

Untersuchung und Charakterisierung  
neuartiger kationischer Lipide  
für die nicht-virale Gentransfektion

**DISSERTATION**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl. Pharm. Nicole Erdmann

geboren am 23. Juni 1981 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Langner

2. Prof. Dr. B. Dobner

3. Prof. Dr. A. Aigner

Halle (Saale) im April 2013

verteidigt am 27.09.2013

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung .....	1
1.1 Somatische Gentherapie .....	1
1.1.1 Therapiestrategien und Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie .....	2
1.2 Gentransfervektoren .....	3
1.2.1 Kationische Polymere für den nicht-viralen Gentransfer.....	5
1.2.2 Kationische Lipide für den nicht-viralen Gentransfer .....	6
1.2.3 Lipoplexbildung und Struktur von Lipoplexen.....	10
1.2.4 Mechanismus und Barrieren der Lipofektion .....	12
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	18
2 Materialien .....	19
2.1 Lipide.....	19
2.1.1 Neuartige kationische Lipide .....	19
2.1.2 Kommerziell erworbene Lipide .....	21
2.2 Zelllinien und deren Kulturbedingungen.....	21
2.3 Plasmid-Vektoren .....	22
2.4 Puffer und Lösungen .....	24
2.5 Zellkulturmedien und Supplements .....	27
2.6 Chemikalien und Reagenzien .....	27
2.7 Kommerziell erhältlich Kits .....	30
2.8 Geräte und Verbrauchsmittel.....	30
3 Methoden .....	33
3.1 Liposomenpräparation .....	33
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	33

3.2.1	Gewinnung von pDNA .....	33
3.2.2	Zellkultivierung.....	35
3.2.3	Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen .....	36
3.2.4	Transfektion mit anschließendem Selektionsdruck .....	40
3.3	Analytische Methoden .....	41
3.3.1	Charakterisierung von Lipid- und Lipoplexformulierungen.....	41
3.3.2	Untersuchung mittels Asymmetrischer-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung.....	45
3.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	45
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	46
3.4.1	Fluoreszenzmarkierung .....	46
3.4.2	Zellkulturuntersuchung mit fluoreszenzmarkierten Proben.....	48
3.4.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	49
3.5	Statistische Methoden.....	52
4	Ergebnisse und Diskussion .....	53
4.1	Transfektions- und Zytotoxizitätsstudien .....	53
4.1.1	Kationische Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren .....	53
4.1.2	Kationische Transfektionslipide mit einer Gemini-Grundstruktur .....	62
4.1.3	Einfluss der Kopfgruppe kationischer Lipidformulierungen auf die Transfektionseffizienz.....	64
4.1.4	Einfluss des Helferlipids auf die Transfektionseffizienz .....	67
4.1.5	Serumeinfluss auf die Transfektionseffizienz .....	70
4.1.6	Untersuchungen zum stabilen Einbau von pDNA .....	71
4.2	Charakterisierung von Lipid- und Lipoplexformulierungen .....	72
4.2.1	Bestimmung von Partikelgrößen und Zeta-Potential ausgewählter Lipid- und Lipoplexformulierungen .....	73
4.2.2	Vergleichende Untersuchungen zur Partikelgröße: Partikelgrößenanalyse mittels PCS und Transmissionselektronenmikroskopie.....	74
4.3	Fluoreszenzmikroskopische Zellkulturuntersuchungen .....	80
4.3.1	Systemauswahl für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen .....	81
4.3.2	Lipoplex-Aufnahmestudien unter Verwendung von kovalent markierter pDNA .....	82
4.3.3	Aufnahmestudien mit YOYO <sup>®</sup> -1 Jodid markierter pDNA .....	84

4.3.4	Lipoplexuntersuchungen am Zellkulturmodell mittels FRET-Messung unter Zuhilfenahme des Akzeptor-Bleich-Verfahrens .....	89
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	92
6	Literatur.....	97
Anhang		

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AAV	Adeno-assoziierte Viren
BCA	Bicinchoninsäure (engl. Bicinchoninic Acid)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMV	Cytomegalievirus
DC	Dünnschichtchromatographie
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering)
DMEM	Medium (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
DOGS	Diocetylamidoglycylspermin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphoethanolamin
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
EMA	Europäische Arzneimittel Behörde (engl. European Medicines Agency)
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fötale Rinderserum
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl. Green Fluorescent Protein)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
i.v.	intravenös
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

LB	Medium (engl. Luria Broth)
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MEM	Medium (engl. Minimum Essential Medium)
MLU	Martin-Luther-Universität
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
P	Passage
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie (engl. Photon Correlation Spectroscopy)
pDNA	Plasmid-DNA
RES	Retikuloendotheliale System
RGD	Einbuchstabencode für (Arginin, Glycin und Asparaginsäure Sequenz)
RI	Refraktionsindex
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Round per Minute)
RT	Raumtemperatur
SCID	schwere kombinierte Immundefekte (engl. Served Combined Immunodeficiency Syndrome)
SOB	Medium (engl. Super Optimal Broth)
TE	Transfektionseffizienz
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie (engl. Transmission Electron Microscopy)
WGA	Weizenkeimagglutinin (engl. Wheat Germ Agglutinin)
X- SCID	X-chromosomal rezessiv vererbte kombinierte Immundefekte
RFU	relative Fluoreszenzeinheit (engl. Relative Fluorescence Units)

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Behandlungsstrategien für die somatische Gentherapie <sup>[4]</sup> .....	1
<b>Abb. 2:</b> Übersicht der Gentransfermethoden und deren Anteil an klinischen Gentherapiestudien, Stand Juni 2012 <sup>[19]</sup> .....	4
<b>Abb. 3:</b> Chemische Struktur kationischer Polymere für den nicht-viralen Gentransfer.....	5
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung von Lipid/DNA-Strukturen <sup>[85]</sup> .....	12
<b>Abb. 5:</b> Barrieren des nicht-viralen Gentransfers <sup>[32]</sup> .....	13
<b>Abb. 6:</b> Klassifikation verschiedener Endozytosewege, modifiziert nach SAHAY et al. <sup>[108]</sup> .....	15
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung der endozytotischen Aufnahme und Freisetzung von pDNA modifiziert nach XU et al.: 1. elektrostatische Interaktion der Lipoplexe mit der Zellmembran; 2. Endozytose 3. Destabilisierung der Endosomenmembran durch den Lipoplex, Flip-Flop der anionischen Lipide; 4. Dissoziation der pDNA vom Komplex und Freisetzung ins Zytoplasma <sup>[5]</sup> .....	16
<b>Abb. 8:</b> Plasmid pCMV·SPORT-βGal, schematisch <sup>[143]</sup> .....	23
<b>Abb. 9:</b> Plasmid pEGFP-C2, schematisch <sup>[151]</sup> .....	24
<b>Abb. 10: links:</b> Interferenz von Lichtstrahlen ausgehend von diffundierenden Partikeln, <b>rechts:</b> Intensitätsänderung und Korrelationsfunktion von kleinen und großen Partikeln <sup>[160]</sup> .....	42
<b>Abb. 11:</b> Darstellung von SD-E14Rho6G .....	46
<b>Abb. 12:</b> Struktur von Rhodamin 6G.....	46
<b>Abb. 13:</b> Schematische Darstellung der kovalenten pDNA Markierung <sup>[1]</sup> .....	47
<b>Abb. 14:</b> Strahlengang eines konfokalen LSM <sup>[3]</sup> .....	50
<b>Abb. 15:</b> Abbildungen eines dreifach gefärbten Zellverbands <b>links:</b> nichtkonfokale Darstellung <b>rechts:</b> konfokale Darstellung <sup>[3]</sup> .....	51
<b>Abb. 16:</b> Jablonski-Diagramm für Förster-Energietransfer <sup>[2]</sup> .....	51
<b>Abb. 17:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der E-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis) .....	55
<b>Abb. 18:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Transfektionslipide E14Lys und E14GlyLysin in Kombination mit dem neutralen Helferlipid DOPE in einem Verhältnis von 1/2 (n/n) an A549, COS-7 und Hep-G2; Zellen im jeweils optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis) .....	56
<b>Abb. 19:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der P-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis) .....	57
<b>Abb. 20:</b> Transfektionseffizienz der P-Reihen-Lipiden im Vergleich mit E- Reihen-Lipiden an Hep-G2 Zellen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; $p \leq 0,05$ .....	58

<b>Abb. 21:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von P14Lys und P14GlyLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen im jeweils optimierten Ladungsverhältnis; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis).....	59
<b>Abb. 22:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der T-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis) .....	60
<b>Abb. 23:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys, T14_16diLys und T16diLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen im jeweils optimierten Ladungsverhältnis; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis).....	62
<b>Abb. 24:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Gemini-Lipide G14diLys und G16diLys an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis) .....	63
<b>Abb. 25:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von G14diLys und G16diLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis).....	64
<b>Abb. 26:</b> Darstellung der Transfektions- und Viabilitätsuntersuchungen kationischer Transfektionslipide mit verschiedenen Kopfgruppenstrukturen, dargestellt sind die Ergebnisse der jeweiligen Liposomenformulierung mit DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n), im optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis, an Hep-G2-Zellen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ .....	66
<b>Abb. 27:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys mit DOPE und Cholesterol in verschiedenen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen, sowie ohne Helferlipid mit optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis an Hep-G2 Zellen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ .....	68
<b>Abb. 28:</b> Darstellung der Viabilitätsdaten der Lipoplexformulierungen von T14diLys mit DOPE und Cholesterol im Verhältnis 1/2 (n/n) an Hep-G2 Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Stoffmenge an kationischem Lipid je Well .....	69
<b>Abb. 29:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys mit DOPE und Cholesterol in verschiedenen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen sowie ohne Helferlipid mit optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis an COS-7 Zellen; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ .....	69
<b>Abb. 30:</b> Transfektions- und Viabilitätsergebnisse ausgewählter Transfektionslipide mit dem Helferlipid DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n), an Hep-G2 Zellen, mit und ohne serumfreien Inkubationsintervall; $x \pm s$ ; $n \geq 3$ .....	70
<b>Abb. 31:</b> Selektionsversuche; 7 Tage nach Kultivierung mit Selektionsmedium, <b>links:</b> Kontrolle der nicht transfizierten Zellen Vergrößerung 1:400, <b>rechts:</b> transfizierte Hep-G2 Zellen; Vergrößerung 1:200.....	71
<b>Abb. 32:</b> Selektionsversuche; 10 Tage nach Kultivierung mit Selektionsmedium, <b>links:</b> Kontrolle der nicht transfizierten Zellen, <b>rechts:</b> transfizierte Hep-G2 Zellen; Vergrößerung 1:200 .....	72
<b>Abb. 33:</b> Graphische Darstellung zur Partikelcharakterisierung der Lipoplexe von T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) mit pCMV·SPORT-βgal; <b>links:</b> Partikelgröße in Abhängigkeit vom (+/-)-Ladungsverhältnis, Gauß-Fit; <b>rechts:</b> ζ-Potential in	

Abhängigkeit vom (+/-)-Ladungsverhältnis, nicht lineare Kurvenanpassung, Boltzmann (Parameter der Kurvenanpassungen siehe Anhang) .....	73
<b>Abb. 34:</b> Partikelgrößenverteilung der Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) als ungewichtet, massengewichtete und anzahlgewichtete Darstellung (von <b>links</b> nach <b>rechts</b> ) .....	76
<b>Abb. 35:</b> TEM-Aufnahmen der Liposomen T14diLys/DOPE 1/2 (n/n); Proben mit Uranylacetat (1%) kontrastiert; Balken entspricht 100 nm.....	77
<b>Abb. 36:</b> Darstellung der Partikelgrößenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe: T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) / pCMV·SPORT-βgal bei den (+/-)-Ladungsverhältnissen 1/2, 2/1 und 9/2 (von <b>oben</b> nach <b>unten</b> ), Größenverteilung als ungewichtet, massengewichtet und anzahlgewichtete (von <b>links</b> nach <b>rechts</b> ) .....	78
<b>Abb. 37:</b> TEM-Aufnahmen der Lipoplexe T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) / pCMV·SPORT-βgal, (+/-)-Ladungsverhältnissen (von <b>oben</b> nach <b>unten</b> ): 1/2, 2/1 und 9/2; Proben mit Uranylacetat (1%) kontrastiert .....	79
<b>Abb. 38:</b> Darstellung der Lichtstreu- und Fluoreszenzintensitäten der Lipidformulierung: T14diLys/DOPE/SD E14Rho6G 1/2/0,0 (n/n/n) in Abhängigkeit der Elutionszeit an der A4F.....	82
<b>Abb. 39:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA 6 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label Fluoreszein (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß), die Pfeile weisen sowohl auf internalisierte als auch auf extrazelluläre Lipoplexstrukturen hin .....	83
<b>Abb. 40:</b> Vergrößerter Ausschnitt aus <b>Abb. 39:</b> fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA, 6 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label Fluoreszein (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß); <b>Bilder A1-A6:</b> Schnitte durch die z-Ebene, <b>Bild B:</b> simultane Darstellung von allen drei Raumrichtungen.....	84
<b>Abb. 41:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO®-1-Jodid markierter pDNA 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO®-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß) <b>Bilder A-D:</b> Schnitte durch die z-Ebene (Abstand 1 μm) .....	85
<b>Abb. 42:</b> Vergrößerter Ausschnitt aus <b>Abb. 41:</b> fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO®-1-Jodid markierter pDNA 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO®-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß); <b>Bild A:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO®-1-Jodid, <b>Bild B:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, <b>Bild C:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor® 633, <b>Bild D:</b> Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten; <b>Bild E:</b> Mischbild mit simultaner Darstellung aller drei Raumrichtungen .....	86
<b>Abb. 43:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO®-1-Jodid markierter pDNA, 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO®-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß); <b>Bilder A1-A3:</b> Schnittebenen in z-Richtung im Abstand von 0,8 μm; <b>Bilder B1-B4:</b> vergrößerte Darstellung aus <b>Bild A1</b> (weißer Kasten); <b>Bild B1:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO®-1-Jodid, <b>Bild B2:</b>	

Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, <b>Bild B3:</b>	
Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor <sup>®</sup> 633, <b>Bild B4:</b>	
Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten .....	87
<b>Abb. 44:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO <sup>®</sup> -1-Jodid markierter pDNA, 6 ( <b>Bilderserie A</b> ) und 24 h ( <b>Bilderserie B</b> ) nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO <sup>®</sup> -1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 (weiß); <b>Bilder A1 und B1:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO <sup>®</sup> -1-Jodid, <b>Bilder A2 und B2:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, <b>Bilder A3 und B3:</b> Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor <sup>®</sup> 633, <b>Bilder A4 und B4:</b> Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten, <b>Bilder A5 und B5:</b> Mischbild mit simultaner Darstellung aller drei Raumrichtungen .....	88
<b>Abb. 45:</b> FRET-Messung an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA, 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label ATTO Rho6G = Akzeptor (rot), pDNA-Label Fluoreszein = Donor (grün), Membran-Label Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 (weiß); Verfahren: Akzeptor-Bleich-Verfahren; <b>Bild A:</b> zeigt den ersten Scan von 8 (vor dem Bleichschritt); <b>Bild B:</b> zeigt den fünften Scan (Fluoreszenzintensitäten nach dem Bleichschritt); die Fluoreszenzaufnahmen, sowie die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten zu allen 8 Scans befinden sich im Anhang .....	90
<b>Abb. 46:</b> Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von ATTO Rho6G und Fluoreszein aus der markierten Bildregion in <b>Abb. 45</b> in Abhängigkeit der durchgeführten Scans .....	90

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Lipide für den nicht-viralen Gentransfer.....	7
<b>Tab. 2:</b> Übersicht der verwendeten neuen kationischen Lipide.....	19
<b>Tab. 3:</b> Übersicht kommerziell erworbener Lipide .....	21
<b>Tab. 4:</b> Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen.....	24
<b>Tab. 5:</b> Übersicht verwendeter Zellkulturmedien und Supplements .....	27
<b>Tab. 6:</b> Übersicht verwendeter Chemikalien und Reagenzien .....	27
<b>Tab. 7:</b> Übersicht verwendeter Kits.....	30
<b>Tab. 8:</b> Übersicht verwendeter Geräte .....	30
<b>Tab. 9:</b> Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel.....	31
<b>Tab. 10:</b> Zusammenfassung der verwendeten Fluoreszenzlabel und der damit markierten Strukturen.....	50
<b>Tab. 11:</b> Chemische Strukturen der E-Reihen-Lipide .....	54
<b>Tab. 12:</b> Chemische Strukturen der P-Reihen-Lipide .....	57
<b>Tab. 13:</b> Chemische Strukturen der T-Reihe Lipide .....	60
<b>Tab. 14:</b> Chemische Strukturen der Gemini-Lipide .....	63
<b>Tab. 15:</b> Chemische Strukturen ausgewählter Lipide mit verschiedener Kopfgruppenstruktur .....	65
<b>Tab. 16:</b> Chemische Strukturen der Lipide E14, T14diLys und SD-E14Rho6G .....	81

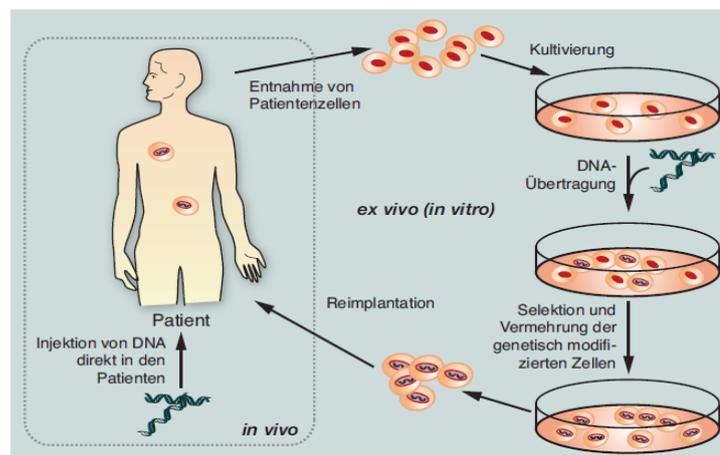
# 1 Einleitung

## 1.1 Somatische Gentherapie

Die Gentherapie bezeichnet das gezielte Einführen therapeutischer Gene in Körperzellen mit dem Ziel, durch Expression dieser Gene Krankheiten zu lindern oder zu heilen. Dabei richtet sich die somatische Gentherapie auf die Korrektur bzw. Regulierung von Gendefekten in somatischen Körperzellen und nicht auf Veränderungen von Keimbahnzellen. Die genetische Veränderung von Ei- und Samenzellen ist in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz verboten, da dies zu einer Vererbung der eingebrachten Gene auf die Nachkommen führen würde und ethisch nicht vertretbar ist.

Grundsätzlich kann man zwei Behandlungsstrategien für die somatische Gentherapie unterscheiden, die In-vivo- und die

Ex-vivo-Gentherapie (siehe **Abb. 1**): Bei der In-vivo-Gentherapie werden die Vektoren, welche das gewünschte genetische Material tragen, in den Patienten injiziert. Die Gentransfektion, also das Einschleusen des therapeutischen genetischen Materials in das Zielgewebe, erfolgt direkt im Organismus.



**Abb. 1:** Behandlungsstrategien für die somatische Gentherapie<sup>[4]</sup>

Um ausschließlich die gewünschten Zellen zu erreichen setzt diese Methode die Anwendung eines zielgerichteten Vektors voraus. Im Gegensatz dazu werden bei der Ex-vivo-Gentherapie Zellen aus dem Patienten isoliert und auf Nährmedien kultiviert. Die Patientenzellen werden dann genetisch modifiziert und nach Selektion und Vermehrung dem Patienten reimplantiert. Diese Strategie beschränkt sich jedoch auf Zellen, welche relativ leicht aus dem Organismus isoliert und kultiviert werden können (Blut oder Knochenmarkzellen).<sup>[6-7]</sup>

### 1.1.1 Therapiestrategien und Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie

Die somatische Gentherapie wurde ursprünglich zur Behandlung schwerer monogenetischer Erberkrankungen entwickelt. Dabei sollte mittels Substitutionsstrategie das fehlende oder fehlerhafte Gen durch eine gesunde Version ersetzt werden und somit eine kausale Therapie ermöglichen. Erste Therapieerfolge wurden bereits bei einigen auf einem einzelnen Gendefekt beruhenden Erkrankungen erzielt: Beispielhaft erwähnt sind dabei die schweren kombinierten Immundefekte (SCID), wie die Adenosin-Desaminase-Defizienz (ADA-SCID) oder das X-SCID, welches einen X-chromosomal rezessiv vererbten schweren kombinierten Immundefekt bezeichnet. Aber auch die Hämophilie, das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und viele weitere, seltene genetisch bedingte Erkrankungen sind Gegenstand klinischer Gentherapiestudien.<sup>[8-9]</sup> Mittlerweile umfasst das Anwendungsspektrum der somatischen Gentherapie jedoch nicht mehr nur monogenetische Erberkrankungen, sondern auch multifaktorielle genetische Erkrankungen sowie erworbene Erkrankungen, wie Tumor-, Herz-Kreislaufferkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, chronische Infektionskrankheiten (HIV-Infektion, Hepatitis C) aber auch neurologische Erkrankungen (Parkinson, Alzheimer) und Augenerkrankungen (Macula Degeneration, Glaukom).<sup>[10]</sup> So erteilte die Europäische Arzneimittel Behörde (EMA) erstmals 2012 die Zulassung für ein Gentherapeutikum. Dabei handelt es sich um einen viralen Vektor (AAV) zur Behandlung einer sehr seltenen, erblich bedingten Lipoproteinlipase-Defizienz.<sup>[11-13]</sup> Die kommerzielle Einführung soll voraussichtlich im zweiten Halbjahr 2013 erfolgen. In China wurde bereits 2005 ein Gentherapeutikum zugelassen, welches auf einem nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektor basiert. Der Vektor ist mit dem Tumorsuppressorgen p53 ausgestattet und wird zur Behandlung von malignen Kopf-Hals-Karzinomen eingesetzt.<sup>[14-15]</sup>

Um regulatorische Effekte an Zellen und Geweben zu erzielen stellt neben der Substitutionstherapie auch die Addition von Genen eine Möglichkeit zur Behandlung dar. Dabei werden Gene in die zu behandelnden Zellen eingebracht, welche normalerweise nicht in diesen vorkommen. Für die Substitutions- und Additionstherapie wird als genetisches Material meist Plasmid-DNA (pDNA) verwendet. Im Gegensatz dazu zielt die Anwendung von therapeutischen Antisense-Oligonukleotiden, sowie short hairpin RNAs (shRNAs) und small interfering RNA (siRNAs) auf die Inhibition – durch Hemmung der Expression auf der Transkriptionsebene – bestimmter Protein ab.<sup>[16]</sup>

Leider kam es in der Vergangenheit auch zu Rückschlägen bei der Behandlung mittels Gentherapie. So erlag der an einer erblich bedingten Fehlfunktion der Leber leidende Jesse

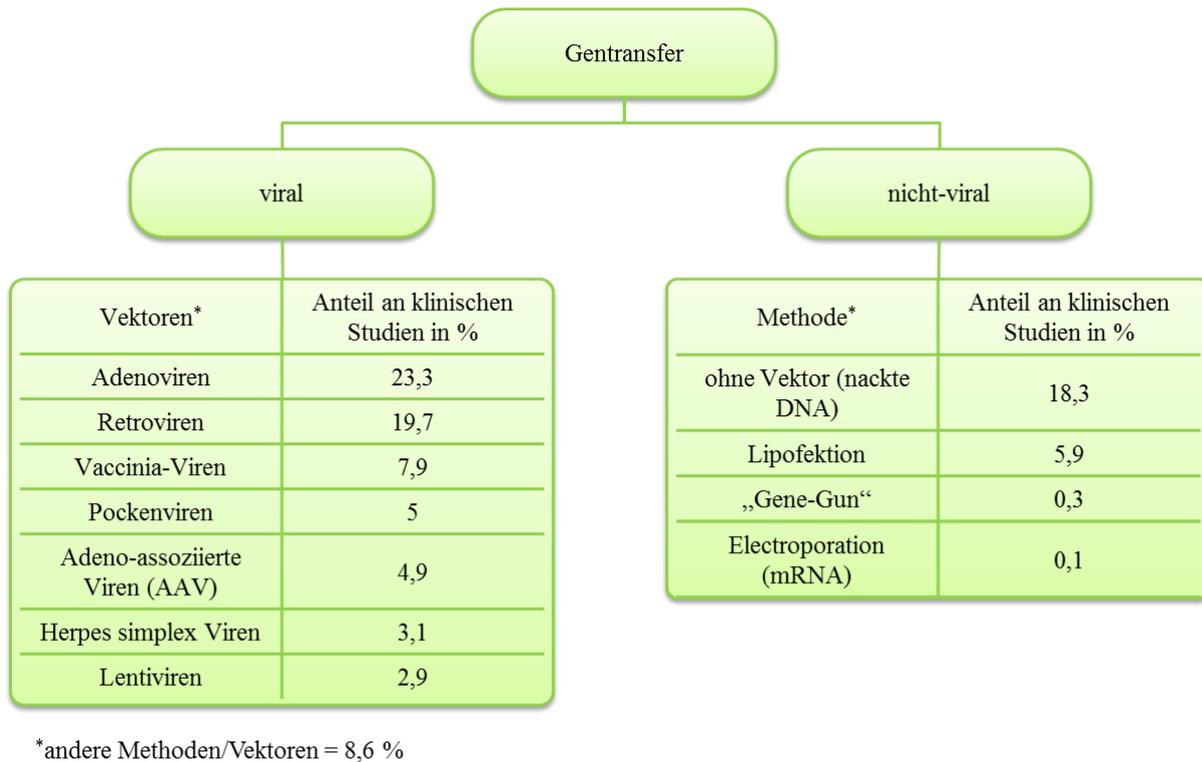
Gelsinger 1999 einer heftigen Immunreaktion nach der Applikation eines adenoviralen Vektors. Für die starke Immunantwort wurde eine zu hohe Dosis des Vektors vermutet.<sup>[17]</sup> Weiterhin erkrankten zwischen 2002 und 2007 vier von zehn Patienten mit X-SCID, welche zuvor erfolgreich mit einem retroviralen Vektor behandelt wurden, an Leukämie.<sup>[18]</sup> Trotz dieser Komplikationen sollte die somatische Gentherapie, aufgrund ihrer kausalen Behandlungsmöglichkeit, durch die Entwicklung von sicheren und effizienten Gentransfervektoren weiter vorangetrieben werden.

## 1.2 Gentransfervektoren

Die Aufnahme von genetischem Material in Zellen oder Geweben ist aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativ geladenen Nucleinsäuren und der ebenfalls negativen Oberflächenladung von Zellmembranen erschwert. Der Einsatz von reiner „nackter“ DNA führt daher zu sehr geringen therapeutischen Effekten, sodass für eine effektive Behandlung ein geeignetes „Transportmittel“ erforderlich ist. An einen idealen Vektor werden folgende Anforderungen gestellt. Er sollte:

1. sicher und gut verträglich, ungiftig und nicht immunogen sein,
2. das genetische Material vor dem Abbau durch Nukleasen schützen,
3. mit den Zellmembranen der Zielzellen interagieren und selektive des genetische Material in diese internalisieren,
4. das genetischen Material nach Aufnahme in den Zellen, für eine biologische Aktivität, freisetzen sowie
5. einfach und in reproduzierbarer Qualität herstellbar sein.

Die Vektorsysteme werden allgemein in virale und nicht-virale Genfähren eingeteilt. Eine Übersicht über verschiedene Gentransfermethoden und deren prozentualen Anteil an allen weltweiten, klinischen Gentherapiestudien (Stand 2012) gibt **Abb. 2** wieder.

