Das Aminodextran wird über eine Pinozytose aufgenommen.

Die mittleren Fluoreszenzbilder zeigen die Mannuronsäure-Aminodextran-Vektoren mit und ohne PEO-Seitenkette an den drei Zelllinien HepG2, HeLa und 16HBE. In allen Abbildungen ist eine hohe grüne Fluoreszenzintensität zu erkennen. Diese Fluoreszenz wird hierbei ausschließlich in kleinen Vesikeln, den Endosomen, detektiert, die sich z.T. an der Zellkernmembran befinden, wie z.B. in der Abb. 3.44 deutlich zu erkennen ist.

In den rechten Fluoreszenzbildern sind die Transfektionsversuche der Man-Aminodextran-Vektoren mit einem Überschuss an freier Mannuronsäure dargestellt. In allen Zellen ist die Fluoreszenzintensität nahezu gleich null, da die niedermolekularen Mannuronsäuremoleküle die Rezeptoren auf der Zellmembran besetzen und somit die Ligand-Vektoren nicht rezeptorvermittelt endozytiert werden können. Die Einschleusungseffizienz der Vektoren in die Zellen sinkt dadurch stark ab.

Durch diese Ergebnisse wird eindeutig belegt, dass die Man-funktionalisierten Vektoren über eine rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden.

Ähnliches wurde schon an hand von Zucker-Vektoren von Midoux et al. [136] beobachtet, die Lac-PLL und Chloroquin mit HepG2-Zellen inkubierten. Nach 4 h Inkubationszeit wurden viele kleine fluoreszierende Vesikel in 95% der Zellen mittels Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Bei Choi et al. [143] wurden Gal-PNIPAM und PNIPAM mit HepG2-Kulturen inkubiert und mittels Konfokaler Mikroskopie untersucht. Es konnte eine intensivere Fluoreszenz bei den Zellen, die mit dem Gal-Vektor transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Park et al. [144] untersuchten die Transfektion von Gal-(Chitosan-g-PEO) an HepG2- und HeLa-Zellen sowohl mit

Fluoreszenzmikroskopie als auch mit Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden kleine fluoreszierende Vesikel in der Zelle detektiert und somit eine effiziente Transfektion hinsichtlich der HepG2-Zellen beobachtet. Die HeLa-Zellen zeigten dagegen keine Fluoreszenz und somit keine Transfektion des Gal-(Chitosan-*g*-PEO) in die Zelle. Eine Erklärung wurde hinsichtlich der nicht vorhandenen Gal-Rezeptoren auf der Membran der HeLa-Zellen gefunden.

In dieser Arbeit konnte an Hand von *in vitro* Transfektionen, sowohl ohne und mit Überschuss an niedermolekularer Mannuronsäure als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die Man-funktionalisierten Vektoren über eine rezeptorvermittelte Endozytose an HepG2-, HeLa- und 16HBE-Zellen internalisiert werden.

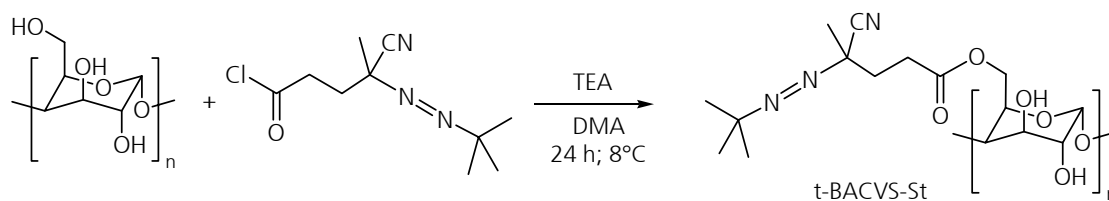
Diese Internalisierung resultiert höchstwahrscheinlich aus der Anwesenheit spezieller Mannose-Rezeptoren, die sich auf den hier verwendeten Zellen befinden.

3.5 Genvektoren auf Basis von kationischen Stärkepfropfcopolymeren

Eine neue Idee für den Einsatz eines kationischen Copolymers in der somatischen Gentherapie ist die Synthese von kationischen Stärkepfropfcopolymeren. Die kationischen Pfropfketten können die DNA komplexieren, während die Stärke den Komplex abschirmt, um Wechselwirkungen mit z.B. Blutplasmabestandteilen (Biokompatibilität) zu vermeiden.

Die Synthese dieser Pfropfcopolymere wurde über einen Stärkemakroinitiator erreicht. Hierbei wurde der niedermolekulare Initiator tert.-Butylazocyanoveriersäurechlorid (t-BACVS) kovalent an die Stärke (St) gebunden (Abb. 3.49). Es wurde eine Reaktionstemperatur von 8°C gewählt, da bei dieser niedrigen Temperatur die Regioselektivität der Reaktion erhöht wird und Azo-initiatoren generell temperaturempfindlich sind. Eine spezifische Substitution am C-6 der Stärke konnte mittels ¹³C-NMR nachgewiesen werden. Durch die Variation der Reaktionsbedingungen können hierbei Makroinitiatoren mit unterschiedlichem Substitutionsgrad hergestellt werden.

Abb. 3.49: Reaktion von 4-tert.-Butylazo-4-cyanoveriersäurechlorid mit Stärke



Anschließend wurden in einer radikalischen Polymerisation bei 70°C kationische Acryl-Monomere auf das Stärkerückgrat gepfropft. In ersten Untersuchungen wurde das Monomer 3-Dimethylaminopropyl-methacrylamid (DMAPMAM) verwendet. In Abb. 3.50 ist die Pfropfpolymerisation von Stärke mit DMAPMAM dargestellt. Wie kinetische Untersuchungen im Rahmen der Dissertation von Bruzzano [145] belegen, kann durch eine asymmetrische Initiatorstruktur die Bildung von Homopolymer in Pfropfpolymerisationen auf Stärke weitgehend vermieden werden. Das abgespaltene tert.-Butylradikal startet nur in geringem Maße die Polymerisation des Pfropfmonomers. Dabei sollte das Monomer eine sehr geringe Übertragungsaktivität besitzen.

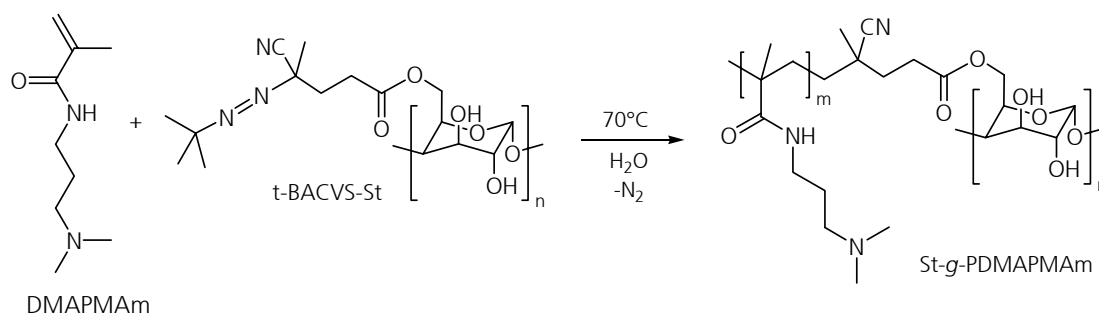


Abb. 3.50: Pfropfpolymerisation von Stärke mit DMAPMAM

3.5.1 Charakterisierung der Stärkemakroinitiatoren

Der Substitutionsgrad (DS) der Stärkemakroinitiatoren wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 bestimmt. Im NMR-Spektrum treten im Bereich von 4,2-6,0 ppm die Signale der 3 Protonen der Hydroxyl-Gruppen sowie das Signal des Halbacetalprotons der Stärke auf. Diese Signale der Stärke werden ins Verhältnis zu dem charakteristischen Signal der tert.-Butyl-Gruppe bei 1,2 ppm bzw. zu dem Signal der Methylgruppe bei 1,6 ppm gesetzt, um den Substitutionsgrad DS zu berechnen.

Des Weiteren wurde zur Bestimmung des Substitutionsgrades die Thermoanalyse herangezogen. Hierbei kann die Ermittlung des DS aus den Thermogrammen von DSC-Messungen erfolgen. Dazu wurde der thermische Zerfall der asymmetrischen Makroinitiatoren t-BACVS-St in Festsubstanz untersucht (siehe Kapitel 5.4.9).

Für die beiden verwendeten Stärkemakroinitiatoren t-BACVS-St 1 und 2 wurde sowohl aus $^1\text{H-NMR}$ -Messungen als auch aus der DSC ein DS von 0,07 bzw. 0,05 erhalten.

Die Molmassen und -massenverteilungen der Ausgangsstärken wurden mittels SEC-MALLS bestimmt. Für alle synthetisierten Makroinitiatoren wurden die Molmassen der Stärkesubstrate verwendet, da eine Vergleichsmessung von Stärkesubstrat und Makroinitiator mit einem DS von 0,05 gezeigt hat, dass sich die Molmasse und Molmassenverteilung während der Reaktion nicht wesentlich ändern. Das Stärkesubstrat wies ein $M_{p,LS}$ von 10^5 g/mol auf.

3.5.2 Physikochemische Charakterisierung der kationischen Stärkepfropfcopolymere

Die Copolymerzusammensetzung des kationischen Stärkepfropfcopolymers wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden die Signale der Stärke-Protonen zwischen 3,5 ppm und 4,2 ppm zu dem Signal der Methyl-Protonen an der Amino-Gruppe der kationischen Pfropfkette ins Verhältnis gesetzt.

Die hydrodynamischen Durchmesser und deren Verteilung wurden in DLS-Messungen ermittelt. Die Molmassen wurden in der SEC-MALLS bestimmt. Da hier eine direkte Pfropfung der Stärke vorliegt, wurde ein ideal gepfropftes Copolymer ohne Homopolymer als Nebenprodukt erhalten. Alle Stärkepolymere weisen kationische Seitenketten auf. Die Molmassen in Tabelle 3.11 bestätigen die ideale Pfropfung, da sowohl bei der Molmassen-Auswertung mittels universeller Kalibrierung als auch mittels Statischer Lichtstreuung (MALLS) für die Pfropfcopolymere eine Molmasse um 300000 g/mol ermittelt wurde. Die Ausgangsstärke wies eine Molmasse von 10^5 g/mol auf. Die Schwankungen in den Molmassen der zwei Auswerteverfahren liegen im Bereich der Messgenauigkeit der SEC-MALLS. Die Molmassen der Polymere sind breit verteilt, da schon das Amylopektinstärkehydrolysat in einer breit verteilten, verzweigten Architektur vorlag. Die Polydispersität sinkt mit Zunahme des kationischen Anteils.

Tabelle 3.11: Charakterisierung der kationischen Stärkepfropfcopolymere

	Initiator	kat. Anteil [mol%]	d_h [nm]	PDI	$M_{w,LS}$ [10^3 g/mol]	$M_{w,UK}$ [10^3 g/mol]	D
St-g-PDMAPMAm 1	1	39	15,7	0,34	277	319	2,8
St-g-PDMAPMAm 2	1	57	18,4	0,39	295	268	1,9
St-g-PDMAPMAm 3	2	41	22,8	0,32	312	246	2,1

3.5.3 Stärkepfropfcopolymere mit Ligand

Die Spezifität des Stärke-PDMAPMAm-Vektors wurde durch eine Weitermodifizierung des Polymers mit Liganden erreicht. Hierbei wurden die gleichen Reaktionen wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben verwendet; als Liganden wurden Mannuronsäure und Triiod-L-thyronin eingesetzt. In ersten Versuchen wurden Man und T3 über einen PEO-Seitenarm an die Stärkepfropfcopolymere gebunden. In UV/VIS-Messungen wurde bei (St-g-PDMAPMAm)-g-(PEO-T3) eine Liganden-Anzahl von 12 T3 bestimmt. Bei (St-g-PDMAPMAm)-g-(PEO-Man) wurden 5 Man-Liganden pro Polymer vermessen. Eine Molmassenbestimmung wurde nicht durchgeführt.

3.5.4 Transfereffizienz der Stärkepfropfcopolymere

Die *in vitro* Versuche wurden an HepG2- und 16HBE-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.51 und Abb. 3.52 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Vektoren der kationischen Stärkepfropfcopolymere signifikant schlechtere Transfereffizienzen sowohl an HepG2 als auch an 16HBE im Vergleich zum PEI-Vektor aufweisen.

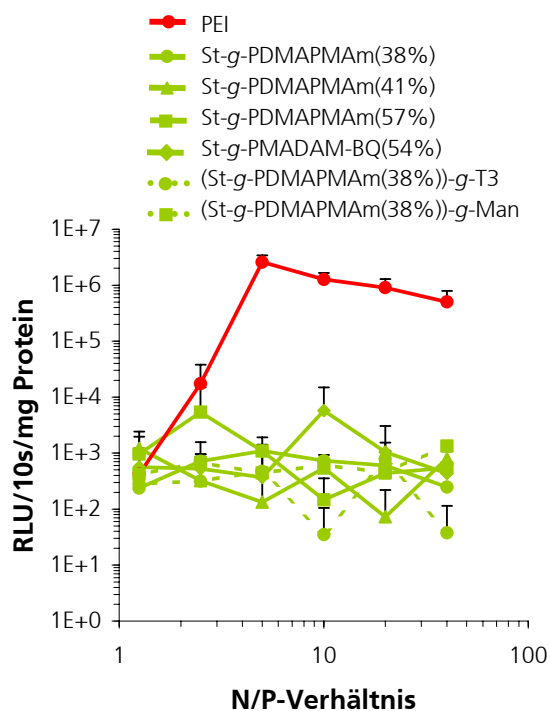


Abb. 3.51: Transfektion der Vektoren auf Stärkebasis an HepG2-Zellen

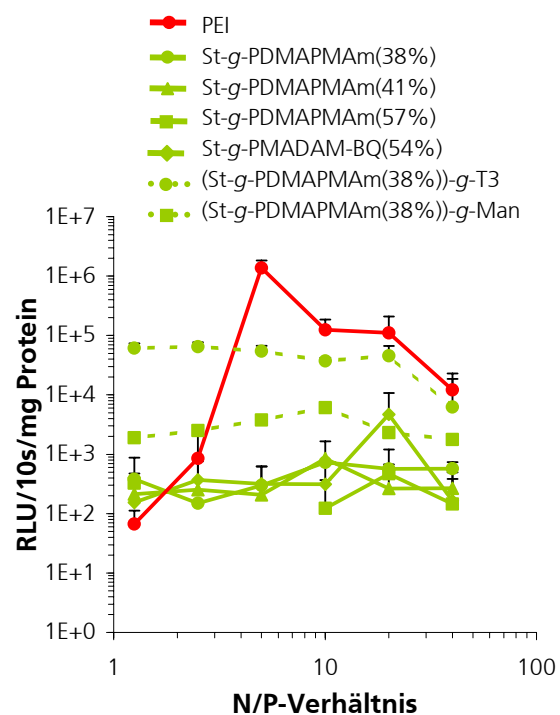


Abb. 3.52: Transfektion der Vektoren auf Stärkebasis an 16HBE-Zellen

Die Vektoren auf Basis von St-*g*-PDMAPMAm(38%), St-*g*-PDMAPMAm(41%), St-*g*-PDMAPMAm(57%) und St-*g*-PMADAM-BQ(54%) zeigen an beiden Zelllinien (HepG2, 16HBE) im Mittel eine Luciferase-Aktivität von $1 \cdot 10^3$ RLU/10s/mg Protein und sind bei einem N/P-Verhältnis von 5 (Maximum des PEI-Vektors) etwa 400fach schlechter an HepG2 und 2000fach schlechter an 16HBE im Vergleich zum PEI-Vektor. Bei den Stärke-Vektoren mit T3- und Man-Ligand konnten an 16HBE-Zellen etwa 170 bzw. 13fach höhere Effizienzen gegenüber den kationischen Stärkepfropfcopolymer-Vektoren gemessen werden. Hierbei ist die Transfektion konstant und unabhängig vom N/P-Verhältnis. Bei N/P= 2,5 liegt beim T3-Vektor auf Stärkebasis (St-*g*-PDMAPMAm(38%))-*g*-T3 eine 75fach und beim Man-Vektor (St-*g*-PDMAPMAm(38%))-*g*-Man eine 3fach bessere Transfektion gegenüber dem Vergleichsvektor PEI vor. Die Steigerung der Ligand-Stärke-Vektoren (T3, Man) gegenüber den kationischen Stärke-Vektoren an 16HBE lässt hier eindeutig auf eine rezeptorvermittelte Endozytose schließen. Das Ergebnis der hohen Transfektionen der Ligand-Stärke-Vektoren konnte an den HepG2-Zellen nicht erzielt werden.

3.6 Genvektoren mit der Kernlokalisationssequenz des TAT-Peptids

3.6.1 Synthese der dimeren TAT-Sequenz mittels Peptidsynthesizer

Die Synthese des linearen Peptides (TAT)₂ wurde nach der von Merrifield 1963 [146] entwickelten Festphasensynthese an einem unlöslichen, polymeren Träger (1%ig quervernetztes Polystyrol-Harz) durchgeführt. Die Peptidsynthese erfolgte nach einem Standardprotokoll der Fmoc-Chemie [147] (*FastMoc™*) mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers der Arbeitsgruppe Dr. H. Börner des Max-Planck-Institutes für Kolloid- und Grenzflächenforschung. Dazu wurden die N-terminal Fmoc (9-Fluorenmethoxycarbonyl)-geschützten Aminosäuren an das an der Festphase befindliche N-terminal entschützte wachsende Peptid gekoppelt (Abb. 3.53).

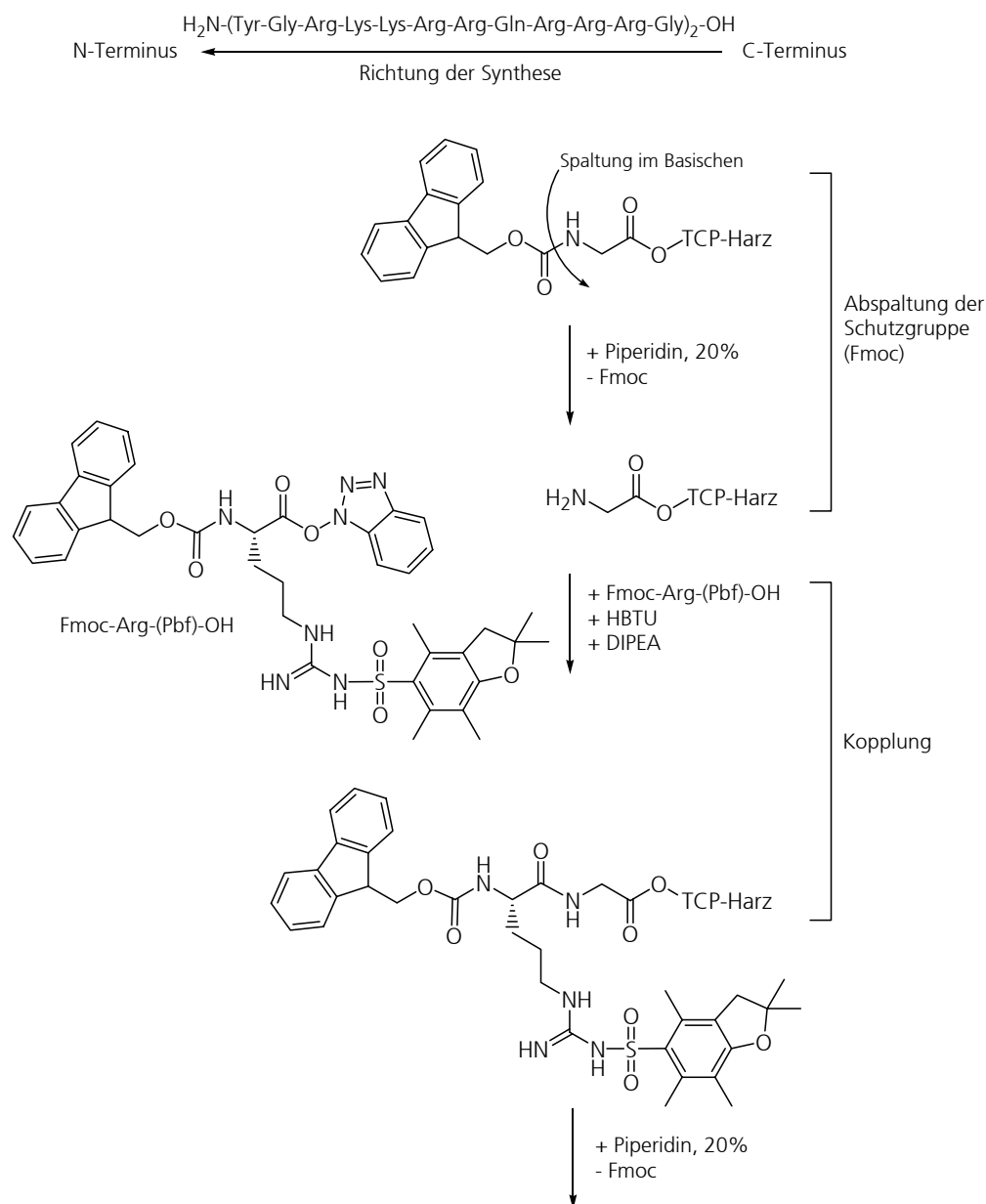


Abb. 3.53: Schematischer Ablauf der Peptidsynthese (1 Zyklus)

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde im Basischen durch Piperidin abgespalten. Im darauffolgenden Schritt wurde die nächste, mit HBTU/DIPEA (2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat/Diisopropylethylamin) [148] aktivierte, Aminosäure an das Peptid gekoppelt. Hieraus ergab sich für die Peptidsynthese ein alternierender Mechanismus aus Fmoc-Abspaltung und anschließender Kopplung der aktivierten Carboxyl-Gruppe an die zuletzt gekoppelte Aminosäure. Das Peptid wuchs vom C-Terminus in Richtung N-Terminus.

3.6.2 Synthese des Genvektors PEI-g-(TAT)₂

Nach der Synthese der dimeren TAT-Sequenz, bestehend aus der Aminosäureabfolge (YGRKKRRQRRRG)₂, wurde das Peptidharz gewaschen und das Peptid (TAT)₂ von der Festphase abgespalten. Da das (TAT)₂ direkt an Poly(ethylenimin) nach der Komplexbildung mit DNA gekoppelt werden sollte, musste eine spezielle reaktive Endgruppe sowohl am (TAT)₂ als auch am PEI geschaffen werden, damit Nebenreaktionen mit der DNA oder den Seitenketten der Aminosäuren ausgeschlossen werden. Die Idee hierbei war die Einführung einer Thiol-Endgruppe am (TAT)₂ durch die Reaktion mit Traut's Reagenz (2-Iminothiolan) (Abb. 3.54). Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen des Peptids (Thyrosin: tert.-Bu, Glutamin: Trt, Arginin: Pbf, Lysin: Boc) abgespalten. Hierzu wurde eine Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA), Wasser, Triisopropylsilan und Ethandithiol verwendet.

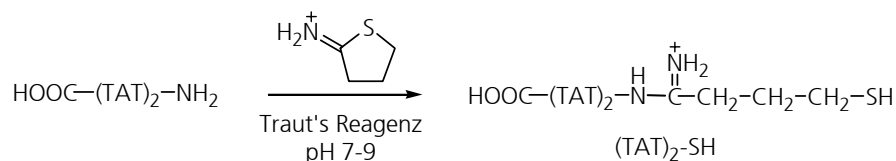


Abb. 3.54: Syntheseweg vom (TAT)₂ zum (TAT)₂-SH

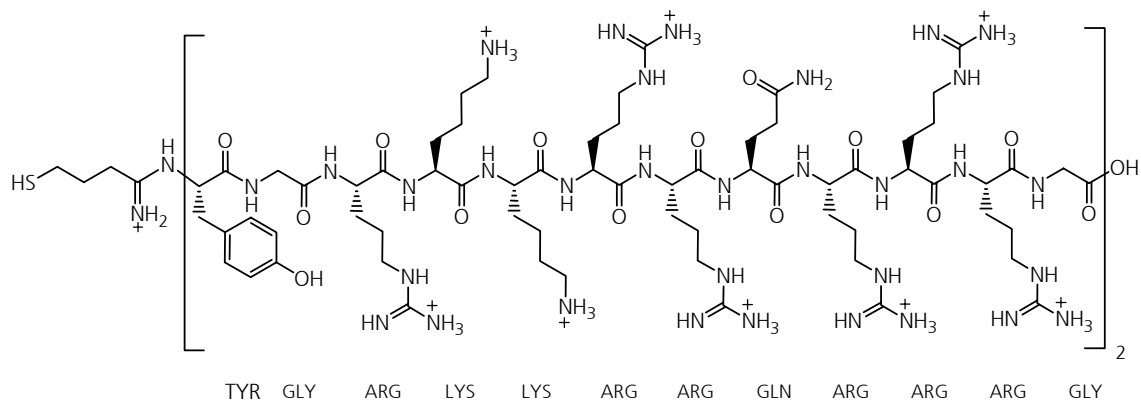


Abb. 3.55: Entschütztes (TAT)₂-SH mit einer reaktiven Thiol-Endgruppe

In einer weiteren Reaktion wurde das Poly(ethylenimin) mit dem heterofunktionellen Vernetzer Succinimidyl-3-(2-pyridylthiopropionat) (SPDP) [149] umgesetzt. Dieser Vernetzer reagiert im ersten Schritt mit dem primären Amin des Poly(ethylenimins) bei pH 7 bis 9. Das entstandene gemischte Disulfid kann nun mit der Thiol-Endgruppe eines anderen Moleküls reagieren. In Abb. 3.56 ist schematisch die Reaktion an PEI und dem (TAT)₂-SH-Derivat dargestellt.

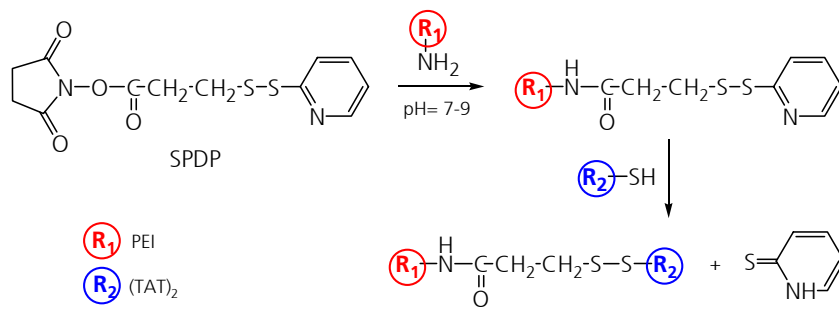


Abb. 3.56: Reaktion von Poly(ethylenimin) mit SPDP und Ankopplung von (TAT)₂-PEO-SH

3.6.3 Charakterisierung des (TAT)₂-Peptides

Die Strukturkontrolle und die Bestimmung des Molekulargewichts des (TAT)₂-Peptides erfolgte mit Hilfe von MALDI-TOF. In Abb. 3.57 ist das MALDI-TOF-Spektrum von (TAT)₂ dargestellt.

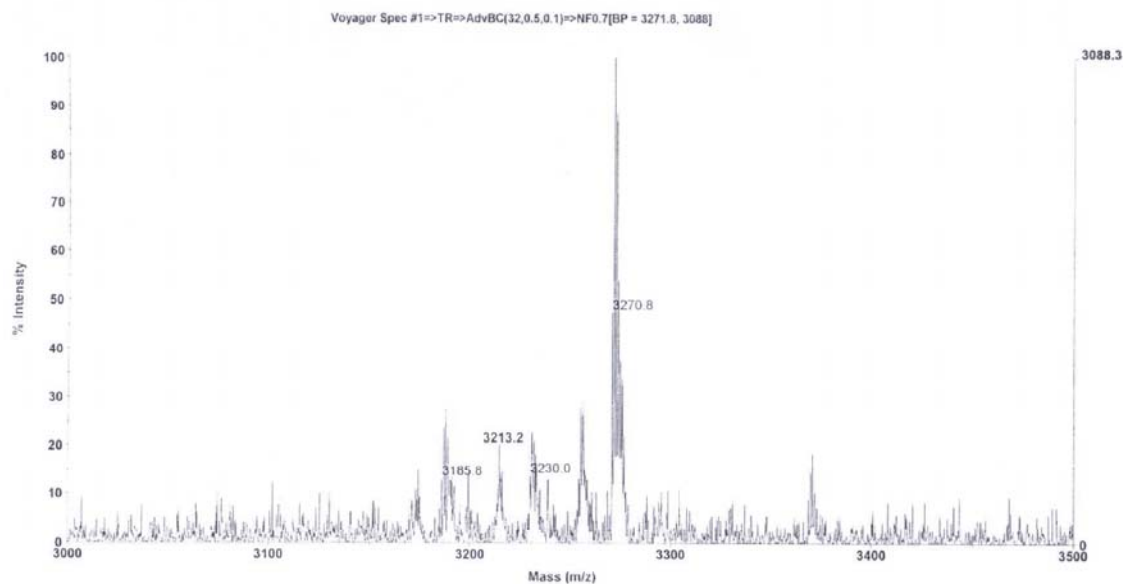


Abb. 3.57: MALDI-TOF-Spektrum des (TAT)₂

Der Peak bei 3271 g/mol entspricht dem Molekulargewicht der dimeren TAT-Sequenz (YGRKKRRQRRRG)₂G. Das Signal bei 3213 g/mol entspricht der (TAT)₂-Sequenz minus der endständigen Aminosäure Glycin (M=57,1 g/mol) und bei 3254 g/mol liegt das Molekulargewicht des (TAT)₂-Peptides minus der Molmasse einer OH-Gruppe vor. Ein eindeutiger Nachweis des kompletten Peptides (TAT)₂ ist somit gegeben.