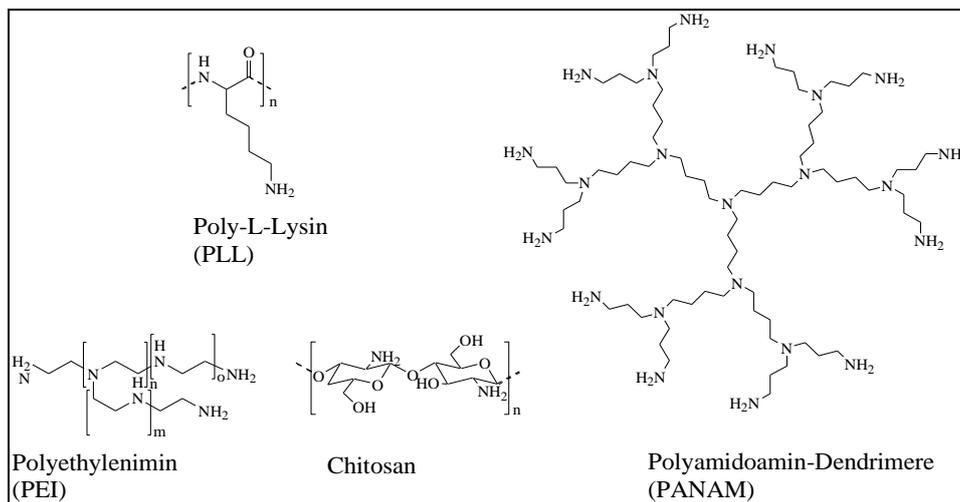


**Abb. 2:** Übersicht der Gentransfermethoden und deren Anteil an klinischen Genthapiestudien, Stand Juni 2012<sup>[19]</sup>

Wie aus der Übersicht zu entnehmen ist, stellen die viralen Systeme derzeit den größten Anteil in klinischen Studien dar. Dies liegt in ihrer hohen Transfektionseffizienz sowie einer langfristigen Expression begründet. Viren können, durch ihre natürliche Fähigkeit Zellen zu infizieren, ihre Gene sehr effizient einzuschleusen. Dennoch sind die Nachteile der viralen Vektoren – heftige Immunreaktionen, Insertionsmutagenese sowie die Produktion vermehrungsfähiger infektiöser Viren – für eine sichere Anwendung am Menschen bedenklich.<sup>[20-21]</sup> Erschwerend wirken sich weiterhin aufwendige und kostenintensive Herstellungsverfahren für eine gleichbleibende Qualität der viralen Vektoren sowie die durch das Kapsid bedingte Größenlimitierung des zu transportierenden genetischen Materials aus. Daher richtet sich der Fokus der Forschung auf die Entwicklung von nicht-viralen Genfähern. Neben den mechanischen und physikalischen Methoden (Mikroinjektion, „Gene-Gun“, Elektroporation oder Ultraschallbehandlung), welche ausführlich von GAO et al. diskutiert wurden, finden vor allem chemische Vektoren zur Internalisierung von genetischem Material Anwendung.<sup>[22]</sup> Eine große Rolle spielen dabei Gentransfersysteme auf Basis kationischer Polymere und kationischer Lipide, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen.

### 1.2.1 Kationische Polymere für den nicht-viralen Gentransfer

Die Polymer-vermittelte Gentransfektion (Polyfektion) ist eine nicht-virale Transfermethode von genetischem Material in die gewünschten Zielzellen. Dabei bilden kationische Polymere durch elektrostatische Interaktion mit Nucleinsäuren Komplexe (Polyplexe) aus.<sup>[23]</sup> Diese Komplexe ermöglichen den Transport des genetischen Materials in Zellen oder Gewebe.



**Abb. 3:** Chemische Struktur kationischer Polymere für den nicht-viralen Gentransfer

Die zahlreichen Ansatzpunkte für Strukturvariationen dieser Verbindungsklasse führten in den vergangenen Jahren zu einer Vielzahl von linearen, verzweigten und globulären kationischen Polymeren (siehe **Abb. 3**). Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz und Zytotoxizität erheblich voneinander. Eines der ersten Polymere, welches für den nicht-viralen Gentransfer verwendet wurde, war das Poly-L-Lysin (PLL). Dieser synthetische Genvektor wurde aufgrund seiner bioabbaubaren Polypeptidstruktur auch für In-vivo-Untersuchungen verwendet.<sup>[24-25]</sup> Weitere Vertreter der Polymere sind die Polyethylenimine (PEI). Diese Moleküle wurden erstmals 1995 von BEHR et al. als Transfersysteme verwendet. Seither stellen sie eines der am häufigsten verwendeten Polymere für den nicht-viralen Gentransfer dar.<sup>[26]</sup> Die hohen Transfektionsraten, welche sowohl mit linearem PEI als auch mit verzweigtem PEI ermittelt werden konnten, wurden unter anderem auf die hohe Ladungsdichte der Moleküle zurückgeführt.<sup>[27]</sup> Sie ermöglicht eine effiziente Bindung der DNA im Komplex. Weiterhin wird in der Literatur eine, durch die hohe Pufferkapazität der PEI-Derivate, erleichterte Freisetzung aus dem Endosom beschrieben. So erfolgt im Endosom, ausgelöst durch die Verschmelzung mit dem Lysosom, eine pH-Wert Absenkung. Dadurch werden weitere, bis dahin noch nicht protonierte, Stickstoffgruppen der PEI-Derivate protoniert. Dies bewirkt den gleichzeitigen Einstrom von Protonen und Gegenionen ( $\text{Cl}^-$ ) was den osmotischen Druck im Endosom ansteigen lässt. Daraufhin

kommt es zum Aufquellen der Endosomen und schließlich zur Ruptur der Endosomenmembran („Protonenschwamm-Effekt“), was folglich die Freisetzung der Polyplexe ins Zytoplasma ermöglicht.<sup>[28-29]</sup> Die hohe Ladungsdichte der Polymere bewirkt jedoch auch bei systemischer Applikation eine sehr starke Plasmaproteinbindung und eine schnelle Elimination über das Retikuloendotheliale System (RES) aus der Blutbahn. Die Notwendigkeit einer positiven Gesamtladung der Polyplexe zum Andocken an die negativen Zellmembranoberflächen und die damit verbundenen unerwünschten Wechselwirkungen resultieren in einem sogenannten „Ladungs-Dilemma“ dieser Verbindungsklasse.<sup>[30-31]</sup> Die hohe Ladungsdichte der PEI-Derivate erhöht zudem das Risiko der Agglomeration mit Blutbestandteilen. So kann es, nach systemischer Applikation von Polyplexen, zu Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Oberflächen von Erythrozyten kommen. Diese Interaktion kann Embolien, durch Hämolyse oder Erythrozytenaggregation, auslösen.<sup>[32]</sup> Die stark positiven Oberflächenladungen konnten durch Oberflächenmodifikationen mittels Polyethylenglycol (PEG)-Ketten reduziert werden. Dies resultierte jedoch in einer erniedrigten Transfektionseffizienz.<sup>[22]</sup> Weiterhin wirkt sich die hohe Toxizität der PEI-Polymere, welche mit steigendem Molekulargewicht der Verbindungen korreliert, und deren fehlende Bioabbaubarkeit negativ auf eine mögliche In-vivo-Anwendung am Menschen als nicht-virale Genfähren aus.

### **1.2.2 Kationische Lipide für den nicht-viralen Gentransfer**

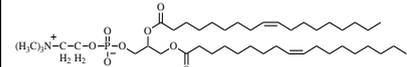
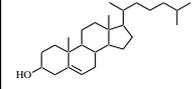
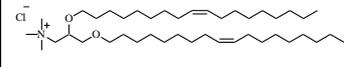
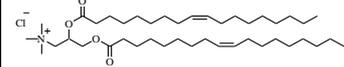
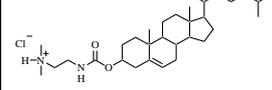
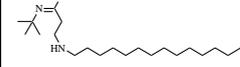
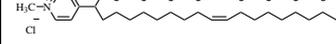
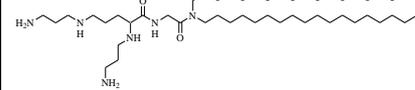
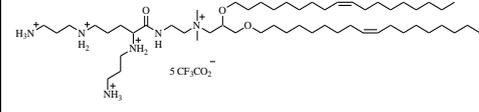
Eine weitere nicht-virale Transfektionsmethode stellt der Lipid-vermittelte Gentransfer dar. Dabei werden Lipide mit einer basischen Kopfgruppe für die Komplexierung des genetischen Materials verwendet. Diese kationischen Lipide sind amphiphile Verbindungen bestehend aus einer hydrophoben Kettenregion, welche kovalent über einen Spacer mit einer kationischen bzw. basischen Kopfgruppe verbunden ist. Die Kopfgruppe ermöglicht, durch elektrostatische Interaktion, spontan Nukleinsäuren zu komplexieren. In diesen auch als Lipoplexe bezeichneten Aggregaten ist das zu transportierende genetische Material vor dem Abbau durch endogene Nukleasen geschützt. Der Lipoplex ermöglicht zudem die Interaktion mit Zellmembranen und bewirkt somit die zelluläre Aufnahme der Nukleinsäuren.<sup>[5]</sup> Gegenüber viralen Gentransfersystemen weisen die chemischen Vektoren folgende Vorteile auf:<sup>[33]</sup>

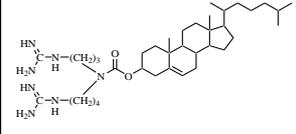
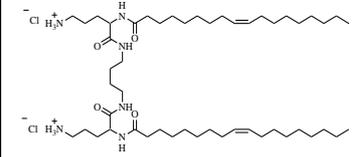
1. sie sind in reproduzierbarer Qualität, verhältnismäßig leicht und in größeren Mengen herstellbar,
2. sie enthalten keine immunogenen Proteine und
3. ihre Beladungskapazität mit genetischem Material ist nicht, wie bei den Viren, Größenlimitiert.

Den kationischen Lipiden werden häufig bei der Formulierung Helferlipide wie 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamin (DOPE) oder Cholesterol (siehe **Tab. 1**) zugesetzt. Dies erleichtert die Liposomenbildung, welche unter Umständen durch die positive Ladung und der daraus resultierenden elektrostatischen Abstoßung im Kopfgruppenbereich der kationischen Lipide erschwert sein kann.<sup>[32,34]</sup>

Seit der ersten Beschreibung von kationischen Lipiden für den nicht-viralen Gentransfer in den 80iger Jahren durch FELGNER et al.<sup>[35]</sup> wurden, um Transfektionseigenschaften und Zytotoxizität zu verbessern, durch Variation der einzelnen Strukturelemente – Kopfgruppe, Spacer und hydrophober Molekülteil – zahlreiche Lipide entwickelt. **Tab. 1** gibt hierzu eine Übersicht.

**Tab. 1:** Lipide für den nicht-viralen Gentransfer

Ladung	Lipid	Abk.	Struktur	Lit.
zwitterionisch	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphoethanolamin	DOPE		[36]
neutral	Cholesterol	Chol		
monovalent	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid	DOTMA		[35]
monovalent	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropanchlorid	DOTAP		[37]
monovalent	3β-[ <i>N</i> -( <i>N,N</i> -Dimethylaminoethan)carbamoyl]-cholesterolhydrochlorid	DC-Chol		[38]
monovalent	<i>N-tert</i> .Butyl- <i>N'</i> -tetradecyl-3-tetradecylaminopropionamidin	diC <sub>14</sub> <sup>-</sup> Amidin		[39]
monovalent	<i>N</i> -Methyl-4(dioleyl)methylpyridiniumchlorid	SAINT-2		[40-41]
multivalent	Dioctadecylamidoglycylspermin	DOGS		[42]
multivalent	2,3-Dioleoyloxy- <i>N</i> -[2-(spermincarboxamido)ethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat	DOSPA		[43]

Ladung	Lipid	Abk.	Struktur	Lit.
multi-valent	3 $\beta$ -[N-(N,N-Diguanidino-spermidin)carbamoyl]cholesterol	BGSC		[44]
multi-valent	4,4'-Bis[(9Z)-octadec-9-enylamino]-5,5'-dioxo-6,6'-diazatetradecan-1,1'-diylbis(aminiumchlorid)	Gemini-Lipid (GSN13)		[45-46]

### Kationische Kopfgruppenstrukturen von Transfektionslipiden

Die Kopfgruppenstruktur der kationischen Lipide hat, aufgrund der Interaktionsmöglichkeit mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren, einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Als funktionelle Gruppen dienen häufig Aminderivate, wie primäre, sekundäre und tertiäre Amine (DC-Chol) sowie quarternäre Ammoniumgruppen (DOTMA, DOTAP). Weiterhin werden Kombinationen verschiedener Amine (DOSPA), Amidiniumsalze (diC14-Amidin) sowie verschiedene basische Aminosäuren (Lysin, Arginin) verwendet.<sup>[47]</sup> In der Literatur werden weiter Kopfgruppenelemente aus Guanidin- (BGSC) und Imidazolgruppen<sup>[48]</sup> sowie Pyridine beschrieben.<sup>[49]</sup> Monovalente Transfektionslipide wie DOTMA enthalten nur eine kationische (basische) funktionelle Gruppe. DOTMA kam als erstes, kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz in Mischung mit dem neutralen Helferlipid DOPE im Verhältnis von 1/1 ( $m_{\text{DOTMA}}/m_{\text{DOPE}}$ ) unter dem Namen Lipofectin<sup>TM</sup> auf den Markt.<sup>[50]</sup> Eine Weiterentwicklung von monovalenten Strukturen erfolgte durch die Verwendung von Polyaminen, wie Spermin. So konnte eine höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu DOTMA mit dem Struktur analogon DOSPA (einem multivalenten Lipid, siehe **Tab. 1**) erzielt werden.<sup>[51]</sup> Dieses Transfektionsreagenz ist in der Formulierung mit DOPE im Verhältnis von 3/1 ( $m_{\text{DOSPA}}/m_{\text{DOPE}}$ ) unter dem Namen Lipofectamine<sup>TM</sup> im Handel erhältlich. Auch bei anderen Lipiden, wie das von BEHR et al. synthetisierte kationische Transfektionslipid DOGS, zeigte sich Spermin als geeignetes Kopfgruppenelement.<sup>[42]</sup> Zur Verbesserung von zytotoxischen Eigenschaften wurden weitere physiologische Strukturen (basische Aminosäuren) als Träger der positiven Ladung verwendet.<sup>[52]</sup> Dabei erwiesen sich insbesondere Lysin und Arginin als vielversprechend.<sup>[49,53]</sup> Um die Anzahl an positiven Ladungen im Molekül zu erhöhen wurden in den vergangenen Jahren Strukturen entwickelt, in welchen mehrerer Aminosäuren miteinander verknüpft sind. So wurden kationische Lipide mit mono-, di- und trilysierten Kopfgruppen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz hin untersucht.<sup>[54]</sup>

### Linker- und Spacerstrukturen von Transfektionslipiden

Für die Verknüpfung der polaren Kopfgruppe mit der apolaren Kohlenwasserstoffregion in Transfektionslipiden werden Linkerstrukturen wie Ether-, Ester-, Carbamat- und Amid-Strukturen eingesetzt.<sup>[55]</sup> Die Eigenschaften der Linker wirken sich sowohl auf das Aggregationsverhalten als auch auf die Bioabbaubarkeit und Stabilität der kationischen Lipide aus und sind somit wesentlich an den Transfektions- und Zytotoxizitätseigenschaften der Verbindungen beteiligt.<sup>[56]</sup> So führte die Verwendung einer Etherbindung als Verknüpfung in DOTMA zu einer chemisch stabilen Verbindung, welche für die In-vivo-Transfektion geeigneter erschien als ihr Struktur analogon mit Esterbindung (DOTAP). Gleichzeitig wies DOTMA eine erhöhte Zytotoxizität auf, welche auf eine schlechtere Abbaubarkeit von Ether- im Vergleich zu Ester-Bindung im biologischen System zurückzuführen ist.<sup>[57-58]</sup> Um die chemische Instabilität von Lipiden mit Ester-Linker zu überwinden und dennoch eine Bioabbaubarkeit zu ermöglichen fanden neben Carbamat- auch Amidbindungen (DOGS) für die Synthese von kationischen Lipiden Anwendung.<sup>[59]</sup> Neben verschiedenen Verknüpfungstypen werden zudem Spacer („Abstandshalter“) zwischen den polaren Kopfgruppen und dem hydrophoben Kettenteil verwendet. Arbeiten von OBATA et al. ermittelten dabei den Einfluss der Spacerlänge auf die Transfektion.<sup>[60]</sup>

### Hydrophober Molekülteil von Transfektionslipiden

Der hydrophobe Teil der Lipide besteht üblicherweise aus aliphatischen Kohlenwasserstoffketten oder Cholesterolderivaten.<sup>[61]</sup> Als hydrophoben Molekülteil werden häufig zwei Alkylketten mit einer Länge zwischen 12 und 18 Kohlenwasserstoffeinheiten verwendet. Daneben wurden in der Literatur auch Lipide mit nur einer Alkylkette beschrieben. Diese erwiesen sich jedoch als wenig effiziente Genfähren mit einer vergleichsweise hohen zytotoxischen Aktivität.<sup>[21,62]</sup> Aus zahlreichen Studien zur Untersuchung des Kettenlängeneinflusses gesättigter Verbindungen ging weiterhin hervor, dass bei einer mittleren Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen im Allgemeinen die höchste Transfektionsrate resultierte. Neben dem Kettenlängeneinfluss zeigten diese Studien auch die Abhängigkeit der Transfektionsrate vom Sättigungsgrad der Kette.<sup>[63]</sup> So belegte ZUHORN et al. durch vergleichende Untersuchungen von gesättigten und ungesättigten Verbindungen – SAINT-5 (diC18:0) und SAINT-2 (diC18:1) Struktur siehe **Tab. 1** – eine höhere Transfektionsrate für das ungesättigte Lipid.<sup>[40]</sup> In einer Serie von strukturanalogen Verbindungen mit 0 bis 3 Doppelbindungen pro Alkylkette konnte dieser Trend auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Dabei erwiesen sich die Verbindungen mit 2

Doppelbindungen am effektivsten, gefolgt von den Lipidstrukturen mit 3 Doppelbindungen pro Kette. Am unwirksamsten zeigten sich die gesättigten Verbindungen.<sup>[64]</sup>

Eine weitere Klasse amphiphiler Verbindungen, welche für den nicht-viralen Gentransfer eingesetzt wird, stellen die Gemini-Lipide dar. Bei diesen Molekülen sind zwei basische Kopfgruppen und zwei aliphatische Kohlenwasserstoffketten durch einen starren oder flexiblen Linker miteinander verbunden.<sup>[45,65]</sup> Die vergleichsweise höhere Oberflächenaktivität gegenüber monovalenten Verbindungen und die daraus resultierenden Interaktionsmöglichkeiten mit biologischen Membranen ließen in den letzten Jahren das Interesse an Gemini-Lipiden für den nicht-viralen Gentransfer steigen.<sup>[66-67]</sup>

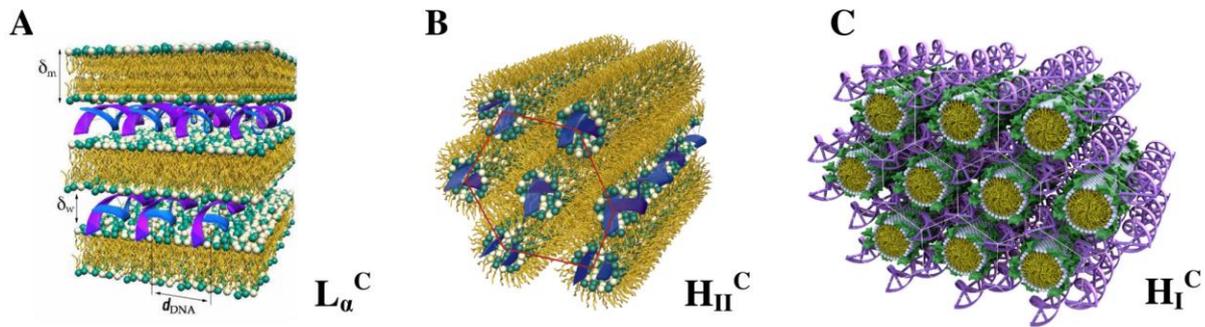
Die guten Transfektionseigenschaften der nicht-viralen Genfähren sowie das Vorhandensein von einfachen Transfektionsprotokollen ermöglichten es in der Laborpraxis die viralen Systeme weitgehend zu ersetzen.<sup>[68]</sup> Dennoch ist zu erwähnen, dass die Transkriptionseffizienz der viralen Methoden wesentlich höher als die der nicht-viralen Systems ist. So zeigten HAMA et al. im direkten Vergleich eines viralen mit einem Lipid-vermittelten Gentransfersystems, dass mittels der Lipoplexe zwar mehr genetisches Material in die Zellen transportiert werden konnte, jedoch die Freisetzung, der Transport der DNA in den Zellkern und die Transkription bei der viralen Übertragung effektiver war. Die virale Methode benötigte somit einen geringeren Einsatz von genetischem Material um vergleichbare Transfektionsraten wie die der nicht-viralen Methode zu erreichen.<sup>[69]</sup> Weiterhin ist die geringere Transfektionseffizienz der Lipofektion in vivo immer noch ein großer Nachteil.<sup>[70]</sup> Diese Tatsachen verdeutlichen die Notwendigkeit zur weiteren Optimierung der nicht-viralen Transfektionssysteme auf Basis kationischer Lipide durch Modifikation der einzelnen Strukturelemente wie Kopfgruppe, Linker, Spacerregion und hydrophober Molekülteil.

Studien zur vollständigen Aufklärung des Aufnahmemechanismus der Lipoplexe in die Zellen sowie die Analyse von extrazellulären und intrazellulären Vorgängen der Lipofektion sind dabei genauso essentiell wie die physikochemische Charakterisierung kationischer Lipide und Lipoplexe. Zusammen ermöglichen diese Informationen gezielt strukturelle Veränderungen zur Optimierung der Vektorsysteme vorzunehmen und quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (engl. QSAR) zu ermitteln.<sup>[71]</sup>

### 1.2.3 Lipoplexbildung und Struktur von Lipoplexen

Die Lipoplexbildung erfolgt spontan durch Mischen von kationischen Lipidformulierungen mit Nukleinsäuren und wird in der Literatur als hochdynamischer Prozess beschrieben. Die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den positiv geladenen, kationischen

Kopfgruppen und den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats, verbunden mit der Freisetzung von Gegenionen, sind dabei die treibende Kraft dieses Prozesses.<sup>[72]</sup> Anschließend bewirken die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide, durch Wechselwirkungen untereinander, eine Stabilisierung des gebildeten Komplexes.<sup>[73-74]</sup> Thermodynamische Untersuchungen bestätigten als ersten Schritt der Lipoplexbildung einen schnellen Prozess, ausgelöst durch elektrostatische Interaktion von positiver und negativer Ladung.<sup>[75]</sup> Dabei lagert sich die DNA an den Oberflächen der Lipidaggregate an. Im Anschluss erfolgt, in einem wesentlich langsameren endothermen Prozess, die Reorganisation der Vesikel, wobei multilamellare Lipoplexe resultieren können.<sup>[76]</sup> Die ursprüngliche Vorstellung von FELGNER et al., welche die Bindung der DNA ausschließlich an der Vesikeloberfläche postulierten und dabei keine wesentliche Änderung von Form und Größe der Vesikel beschrieben, wurde somit nicht bestätigt.<sup>[77]</sup> So zeigten STERNBERG et al. in Gefrierbruchaufnahmen von Lipoplexen sich abwechselnde, tubuläre und sphärische Strukturen, so genannte „spaghetti-meatball“ Strukturen, und stellten dabei in Abhängigkeit des Lipid/DNA-Ladungsverhältnisses Unterschiede in Größe und Form der Aggregate fest.<sup>[78-79]</sup> Den Einfluss des Lipid/DNA-Ladungsverhältnisses auf die Komplexierung der DNA untersuchten GERSHON et al. bereits 1993.<sup>[80]</sup> Durch Fluoreszenzuntersuchungen stellten sie am Ladungsneutralpunkt eine vollständige Maskierung der DNA fest und postulierten die Verkapselung der DNA durch Lipidmoleküle, wobei sie auf heterogene und dynamische Lipoplexstrukturen in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von kationischem Lipid und DNA hinwiesen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten diese Beobachtungen bestätigen und beschrieben nach Erreichen des Ladungsneutralpunkts große Komplexstrukturen, welche sie als multilamellare Lipidstrukturen, in denen die DNA vollständig eingeschlossen vorliegt, deuteten.<sup>[81]</sup> Diese These wurde erstmals 1997 von RÄDLER et al. experimentell bestätigt.<sup>[82-83]</sup> Die Autoren wiesen mit Hilfe von Röntgenbeugungsexperimenten einen sandwichartigen Einbau der DNA zwischen kationischen Doppellipidschichten nach und beobachteten hochgeordnete, multilamellare Struktur mit alternierenden Lipiddoppelschichten und DNA-Monoschichten (siehe **Abb. 4**, Bild A). Neben dieser lamellaren  $L_{\alpha}^C$ -Phase wurden zwei weitere Strukturen der Lipid/DNA-Komplexe durch Röntgenbeugungsanalyse beschrieben. Bei der invers hexagonalen  $H_{II}^C$ -Phase ist eine tubuläre Grundstruktur vorhanden in der die DNA innerhalb inverser Lipidröhren angeordnet vorliegt. Dabei ordnen sich die tubulären Strukturen in einem hexagonalen Gitter an (**Abb. 4**, Bild B).<sup>[84]</sup>



**Abb. 4:** Schematische Darstellung von Lipid/DNA-Strukturen<sup>[85]</sup>

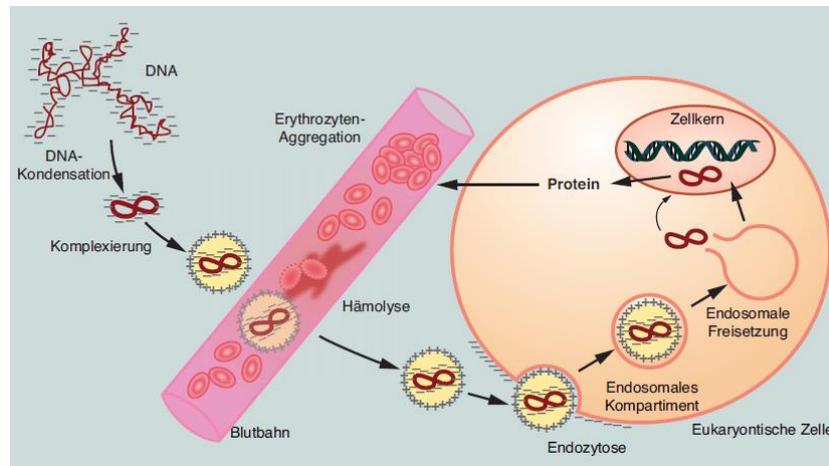
In der hexagonalen  $H_I^C$ -Phase, welche erstmals von EWERT et al. 2006 beschrieben wurde, bilden die Lipide stabförmige Mizellen in einem hexagonalen Gitter aus. Die DNA befindet sich eingeschoben in den Zwischenräumen dieses Gitters, was zur Ausbildung einer wabenförmigen Symmetrie führt (**Abb. 4**, Bild C). Bevorzugt wird diese Phase von Lipiden mit großen dendritischen Kopfgruppen ausgebildet.<sup>[86]</sup> Umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich der Transfektionsleistung verschiedener Lipid/DNA-Komplexe mit Bezug zu ihren physikochemischen Eigenschaften wurden in der Arbeit von EWERT et al. beschrieben.<sup>[87]</sup>

Weiterhin ist bekannt, dass neben der Lipidmorphologie (der kationischen und neutralen Lipide) und dem Konzentrationsverhältnis zwischen Lipid und DNA auch weitere Faktoren die resultierende Lipoplexgröße und Struktur beeinflussen und sich zudem auf Homogenität und Stabilität der Lipid/DNA-Komplexe auswirken. Zu nennen sind dabei u. a. die Zusammensetzung des Suspensionsmediums sowie dessen Ionenstärke und Temperatur, weiterhin die Reihenfolge der Komponentenzugabe und die Inkubationszeit der Lipidformulierung mit dem genetischen Material.<sup>[88-90]</sup> In zahlreichen Studien wurden daher neben der Ermittlung der Transfektionseffizienz auch die Partikelgröße und die Oberflächenladung der Lipoplexe bestimmt. Dabei konnte am Ladungsneutralpunkt ein Absinken der Partikelstabilität ermittelt werden, was zur Aggregation und Ausfällung der Komplexe führte.<sup>[91]</sup> Bei Lipid-Überschuss wurden Lipoplexe mit einer positiven Gesamtladung ermittelt. Diese Situation begünstigt nicht nur die Stabilität der Partikel sondern ermöglicht zudem Wechselwirkungen mit Zellmembranen und fördert somit die Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen.<sup>[92-93]</sup>

#### 1.2.4 Mechanismus und Barrieren der Lipofektion

Eine erfolgreiche Lipofektion setzt voraus, dass das gewünschte genetische Material in ausreichend hohem Maße in die Zielzellen gelangt, dort freigesetzt und abgelesen wird. Dafür muss der Gentransfervektor folgende Barrieren überwinden (siehe **Abb. 5**):