Die Aufreinigung des geschützten Peptides erfolgte mittels eines HPLC-Gradientenlaufes von Acetonitril-Trifluoressigsäure (1% ig). Das gewonnene (TAT)₂ wurde anschließend *in situ* in Transfektionsversuchen über den Vernetzer SPDP an den PEI-DNA-Vektor gebunden, um eine mögliche Komplexbildung des kationischen Peptides (TAT)₂ mit der Plasmid-DNA zu vermeiden. Die Transfektion wurde anschließend an 16HBE-Zellen getestet.

3.6.4 *In vitro* Transfektion der (TAT)₂-Vektoren

Die (TAT)₂-Vektoren für die *in vitro* Experimente an 16HBE-Zellen wurden in folgender Weise hergestellt. Zuerst wurde die DNA-Lösung zu einer PEI-Lösung pipettiert (m(DNA)=0,5 µg, N/P=10) und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die (TAT)₂-SH-Lösung hinzugegeben und nochmals 10 min inkubiert. Die Komplexe wurden dann auf die Zellen pipettiert, nach 4 h das Medium gewechselt und nach 24 h die Luciferase-Aktivität gemessen.

Die Transfektionsraten der (TAT)₂-Vektoren [PEI(TAT)(4), PEI(TAT)(12)] und deren Ausgangsvektoren [PEI, PEI(SPDP)(4), PEI(SPDP)(12)] sowie Mischungen aus PEI und (TAT)₂ [PEI+(TAT)(4), PEI+(TAT)(12)] sind in Abb. 3.58 dargestellt.

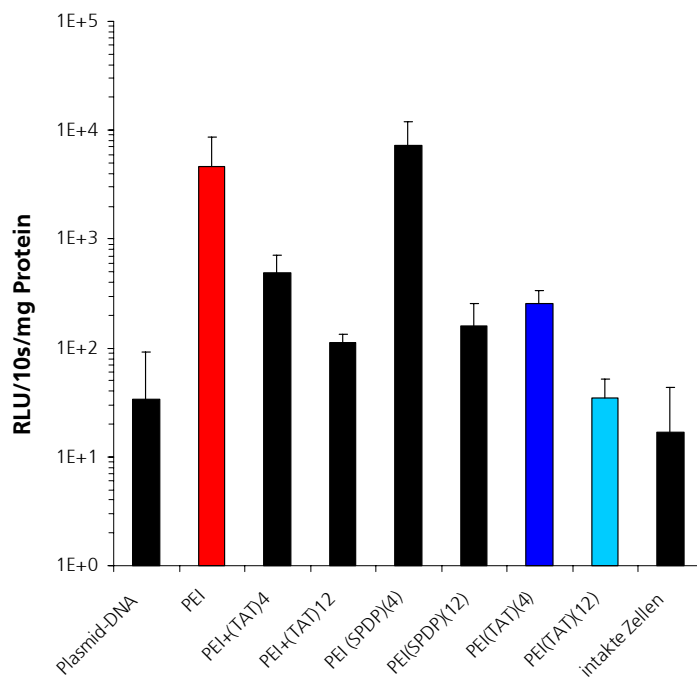


Abb. 3.58: Transfektionsraten der (TAT)₂-Vektoren und der Ausgangspolymere

Die Transfereffizienzen der (TAT)₂-PEI-Vektoren [PEI(TAT)(4), PEI(TAT)(12)] und der Vektoren aus Mischungen von PEI und (TAT)₂ weisen im Vergleich zum PEI-Vektor 20 bzw. 100fach niedrigere Werte auf. Hierbei ist gut zu erkennen, dass bei dem höheren Umsetzungsgrad von 12 (TAT)₂-Liganden pro Vektor die schlechtesten Transfereffizienzen erzielt wurden. Analoge Ergebnisse wurden auch bei den Mischungen aus PEI und (TAT)₂ erhalten. Daher ist zu vermuten, dass die Toxizität der Vektoren mit Zunahme der Anzahl der (TAT)₂-Liganden deutlich erhöht wurde. Es resultierten signifikant schlechtere Transfektionen der (TAT)₂-PEI-Vektoren an den 16HBE-Zellen im Vergleich zum unmodifizierten PEI-Vektor. Im Gegensatz dazu wurde bei Rudolph [109] in Transfektionsstudien an COS7-Zellen gezeigt, dass bei ternären Komplexen aus PEI, (TAT)₂ und DNA, bei denen zuerst DNA mit (TAT)₂ komplexiert und anschließend PEI dazugegeben wurde, eine 100fach höhere Transfereffizienz im Vergleich zum PEI-Vektor resultierte. Die (TAT)₂-Konzentration war hierbei aber deutlich geringer. Dagegen wurde keine Verbesserung der Transfektion erzielt, wenn erst der Vektor hergestellt und dann das Peptid hinzugegeben wurde. Daher kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass auch die Vorgehensweise der Komplex-Herstellung einen entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz besitzt.

3.7 *In vivo* Transfektionen

3.7.1 Triiod-L-thyronin-Genvektoren

Die T3-funktionalisierten Genvektoren wurden *in vivo* bei Mäusen appliziert. Hierbei wurden die kationischen Polymere in einem N/P-Verhältnis von 5 mit der DNA in 5%iger Glucose-Lösung komplexiert und der Maus so in die Schwanzvene injiziert, dass 50 µg Plasmid-DNA pro Maus resultierte. Jeder Genvektor wurde an vier Mäusen getestet. 24 h nach Applikation wurden die Mäuse getötet, die entsprechenden Organe sezerniert, homogenisiert und tiefgefroren. In Abb. 3.59 sind die luminometrischen Ergebnisse der *in vivo* Transfektion der T3-Vektoren in den Organen Lunge, Herz, Milz, Leber, Niere und Schilddrüse dargestellt.

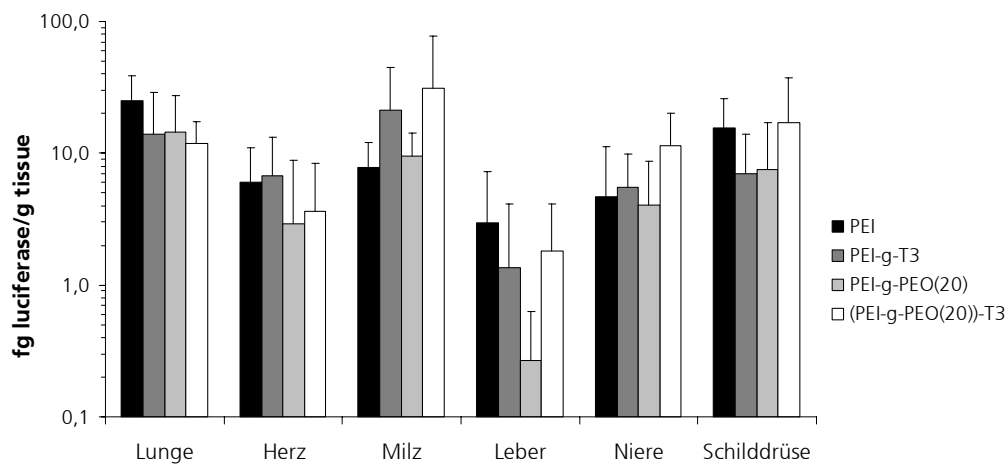


Abb. 3.59: *in vivo* Experiment von T3-Vektoren an Mäusen

Die Expressionen der vier Genvektoren mit PEI, PEI-g-T3, PEI-g-PEO(20) und (PEI-g-PEO)-T3 sind in den Organen Lunge, Herz, Niere und Schilddrüse nicht signifikant unterschiedlich. Sowohl in Herz als auch in der Lunge konnte kein eindeutiger Trend der Transfektionseffizienz beobachtet werden. Bei den Expressionen in Niere und Schilddrüse ist dagegen zu bemerken, dass die Transfektion des (PEI-g-PEO)-T3-Vektors im Vergleich zu seinem entsprechenden unmodifizierten Vektor (PEI-g-PEO) angestiegen ist. Interessanterweise ist die Expression des Vektors auf Basis von PEI-g-PEO(20) in der Leber deutlich niedriger als die des unmodifizierten PEI. Sie steigt nach der Modifizierung mit dem T3-Liganden wieder signifikant an. Dies konnte zuvor auch in der Zellkultur beobachtet werden. Die besten Ergebnisse der T3-Vektoren wurden in der Milz erhalten. Hier konnten jeweils etwa 3fach höhere Transfektionen von PEI-g-T3 und (PEI-g-PEO)-T3 gegenüber der Vergleichsvektoren PEI und PEI-g-PEO(20) ermittelt werden.

Die Aussagekraft dieser Versuche ist leider nicht sehr hoch, da angenommen werden muss, dass die Ergebnisse hauptsächlich von den Partikeleigenschaften der Komplexe abhängen, die bei den T3-Vektoren deutlich im Vergleich zu dem PEI-Vektor differieren. Die Partikelgrößen der T3-Vektoren wuchsen auf etwa 1µm Durchmesser in 5%iger Glucose-Lösung an (Aggregatbildung durch Komplexinstabilität). Die Größe dieser Vektoren ist für *in vivo* Anwendungen zu hoch und somit ungeeignet. Kleine nicht aggregierende Komplexe sind hierbei effizienter als große Komplexe [62, 150].

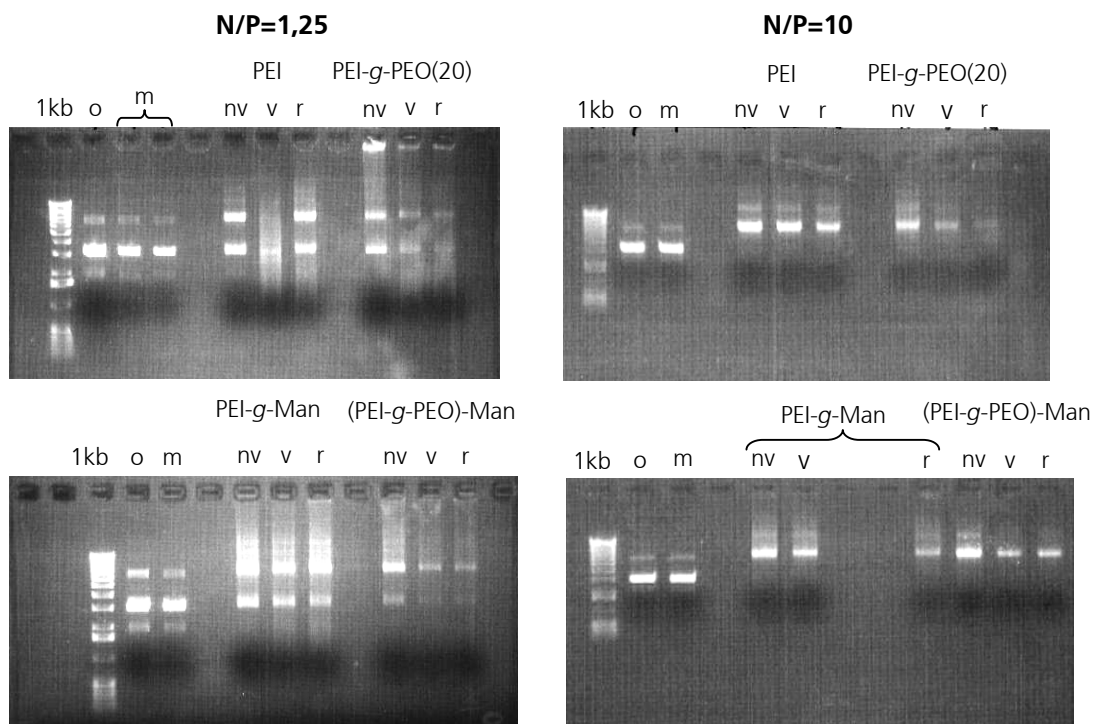
3.7.2 Vernebelung der Mannuronsäure-Genvektoren

Für den Gentransfer in die Lunge sind prinzipiell zwei verschiedene Applikationsmethoden denkbar. Einerseits können die Gentransfervektoren direkt intratracheal via Intubation oder Bronchoskopie appliziert werden, andererseits stellt die Vernebelung eine für den Patienten schonende und weit verbreitete Applikationsmethode dar. Letztere Methode wurde in der *in vivo* Testung der Man-funktionalisierten Vektoren an Mäusen eingesetzt.

(1) Vernebelung der Genvektorkomplexe und Agarose-Gelelektrophorese

Die physikalische Integrität der vernebelten DNA ist eine entscheidende Voraussetzung, um Transgenexpressionen zu erzielen. Aus diesem Grund sollte zunächst die Komplexstabilität untersucht werden. Hierzu wurden Komplexe bei N/P-Verhältnissen von 1,25 und 10 hergestellt. Bevor die Komplexe vernebelt wurden, wurde eine nicht vernebelte Fraktion (nv) entnommen. Für die Vernebelung der Vektoren wurde ein im Handel erhältlicher Venturi-Düsenvernebler PARI BOY® verwendet. Experimentell wurden 2,4 ml der Vektoren (DNA=10µg/ml) für 10 min vernebelt. Mit Hilfe der Fixierung einer Spritze an der Austrittsöffnung des Verneblers wurde das Aerosol in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen.

Um die Integrität der DNA in den Komplexen zu überprüfen, wurden sowohl die vernebelten Komplex-Lösungen (v), die nicht-vernebelten Fraktionen (nv) als auch die Reservoir-Fractionen (r) mittels alkalischer Gelelektrophorese (Heparansulfat) untersucht. Hierbei wurde die DNA vom Polykation abgetrennt. In Abb. 3.60 sind die Ergebnisse aus der alkalischen Elektrophorese zu unterschiedlichen Fraktionen aus dem Vernebelungsprozess dargestellt.



nv: nicht vernebelt, v: vernebelt, r: Reservoir, o: DNA ohne Heparansulfat, m: DNA mit Heparansulfat

Abb. 3.60: Integritätsprüfung der DNA nach Vernebelung der Vektoren

Es zeigte sich, dass die Komplexe bei N/P=10 sowohl vor dem Vernebelungsprozess (nv) als auch nach der Vernebelung (n) keine Zerstörung der DNA aufwiesen, was durch die intakten DNA-Banden zu erkennen war. Dagegen konnte bei allen Komplexen (PEI, PEI-g-PEO, PEI-g-Man, (PEI-g-PEO)-Man) eine Verschmierung der DNA-Banden bei N/P=1,25 beobachtet werden. Diese Verschmierung der DNA-Banden weist auf die Bildung kleinerer Fragmente der DNA im Vernebelungsprozess hin. Ursache hierfür ist die niedrige Komplexstabilität bei N/P=1,25. Die folgenden Vernebelungen der Komplexe an Mäusen wurden daher bei einem N/P=10 durchgeführt.