1. Blutbahn und Retikuloendotheliales System
2. Plasmamembran
3. Endosom
4. Zytoplasma und Kernmembran



**Abb. 5:** Barrieren des nicht-viralen Gentransfers<sup>[32]</sup>

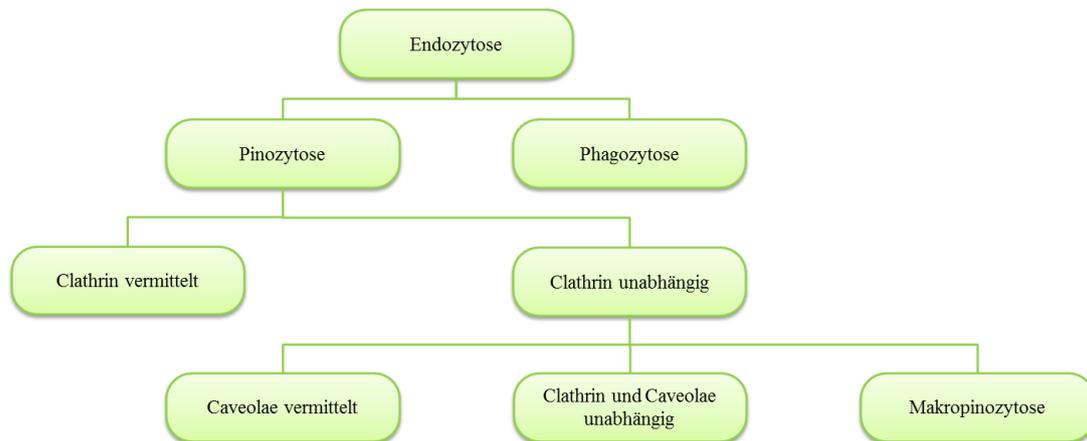
Nach der Lipoplexpräparation und einer systemischen Applikation muss der Vektor als *1. Barriere die Blutbahn und das Retikuloendotheliale System* für eine erfolgreiche Transfektion des Zielgewebes, überwinden. Blutbestandteil werden, im nicht-viralen Gentransfer, häufig als großes Hindernis beschrieben und senken die Effizienz vieler kationischen Transfektionssysteme.<sup>[94]</sup> Die Gründe liegen in unspezifischen Interaktionen der meist positiv geladenen Lipoplexe mit verschiedenen Serumkomponenten (Albumine, Lipoproteine, Fibrinogene, Heparine) durch elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>[95]</sup> Die Bindung von Plasmaproteinen an der Lipoplexoberfläche kann zur Bildung von Aggregaten führen, welche im Verlauf entweder präzipitieren oder zerfallen. Somit gelangt die therapeutische DNA nicht in die Zielzelle. Des Weiteren können die elektrostatischen Bindungen zwischen der DNA und den kationischen Lipiden im Lipoplex geschwächt werden, was eine vorzeitige Freisetzung der DNA aus dem Komplex bewirken würde.<sup>[96]</sup> Nach systemischer Applikation besteht weiterhin die Gefahr, dass die Lipoplexe mit Blutbestandteilen wechselwirken und schnell über des RES aus dem Blutkreislauf eliminiert werden.<sup>[97]</sup> Zur Erhöhung der Zirkulationszeit im Blut und zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen der Vektoren, wurden die Genfähren durch Oberflächenmodifikationen unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) verändert. Diese PEGylierten Lipoplexe zeichnen sich, aufgrund der abgeschirmten positiven Ladung, durch eine verringerte Plasmaproteinbindung aus, wodurch diese Technologie auch als „Stealth“-Technologie bezeichnet wird.<sup>[98-99]</sup> Nachteilig wirkte sich jedoch, analog zu dem Polymer-vermittelten Gentransfer (siehe Kapitel 1.2.1), eine (mit der Oberflächenmodifikati-

on verbundene) reduzierte Zellaufnahme der Lipoplexe und somit ein Absinken der biologische Aktivität der Vektoren aus. Um die Spezifität der Vektoren d.h. die Aufnahme dieser in die Zielzellen zu erhöhen wurden spezifische Liganden kovalent an die Komplexe gebunden. Diese Veränderung von Wirkstoffträgern (Vesikel) ist in der Literatur unter dem Begriff „Drug Targeting“ bekannt.<sup>[100]</sup> Das Ziel der Targetierung ist neben einer gesteigerten Aufnahme der Vesikel in die Zielzellen auch eine Reduktion von systemischen Toxizitäten durch Senkung von unspezifischen Wechselwirkungen mit gesunden bzw. Nicht-Zielzellen. Insbesondere für Tumore und bestimmte Organe (Leber) wurden bereits ligandengesteuerte, nicht-virale Gentransfersysteme entwickelt. Als Liganden dienten dabei unter anderem: Antikörper (RGF, HER-2), Folsäure, Transferin, RGD-Peptide, Lektine und Kohlenhydrate.<sup>[101-104]</sup>

Die Transfektionseffizienz der Vektoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wird weiterhin von der Wahl des Helferlipids beeinflusst. So erwies sich das Helferlipid DOPE im Vergleich zu Cholesterol in *In-vitro*-Anwendung als sehr effizient. Im Gegensatz dazu sank die Transfektionsrate bei Anwesenheit von Serum und bei der *In-vivo*-Anwendung stark ab. Als Grund werden unspezifische Wechselwirkungen von DOPE mit Zellmembranen und Serumbestandteilen vermutet. Dies resultiert in einer verminderten Stabilität der Lipoplexe vor Erreichen des Zielgewebes und führt somit zu einer frühzeitigen Freisetzung des genetischen Materials. Cholesterol hingegen fördert die Bildung von lamellaren Lipoplexstrukturen und wirkt sich daher stabilisierend auf die Lipoplexe aus. Dies erklärt die besseren Aktivität von Lipoplexen mit Cholesterol als Helferlipid bei systemischer Anwendung im Vergleich zu DOPE.<sup>[105]</sup>

Nach dem Transport der Lipoplexe zum Zielgewebe muss als 2. *Barriere die Plasmamembran* von den Komplexen überwunden werden. Dies erfordert zunächst eine unspezifische Interaktion der Lipid/DNA-Komplexe mit der Zellmembran. Lipoplexe mit einer positiven Nettoladung, entsprechend einem Lipid/DNA-Ladungsverhältnis von  $> 1$ , können dabei stärker mit negativen Membranbestandteilen (z.B. Proteoglykanen) interagieren und werden im Allgemeinen in einem höheren Maß als Lipoplexe mit einer negativen Gesamtladung in die Zellen aufgenommen.<sup>[106]</sup> Die Erhöhung der positiven Gesamtladung der Vesikel ist jedoch häufig durch die damit verbundene steigende Zytotoxizität limitiert.<sup>[36,107]</sup>

Der Hauptaufnahmemechanismus der Lipoplexe ist nach derzeitigem Stand der Forschung die Endozytose. Die verschiedenen endozytotischen Wege sind in **Abb. 6** zusammengefasst. Ursprüngliche Auffassungen, dass das Einschleusen in die Zellen hauptsächlich durch Membranfusionsvorgänge (Verschmelzung von Plasmamembran und Liposomen) erfolgt, wurden durch zahlreiche Untersuchungen widerlegt.



**Abb. 6:** Klassifikation verschiedener Endozytosewege, modifiziert nach SAHAY et al.<sup>[108]</sup>

So wiesen elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach Internalisierung der Lipoplexe intrazelluläre Vesikelabschnürungen unterhalb der Zellmembran nach.<sup>[109]</sup> Weitere Nachweise der Lipoplexaufnahme via Endozytose konnten durch Co-Lokalisationsstudien mit endosomalen Markern erbracht werden.<sup>[110]</sup> Aber auch Studien zur Inhibition der Endozytose (chemisch induziert als auch durch Temperaturabsenkung bewirkte Inhibition) unterstützen die Auffassung der endozytotischen Aufnahme.<sup>[111-113]</sup> Für den Lipid-vermittelten Gentransfer wird der Clathrin-abhängigen Endozytose die größte Bedeutung zugeschrieben, gefolgt von der Caveolae-vermittelten Endozytose.<sup>[114-115]</sup> Der Aufnahmeweg ist dabei stark von der Partikelgröße abhängig. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von REJMAN et al. zeigten dazu, dass Partikel mit einer Größe unter 200 nm vermehrt über Clathrin-vermittelte und Partikel ab einer Größe von 500 nm durch Caveolae abhängige Endozytose internalisiert wurden.<sup>[116]</sup>

Nach erfolgreicher endozytotischer Aufnahme der Lipoplexe müssen diese als *3. Barriere der Lipofektion das Endosom* wieder verlassen. Dieser Schritt sollte schnell erfolgen, da die Verschmelzung mit dem Lysosom und die damit verbundene pH-Wert Absenkung zur Aktivierung von abbauenden Enzymen und somit zur Degradation der DNA führen kann. Eine ineffektive Freisetzung aus dem Endosom wird als eines der kritischsten Faktoren beim nicht-viralen Gentransfer verstanden. Somit stellt das Endosom eine der Hauptbarrieren für die Gentransfektion dar. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen der endosomalen Freisetzung diskutiert. Ein von ZELPHATI und SZOKA postulierter Mechanismus der Oligonukleotidfreisetzung basiert auf elektrostatischer Interaktion zwischen den kationischen Lipiden der Lipoplexe und den anionischen Phospholipiden der Endosomenmembran. Dieser Wechselwirkung geht einem, vom Lipoplex induzierten, Übergang (Flip Flop) anionischer Lipide von der äußeren Seite der Endosomenmembran auf die innere Seite voran. Anschließend führt die Wechselwirkung zwischen kationischen und anionischen Lipiden

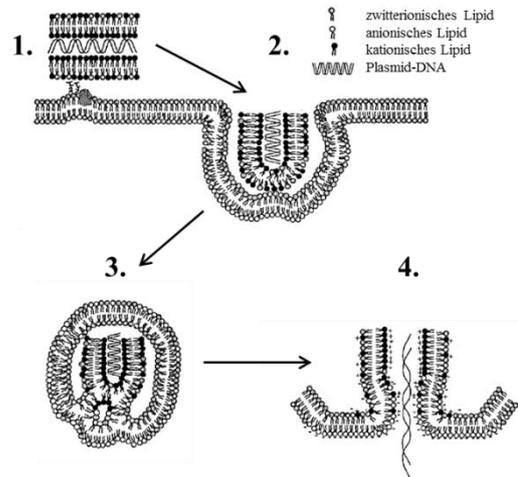
durch Veränderungen des Lipidphasenverhaltens zur Porenbildung in der Endosomenmembran.<sup>[117]</sup> Weiterhin wird durch die Wechselwirkung der anionischen Lipide mit dem Lipoplex die Dissoziation der DNA vom Komplex und somit deren Freisetzung ins Zytoplasma erleichtert (siehe **Abb. 7**).<sup>[5]</sup> Die Interaktion der kationischen Lipide mit der Endosomenmembran, ausgelöst durch elektrostatische Wechselwirkungen, eine anschließende Fusion der kationischen Lipide mit der

Endosomenmembran, sowie eine Porenbildung zur Freisetzung des genetischen Materials wurde auch von anderen Arbeitsgruppen als Freisetzungsmechanismus diskutiert.<sup>[118-119]</sup> Weiterhin werden membrandestabilisierende und fusogene Eigenschaften von Helferlipiden genutzt um die endosomale Freisetzung des genetischen Materials zu verbessern.<sup>[51,120]</sup> So wurde in vitro eine erhöhte Transfektionseffizienz bei der Verwendung von DOPE als Helferlipid im Vergleich zu Cholesterol ermittelt. Das Phospholipid DOPE unterliegt einer pH-Wert abhängigen Phasenumwandlung von lamellarer zu invers-hexagonaler Phase.<sup>[121]</sup> Die Verwendung von

DOPE als Helferlipid bewirkt somit eine kolloidale Instabilität der Lipoplexe und erleichtert Wechselwirkungen zwischen den Lipiden des Vektors und der Endosomenmembran.<sup>[122]</sup> Mischungen von kationischen Lipiden mit Cholesterol hingegen bilden, wie bereits erwähnt, lamellare Strukturen, was sich stabilisierend auf die Lipoplexstruktur auswirkt. Dies erschwert jedoch die Freisetzung des genetischen Materials aus dem Komplex.

Um die Freisetzung des genetischen Materials aus dem Komplex zu erleichtern wurden pH-sensitive Lipide entwickelt.<sup>[61]</sup> Die dabei verwendeten Lipide weisen säurelabile Bindungen und funktionelle Gruppen, wie Vinylether, Ketale/Acetale oder Orthoester, auf.<sup>[123-124]</sup> Diese Gruppen bewirken, ausgelöst durch die pH-Wert Absenkung im Endosom, einen Lipidbindungsbruch. Durch diesen Vorgang wird möglicherweise die Lipoplexstruktur gestört und somit eine effektivere Freisetzung des genetischen Materials ermöglicht.<sup>[125]</sup>

Nach erfolgreicher Freisetzung aus dem Endosom muss das genetische Material als *letzte Barrieren das Zytoplasma und die Kernmembran* für einen stabilen Einbau in das Genom



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der endozytotischen Aufnahme und Freisetzung von pDNA modifiziert nach XU et al.: 1. elektrostatische Interaktion der Lipoplexe mit der Zellmembran; 2. Endozytose 3. Destabilisierung der Endosomenmembran durch den Lipoplex, Flip-Flop der anionischen Lipide; 4. Dissoziation der pDNA vom Komplex und Freisetzung ins Zytoplasma<sup>[5]</sup>

überwinden. Bisher ist über den Zustand der DNA nach der Freisetzung aus dem Endosom und dem Weg bis zur Kernmembran nur wenig bekannt.<sup>[126]</sup> Vermutet werden sowohl frei vorliegende als auch noch am Vektor gebundene sowie verdichtete DNA-Moleküle.<sup>[127-128]</sup> Weiterhin sollte ein schneller Transport der Nukleinsäuren zum Kern erfolgen, da ungeschützte DNA im Zytosol schnell durch die dort vorhandenen Nukleasen abgebaut wird. Für die Internalisierung in den Zellkern muss die DNA die Kernmembran überwinden, welche aus zwei Membranen besteht und für den Stofftransport mit zahlreichen Kernporenkomplexen durchsetzt ist. Der passive Transport durch die Kernporen (Durchmesser von 9 nm) ist jedoch größenlimitiert und erlaubt lediglich die Passage von Molekülen bis zu 60 kDa. Größere Moleküle benötigen aktive Transportmechanismen. Hierfür stehen spezielle Transportproteine (Importine) zur Verfügung, welche die Proteine über Kernlokalisationssequenzen erkennen und diese unter Energieverbrauch durch die Pore in den Zellkern transportieren.<sup>[129]</sup> Die Kernlokalisationssequenzen werden genutzt um die Effektivität von nicht-viralen Genfähren zu erhöhen, indem sie entweder direkt an das genetische Material oder an den Vektor gebunden werden.<sup>[130-131]</sup> Weiterhin wird die Überwindung der Kernmembran während der Mitose eine große Bedeutung zugesprochen.<sup>[132]</sup> Der Einfluss des Zellzykluses auf die Transfektionseffizienz konnte von verschiedenen Forschungsgruppen festgestellt werden. Sie ermittelten in mitotisch aktiven Zellen eine höhere Transfektionsrate als bei Zellen welche sich in die G- oder S-Phase befanden und konnten dadurch zellspezifische Transfektionsunterschiede zwischen schnell und langsam proliferierenden Geweben erklären.<sup>[133-135]</sup> Dieser Sachverhalt kann möglicherweise für eine Targetierung von Tumorzellen ausgenutzt werden um spezifisch schnell teilende Zellen zu transfizieren.<sup>[128]</sup>

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Trotz der umfangreichen Bemühungen und der zahlreich entwickelten Vektoren konnte bis zum heutigen Tag kein Gentransfersystem etabliert werden, welches alle Anforderungen für eine sichere und effiziente Gentherapie erfüllt.