(2) Vernebelung der Genvektoren zum Lungenflügel von Mäusen

Für das Vernebelungs-Verfahren wurden pro Genvektor vier Mäuse in einen versiegelten Acrylglaskasten gebracht, und die jeweilige Genvektor-Lösung innerhalb von ca. 20 min zu den Mäusen vernebelt. 24 h nach der Genvektorapplikation wurden die Mäuse getötet, das Lungengewebe gereinigt, homogenisiert und die Luciferase-Aktivität in einem Luminometer bestimmt. Gleichzeitig wurde die Größe der Komplexe vor der Applikation mittels Dynamischer Lichtstreuung vermessen. Die Genexpressionen aus dem Lungengewebe der Mäuse sowohl der Man-Vektoren als auch der Vergleichsvektoren (PEI, PEI-g-PEO) sind im Vergleich zu den Partikelgrößen der Vektoren vor der Applikation in Abb. 3.61 dargestellt.

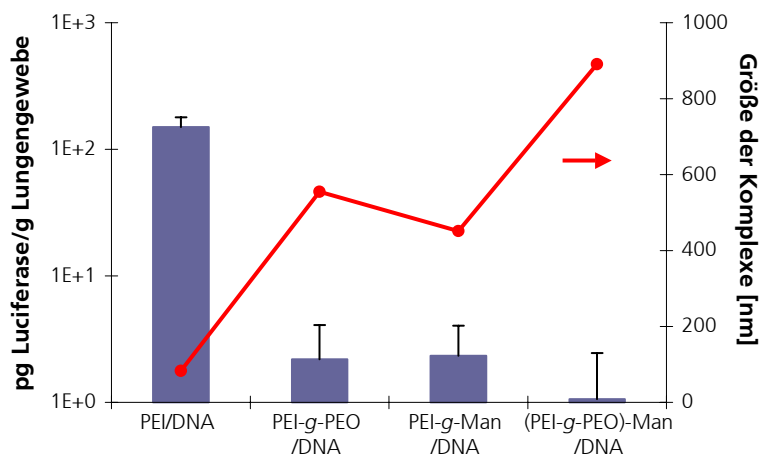


Abb. 3.61: Vernebelungsergebnisse der Vektoren an Mäusen im Vergleich zu den Partikelgrößen der Vektoren

Der PEI-Vektor zeigte mit 150 pg Luciferase/g Lungengewebe die höchste Luciferase-Aktivität bei diesen Vernebelungsbedingungen (N/P=10). Die PEI/DNA-Komplexe wiesen hierbei vor der Vernebelung eine Partikelgröße von etwa 85 nm auf. Die Man-Vektoren auf Basis von PEI-g-Man und (PEI-g-PEO)-Man erzielten dagegen nur geringe Genexpressionen (2,5 bzw. 1 pg Luciferase/g Gewebe) und die Partikelgrößen waren im Vergleich zum PEI-Vektor (85 nm) deutlich erhöht (450 nm bzw. 890 nm). Bei diesen Man-Vektoren konnten bereits vor dem Vernebelungsprozess Aggregate von z.T. etwa 1 µm Durchmesser in Lösung beobachtet werden. Da die Größe der Komplexe einen entscheidenden Einfluss auf die Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo* hat [109], ist daher zu vermuten, dass auf Grund der hohen Partikeldurchmesser der Man-Vektoren nur geringe Genexpressionen in dem Lungengewebe der Mäuse erzielt wurden. Eine Expressionserhöhung würde hier nur durch die Erniedrigung der Vektorgröße resultieren, da die rezeptorvermittelte Endozytose bei diesen Partikelgrößen keine entscheidende Bedeutung hat.

4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue nicht-virale Genvektoren (Polykation-DNA-Komplexe) auf Basis Ligand-funktionalisierter Polykationen hergestellt, charakterisiert und nachfolgend für Transfektionsversuche an verschiedenen Zelllinien (HepG2 - Leberkrebszellen; HeLa – Gebärmutterhalskrebszellen und 16HBE - Atemwegsepithelzellen) eingesetzt.

Im Rahmen von Voruntersuchungen wurde eine Reihe von PEI-*g*-PEO-Copolymeren durch Pfropfung von PEO 400 auf hochverzweigtes Poly(ethylenimin) (PEI) synthetisiert und diese im Vergleich zur kationischen Pfropfgrundlage in Transfektionsexperimenten getestet. Bis zu einem PEO-Gehalt von 15% w/w kann die hohe Transfereffizienz von PEI nahezu aufrechterhalten werden, wobei gleichzeitig eine Verminderung der Zytotoxizität beobachtet werden konnte.

In einem zweiten Syntheseschritt wurden PEI und das entsprechende Pfropfcopolymer PEI-*g*-PEO(20) in Hinblick auf die Transfektion an den einzelnen Zelllinien mit spezifischen Rezeptorliganden ausgerüstet, um eine Erhöhung der Transfektionsselektivität zu erzielen. Dadurch wird es prinzipiell möglich, Genvektoren mit geringerer Ladung und somit verminderter Zytotoxizität in die Zelle einzuschleusen. Für die spezifische Transfektion bei HeLa-Zellen bzw. HepG2 wurden Folsäure bzw. Triiod-L-thyronin als Rezeptorliganden ausgewählt, während die Uronsäuren der Galactose, Mannose sowie die Lactobionsäure bei allen drei Zelllinien eine rezeptorvermittelte Endozytose induzieren sollten.

Die Ankopplung der Liganden an das PEI und PEI-*g*-PEO(20) erfolgte direkt oder über weitere PEO-Seitenketten mit Hilfe von Carbodiimiden, so dass entsprechende Amid-Gruppen gebildet wurden.

Das Pfropfsubstrat PEI, die Pfropfcopolymere sowie die nachfolgend Ligand-funktionalisierten Polymere wurden hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und molekularen Parameter mittels NMR, UV/VIS-Spektroskopie, Lösungviskosimetrie, Densimetrie, Dynamischer Lichtstreuung, analytischer Ultrazentrifugation sowie Größenausschlusschromatographie mit Multidetektion (MALLS, RI, UV, VISCO) charakterisiert. Die gelchromatographische Analyse der o.g. Polymere zeigte, dass aus dem Pfropfprozess unterschiedliche Pfropfcopolymerfraktionen mit nicht einheitlicher chemischer Zusammensetzung erhalten werden. Die Molmassen und Polydispersitäten erhöhen sich erwartungsgemäß mit zunehmendem PEO-Gehalt der Pfropfprodukte. Ferner nehmen höhersubstituierte Produkte eine zunehmend kompaktere Struktur in wässriger Lösung ein.

Die nachfolgenden Transfektionsversuche wurden mit Hilfe eines Luciferase-Reportergens quantifiziert. In den Experimenten zeigen die Vektoren der Folsäure- bzw. T3-Ligand-Copolymeren gegenüber den Referenzvektoren von PEI und PEI-*g*-PEO ein differenziertes Transfektionsverhalten an den Zelllinien HeLa bzw. HepG2.

Bei Einsatz der Ligand-Vektoren konnte stets in Abhängigkeit vom eingesetzten N/P- bzw. Polykation-DNA-Verhältnis ein spezifisches Transfektionsmaximum ermittelt werden, das auf eine rezeptorvermittelte Endozytose hinweist. Im Fall der T3-funktionalisierten Vektoren ließ sich die Hypothese durch entsprechende T3-Überschuss-Experimente verifizieren. Die Transfereffi-

zienz der T3-Genvektoren nahm bei einem Zusatz an freiem, niedermolekularem T3 deutlich ab. Darüber hinaus belegen *in vivo* Versuche an Mäusen eine gegenüber PEI und PEI-g-PEO-Vektoren verbesserte Genexpression der entsprechenden T3-Vektoren. Besonders in der Milz, Niere und Schilddrüse konnte eine Anreicherung der eingeschleusten Plasmid-DNA luminometrisch nachgewiesen werden.

Bei den Uronsäure-Konjugaten zeigen analoge *in vitro* Transfektionsversuche in allen drei Zelllinien, dass nur Ligand-Vektoren mit Mannuronsäure rezeptorvermittelt endozytiert werden können. Für diese Man-Vektoren wurde eine überraschend hohe Transfektionseffizienz (50 bis 100mal höher als für den unmodifizierten PEI-Vektor) gefunden, die zugleich von der Nettoladung des Vektorkomplexes unabhängig war. Durch Blockierung der glykosidischen OH-Gruppen lässt sich dieses für den Ligand-Vektor spezifische Transfektionsverhalten aufheben. Das rezeptorvermittelte Transfektionsvermögen von Mannuronsäure-Liganden konnte nochmals anhand von entsprechenden Man-Aminodextran-Vektoren mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Die *in vivo* Vernebelung der Man-Vektoren an Mäusen zeigt dagegen eine ineffiziente Transfektion, die hauptsächlich aus der Aggregatbildung der Man-Vektoren in Lösung resultiert.

In weiterführenden Studien sollen Polykationen auf Basis natürlicher Polymere zur Herstellung von entsprechenden Ligand-Vektoren genutzt werden, um synthetische Vektoranteile zu maskieren und somit eine verminderte Zytotoxizität als auch verbesserte Transfektionseffizienz, speziell *in vivo*, erzielen zu können. Dazu wurden bereits Vektoren mit speziellen Peptiden, die sich durch Kernlokalisationssequenzen auszeichnen (z.B. TAT), funktionalisiert. Neben diesen Vektoren sind auch DNA-Komplexe mit kationischen Stärkepfropfcopolymeren sowie T3- und Mannuronsäure-Liganden eingesetzt worden. Die Vektorsysteme auf Basis der kationischen Stärkepfropfcopolymeren zeigen in ersten Transfektionsversuchen positive Ergebnisse, so dass im Folgenden Polykationen mit variabler Architektur (bzw. Pfropfdichte) und chemischer Zusammensetzung (z.B. Stärkeanteil, Verhältnis von sekundären zu tertiären Amino-Gruppen) für die Aufklärung weiterer Struktur-Wirkungs-Prinzipien synthetisiert werden sollen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Poly(ethylenimin)

Als Ausgangspolymer wurde das hochmolekulare, breitverteilte, wasserfreie Poly(ethylenimin) (PEI) der Fa. BASF (Lupasol WF) mit einem Amino-Gruppen-Verhältnis (prim. : sek. : tert.) von etwa 1:2:1 eingesetzt. Durch die Fraktionierung des PEI mit Hilfe der Ultrafiltration (regenerierte Cellulose, Cut-off: 10 kD) wurde eine engere Molmassenverteilung erhalten. Es fand des Weiteren eine Aufreinigung des Poly(ethylenimins) statt, da niedermolekulare Verunreinigungen abgetrennt wurden.

5.2 Pfropfcopolymer Poly(ethylenimin)-graft-Poly(ethylenoxid)

In einem 250ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer sowie Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr wurden 35,0 g Poly(ethylenoxid)₈-monomethylether (M=350 g/mol; 0,1 mol) zu einer Mischung aus 27,76 g Epichlorhydrin (0,3 mol; M=92,53 g/mol, Sdp.: 115-117°C) sowie 3,2 g Natriumhydroxyd (0,08 mol; M=40 g/mol) und 0,5 ml Wasser gegeben und für 16 h auf 60°C unter Argonatmosphäre erhitzt. Danach wurde für 1,5 h auf 90°C erwärmt. Das Produkt wurde anschließend in 150 ml Chloroform (Sdp.: 61,3°C; $\rho=1,483$ g/ml) suspendiert und 100 ml Wasser wurden hinzugegeben. Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) wurde zum Justieren des pH-Wertes auf pH 7 verwendet. Der Feststoff wurde abfiltriert.

Nach der Phasenseparation wurde die organische Phase zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das verbliebene Epichlorhydrin wurde im Hochvakuum bei 10⁻²-10⁻³ mbar entfernt. Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung von Epichlorhydrin wurde der Methoxy-poly(ethylenoxid)₈-glycidylether im Basischen erwärmt, dann mittels Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitrat versetzt. Bei Anwesenheit von Epichlorhydrin wurde ein Niederschlag von Silberchlorid gebildet. ¹H-NMR (D₂O): $\delta(\text{ppm})=3,5-3,7$ (breites Multipllett; CH₂-O; 32H); $\delta(\text{ppm})=3,4$ (Singulett; O-CH₃, 3H), $\delta(\text{ppm})=2,9$ (Triplet; CH; 1H); $\delta(\text{ppm})=2,8$ (Triplet; CH₂; 2H)

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer sowie Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr wurde zu einer Lösung aus 8,0 g Poly(ethylenimin) (0,00016 mol; M~50000 g/mol) in 30 ml Methanol eine Lösung aus 1,76 g Methoxy-poly(ethylenoxid)₈-glycidylether (0,0044 mol; M_w= 400 g/mol) in 10 ml Methanol gegeben und die homogene Mischung über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das erhaltene Pfropfcopolymer wurde anschließend mittels Dialyse (MWCO 4000-6000 g/mol) gegen deionisiertes Wasser aufgereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde ein wachsartiges, gelbes Gel mit einer Ausbeute von 75% erhalten. Es wurde ein Copolymer mit 20 PEO₈-Seitenketten pro PEI-Molekül synthetisiert.

¹H-NMR (D₂O): $\delta(\text{ppm})=2,4-2,8$ (breites Multipllett; CH₂-N); $\delta(\text{ppm})=3,5-3,7$ (Multipllett; CH₂-O)

5.3 Synthese der kationischen Copolymere mit Liganden

Das Poly(ethylenimin) und das Pfropfcopolymer Poly(ethylenimin)-*g*-Poly(ethylenoxid) wurden in einem weiteren Schritt mit verschiedenen Liganden modifiziert, um neue kationische Polymere mit einer spezifischen Gruppe für den Gentransfer an ausgewählten Zelllinien zu erhalten. Die Kopplung der Liganden an die Poly(ethylenimin)-Copolymere wurde direkt oder mittels einer Poly(ethylenoxid)-Seitenkette durchgeführt.

5.3.1 Folsäure-Ligand (Fol)

In einem 250ml-Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr und Magnetrührstab wurden 2,648 g Folsäure ($M=441,4$ g/mol; $6 \cdot 10^{-3}$ mol) und 1,534 g *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid *HCl* (EDC) ($8 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=191,7$ g/mol) in 100 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (NaHCO_3) (pH=8-9) gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 0,921 g *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) ($8 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=115,1$ g/mol) versetzt. Nach 5 min wurden 3,75 g *O,O'*-Bis-(3-aminopropyl)-poly(ethylenoxid)₃₂ ($M \sim 1500$ g/mol; $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol) in 10 ml 0,1 M NaHCO_3 -Lösung hinzugegeben.