In Anknüpfung an vorangegangene Arbeiten,<sup>[125,136]</sup> hat die vorliegende Dissertation das Ziel neue kationische Lipide auf ihre Transfektionseffizienz und Zytotoxizität am Zellkulturmodell zu untersuchen. Die zur Verfügung gestellten Lipide basieren entweder auf  $\alpha$ -verzweigten Fettsäureamiden oder auf 2,2'-alkylierten 1,8-Octandisäuren (Gemini-Lipide). Die Substanzen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kopfgruppenstruktur, des Spacers oder der Kohlenwasserstoffkette und werden zur Bildung der Lipidformulierungen mit zwei verschiedenen Helferlipiden (DOPE oder Cholesterol) in unterschiedlichen molaren Verhältnissen kombiniert. Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgt mit dem Reporter gen für  $\beta$ -Galactosidase in unterschiedlichen (+/-)-Ladungsverhältnissen an den Zelllinien Hep-G2, COS-7 und A549. Um die Effizienz der neuartigen Vektoren beurteilen zu können sollen die ermittelten Ergebnisse mit dem kommerziell erhältlichen, nicht viralen Gentransfervektor Lipofectamine<sup>TM</sup> verglichen werden. Um den Einfluss von Serumbestandteilen auf die Transfektion der neuen Vektoren zu untersuchen sollen weiterhin Transfektionsversuche ohne serumfreies Inkubationsintervall erfolgen.

Ferner besteht die Aufgabe die Lipid- und Lipoplexformulierungen hinsichtlich ihrer Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung zu charakterisieren. Zu Aufklärung von Lipoplexstrukturen bei verschiedenen (+/-)-Ladungsverhältnissen soll zudem repräsentativ eine Lipidformulierung neben der Bestimmung der z-Average-Werten auch mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht werden und den erhaltenen Ergebnissen der photonenkorrelationspektroskopischen (PCS)-Messung gegenübergestellt werden.

Neben dem Screening der Vektorsysteme auf Transfektionseffizienz und Zytotoxizität, sowie die Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen aus den Ergebnissen, galt es weiterhin fluoreszenzmikroskopische Zellkulturuntersuchungen zur Aufnahme der Lipoplexe und zur Lokalisation der Lipid/DNA-Aggregate in den Zellen vorzunehmen. Die hieraus gewonnen Erkenntnisse sollen zur Aufklärung von intrazellulären Vorgängen der Lipofektion beitragen.

## 2 Materialien

### 2.1 Lipide

#### 2.1.1 Neuartige kationische Lipide

Die in dieser Arbeit verwendeten neuartigen kationischen Lipide stellen amphiphile Verbindungen, bestehend aus einem hydrophilen Molekülteil, welcher über einen Spacer mit dem hydrophoben Molekülbereich verbunden ist, dar. Die Lipide wurden von Herrn Dr. I. Schulze und Frau Dr. M. Folz Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg synthetisiert.<sup>[125]</sup> Die Synthese erfolgte ausgehend vom Malonsäurediethylester, welcher durch symmetrische oder unsymmetrische Bisalkylierung mit anschließender Verseifung und Decarboxylierung in die entsprechenden verzweigten Fettsäuren und 2,2'-alkylierten 1,8-Octandisäuren (Gemini-Lipide) überführt wurde. Über eine anschließende Amidknüpfung mit verschiedenen Aminen konnten unterschiedliche kationische Kopfstrukturen erhalten werden. Als Spacer fungierten Ethylendiamin, Putrescin und Tris(2-aminoethyl)amin. Zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden einerseits die Kettenlängen des lipophilen Molekülbereichs variiert und andererseits die Anzahl der Aminofunktionen im kationischen Kopfbereich durch Einführung von Lysin bzw. entsprechender Di- oder Tripeptide erhöht (siehe **Tab. 2**). Um mögliche Toxizitätsprobleme von vornherein zu minimieren, basieren die verwendeten Strukturen auf natürlich vorkommenden Untereinheiten, wie Fettsäuren und  $\alpha$ -Aminosäuren (Glycin und Lysin). Eine Amidbindung als Kopplungselement zwischen den einzelnen Lipidbausteinen wurde aus zweierlei Gründen gewählt: Zum einen ist diese Bindung hydrolysestabiler als Esterbindungen und zum anderen enzymatisch spaltbar, wodurch ein biologischer Abbau ermöglichen werden kann.<sup>[137]</sup>

**Tab. 2:** Übersicht der verwendeten neuen kationischen Lipide

IUPAC Name	Abkürzung
2-Dodecyltetradecansäure-(2-aminoethyl)amid	E12
2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]amid	E12Lys
2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid	E14
2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid	E14/16

<b>IUPAC Name</b>	<b>Abkürzung</b>
2-Tetradecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]amid	E14/16Lys
2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{[2-(2,6diamino-1-oxohex-1-yl)-amino]-1-oxohex-1-yl}aminoethyl)amid	E14GlyLys
2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]amid	E14Lys
2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)]-diamino-1-oxohex-1-yl}aminoethyl)amid	E14trisLys
2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid	E16
2-Hexadecyloctadecansäure-(2-{[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxohex-1-yl}aminoethyl)amid	E16GlyLys
2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]amid	E16Lys
2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)-aminoethyl]amid	G14diLys
2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)-aminoethyl]amid	G16diLys
2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{6-[(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)-amino]-2-amino-1-oxohex-1-yl}aminobutyl)amid	P14diLys
2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)amino]-1-oxohex-1-yl}aminobutyl)amid	P14GlyLys
2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminobutyl]amid	P14Lys
2-Hexadecyloctadecansäure-(4-{[2-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)amino]-1-oxohex-1-yl}aminobutyl)amid	P16GlyLys
2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminobutyl]amid	P16Lys
2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid	T12
2-Dodecyltetradecansäure-(bis{2-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]}-aminoethyl)amid	T12diLys
2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid	T14
2-Tetradecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid	T14/16

IUPAC Name	Abkürzung
2-Tetradecyloctadecansäure-(bis{2-[(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]}aminoethyl)amid	T14/16diLys
2-Tetradecylhexadecansäure-(bis{2-[(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]}aminoethyl)amid	T14diLys
2-Hexadecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid	T16
2-Hexadecyloctadecansäure-(bis{2-[(2,6-diamino-1-oxohex-1-yl)aminoethyl]}aminoethyl)amid	T16diLys

### 2.1.2 Kommerziell erworbene Lipide

Tab. 3: Übersicht kommerziell erworbener Lipide

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) ( $\geq 98\%$ )	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Cholesterol (95%)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

## 2.2 Zelllinien und deren Kulturbedingungen

### A549

Diese Zellen wurden 1972 aus einem Lungenkarzinom eines 58 Jahre alten Mannes isoliert. Es handelt sich dabei um eine adhärent als Monolayer wachsende Zelllinie mit einer Verdopplungszeit von 40h (DSMZ Nr.: ACC 107). In ihrer Morphologie zeigen die A549 Zellen epitheliale Eigenschaften von Typ II Alveolarzellen und sind in der Lage oberflächenaktive Substanzen, wie Lecithin, zu sezernieren.<sup>[138]</sup> Die Kultivierung erfolgte in DMEM (4,5g/l Glucose) mit oder ohne Phenolrot unter Zusatz von 2mM Glutamin, 50µg/ml Gentamycin und 10% Serum. Die Zellen wurden 2-mal wöchentlich passagiert und alle 2 bis 3 Tag mit frischem Medium versehen. Für die Zellversuche wurden in der Regel Passagen zwischen P10 und P40 verwendet.

### COS-7

Die Ursprungszellen (CV-1 Zellen) für diese Kultur stammen aus dem Nierengewebe Grüner Meerkatzen. Diese wurden 1980 stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert.<sup>[139]</sup> Die Zellen wachsen fibroblastenartig als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von 35-48h

(DSMZ Nr.: ACC 60). Die Kultivierung erfolgte in DMEM (4,5 g/l Glucose) mit oder ohne Phenolrot unter Zusatz von 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin und 10% Serum. Die Zellen wurden 2-mal wöchentlich passagiert und alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium versehen. Für die Zellversuche wurden in der Regel Passagen zwischen P20 und P50 verwendet.

### Hep-G2

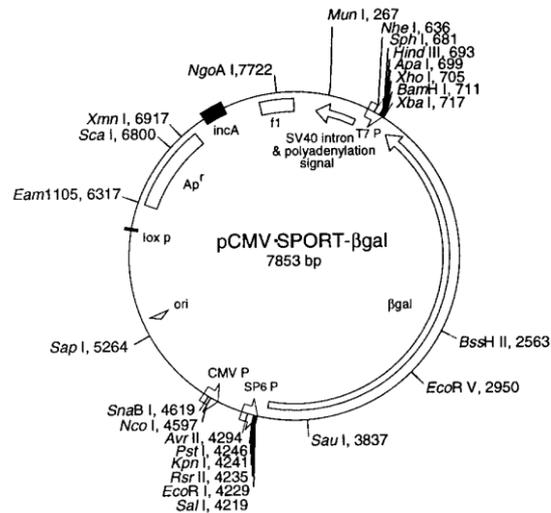
Die Hep-G2 Zellen wurden von einem 15-jährigen argentinischen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom im Jahr 1975 isoliert. Sie sezernierten  $\alpha$ -1-Fetoprotein, Transferrin,  $\alpha$ -1-Antichymotrypsin, Haptoglobin, Ceruloplasmin, Plasminogen, Komplementfaktoren (C3, C4), C3-Aktivator, Fibrinogen, Sauer- $\alpha$ -1-Glykoprotein,  $\alpha$ -2-HS-Glykoproteine,  $\beta$ -Lipoproteine sowie Retinol-bindende Proteine.<sup>[140-141]</sup>

Die Zellen wachsen epithelialartig als Monolayer und in kleinen Aggregaten bei einer Verdopplungszeit von 50 bis 60 h (DSMZ Nr.: ACC 180). Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in MEM (mit Earl's Salzen) mit oder ohne Phenolrot unter Zusatz von 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin, 10 mM MEM nicht essentielle Aminosäuren, Natriumpyruvat in einer Arbeitskonzentration von 1 mM und 10% Serum. Die Zellen wurden einmal wöchentlich passagiert und alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium versehen. Für die Zellversuche wurden in der Regel Passagen zwischen P5 und P40 verwendet.

## **2.3 Plasmid-Vektoren**

### pCMV·SPORT- $\beta$ gal

Die Transfektionsuntersuchungen erfolgten mit dem Plasmid pCMV·SPORT- $\beta$ gal (Invitrogen™, siehe **Abb. 8**). Dieser mit dem CMV-Promotor ausgestattete Expressionsvektor mit einer Größe von 7853 Basenpaaren enthält das LacZ-Gen aus dem Lac-Operon von E.coli, welches als Not I Fragment in das Plasmid pCMV·SPORT1 kloniert wurde und für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Als Selektionsmarker in E.coli besitzt es ein Resistenzgen für Ampicillin. Diese pDNA wird häufig als Expressionsvektor für Transfektionsuntersuchungen verwendet.<sup>[142]</sup>



**Abb. 8:** Plasmid pCMV·SPORT-βGal, schematisch<sup>[143]</sup>

### pEGFP-C2

Das Plasmid pEGFP-C2 (Clontech<sup>®</sup>, siehe **Abb. 9**), mit einer Größe von 4700 Basenpaaren, wurde für Transfektionsuntersuchungen zum stabilen Einbau der pDNA verwendet. Der ebenfalls mit einem CMV-Promotor ausgestattete Expressionsvektor kodiert für eine „red-shift“ Variante des Wildtyp GFP (Grün fluoreszierendes Protein) mit einem Anregungsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 507 nm.<sup>[144-146]</sup> Des Weiteren enthält der Vektor eine Neomycin/Kanamycin Resistenzkassette, welche die Selektion sowohl in Bakterien mittels Kanamycin als auch in eukaryotischen Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) ermöglicht. Geneticin gehört zur Gruppe der Aminoglycoside und hemmt die Proteinbiosynthese der Eukaryoten durch Bindung an 80S-Ribosomen.<sup>[147-148]</sup> Das Resistenzgen im Plasmid kodiert für die Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche das Geneticin an der Hydroxygruppe phosphoryliert, damit inaktiviert und zur Selektion stabil transfizierter eukaryotischer Zellen Anwendung findet.<sup>[149-150]</sup>

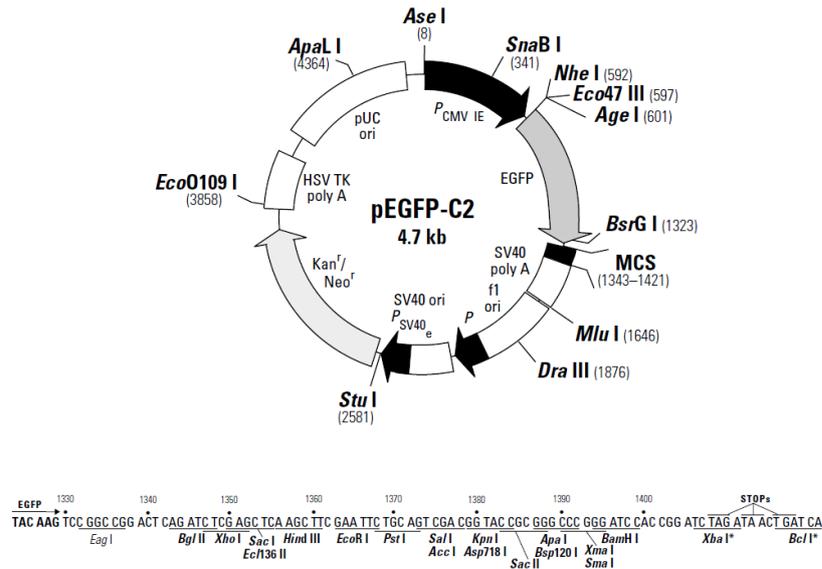


Abb. 9: Plasmid pEGFP-C2, schematisch<sup>[151]</sup>

## 2.4 Puffer und Lösungen

Tab. 4: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

Bezeichnung (Verwendung)	Substanzen	Einwaage	Herstellungshinweise / Lagerung
10×Fixierlösung	Formaldehyd (30%) Glutaraldehyd (25%) PBS	6,67 ml 0,8 ml ad 100 ml	Lagerung -20°C
2× Assay Puffer (ONPG-Assay)	ONPG Mercaptoethanol MgCl <sub>2</sub> (0,2M) Phosphatpuffer pH 7,3	1,33 g 7,81 ml 1 ml ad 1 l	Lagerung -20°C
Ampicillin Stammlösung	Ampicillin Aqua bidest	1 g ad 10 ml	Lagerung +4°C
EDTA Lösung 0,5 M	EDTA Aqua bidest	186,2 g ad 1 l	Lagerung +4°C
Glucoselösung 2M	Glucose Aqua bidest	3,6 g ad 10 ml	Lagerung +4°C
LB-Agar	Trypton Hefeextrakt	10 g 5 g	pH 7,5 mit 5 M NaOH eingestellt autoklaviert nach Abkühlen (40-50°C) Zusatz

Bezeichnung (Verwendung)	Substanzen	Einwaage	Herstellungshinweise / Lagerung
	NaCl Agar Aqua bidest	10 g 15 g ad 1 l	von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) möglichst blasenfrei in Petrischalen gegossen Lagerung +4°C
LB-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl Aqua bidest	10 g 5 g 10 g ad 1 l	pH 7,5 mit 5 M NaOH eingestellt anschließend autoklaviert nach Abkühlen (40-50°C) Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) Lagerung +4°C
Lösung A (BCA-Assay)	BCA Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaOH Natriumtartrat NaHCO <sub>3</sub> Aqua bidest	10 g 20 g 4 g 1,6 g 9,5 g ad 1 l	pH 11,25 mit 5 M NaOH eingestellt Lagerung -20°C
Lösung B (BCA-Assay)	CuSO <sub>4</sub> Aqua bidest	40 g ad 1 l	Lagerung -20°C
Lysis-Puffer (ONPG-Assay)	CHAPS HEPES Puffer (1 M) Aqua bidest	3,075 g 50 ml ad 1 l	Lagerung -20°C
MgSO <sub>4</sub> /MgCl <sub>2</sub> Lösung 1 M	MgSO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> Aqua bidest	3,02 g 2,46 g ad 10 ml	Lagerung +4°C
MTT Lyse-Puffer	SDS DMSO Essigsäure	100 g 750 ml 250 ml	Lagerung +4°C
MTT Stammlösung	MTT PBS	5 g ad 1 l	Lagerung -20°C
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung 0,23 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Aqua bidest	33,33 g ad 1 l	Lagerung +4°C

Bezeichnung (Verwendung)	Substanzen	Einwaage	Herstellungshinweise / Lagerung
NaCH <sub>3</sub> COO Lösung 3 M	Natriumacetat Aqua bidest	0,82 g ad 10 ml	Lösung anschließend sterilfiltrierten Lagerung +4°C
NaCl Lösung 0,1 M	NaCl Aqua bidest	5,84 g ad 1 l	Lagerung +4°C
NaCl Lösung 1 M	NaCl Aqua bidest	58,4 g ad 1 l	Lagerung +4°C
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Lösung 0,19 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Aqua bidest	22,46 g ad 1 l	Lagerung +4°C
Phosphatpuffer pH 7,3 0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Lösung Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung	280 ml 720 ml	Lagerung +4°C
SOC-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl Aqua bidest	20 g 5 g 0,6 g 0,2 g ad 1 l	pH 7,5 mit 5 M NaOH eingestellt autoklaviert Zusatz von 10 ml einer sterilfiltrierten 1 M MgSO <sub>4</sub> /MgCl <sub>2</sub> Lösung und 10 ml einer 2 M Glucoselösung Lagerung +4°C
Stopplösung (ONPG-Assay)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Aqua bidest	106 g ad 1 l	Lagerung -20°C
TAE Puffer (50×) pH 8,4	Tris-Base Eisessig EDTA 0,5 M	242 g 57,1 ml 200 ml	pH 8,4 mit Essigsäure eingestellt Lagerung RT
TE-Puffer	Tris (Base) (1 M) NaCl (0,1 M) EDTA (0,1 M) Aqua bidest	10 ml 50 ml 1 ml ad 1 l	pH 8,0 mit 1 M HCl eingestellt autoklaviert Lagerung +4°C
Tris-HCl 1 M pH 7,4	Tris-HCl Aqua bidest	121,14 g ad 1 l	pH 7,4 mit 0,2 M HCl eingestellt Lagerung +4°C
milliQ-Wasser			aus Reinstwasseranlage Lagerung +4°C

## 2.5 Zellkulturmedien und Supplements

**Tab. 5:** Übersicht verwendeter Zellkulturmedien und Supplements

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
DMEM ohne Phenolrot (weißes DMEM-Medium)	Gibco® (Darmstadt)
DMEM mit Phenolrot	Gibco® (Darmstadt)
DMSO (steril)	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
FBS (Serum)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
G418-disulfat Lösung 50 mg/ml (Geneticin® Disulfat-lösung)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Gentamycin Lösung 10 mg/ml	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Gentamycin-Glutamin Lösung	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
L-Glutamin Lösung 200 mM	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
MEM mit Earl's Salzen ohne Phenolrot (weißes MEM-Medium)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
MEM mit Earl's Salzen und Phenolrot	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
MEM nicht essentielle Aminosäure Lösung 10 mM	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Natriumpyruvat Lösung 100 mM	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Trypsin-EDTA Lösung (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)

## 2.6 Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 6:** Übersicht verwendeter Chemikalien und Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agar	ICN Biomedicals (Eschwege)
Agarose	Promega® (Mannheim)
Ampicillin	ICN Biomedicals (Eschwege)
Aquatex® Einbettungsmedium	Merck™ (Darmstadt)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Bakterienstamm DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	Invitrogen <sup>TM</sup> (Darmstadt)
BCA	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
BSA	Fluka Biochemika (St. Louis)
Casy <sup>®</sup> ton-Lösung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim)
CHAPS	MP Biomedicals (Eschwege)
CHCl <sub>3</sub> (Uvasol <sup>®</sup> )	Merck <sup>TM</sup> (Darmstadt)
CuSO <sub>4</sub> (wasserfrei)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
DMSO	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DNA Leiter 1kb	Promega <sup>®</sup> (Mannheim)
EDTA	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (G Chromasolv <sup>®</sup> )	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
Formaldehyd-Lösung 30%	Grüssing GmbH (Filsum)
Glucose	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerol 86 – 88%	KMF Laborchemie GmbH
Hefeextrakt	ICN Biomedicals (Eschwege)
HEPES Puffer 1 M	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> (St. Louis)
Immersol <sup>TM</sup> 518F	Merck <sup>TM</sup> (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kanamycin	Fluka Biochemika (St. Louis)
KCl	ICN Biomedicals (Eschwege)
Ladepuffer für Gelelektrophorese	Promega <sup>®</sup> (Mannheim)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Lipofectamine™ Reagenz	Invitrogen™ (Darmstadt)
Methanol (Uvasol®)	Merck™ (Darmstadt)
MgCl <sub>2</sub> ×6 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
MgSO <sub>4</sub>	ICN Biomedicals (Eschwege)
MTT Reagenz	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
NaCl	ICN Biomedicals (Eschwege)
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Natriumhydroxid reinst	Grüssing GmbH (Filsum)
Natriumtartrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
ONPG	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
SDS	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Tris-Base	Sigma-Aldrich® (St. Louis)
Trypton	ICN Biomedicals (Eschwege)
WGA, Alexa Fluor® 633 Konjugat	Invitrogen™ (Darmstadt)
YOYO®-1 Jodid 1 mM in DMSO	Invitrogen™ (Darmstadt)
β-Galactosidase	Sigma-Aldrich® (St. Louis)

## 2.7 Kommerziell erhältlich Kits

Tab. 7: Übersicht verwendeter Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Label IT <sup>®</sup> Fluorescein Labeling Kit Trial Size	Mirus (Madison)
QIAfilter <sup>®</sup> Plasmid Mega Kit	Qiagen (Hilden)
QIAfilter <sup>®</sup> Plasmid Giga Kit	Qiagen, (Hilden)

## 2.8 Geräte und Verbrauchsmittel

Tab. 8: Übersicht verwendeter Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Typ MC5-0CE	Sartorius (Göttingen)
Autoklav GVA 460	Fritz Gössner GmbH & Co. KG, (Hamburg)
Brutschrank Hera 150	Heraeus Laborgeräte (Zürich)
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pro Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Gelelektrophorese Blue Maxime 200 mit Blue Power 500	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) 710	Carl Zeiss Jena (Jena)
Kühlzentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena (Jena)
Mikrotiterplatten-Photometer: POLARstar Galaxy FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies (Offenburg)
pH Meter inoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Photometer Ultrospec 2000	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
Pipettierhilfe Accu-jet <sup>®</sup>	Brand (Wertheim)

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Präzisionswaage BP 2215	Sartorius (Göttingen)
Schüttler Titramax 1000	Heidolph (Kehlheim)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallbad Transonic T 660/H	Elma (Singen)
Vakuumpumpe Typ 120002 (Zellkultur)	VEB Reglerwerk (Dresden)
Vakuumsrotationsverdampfer Rotavapor R114	Büchi Labortechnik (Flawil)
Vortexer MS2 und MS3 Minishaker	IKA Works Inc. (Wilmington)
Wasserbad GFL <sup>®</sup> Typ 1092	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Reinstwasseranlage TKA (Thermo Fischer): TKA Pacific, TKA x-(A1)-Dispenser	Thermo Electron LED GmbH (Niederelbert)
Zellzählgerät CASY <sup>®</sup> -1 Modell TT,	Schärfe System (Reutlingen)
Zetasizer Nano-ZS („Red badge“)	Malvern (Herrenberg)

**Tab. 9:** Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Sterilfilter Celluloseacetat (0,2 µm)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Deckgläser (18 × 18 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Objektträger (76 × 26 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einmalpipette 10, 25, 50 ml	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäuser)
Einmalküvetten (Polystyrol, Schichtdicke = 10 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Impfösen	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäuser)
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Petrischalen 94 mm	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäuser)

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Pipettenspitzen 10, 200, 300, 1000, 5000 µl	VWR International GmbH (Darmstadt)
Polypropylen-Röhrchen 15, 50 ml	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäusen)
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 ml	VWR International GmbH (Darmstadt)
Rotilabo <sup>®</sup> Spritzenfilter steril	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Spritzen 5 ml ohne Kanüle	VWR International GmbH (Darmstadt)
Sterilisationsklebeband	VWR International GmbH (Darmstadt)
Zellkulturflasche 25, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäusen)
Zellkulturplatte 6, 24, 96 Well	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäusen)
Zellkulturplatte 96 Well U-Form	Greiner Bio One GmbH (Frickenhäusen)
gefaltete Kapillarzelle (Probenvolumen 750 µl)	Malvern (Herrenberg)

## **3 Methoden**

### **3.1 Liposomenpräparation**

Die zu untersuchenden Lipide wurden in Chloroform oder einer Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 1/1 (V/V) gelöst. Die Lipidstammlösung wies eine Konzentration von 2 mg/ml auf. Zur Herstellung der Liposomendispersion wurden die entsprechenden Volumina an Transfektionslipidstammlösung und der Helferlipidstammlösung in ein Mikroreagenzglas überführt und gut, mit Hilfe des Vortexers, durchmischt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 37°C am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen und der resultierende Lipidfilm für zwei Stunden im Vakuum ( $\leq 15$  mbar) bei 37°C getrocknet. Die Hydratisierung des Lipidfilmes erfolgte mit milliQ-Wasser, welches kurz zuvor sterilfiltriert wurde (Porengröße: 0,22  $\mu$ m). Der Lipidfilm wurde für 15 min auf dem Wasserbad bei 37°C quellen gelassen und anschließend für eine Minute gevortext. Danach wurde der Film im Ultraschallbad bei 37°C in der Regel für 2 bis 3 Zyklen (ein Zyklus entsprach 15 min) beschallt. Bei stark getrübbten Dispersionen wurde die Anzahl der Zyklen erhöht. Die Endkonzentration an Gesamtlipid in der Liposomendispersion betrug 1 mg/ml, diese wurde maximal vier Wochen nach der Herstellung für Zellkulturversuche verwendet. Die Lagerung erfolgte bei +4°C.

### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden an Sterilbänken (Laminar-Air-Flow) durchgeführt. Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, zuvor für 30 min auf 37°C temperiert. Die Desinfektion der Arbeitsflächen erfolgte mit 70%igem Ethanol.

#### **3.2.1 Gewinnung von pDNA**

##### ***3.2.1.1 Transformation und Anzucht der Bakterien***

Die Transformation mit pCMV·SPORT- $\beta$ Gal oder pEGFP-C2 wurde in dem kompetenten E. coli Stamm DH5 $\alpha$  durchgeführt. Hierfür wurden die E. coli-Zellen vorsichtig auf Eis liegend aufgetaut. Anschließend wurden 5 ng der entsprechenden pDNA in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 50  $\mu$ l der kompetenten Zellen versetzt. Durch Antippen wurde der Ansatz gemischt und sofort für 30 min auf Eis gestellt. Für den Hitze-Schock-Schritt wurde der Transformationsansatz für 90 s bei 42°C inkubiert und danach sofort für 2 min auf Eis

gestellt. Im Anschluss daran wurden 800 µl SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und bei 37°C und 200rpm für 60min auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren auf den Agar-Selektiv-Platten direkt aus dem Transformationsansatz und deren Inkubation über Nacht bei 37°C. Eine Einzelkolonie wurde von der Agar-Selektiv-Platte gepickt, für die Gewinnung der Vorkultur in 10ml LB-Medium ausgeschüttelt und für 8 bis 10h bei 37°C und 300rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:500 mit dem entsprechenden Volumen an LB-Medium (500ml oder 2,5l) verdünnt und über Nacht weiter kultiviert.

Das Anlegen eines Glycerolstammes erfolgte aus der Vorkultur durch Zugabe von 1,2ml 80%igen Glycerol zu 2,8ml Kultur. Der Glycerolstamm wurde in Kryogefäßen aliquotiert und in einer Ethanol-Trockeneis Mischung schnell eingefroren und letztlich bei -80°C gelagert. Dieser Glycerolstamm konnte für eine erneute Anzucht der Bakterienkultur direkt auf die Agar-Selektiv-Platten ausplattiert werden.

### ***3.2.1.2 Isolation und Reinigung der pDNA***

Für die Isolation der pDNA wurde entweder das QIAfilter Plasmid Mega Kit oder das QIAfilter Plasmid Giga Kit mit den jeweils entsprechenden Kulturvolumina für Plasmide mit hoher Kopienzahl (500ml LB-Medium für Mega- und 2,5l LB-Medium für Giga-Präparation) verwendet.