Die Mischung wurde 24 h bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurden nochmalig 1,765 g Folsäure ($M=441,4$ g/mol; $4 \cdot 10^{-3}$ mol) und 0,8627g EDC ($4,5 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=191,7$ g/mol) sowie 0,518 g NHS ($4,5 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=115,1$ g/mol) in 50 ml 0,1 M NaHCO_3 -Lösung der Mischung zugesetzt. Es wurde weitere 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Produktlösung mittels Dialyse (MWCO 1000 g/mol) gegen 0,05 M NaHCO_3 -Lösung und anschließend deionisiertes Wasser aufgereinigt und gefriergetrocknet.

Beispielsynthese von Poly(ethylenimin)-g-[Poly(ethylenoxid)-Folsäure]

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr und Magnetrührstab wurden 0,325 g Folsäure-PEO₃₂ ($M \sim 2500$ g/mol; $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol) und 191,7 mg EDC ($1 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=191,7$ g/mol) in 20 ml dest. H_2O gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 115,1 mg NHS ($1 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=115,1$ g/mol) versetzt. Nach 3 min wurden 0,52 g Poly(ethylenimin) (PEI) ($M \sim 50000$ g/mol; $1,04 \cdot 10^{-5}$ mol) in 30 ml dest. H_2O hinzugegeben. Der pH-Wert der PEI-Lösung wurde zuvor mit 1 M HCl-Lsg auf ca. 7 eingestellt. Die Mischung wurde 24 h bei RT gerührt. Dann wurde die Produktlösung mittels Dialyse (MWCO 4000-6000 g/mol) aufgereinigt und lyophilisiert. Es wurde ein gelber Feststoff in einer Ausbeute von 95% erhalten.

5.3.2 Triiod-L-thyronin-Ligand (T3)

Beispielsynthese von Poly(ethylenimin)-g-[Poly(ethylenoxid)-T3]

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Blasenähler und Gaseinleitungsrohr wurden 0,21 g PEO₁₃-di-säure (M=600 g/mol; 0,00035 M) in 10 ml DMSO gelöst. Anschließend wurden 0,2344 g Triiod-L-thyronin (T3) (M=651,01 g/mol; 0,00036 mol) in 10 ml DMSO und 0,3 ml Pyridin (Sdp. 115°C; M=79,10 g/mol) zu der Lösung gegeben. Zum Initiieren wurden 0,4127 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (M=206,33 g/mol; 0,002 mol) hinzugegeben. Die Mischung wurde bei RT gerührt. Nach 3 h wurde die Reaktion mit 1,32 g PEI (M~50000 g/mol; 2,64·10⁻⁵ mol) in 20 ml DMSO versetzt und bei 20°C über Nacht gerührt.

Mit 5 ml H₂O wurde die Reaktion abgebrochen. Das ausgefallene Ureaprodukt wurde entfernt und die Lösung gegen deionisiertes Wasser mittels Dialyse (MWCO 4000-6000) aufgereinigt. Nach dem Lyophilisieren wurde ein gelb-bräunliches Gel in einer Ausbeute von 60% gewonnen.

5.3.3 Zucker-Liganden (Glucose, Galactose, Lactobionsäure, Mannose)

5.3.3.1 Synthese von Mannuronsäure durch selektive Oxidation von Methyl- α -D-Mannopyranosid

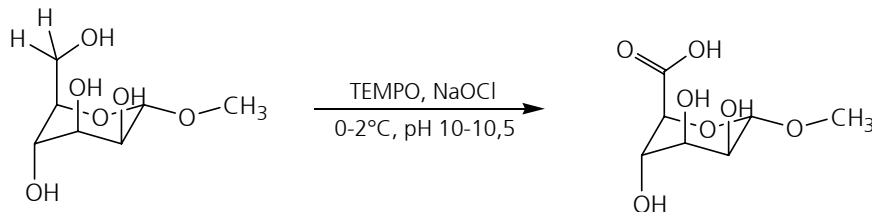


Abb. 5.1: Oxidation von Methyl- α -D-Mannopyranosid

In einen 250ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab und Thermometer wurden 10,0 g Methyl- α -D-Mannopyranosid (0,0515 mol; M=194,13 g/mol) sowie 0,0523 g Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Radikal (TEMPO; 3,35·10⁻⁴ mol; M=156,25 g/mol) und 1,033 g Natriumbromid (10,04 mol; M=102,89 g/mol) in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst. In einem 250 ml Becherglas wurden 77,25 ml einer Natriumhypochlorit-Lösung (14%-ig; 0,1545 mol; M=64,45 g/mol) mit 1 M Salzsäure auf pH 10 eingestellt. Beide Lösungen wurden in einem Eisbad auf 0-2°C abgekühlt. Anschließend wurde die Natriumhypochlorit-Lösung in die erste Lösung gegeben und der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf pH=10 eingestellt. Während der Reaktion wurde der pH-Wert ständig kontrolliert und gegebenenfalls nachgeregelt. Nach 2 h wurde die Reaktion mit 13 ml Ethanol abgebrochen, das Gemisch mit 1 M Salzsäure auf pH 7 eingestellt und gefriergetrocknet. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in 100 ml Methanol gelöst, die Salze abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Ausbeute betrug 76%. Laut NMR-Analyse bestand das Produkt zu 70% aus Methyl-Mannuronsäure und zu 30% aus noch nicht umgesetzter Methyl-Mannose.

¹H-NMR (D₂O): δ (ppm)=3,5-3,9 (breites Multipllett der Protonen an C2-C4 des Zuckerringes); δ (ppm)=3,4 (Singulett; O-CH₃); δ (ppm)=4,6 (Proton an C5); δ (ppm)=5,3 (Proton an C1)

Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe:

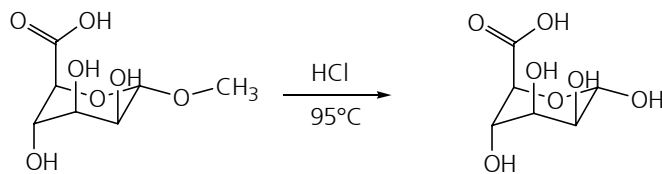


Abb. 5.2: Abspaltung der glycosidischen Schutzgruppe

In einem 250ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Thermometer und Kühler wurde das Methyl-Mannuronsäure/Methyl-Mannose-Gemisch in 75 ml 1 M Salzsäure gelöst und für 20 min auf 95°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktion mit 75 ml 1 M Natronlauge abgebrochen und das Wasser am Rotationsverdampfer entfernt. Die Ausbeute betrug 12,4 g.

Bei der Reaktion fällt als Nebenprodukt Natriumchlorid (NaCl) an. Die Salzmenge kann jedoch abgeschätzt werden und sollte die Reaktion von Mannuronsäure mit den kationischen Polymeren nicht beeinflussen. Aus diesem Grund wurde das Produkt ungereinigt eingesetzt. Entsprechend des Gehaltes an Mannuronsäure in dem Gemisch (ca. 40%) wurden die für die Reaktionen mit den Basis-Polymeren einzusetzenden Massen hochgerechnet.

5.3.3.2 Synthese der Copolymere mit Uronsäure-Ligand

Beispielsynthese von Poly(ethylenimin)-g-[Poly(ethylenoxid)-Galacturonsäure]

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Blasenähler und Argon-Gaseinleitungsrohr wurden 0,106 g Galacturonsäure ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=212,16$ g/mol) und 0,105 g EDC ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=191,7$ g/mol) in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 0,063 g NHS ($5,5 \cdot 10^{-5}$ mol; $M=115,1$ g/mol) versetzt. Nach ca. 3 min wurde eine Lösung aus 0,750 g O,O'-Bis-(3-aminopropyl)-poly(ethylenoxid)₃₂ ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=1500$ g/mol) in 5 ml Wasser zugefügt. Nach 2 h wurden zunächst 0,105 g EDC ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=191,7$ g/mol) und 0,063 g NHS ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=115,1$ g/mol) in 5 ml Wasser und anschließend eine Lösung aus 0,059 g Bernsteinsäure ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=118,09$ g/mol) in 5 ml Wasser zu dem Gemisch gegeben. Nach weiteren 2 h wurden abermals 0,105 g EDC ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=191,7$ g/mol) und 0,063 g NHS ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mol; $M=115,1$ g/mol) in 5 ml Wasser und abschließend eine Lösung aus 2,0 g PEI ($4,0 \cdot 10^{-5}$ mol; $M \sim 50000$ g/mol) in 10 ml Wasser zugefügt. Die Lösung wurde unter einem Argongasstrom bei RT über Nacht gerührt, gegen deionisiertes Wasser dialysiert (MWCO 4000-6000 g/mol) und lyophilisiert.

5.3.4 Pffropfpolymerisation mittels Stärkemakroinitiator

Die Synthese und Charakterisierung von Stärkemakroinitiatoren t-BACVS-St mit unterschiedlichen Substitutionsgraden DS wurde bei Bruzzano et al. [145] durchgeführt.

5.3.4.1 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäureester (t-BACVS-St)

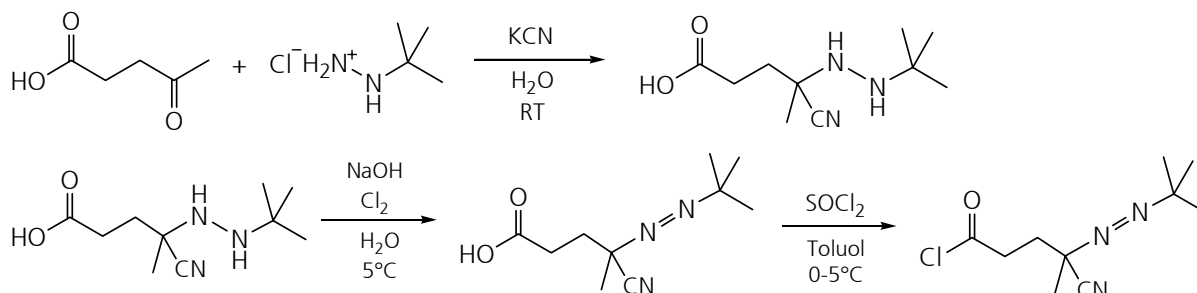


Abb. 5.3: Synthese von 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurechlorid (t-BACVSC)

(1) 4-tert.-Butylhydrazono-4-cyanovaleriansäure (t-BHCVS)

In einem 100ml-Einhalskolben mit Magnetrührstab wurden 11,62 g *Laevulinsäure* (0,1 mol; M=116,1 g/mol) in 50 ml Wasser aufgelöst und mit 17,45 g *tert.-Butylhydrazoniumchlorid* (0,14 mol; M=124,6 g/mol) sowie 6,51 g *Kaliumcyanid* (0,1 mol; M=65,1 g/mol) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Dieser wurde abgesaugt, mit verdünnter Salzsäure gewaschen und über Phosphor-pentoxid getrocknet.

(2) 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäure (t-BACVS)

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Gaseinleitungsrohr und Thermometer wurden 4,00 g *Natriumhydroxidplättchen* (0,1 mol; M=40 g/mol) in 50 ml Wasser aufgelöst und 21,33 g *t-BHCVS* (0,1 mol; M=213,28 g/mol) unter Rühren dazugegeben. Die Lösung wurde auf 5°C abgekühlt und Stickstoff eingeleitet. Anschließend wurde so lange *Chlor* eingeleitet, bis eine dicke gelbe Kruste auf der Reaktionslösung entstanden ist. Die Reaktionstemperatur sollte stets unter 10°C gehalten werden. Das gebildete Produkt wurde abfiltriert und in Pentan/Toluol umkristallisiert.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ(ppm)=23,81 ppm (q, 1C); δ(ppm)=26,54 ppm (q, 3C); δ(ppm)=28,87 ppm (t, 1C); δ(ppm)=32,82 ppm (t, 1C); δ(ppm)=68,61 ppm (s, 1C); δ(ppm)=70,72 ppm (s, 1C); δ(ppm)=118,89 ppm (s, 1C); δ(ppm)=177,78 ppm (s, 1C)

(3) 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurechlorid (t-BACVSC)

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab und Thermometer wurden 21,13 g *t-BACVS* (0,1 mol; M=211,26 g/mol) in 100 ml wasserfreiem Toluol gelöst und auf 0-5°C abgekühlt. Anschließend wurden 9 ml *Thionylchlorid* (0,12 mol; M=118,97 g/mol) langsam unter Rühren zugegeben. Der Ansatz wurde noch weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach

wurden das Lösemittel und der Überschuss an Thionylchlorid abdestilliert. Man erhielt eine gelblich-braun gefärbte Flüssigkeit, die im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

(4) *4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurestärkeester (t-BACVS-St) DS 0,05*

In einer Destillationsapparatur wurden *6,30 g Trockensubstanz an Stärkesubstrat* ($39 \cdot 10^{-3}$ mol; $M_{AGE}=162,14$ g/mol) in 350 ml Dimethylacetamid (DMA) aufgelöst und auf ca. 170°C erhitzt, um 50 ml an DMA unter N₂-Strom abzudestillieren.

Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in einen 500ml- Doppelmantelreaktor überführt. Unter Rühren wurde ein Gemisch aus *4,10 g Triethylamin (TEA)* und 10 ml DMA dazugegeben.

Danach wurde die Lösung auf 8°C abgekühlt und langsam *2,10 g 4-tert.-Butylazo-4-cyanovaleriansäurechlorid* ($9,1 \cdot 10^{-3}$ mol; $M=229,71$ g/mol), gelöst in 10 ml DMA, zugetropft.

Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 8°C gerührt. Anschließend wurde das Stärkederivat in 2,5 l Methanol gefällt, in Wasser aufgenommen und mehrere Tage bei 4°C dialysiert (regenerierte Cellulose; Cut-off: 4000-6000; Leitfähigkeitskontrolle). Aus der Gefriertrocknung wurden Stärkeester (t-BACVS-St) mit einem DS von 0,05 isoliert (DSC, ¹H-NMR-Bestimmung).

Durch Variation der Versuchsbedingungen kann der DS gezielt eingestellt werden.

5.3.4.2 Pfropfpolymerisation von Stärke

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflusskühler, Gaseinleitungsrohr und Magnetrührer wurden *0,85 g 3-Dimethylaminopropylmethacrylamid (DMAPMAM)* (frisch destilliert; $M=170$ g/mol; 0,005 mol) eingewogen und in 20 ml entgastem deionisierten Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf 70°C temperiert. Anschließend wurden *0,2268 g t-BACVS-St* ($M=181,4$ g/mol; 0,00125 mol; $DS=0,10$; $n_{Initiator}=0,000125$ mol; $M_{w,St}=100000$ g/mol) in 10 ml entgastem deionisierten Wasser hinzugegeben. Die Polymerisationsmischung rührte 3 h bei 70°C. Das Produkt wurde mittels Dialyse (MWCO 4000-6000) gegen deionisiertes Wasser aufgereinigt und lyophilisiert.

5.3.5 Fluoreszenzmarkierung mit FLUOS

Das kationische Polymer Aminodextran wurde mit T3- bzw. Man-Liganden funktionalisiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um anschließend die Transfektion an Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können.

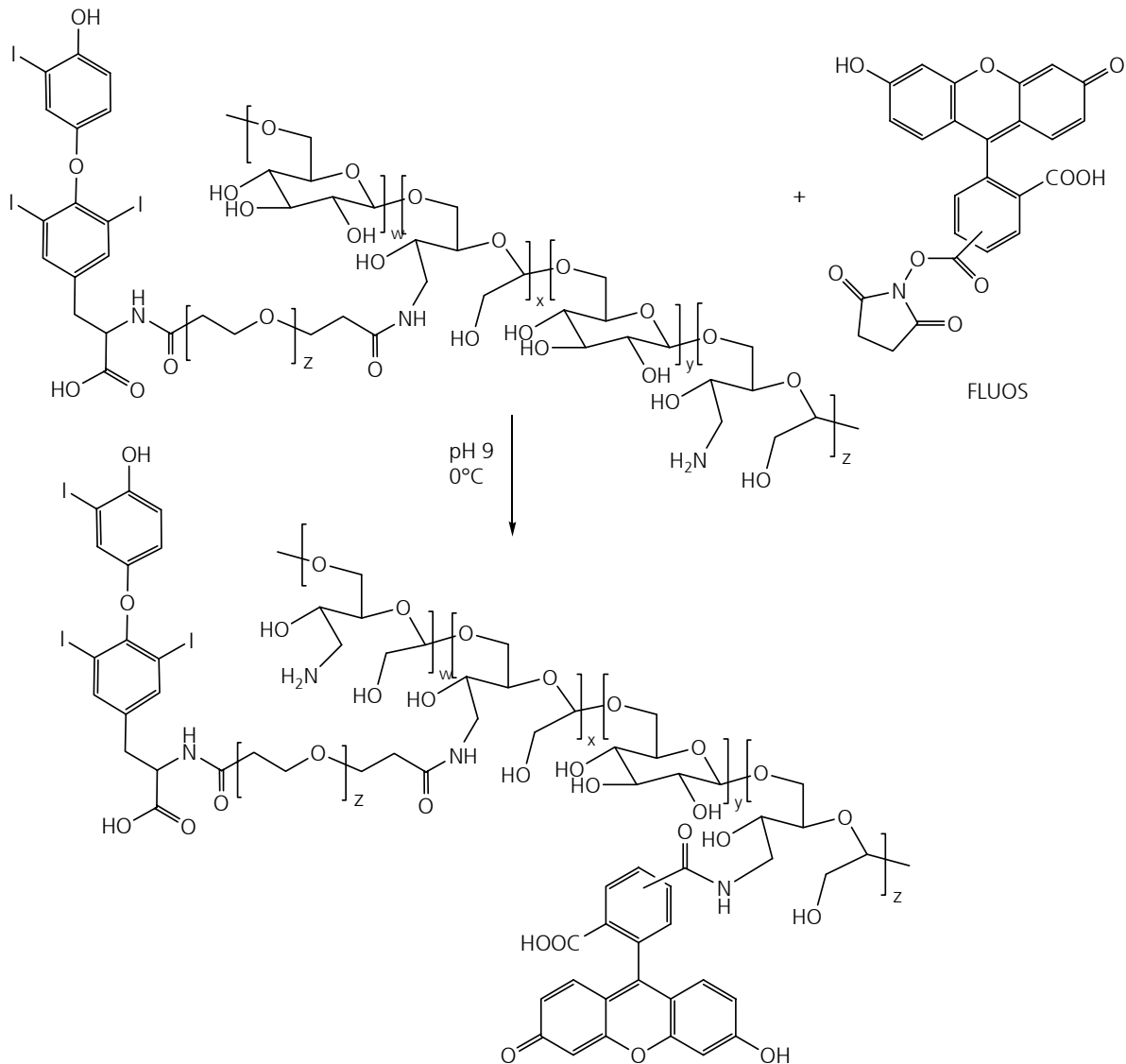


Abb. 5.4: Fluoreszenzmarkierung von Aminodextran-g-(PEO-T3) mit FLUOS

In einem 100ml-Dreihalskolben mit Magnetrührstab und Trockenrohr, sowie Argon-Gaseinleitungsrohr wurde 0,560 g Aminodextran-g-(PEO-T3) ($M=80000$ g/mol; $7 \cdot 10^{-6}$ mol) [Synthese wie PEI-g-(PEO-T3)] in 0,1 M NaCl-Lsg. gelöst. Anschließend wurden 4,7 mg FLUOS (Carboxyfluorescein-N-succinimidylester; $M=473,4$ g/mol; $1 \cdot 10^{-5}$ mol) als Feststoff hinzugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei 0°C gerührt und danach gegen deionisiertes Wasser im Kühlschrank dialysiert (MWCO 4000-6000). Nach dem Lyophilisieren wurde quantitativ ein gelb-orangener Feststoff erhalten.

Die gleiche Synthese wurde auch bei den Mannuronsäure-Vektoren Aminodextran-g-(PEO-Man) und Aminodextran-g-Man durchgeführt.

5.4 Charakterisierungsmethoden

5.4.1 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)

Gerät: DPX 400 (Fa. Bruker, Deutschland)

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz

Messtemperatur : $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$

Lösemittel: D_2O , DMSO-d_6

5.4.2 Photometrische Bestimmung der Anzahl an Liganden pro Polymer

Gerät : UVIKON 930-Zweistrahlphotometer; Fa. Kontron Instruments

Küvette : PS-Einmalküvette, Quarz-Küvette (optische Weglänge: 1 cm)

5.4.2.1 Bestimmung der Anzahl an Folsäure und Triiod-L-thyronin

λ_{Fol} : 361 nm

λ_{T3} : 320 nm

Folsäure und Triiod-L-thyronin sind auf Grund ihrer Struktur UV-aktiv und konnten direkt mittels einer Kalibriergeraden des jeweiligen Liganden vermessen und bestimmt werden. Die Proben mit der Folsäure als Ligand wurden in 0,01 M Natriumhydrogencarbonat-Lsg vermessen. Die T3-Proben wurden in 0,1 M NaOH-Lsg untersucht.

5.4.2.2 Bestimmung des Gehalts an Galacturon- und Mannuronsäure

$\lambda_{\text{Gal/Man}}$: 560 nm

$\epsilon_{\text{Gal/Man-Kalibrierkurve}} = 0,19 \text{ ml/mg} \cdot \text{cm}$

Herstellung der *Dinitrosalicylsäure*-Reagenzlösung: In einen 10 ml Messkolben wurden 100 mg DNSS ($M=228,12 \text{ g/mol}$; $4,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) eingewogen, in 2 ml 2 M Natronlauge in der Wärme gelöst und mit 5 ml deionisiertem Wasser versetzt. Anschließend wurden 3 g Kalium-Natrium-Tartrat ($M=210,16 \text{ g/mol}$; $1,4 \cdot 10^{-2} \text{ mol}$) zugegeben und nach dem Lösen mit Wasser aufgefüllt. Von den Probe-Lösungen wurden je 0,4 ml in 2 Reagenzgläser pipettiert und mit je 0,4 ml DNSS-Reagenz versetzt (Teilproben A und B). Die Reagenzgläser wurden für 5 min ins kochende Wasserbad gestellt und danach im Eisbad abgekühlt.

Die Teilproben A wurden mit 4,2 ml deionisiertem Wasser verdünnt.

Die Teilproben B wurden mit 4,2 ml Salzsäure 0,05 mol/l versetzt.

In einer PS-Einmalküvette wurde die Absorption der Teilprobe A gegen die Teilprobe B bei 560 nm gemessen.

Für die Bestimmung ist eine Kalibrierung notwendig. Hierfür wurden fünf Zucker-Lösungen (0,01-1,0 mg/ml) hergestellt und analog der Proben behandelt.

5.4.2.3 Bestimmung des Lactobionsäure-Gehalts

λ_{LB} : 630 nm

$\epsilon_{LB-Kalibrierkurve}$ = 0,60 ml/mg · cm

Herstellung der Anthron-Reagenzlösung: In einem Becherglas wurden 75 mg Anthron ($M=194,22$ g/mol; $3,9 \cdot 10^{-4}$ mol) vorsichtig in 50 ml konz. Schwefelsäure gelöst (verschlossen aufbewahrt ist das Reagenz ~12 h haltbar).

In einem Reagenzglas wurden 0,5 ml der Probe-Lösung vorsichtig mit 5 ml des Anthron-Reagenzes versetzt und die Lösung für 16 min ins kochende Wasserbad gestellt. Anschließend wurde im Eisbad abgekühlt und in einer PS-Einmalküvette rasch bei 630 nm gegen einen Leerwert aus 0,5 ml Wasser und 5 ml Anthron-Reagenz photometriert. Zur Kalibrierung wurden fünf Lactobionsäure-Lösungen (0,01-1,0 mg/ml) hergestellt und analog der Proben behandelt.

5.4.2.4 Photometrische PEI-Bestimmung [151]

λ_{PEI} : 277 nm

$\epsilon_{PEI-Kalibrierkurve}$ = 6,3 ml/mg · cm

In einem Reagenzglas wurden 2 ml der Probe-Lösungen mit 5 ml einer 0,1 M Kupfer-II-Sulfat-Lösung versetzt. Die Absorption dieser Lösung wurde gegen die Kupfer-II-Sulfat-Lösung in Quarz-Küvetten bei 277 nm gemessen. Kalibriert wurde mit fünf verschiedenen PEI-Lösungen (0,001-0,1 mg/ml), die analog der Proben behandelt wurden.

5.4.3 Teilchengrößenmessung mittels Dynamischer Lichtstreuung

Gerät: HPPS 3.3 – ET (Fa. Malvern Instruments)

Messtemperatur: $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$

Küvette: PS-Einmalküvette (1 cm)

Lösemittel: 0,01 M NaCl-Lösung

5.4.4 Interferometrisches Differentialrefraktometer ScanRef

Gerät: ScanRef SCR 1060 (Fa. PSS)

Laser: He/Ne, 633 nm, 4 mW

Messzellenvolumen: ca. 6 μl

Detektor: Photodiode, 0-10 V

5.4.5 Lösungviskosimetrie

Gerät: Viskosimeter mit automatischer Verdünnung (TI 1; Fa. SEMA-Tech)

Messtemperatur : $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$

Ubbelohde-Viskosimeter: Kapillardurchmesser 0,58 mm

Lösemittel: 0,01 M NaCl-Lösung

5.4.6 Dichtebestimmung mittels Biegeschwinger

Gerät: Präzisionsdichtemessgerät DMA 60/602 (Fa. Anton Paar, Österreich)

Messtemperatur: 20°C ± 0,1°C

Eichsubstanzen: Luft, H₂O

Lösemittel: 0,01 M NaCl-Lösung

5.4.7 Analytische Ultrazentrifuge (AUZ)

Gerät: Analytische Ultrazentrifuge XL-I (Fa. Beckmann-Coulter, USA)

Messtemperatur: 20,0°C ± 0,1°C

Detektion: Interferenzoptik

Mehrkanalzellen: Sedimentationshöhe der Einzelzellen 2,7 mm (3,2 mm für Optima XL-I)

Optische Weglänge: 12 mm

Rotorgeschwindigkeit: 50000 U/min

Lösemittel: 0,01 M NaCl-Lösung

5.4.8 SEC-MALLS

Vierkanal-Entgaser, SCM 400 (Fa. Spectra Physics)

Isokratische Pumpe, P 1000 (Fa. Spectra Physics)

Laufmittel: 0,2 M Na₂SO₄ + 1% Essigsäure in deionisiertem Wasser

Flußrate: 1,0 ml/min (Raumtemperatur)

Autosampler, AS 1000 (Fa. Spectra Physics)

Probenschleife : 100 µl

Säulen: TSK Säulen [Polyglycidyl(meth)acrylat-Gel]

1. PWH Guard (7.5 x 75 mm; 12 µm Partikel Größe)
2. 66000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikel Größe)
3. 65000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikel Größe)
4. 64000 PW (7.5 x 300 mm; 17 µm Partikel Größe)
5. 63000 PW (7.5 x 300 mm; 10 µm Partikel Größe)

Lichtstredetektor Dawn DSP (Fa. Wyatt)

OPTILAB DSP Interferometrisches Refraktometer (Fa. Wyatt)

UV/VIS-Detektor UV 2000 (Fa. Spectra Physics)

Viskositätsdetektor $\eta/\Delta\eta$ 1003 (Fa. WGE Dr. Bures)

Auswertesoftware WinGPC 6.0 (Fa. PSS), Astra 4.7 (Fa. Wyatt)

5.4.9 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Gerät: Kalorimeter DSC 7 (Fa. Perkin-Elmer)

Schutzgas: Stickstoff

Aufheizrate: 10 K/min

Temperaturbereich: 25-170°C

Zerfall der Makroinitiatoren in Substanz

Die thermoanalytische Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A und des präexponentiellen Faktors k_0 erfolgte für den Zerfall des niedermolekularen Initiators t-BACVS sowie für die Stärkeinitiatoren t-BACVS-St.

Im Folgenden wird die Auswertung der DSC-Thermogramme exemplarisch für den Zerfall des niedermolekularen Initiators t-BACVS beschrieben.

Das Thermogramm aus Abb. 5.5 zeigt einen endothermen Peak bei 82-85°C, dessen Maximum bei 84°C liegt. Die direkte Schmelzpunktbestimmung der Probe ergab einen Schmelzbereich von 82-83°C.

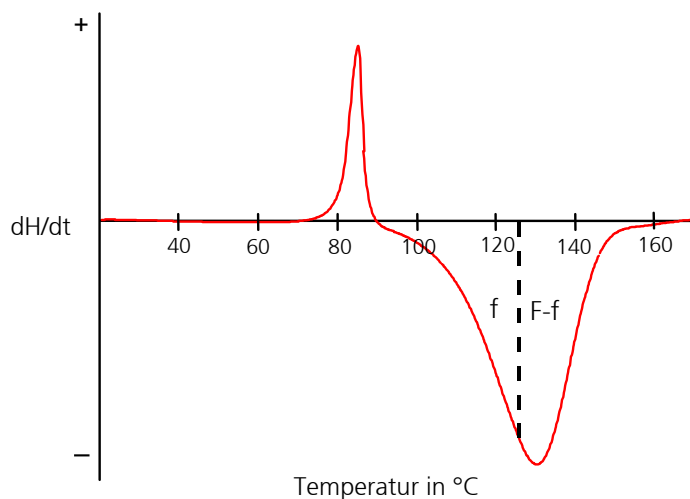


Abb. 5.5: DSC-Thermogramm des Zerfalls von t-BACVS

Der exotherme Zerfall der Azoverbindung erstreckt sich über einen Temperaturbereich von 90-155°C. Das Maximum des Zerfallspeaks liegt bei 130°C.

Die kinetische Analyse des DSC-Thermogramms beruht auf der Proportionalität von umgesetzter Stoffmenge und der Reaktionsenthalpie. Die Reaktionsenthalpie ΔH_R wird hierbei als unabhängig von der Größe des Substitutionsgrades angenommen (Gleichung 5.1).

Zu jeder Temperatur des Thermogramms erhält man aus dem Abstand der Basislinie und der Zerfallskurve die zeitliche Enthalpieänderung dH/dt , wobei Δn an Substanzmenge zerfallen ist. Dadurch ist nach Gleichung 5.2 die zerfallene Initiatorstoffmenge direkt der Fläche F proportional. Ein Proportionalitätsfaktor K zur Bestimmung des Substitutionsgrades der Makroinitiatoren kann aus dem Zerfall des niedermolekularen Initiators t-BACVS nach Gleichung 5.1 berechnet werden. K hat in diesem Fall einen Wert von $K=3,556 \cdot 10^{-8}$ mol/FE.

Der Substitutionsgrad DS der Makroinitiatoren ermittelt sich nach Gleichung 5.4, einer Kombination der Gleichung 5.2 und Gleichung 5.3. Formal erhält man für den niedermolekularen Initiator t-BACVS die Gleichung 5.5, wenn man einen DS von ∞ postuliert.

Gleichung 5.1 $\Delta H_R \neq f(DS)$

mit ΔH_R Reaktionsenthalpie

Gleichung 5.2 $n_i = F \cdot K = n_G \cdot DS$

mit F Peakfläche im Thermogramm
 n_i Stoffmenge an t-BACVS [mol]
 n_G Stoffmenge an t-BACVS-St [mol]
 K Proportionalitätsfaktor

Gleichung 5.3
$$n_G = \frac{m_G}{(M_{AGE} + DS \cdot M_I)}$$

mit m_G Einwaage an Makroinitiator t-BACVS-St [g]
 M_{AGE} Molmasse der Anhydroglucose-Einheit ($M_{AGE}=162,1$ g/mol)
 M_I Molmasse des Substitutionsfragmentes des Initiators ($C_{10}H_{15}ON_3$)
($M_I=193,3$ g/mol)

Gleichung 5.4
$$DS = \frac{M_{AGE}}{\left(\frac{m_G}{F \cdot K} - M_I \right)}$$

Gleichung 5.5
$$K = \frac{m_G}{F \cdot M_I} = 3,556 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{FE}^{-1}$$

5.4.10 Plasmid-DNA

Das Plasmid pCMVluc, das für das Protein Luciferase des Glühwürmchens kodiert und über einen Cytomegalovirus Promoter (CMV) reguliert wird, wurde von Herrn Dr. E. Wagner (Institut für Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* amplifiziert und von PlasmidFactory GmbH & Co. KG (Bielefeld) gereinigt. Die Reinheit (LPS) der Plasmid-DNA ist kleiner 0,1 E.U./DNA, der Anteil an „supercoiled“ DNA ist größer 90% ccc.

5.4.11 Zelllinien

Zelllinie: *HepG2*

Zelltyp: humane Leberkrebszelle

DSMZ-Nr.: ACC 180, Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Ursprung: erhalten von einem Tumorgewebe mit Leberkrebs eines 15jährigen Jungen aus Argentinien (1975)

Morphologie: adherente, epithelartige Zellen; Wachstum in Monolayern und in kleinen Aggregaten

Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS

Zelllinie: *HeLa*

Zelltyp: humane Gebärmutterhalskrebszelle

DSMZ-Nr.: ACC 57, Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Ursprung: erhalten von einem Gebärmutterhalskrebsgewebe einer 31jährigen schwarzen Frau (1951); spätere Diagnoseänderung zu Adenocarcinoma; erst aneuploid

Morphologie: epithelartige Zellen; Wachstum in Monolayern

Medium: 90% MEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin + nichtessentielle Aminosäuren

Zelllinie: *16HBE*

Ursprung: Geschenk von Dieter C. Grunert, University of California, San Francisco

5.4.12 Zeta-Potential/Partikelgröße

Gerät: Zetapals, Zeta Potential Analyzer (Fa. Brookhaven)

Messanordnung: 15°/90°

Zeta-Potential: AQ-376-Einsteckelektroden

beam mode: F(Ka)=1,50 (Smoluchowsky)

Temperatur: 25°C ± 0,1°C

Lösemittel: H₂O

5.4.13 Bestimmung der Transfereffizienz

Gerät: Luminometer Wallac 1420 Multilabel Counter Victor² (Fa. Wallac)

Software: Wallac 1420, Version 2.00

Lösemittel: Lysepuffer (250 mM TRIS; 0,1% Triton-X-100; pH 7,8)

Zur Transfektion wurden je ~20000 Zellen in die 96-Well-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Plasmid-DNA pCMVluc, für die das Reporter-gen Luciferase kodiert (Ernst Wagner, Pharmazeutisches Institut, LMU, München), wurde in einer Konzentration von 0,5 µg pro Well mit dem Genvektor in HBS (HEPES-buffered Saline) gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Genvektor-DNA-Komplexe zu den Zellen gegeben und für 4 h inkubiert (Brutschrank; 37°C; 5 % CO₂; 100% Luftfeuchtigkeit). Danach wurde das Medium abgesaugt, durch ein Medium (200µl MEM/FCS) mit 10% FCS (Fetales Kälber-Serum) und AB (Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)) ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach einmaligem Waschen mit PBS (0,05 M Kaliumphosphat-Puffer; 0,05 M Natriumchlorid; pH 7,5) wurden die Zellen mit 100 µl Lysepuffer (250 mM TRIS; 0,1% Triton; pH=7,8) versetzt. Zur Bestimmung der Transfereffizienz diente die Messung der Luciferaseaktivität. Die Messwerte in relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf den Gesamtproteingehalt im Lysat bezogen (RLU pro 10 s pro mg Protein). Der Proteingehalt wurde mit einem Protein Assay (BioRad) nach der Bradfordmethode bestimmt.

5.4.14 Fluoreszenzmikroskopie

Gerät: Epi-Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 135 (Fa. Zeiss)

Vergrößerung: 630fache

Filter_{FLUOS}: 468 nm Anregung, 535 nm Immission

Kamera: AxioCam MRm (Fa. Zeiss)

Photosoftware: Axiovision, Belichtung: 1 ms

5.4.15 Vernebelungsprozess der Genvektoren

Gerät: Venturi-Düsenvernebler PARI BOY[®] N (Fa. PARI GmbH)

Vernebelungsbehälter: Acrylglaskasten der Maße 9,8 x 13,2 x 21,5 cm

(1) Vernebelung der Genvektorkomplexe und Agarose-Gelelektrophorese.

2,4 ml der Vektor-Lösung (DNA = 10µg/ml) wurde für 10 min mit einem PARI BOY[®] N Zerstäuber (ca. 5 ml·min⁻¹) (PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) vernebelt. Der Aerosolstrom wurde durch eine Spritze konzentriert, die an die Öffnung des Reservoirs des Zerstäubers angeschlossen wurde. Die Proben wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt.

Um die Vollständigkeit der Komplexe zu überprüfen, wurden 20 µl der vernebelten Komplex-Lösungen, der nicht-vernebelten und Reservoir-Fractionen nach Hinzufügen von Heparansulfat

auf ein 0,6% Agarosegel gegeben und für ca. 1 h bei 80 V im TAE Puffer (0,04 M Tris-Acetat; 0,001 M EDTA) gelelektrophoretisch vermessen.

(2) Vernebelung der Genvektoren zum Lungenflügel von Mäusen

Die DNA (pCMVluc) wurde zu den Polymer-Lösungen pipettiert und vor der Vernebelung für 20 min inkubiert. Das abschließende Volumen der Genvektor-Lösungen betrug 8 ml (1 mg DNA). Für das Vernebelungs-Verfahren wurden vier Mäuse in einen versiegelten Acrylglaskasten mit 9,8 x 13,2 x 21,5 cm gebracht, der an einem Ende über einen 45 x 7,7 cm langen Plastikzylinder an den Zerstäuber angeschlossen war (Pari BOY®, PARI GmbH, Starnberg, Deutschland). Die Unterseite des Plastikzylinders wurde homogen mit 150 g Silikagels bedeckt (1-3 mm). Die Genvektor-Lösung wurde in zwei 4 ml Fraktionen aufgespaltet und jede dieser Fraktionen wurde innerhalb von ungefähr 20 min zu den Mäusen vernebelt. Der Zerstäuber wurde hierbei mit synthetischer Luft betrieben, die 5% CO₂ enthielt. 24 h nach der Genvektorapplikation wurden die Mäuse intraperitoneal mit Pentobarbital-Lösung betäubt und das Peritoneum geöffnet. Im Anschluss wurde die Vena cava inferior durchtrennt und 10-15 ml einer isotonischen Natriumchloridlösung (25000 D.H. Heparin/1000 ml) direkt in den rechten Ventrikel injiziert, um die Lungen von dem Blut zu reinigen. Dieses war wichtig, da die Blutbestandteile (vor allem Hämoglobin) die Luciferase-Aktivität beeinflussen. Die Lungen der Tiere wurden zergliedert und mit PBS gewaschen. Nach hinzufügen von 750 µl Lysis-Puffer, wurden die Organe gewogen und in einer Minikugelmühle (Biospec Produkte, Bartlesville, USA) homogenisiert. Die Luciferase-Aktivität wurde in einem Luminometer gemessen (Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland). Rekombinante Luciferase (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde als Standard verwendet, um die Menge der Luciferase zu errechnen, die im Lungenflügelgewebe exprimiert wurde. Es wurden BALB/c Mäuse benutzt (Charles Fluss-Labors, Sulzfeld, Deutschland).

6 Literatur

- ¹ J. Gene Med. 2004, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>
- ² Teichler Z. D., Trends in Genet. **16**, 6, 2000, 272-275
- ³ Marshall E. Science **286**, 1999, 2244-2245
- ⁴ Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., Saint Basile de G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.-L., Bouso P., Le Deist F., Fischer A., Science **288**, 2000, 669-672
- ⁵ Wiethoff C. M., Middaugh C. R., J. Pharmaceut. Sci. **92**, 2, 2003, 203-217
- ⁶ Boussif O., Lezoulac'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 1995, 7297-7301
- ⁷ Remy J.-S., Abdallah B., Zanta M. A., Boussif O., Behr J.-P., Demeneix B., Adv. Drug Del. Rev. **30**, 1998, 85-95
- ⁸ Luo D., Saltzman W. M., Nat. Biotechnol. **18**, 2000, 33-37
- ⁹ Friedmann T., Robin R., Science **175**, 4025, 1972, 949-955
- ¹⁰ Mah C., Byrne B. J., Flotte T. R., Clin. Pharmacokinet. **41**, 12, 2002, 901-911
- ¹¹ Gilboa E., Eglitis M. A., Kanthoff P. W., French Anderson W., Biotechniques **4**, 6, 1986, 504-512
- ¹² Anderson W. F., Science **256**, 5058, 1992, 808-813
- ¹³ Delenda C., J. Gene Med. **6**, 2004, S125-S138
- ¹⁴ Volpers C., Kochanek S., J. Gene Med. **6**, 2004, S152-S163
- ¹⁵ Grimm D., Kleinschmidt J. A., Hum. Gene Ther. **10**, 15, 1999, 2445-2450
- ¹⁶ Flotte T. R., Laube B. L., Chest. **120**, 3 Supp. S, 2001, 124S-131S
- ¹⁷ El-Aneed A., J. Contr. Release **94**, 1, 2004, 1-14
- ¹⁸ Zimmermann U., Schulz J., Pilwat G., Biophys. J. **13**, 10, 1973, 1005-1013
- ¹⁹ Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H., Embo J. **1**, 7, 1982, 841-845
- ²⁰ Yang N.-S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 1990, 9568-9572
- ²¹ Rakhmilevich A. L., Turner J., Ford M. J., McCabe D., Sun W. H., Sondel P. M., Grota K., Yang N.-S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 1996, 6291-6296
- ²² www.brookscole.com/
- ²³ Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Ascadi G., Jani A., Felgner P. L., Science **247**, 4949, 1990, 1465-1468
- ²⁴ Wolff J. A., Williams P., Ascadi G., Jiao S., Jani A., Chong W., Biotechniques **11**, 1991, 474-485
- ²⁵ www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_09/10_20.GIF
- ²⁶ Hickmann M. A., Malone R. W., Lehmann-Buinsma K., Sih T. R., Knoell D., Szoka F. C., Walzem R., Carlson D. M., Powell J. S., Human Gene Ther. **5**, 1994, 1477-1483
- ²⁷ Hengge U. R., Walzer P. S., Vogel J. C., J. Clin. Invest. **97**, 1996, 2911-2916
- ²⁸ Yang J. P., Huang L., Gene Ther. **3**, 1996, 542-548
- ²⁹ Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 27, 1987, 7413-7417
- ³⁰ Hashida M., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., Adv. Drug Del. Reviews **52**, 2001, 187-196
- ³¹ Rolland A. P., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. **15**, 2, 1998, 143-198
- ³² Ruponen M., Ylä-Herttua S., Urtti A., Biochim. Biophys. Acta **1415**, 1999, 331-341
- ³³ Behr J.-P., Bioconj. Chem. **5**, 1994, 382-389
- ³⁴ Kawakami S., Fumoto S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., Pharm. Res. **17**, 3, 2000, 306-313
- ³⁵ Tranchant I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., Scherman D., J. Gene Med. **6**, 2004, S24-S35
- ³⁶ Singh M., Briones M., Ott G., O'Hagan D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 2, 2000, 811-816
- ³⁷ Brown M. D., Schätzlein A. G., Uchegbu I. F., Int. J. Pharm. **229**, 2001, 1-21

- ³⁸ Zabner J., Fasbender A. J., Moninger T., Poellinger K. A., Welsh M. J., *J. Biol. Chem.* **270**, 32, 1995, 18997-19007
- ³⁹ Shi G., Guo W., Stephenson S. M., Lee R. J., *J. Contr. Release* **80**, 1-3, 2002, 309-319
- ⁴⁰ Kabanov A. V., Kabanov V. A., *Bioconj. Chem.* **6**, 1, 1995, 7-20
- ⁴¹ Remy J.-S., Abdallah B., Zanta M. A., Boussif O., Behr J.-P., Demeneix B., *Adv. Drug Del. Rev.* **30**, 1998, 85-95
- ⁴² Hui S. W., Langner M., Zhao Y. L., Ross P., Hurley E., Chan K., *Biophys. J.* **71**, 2, 1996, 590-599
- ⁴³ Leventis R., Silviu J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 1990, 124-132
- ⁴⁴ Rose J. K., Buonacore L., Whitt M. A., *Biotechniques* **10**, 1991, 520-525
- ⁴⁵ Behr J.-P., Demeneix B., Loeffler J.-P., Peres-Mutul J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1989, 6982-8986
- ⁴⁶ Behr J.-P., Loeffler J.-P., DE 690 308 39 T2, 17.04.1989
- ⁴⁷ Gao X., Huang L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179**, 1991, 280-285
- ⁴⁸ Felgner P.-L., Abai A. M., Manthorpe M. C., DE 692 076 03 T2, 16.08.1991
- ⁴⁹ Wu G. Y., Wu C. H., *J. Biol. Chem.* **262**, 10, 1987, 4429-4432
- ⁵⁰ Cotten M., Wagner E., *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 1993, 705-710
- ⁵¹ Perales J. C., Ferkol T., Molas M., Hanson W., *Eur. J. Biochem.* **226**, 1994, 255-266
- ⁵² Kabanov A. V., Astafyeva I. V., Chikindas M. L., Rosenblat G. F., Kiselev V. I., Severin E. S., Kabanov V. A., *Biopolymers* **37**, 1991, 1437-1443
- ⁵³ Helgen J. C., Fallon A. M., *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**, 1990, 731-736
- ⁵⁴ Haensler J., Szoka F. C., *Bioconj. Chem.* **4**, 5, 1993, 372-379
- ⁵⁵ Tang M. X., Szoka F. C., *Gene Ther.* **4**, 8, 1997, 823-832
- ⁵⁶ Cherng J.-Y., Van de Weterung P., Talsma H., Crommelin D. J. A., Hennink W. E., *Pharm. Res.* **13**, 7, 1996, 1038-1042
- ⁵⁷ Reschel T., Konák C., Oupický D., Seymour L. W., Ulbrich K., *J. Contr. Release* **81**, 1-2, 2002, 201-217
- ⁵⁸ Boussif O., Lezoulac'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1995, 7297-7301
- ⁵⁹ Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G., *J. Contr. Release* **60**, 1999, 149-160
- ⁶⁰ Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G., *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 3, 1999, 268-275
- ⁶¹ Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J. P., Zacchello F., Scarpa M., *Gene Ther.* **4**, 10, 1997, 1100-1106
- ⁶² Zou S., Erbacher P., Remy J.-S., Behr J.-P., *J. Gene Med* **2**, 2, 2000, 128-134
- ⁶³ Wolfert M. A., Seymour L. W., *Gene Ther.* **3**, 1996, 269-273
- ⁶⁴ Katayose S., Kataoka K., *Bioconj. Chem.* **8**, 1997, 702-707
- ⁶⁵ Wolfert M. A., Schacht E. H., Toncheva V., Ulbrich K., Nazarova O., Seymour L. W., *Human Gene Ther.* **7**, 17, 1996, 2123-2133
- ⁶⁶ Vanderkerken S., Vanheede T., Toncheva V., Schacht E., Wolfert M. A., Seymour L., Urtti A., *J. Bioact. Compat. Polym.* **15**, 2, 2000, 115-138
- ⁶⁷ Choi Y. H., Lui F., Kim J.-S., Choi Y. K., Park J. S., Kim S. W., *J. Contr. Release* **54**, 1, 1998, 39-48
- ⁶⁸ Männistö M., Vanderkerken S., Toncheva V., Elomaa M., Ruponen M., Schacht E., Urtti A., *J. Contr. Release* **83**, 1, 2002, 169-182
- ⁶⁹ Itaka K., Yamauchi K., Harada A., Nakamura K., Kawaguchi H., Kataoka K., *Biomaterials* **23**, 2003, 4495-4506
- ⁷⁰ Katayose S., Kataoka K., *J. Pharm. Sci.* **87**, 1998, 160-163
- ⁷¹ Toncheva V., Wolfert M. A., Dash P. R., Oupický D., Ulbrich K., Seymour L. W., Schacht E. H., *Biochim. Biophys Acta* **1380**, 3, 1998, 354-368
- ⁷² Laus M., Sparnacci K., Ensoli B., Butto S., Caputo A., Mantovani I., Zuccheri G., Samori B., Tondelli L., *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.* **12**, 2, 2001, 209-228
- ⁷³ Verbaan F. J., Oussoren C., Snel C. J., Crommelin D. J. A., Hennink W. E., Storm G., *J. Gene Med.* **6**, 1, 2004, 64-75
- ⁷⁴ Holmberg K., Tiberg F., Malmsten M., Brink C., *Colloids and Surfaces A* **123-124**, 1997, 297-306
- ⁷⁵ Choi J. H., Choi J. S., Suh H., Park J. S., *Bull. Korean Chem. Soc.* **22**, 1, 2001, 46-52
- ⁷⁶ Sung S.-J., Min S. H., Cho K. Y., Lee S., Min Y.-J., Yeom Y. I., Park J.-K., *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 4, 2003, 492-500

- ⁷⁷ Petersen H., Fechner P. M., Martin A. L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C. J., Fischer D., Davies M. C., Kissel T., *Bioconj. Chem.* **13**, 4, 2002, 845-854
- ⁷⁸ Wu G. Y., Wu C. H., *J. Biol. Chem.* **263**, 29, 1988, 14621-14624
- ⁷⁹ Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H., Birnstiel M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9, 1990, 3410-3414
- ⁸⁰ Wagner E., Cotten M., Foisner R., Birnstiel M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10, 1991, 4255-4259
- ⁸¹ Ogris M., Brunner S., Schüller S., Kircheis R., Wagner E., *Gene Ther.* **6**, 4, 1999, 595-605
- ⁸² Kircheis R., Blessing T., Brunner S., Wightman L., Wagner E., *J. Contr. Release* **72**, 2001, 165-170
- ⁸³ Kursá M., Walker G. F., Roessler V., Ogris M., Roedl W., Kircheis R., Wagner E., *Bioconj. Chem.* **14**, 1, 2003, 222-231
- ⁸⁴ Bennis J. M., Mahato R. I., Kim S. W., *J. Contr. Release* **79**, 1-3, 2002, 255-269
- ⁸⁵ Kollen W. J. W., Midoux P., Erbacher P., Yip A., Roche A. C., Monsigny M., Glick M. C., Scanlin T. F., *Hum. Gene Ther.* **7**, 1996, 1577-86
- ⁸⁶ Fajac I., Briand P., Monsigny M., Midoux P., *Hum. Gene Ther.* **10**, 1999, 395-406
- ⁸⁷ Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotten M., Beug H., Birnstiel M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 10, 1990, 3655-3659
- ⁸⁸ Kircheis R., Schüller S., Brunner S., Ogris M., Heider K.-H., Zauner W., Wagner E., *J. Gene Med.* **1**, 1999, 111-120
- ⁸⁹ Kircheis R., Wightman L., Kursá M., Ostermann E., Wagner E., *Gene Ther.* **9**, 11, 2002, 731-735
- ⁹⁰ Gottschalk S., Cristiano R. J., Smith L. C., Woo S. L. C., *Gene Ther.* **1**, 1994, 185-191
- ⁹¹ Lee R. J., Low P. S., *Biochim. Biophys. Acta* **1233**, 2, 1995, 134-144
- ⁹² Leamon C. P., Weigl D., Hendren R. W., *Bioconj. Chem.* **10**, 1999, 947-957
- ⁹³ Zanta M. A., Boussif O., Adib A., Behr J. P., *Bioconj. Chem.* **8**, 6, 1997, 839-844
- ⁹⁴ Choi Y. H., Liu F., Park J. S., Kim S. W., *Bioconj. Chem.* **9**, 6, 1998, 708-718
- ⁹⁵ Lim D. W., Yeom Y. I., Park T. G., *Bioconj. Chem.* **11**, 5, 2000, 688-695
- ⁹⁶ Morimoto K., Nishikawa M., Kawakami S., Nagano T., Hattori Y., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *Mol. Ther.* **7**, 2, 2003, 254-261
- ⁹⁷ Diebold S. S., Kursá M., Wagner E., Cotten M., Zenke M., *J. Biol. Chem.* **274**, 27, 1999, 19087-19094
- ⁹⁸ Diebold S. S., Lehrmann H., Kursá M., Wagner E., Cotten M., Zenke M., *Hum. Gene Ther.* **10**, 5, 1999, 775-786
- ⁹⁹ Ferkol T., Perales J. C., Mularo F., Hanson R. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1, 1996, 101-105
- ¹⁰⁰ Erbacher P., Bousser M.-T., Raimond J., Monsigny M., Midoux P., Roche C., *Hum. Gene Ther.* **7**, 1996, 721-729
- ¹⁰¹ Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.* **7**, 2000, 292-299
- ¹⁰² Sato A., Kawakami S., Yamada M., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Targeting* **9**, 3, 2001, 201-207
- ¹⁰³ Ogris M., Walker G., Blessig T., Kircheis R., Wolschek M., Wagner E., *J. Contr. Release* **91**, 1-2, 2003, 173-181
- ¹⁰⁴ Ogris M., Steinlein P., Carotta S., Brunner S., Wagner E., *AAPS PharmSci* **3**, 3, 2001, E21
- ¹⁰⁵ Erbacher P., Remy J.-S., Behr J.-P., *Gene Ther.* **6**, 1999, 138-145
- ¹⁰⁶ Suh W., Han S.-O., Yu L., Kim S. W., *Mol. Ther.* **6**, 5, 2002, 664-672
- ¹⁰⁷ Wadia J. S., Dowdy S. F., *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 1, 2002, 52-56
- ¹⁰⁸ Frankel A. D., Pabo C. O., *Cell* **55**, 1988, 1189-1193
- ¹⁰⁹ Rudolph C., Dissertation, FU Berlin, 2002
- ¹¹⁰ Cho Y. W., Kim J. D., Park K., *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 6, 2003, 721-734
- ¹¹¹ Lee H., Jeong J. H., Park T. G., *J. Contr. Release* **76**, 2001, 183-192
- ¹¹² Lee H., Jeong J. H., Park T. G., *J. Contr. Release* **79**, 1-3, 2002, 283-291
- ¹¹³ Alam J., Cook J. L., *Anal. Biochem.* **188**, 1990, 245-254
- ¹¹⁴ de Wet J., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R., Subramani S., *Mol. Cell Biol.* **7**, 1987, 725-737
- ¹¹⁵ Viviani V. R., *Cell. Mol. Life Sci* **59**, 11, 2002, 1833-1850
- ¹¹⁶ Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsässer H.-P., Kissel T., *Pharm. Res.* **16**, 8, 1999, 1273-1279
- ¹¹⁷ von Harpe A., Petersen H., Li Y., Kissel T., *J. Contr. Release* **69**, 2000, 309-322
- ¹¹⁸ Sedláková M., Cölfen H., *Macromol. Chem. Phys.* **202**, 4, 2001, 587-597

- ¹¹⁹ Linow K.-J., Philipp B., *Faserforschung und Textilforschung* **19**, 11, 1968, 509-513
- ¹²⁰ Bohdaneky M., Kovar J., *Viscosity of Polymer Solutions*, Polymer Science Library, Elsevier, 1982
- ¹²¹ Görnitz E., Hahn M., Jaeger W., Dautzenberg H., *Progr. Colloid Polym. Sci.* **107**, 1997, 127-135
- ¹²² Dautzenberg H., Görnitz E., Jaeger W., *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 1998, 1561-1571
- ¹²³ Arndt K.-F., Müller G., *Polymercharakterisierung*, Carl Hanser Verlag, München, Wien, 1996
- ¹²⁴ Lind T., *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlage sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 5. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, 2002
- ¹²⁵ Ward C. M., *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2**, 2, 2000, 182-187
- ¹²⁶ Lee R. J., Low P. S., *J. Biol. Chem.* **269**, 5, 1994, 3198-3204
- ¹²⁷ Leamon C. P., Low P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 13, 1990, 5572-5576
- ¹²⁸ Guo W., Lee R. J., *AAPS Pharmsci.* **1**, 4, 1999, article 19
- ¹²⁹ Ward C. M., Pechar M., Oupicky D., Ulbrich K., Seymour L. W., *J. Gene Med.* **4**, 5, 2002, 536-547
- ¹³⁰ de Nooy A. E. J., Besemer A.C., *Tetrahedron* **51**, 29, 1995, 8023-8032
- ¹³¹ de Nooy A. E. J., Besemer A. C., van Bekkum H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **113**, 1994, 165-166
- ¹³² Sagara K., Kim S. W., *J. Contr. Release* **79**, 1-3, 2002, 271-281
- ¹³³ <http://chem.ch.huji.ac.il/~eugeniik/edc.htm>
- ¹³⁴ Miller G. L., *Anal. Chem.* **31**, 3, 1959, 426-428
- ¹³⁵ Scott T. A., Melvin E. H., *Anal. Chem.* **25**, 11, 1953, 1656-1661
- ¹³⁶ Midoux P., Mendes C., Legrand A., Raimond J., Mayer R., Monsigny M., Roche A. C., *Nucleic Acid Res.* **21**, 1993, 871-878
- ¹³⁷ Bennis J. M., Kim S. W., *J. Drug Targeting* **8**, 1, 2000, 1-12
- ¹³⁸ Fajac I., Grosse S., Briand P., Monsigny M., *Gene Ther.* **9**, 11, 2002, 740-742
- ¹³⁹ Kollen W. J. W., Midoux P., Erbacher P., Yip A., Roche A. C., Monsigny M., Glick M. C., Scanlin T. F., *Hum. Gene Ther.* **7**, 1996, 1577-86
- ¹⁴⁰ Kunath K., von Harpe A., Fischer D., Kissel T., *J. Contr. Release* **88**, 1, 2003, 159-172
- ¹⁴¹ De Smedt S. C., Demeester J., Hennink W. E., *Pharm. Res.* **17**, 2, 2000, 113-126
- ¹⁴² Bettinger T., Remy J.-S., Erbacher P., *Bioconj. Chem.* **10**, 1999, 558-561
- ¹⁴³ Choi S. H., Yoon J. J., Park T. G., *J. Coll. Interf. Sci.* **251**, 2002, 57-63
- ¹⁴⁴ Park I. K., Kim T. H., Kim S. I., Park Y. H., Kim W. J., Akaike T., Cho C. S., *Int. J. Pharm.* **257**, 1-2, 2003, 103-110
- ¹⁴⁵ Bruzzano S., Dissertation, TU Berlin, 2001
- ¹⁴⁶ Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 14, 1963, 2149-2154
- ¹⁴⁷ Fields G. B., Noble R. L., *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 3, 1990, 161-214
- ¹⁴⁸ Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D., *Tetrahedron Lett.* **30**, 15, 1989, 1927-1930
- ¹⁴⁹ <http://www.probes.com/handbook/print/0502.html>
- ¹⁵⁰ Wightman L., Kircheis R., Rössler V., Carotta S., Ruzicka R., Kurska M., Wagner E., *J. Gene Med.* **3**, 4, 2001, 362-372
- ¹⁵¹ Ungaro F., De Rosa G., Miro A., Quaglia F., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **31**, 2003, 143-149