Die Bakterienkultur wurde in Tubes überführt und das Medium bei 6000 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das dabei erhaltene Bakterienpellet in den vorgeschriebenen Puffern resuspendiert und anschließend lysiert. Die hier angewendete Methode der alkalischen Lyse basiert auf einem von BIRNBOIM und DOLY beschriebenen Verfahren, bei dem die bakterielle RNA bereits während der ersten Schritte durch die im Resuspensionspuffer enthaltenen RNase A entfernt wird.<sup>[152]</sup> Durch die Zugabe des Neutralisationspuffers fallen aus dem Lysat genomische DNA, Proteine und Zellrümpfer aus, welche im folgenden Filtrationsschritt abgetrennt wurden. Das Filtrat enthält die freigesetzte pDNA und wurde mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Dabei wurde das klare Bakterienlysat auf die QIAGEN-tip 2500 bzw. 10000 aufgetragen. Die pDNA bindet dabei an der Matrix während andere Komponenten (RNA, Proteine) durchlaufen. Nach den Waschschritten wurde die DNA mit Elutionspuffer eluiert, mittels Isopropanol gefällt und zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurde das erhaltene Pellet vorsichtig mit 70%igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die pDNA wurde dann für 10min bei RT getrocknet und anschlie-

ßend in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Alle Arbeitsschritte wurden laut Anweisung des Herstellers durchgeführt.<sup>[153]</sup>

### **3.2.1.3 Bestimmung der pDNA Konzentration und Qualität**

Die pDNA Konzentration wurde mittels UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Methode werden Purin- und Pyrimidinbasen erfasst, dabei haben 50 µg/ml dsDNA eine Absorption von 1 A<sub>260</sub>/cm. Des Weiteren wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und dabei aromatisch Reste von Proteinen, welche als Verunreinigung enthalten sein können, erfasst. Das Verhältnis der beiden Absorptionswerte (260/280) stellt ein Maß für die Reinheit dar und liegt bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0.<sup>[154]</sup> Zusätzlich wurde eine restriktionsanalytische Kontrolle der pDNA mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde Agarose eingewogen, mit TAE-Puffer aufgefüllt und auf der Heizplatte bis zur Klarheit erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde EtBr-Lösung hinzugefügt (Endkonzentration im Gel: 0,5 µg/ml) und anschließend das Gel gegossen (20 × 15 × 0,5 [cm]). Die bei der Isolierung gewonnen Proben wurden entsprechend aufgearbeitet, mit Ladepuffer versetzt und in die vorgeformten Taschen des Gels pipettiert. Als Standard wurde eine 1 kb DNA-Leiter mitgeführt. Das Gel wurde bei 50 V für 15,5 h entwickelt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

## **3.2.2 Zellkultivierung**

Für die Konservierung der Zellen wurden diese nach der Trypsinierung mit 10 ml einer Mischung aus 80% FKS und 20% DMSO abgespült und anschließend je 1 ml der Zellsuspension in 1,5 ml Kryoröhrchen pipettiert. Um ein langsames Einfrieren der Zelle zu gewährleisten wurden die Röhrchen für je 24 h zunächst bei -24°C und dann bei -80°C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Die Zellen wurden zur Kultivierung aus der Kryokonservierung zügig bei 37°C aufgetaut und in eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) mit 12 ml vorgelegtem Medium (bei HepG2: MEM; bei COS-7 und A549: DMEM mit entsprechenden Zusätzen) überführt. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% (V/V) CO<sub>2</sub> mit maximaler Luftfeuchtigkeit. Nach 24 h wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt um restliches DMSO zu entfernen.

Nach Erreichen eines konfluent gewachsenen Zellrasens erfolgte die Passagierung. Hierfür wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Mittels 3 ml Trypsin/EDTA Lösung wurden die Zellen bei 37°C von der Wachstumsfläche abge-

löst. Die Einwirkzeit wurde auf maximal 3 min beschränkt, um irreversible Zellschädigungen zu vermeiden.<sup>[155]</sup> Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen für 2 bis 3 min im Brutschrank weiter inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Klopfen auf den Boden des Kulturgefäßes vollständig abgelöst und mittels einer Pipette mit 10 ml frischem Medium abgespült, sowie durch mehrmaliges auf und ab pipettieren resuspendiert. 10 ml frisches Medium wurde in einer neuen Zellkulturflasche vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension zur Subkultivierung zugeben.

### **3.2.3 Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen**

#### **3.2.3.1 Zellaussaat**

Für die Untersuchungen der Transfektionssysteme wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: Zunächst erfolgte die Aussaat der Zellen in einer 96-Well-Platte. Dafür wurden die Zellen nach Ablösen von der Wachstumsfläche auf eine definierte Zellzahl mit Medium eingestellt (für Hep-G2  $1,0 \cdot 10^5$  bis  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen/ml, für A549  $2,0 \cdot 10^4$  bis  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/ml, für COS-7  $5,0 \cdot 10^4$  bis  $5,5 \cdot 10^4$  Zellen/ml). Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml isotonischer Casy<sup>®</sup>ton-Lösung pipettiert und mittels des Zellzählgerätes Casy<sup>®</sup>-1 vermessen. Die Bestimmung der Zellzahl basiert dabei auf dem Coulter-Counter Prinzip, wobei die verdünnte Zellsuspension durch eine kleine Kapillaröffnung strömt. Beim Durchgang einer Zelle ändert sich kurzzeitig der elektrische Widerstand, wodurch ein Spannungspuls entsteht, dessen Höhe proportional zum Volumen des Partikels ist. Durch die Anzahl und Intensitäten der Widerstandsänderung lassen sich somit Rückschlüsse auf die Zellzahl, und Größe ermitteln.<sup>[155]</sup> Für die Zelllinien wurde ein definiertes Messfenster zwischen 10 und 40 µm festgelegt, wodurch Zelltrümmer nicht miterfasst werden sollten.

Im Anschluss wurden je 200 µl Zellsuspension in jede Vertiefung der 96-Well-Platte pipettiert und, um eine 70 bis 80%ige Konfluenz des Zellrasens zu gewährleisten, für 16 bis 24 h im Brutschrank inkubiert.

#### **3.2.3.2 Versuchsdurchführung Lipotransfektion**

Die Lipotransfektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 96-Well-Platten mit 0,15 µg Plasmid pCMV·SPORT-βgal pro Well. Die Zellen wurden kurz vor Zugabe des Transfektionsansatzes mit 100 µl PBS gespült. Dieser Schritt diente der Entfernung von Serumbestandteilen, welche sich negativ auf die Transfektionseffizienz auswirken können.<sup>[94]</sup> Zur Untersuchung auf Serumstabilität der neuartigen Transfektionssysteme wurden sowohl Versuche mit

einem serumfreien Inkubationsintervall von 4 h als auch Versuche ohne dieses Intervall durchgeführt.

Für die Bildung der Lipoplexe wurden Liposomendispersionen mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet und zum Erhalt von verschiedenen Lipid/DNA (+/-)-Ladungsverhältnissen in unterschiedlichen Mengen mit pDNA gemischt. Dabei variierte die Menge an Liposomendispersion zwischen 0,05 und 1,5 µl pro Well.

Die Berechnung der benötigten Stoffmenge an kationischem Lipid für ein gewünschtes (+/-)-Ladungsverhältnis erfolgte nach folgender Gleichung. Als mögliche positive Ladungsträger im kationischen Lipid wurden in der vorliegenden Arbeit die primären Aminogruppen angesehen:

$$n_{(+)} = \frac{(m_{\text{DNA}} \cdot 3,24)}{z} \cdot x \quad \text{Gleichung 1}$$

$n_{(+)}$	Stoffmenge an positiver Ladung welcher zur Komplexion benötigt wird [nmol]
$m_{\text{DNA}}$	Masse pDNA [µg]
3,24	negative Ladung in nmol je µg DNA ausgehend von einer mittleren molaren Masse der DNA-Nukleotide von 324 g/mol [nmol/µg]
$z$	Anzahl primärer Aminogruppen im Lipidmolekül
$x$	gewünschtes Lipid/DNA (+/-)-Ladungsverhältnis

Das Volumen an kationischen Lipid lässt sich dann wie folgt ermitteln:

$$V = \frac{n_{(+)}}{c_{\text{kat.Lipid}}} \quad \text{Gleichung 2}$$

$V$	Volumen [µl]
$n_{(+)}$	Stoffmenge positiver Ladung [nmol]
$c$	Konzentration an kationischen Lipid in der Lipidformulierung [µg/nmol]

Das benötigte Volumen der Liposomendispersion wurde in 5 µl Medium (siehe 2.2) mit allen Zusätzen außer Phenolrot und Serum verdünnt und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. Die pDNA-Verdünnung (0,15 µg in 5 µl) wurde dazu pipettiert und vorsichtig mit der Liposomenverdünnung gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Lipoplexansatz mit serumfreiem oder serumhaltigem Medium (Endkonzentration 10% bei Serumver-

suchen) auf 40 µl verdünnt, erneut vorsichtig gemischt und in das betreffende Well pipettiert. Nach 4 h wurden 60 µl frisches Medium zupipettiert, wobei die Serumkonzentration auf 10% eingestellt wurde. Die Zellen wurden anschließend weiter im Brutschrank inkubiert. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte 24 h nach Transfektionsbeginn; dafür wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgeschüttelt und durch 100 µl frisches Medium mit 10% Serum ersetzt. Für Mehrfachansätze wurden die benötigten Mengen an pDNA sowie die Volumina der Liposomendispersion und des Mediums entsprechend vervielfacht.

### 3.2.3.3 *Ermittlung der Zytotoxizität*

Für die Bestimmung der Toxizität wurde in dieser Arbeit der MTT-Test verwendet. Dieser Test beruht auf einer Farbreaktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids zu einem blauen Formazan, welches bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch vermessen werden kann. Die Menge an gebildetem Farbstoff korreliert mit der Stoffwechselaktivität der Zellen und stellt somit ein Maß für deren Viabilität dar.<sup>[152,156]</sup>

Die Viabilitätsuntersuchungen wurden 24 h nach der Transfektion durchgeführt. Dafür wurde, nach dem vollständigen Mediumwechsel (wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben), in jedes Well 10 µl MTT-Reagenz pipettiert, sodass die Endkonzentration an MTT pro Well 0,5 mg/ml betrug. Im Anschluss daran wurden die Zellkulturplatten für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Zur Freisetzung des gebildeten Formazans wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte lysiert und die Platten erneut über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden dann auf dem Laborschüttler für 20 min bei RT geschüttelt und anschließend die Absorption des Farbstoffs bei 570 nm am Plattenreader vermessen. Eine Reihe der Mikrotiterplatte enthielt keine Zellen sondern ausschließlich Medium und diente bei der Auswertung als Leerwert (Blank). Für die Bestimmung der Viabilität wurde von den Absorptionswerten der Leerwert subtrahiert ( $A_{\text{korr.}}$ ) und die Viabilitäten folgendermaßen berechnet:

$$\text{Viabilität}[\%]=100 \cdot \frac{A_{\text{korr. behandelte Zellen}}}{A_{\text{korr. unbehandelte Zellen}}} \quad \text{Gleichung 3}$$

### 3.2.3.4 *Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität und des Proteingehalts*

Das Medium wurde 48 h nach Beginn der Transfektion vorsichtig von den Zellen abgeschüttelt und diese anschließend einmal mit PBS gespült. Im Anschluss wurden 100 µl Lysepuffer in jedes Well pipettiert und für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die

Zellen vom Plattenboden mittels einer Pipettenspitze abgelöst, ausreichend homogenisiert, das Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführt und bei  $10000\times g$  für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Gefäß bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

#### ONPG-Assay

Dieser Assay dient dem biochemischen Aktivitätsnachweis des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase unter Verwendung dessen synthetischen Substrats *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG). Das Produkt der  $\beta$ -Galactosidase-Reaktion, *o*-Nitrophenol, weist eine intensiv gelbe Farbe auf und kann photometrisch bei 405 nm quantifiziert werden. Die Menge an *o*-Nitrophenol ist dabei direkt proportional zu der Menge der in den Zellen gebildeten  $\beta$ -Galactosidase. Daher können die erhaltenen photometrischen Messwerte zur Ermittlung der in erfolgreich transfizierten Zellen gebildeten Menge an  $\beta$ -Galactosidase verwendet werden.<sup>[150]</sup>

Für die Bestimmung wurden je nach Transfektionsrate 10-60  $\mu$ l des nach der Zentrifugation erhaltenen Zelllysateüberstandes in je ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und mit Lyse-Puffer auf 60  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60  $\mu$ l  $2\times$  Assay Puffer in jedes Well. Die Platte wurde für 30 min auf dem Laborschüttler bei 37°C inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion mit 100  $\mu$ l Stopplösung pro Well versehen. Die Bestimmung der Absorption erfolgte umgehend am Plattenreader bei 405 nm. Auf der Platte wurde eine Verdünnungsreihe von  $\beta$ -Galactosidase (zw. 10  $\mu$ U und 1000  $\mu$ U/ $\mu$ l) mitgeführt. Die Verdünnungsreihe diente der Erstellung einer Kalibrierkurve und bildete die Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Enzymaktivität. Die Aktivität des Kontrollenzym wurde zuvor, wie in der Produktinformation des Herstellers angegeben, nach folgender Formel bestimmt. Dabei entspricht eine Enzymeinheit U der Menge an  $\beta$ -Galactosidase, welche 1  $\mu$ mol ONPG bei 37°C pro Minute hydrolysiert.

$$U/Probe = \frac{A \cdot 0,8^*}{4,6 \cdot t_{min}} \quad \text{Gleichung 4}$$

$$U/ml = U/Probe \cdot \frac{10000}{\text{Probenvolumen [ml]}} \quad \text{Gleichung 5}$$

\* Reaktionsvolumen [ml]

A Absorption

$t_{min}$  Inkubationszeit in Minuten

### BCA-Assay

Die Enzymaktivität wurde auf die Masse an Gesamtprotein im Zellextrakt bezogen. Für die Bestimmung der Proteinmenge wurde in dieser Arbeit der BCA-Assay verwendet, welcher neben dem Bradford-Test zu den Methoden der Wahl gehört. Die Proteine bilden bei dieser Reaktion mit  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen einen Komplex, wobei die  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen vermutlich zu  $\text{Cu}^+$  Ionen reduziert werden, welche anschließend mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.<sup>[157-158]</sup>

Je 20  $\mu\text{l}$  des Zellysates (siehe oben) wurden in die Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  einer kurz zuvor gemischten Lösung von 50 Volumenteile Lösung A und 1 Volumenteil Lösung B versetzt. Die Platte wurde für 30 min auf dem Laborschüttler bei 37°C inkubiert und unverzüglich die Absorption bei 570 nm am Plattenreader vermessen. Auf der Platte wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (Bovines Serum Albumin, zw. 10  $\mu\text{g}$  und 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mitgeführt, welche zur Erstellung der Kalibrierkurve und somit als Berechnungsgrundlage zur Bestimmung des Proteingehaltes diente. Die Transfektionseffizienz konnte somit in Aktivität  $\beta$ -Galactosidase pro Masse Protein [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ] angegeben werden.

### **3.2.4 Transfektion mit anschließendem Selektionsdruck**

Die Kultivierung der Hep-G2 Zellen erfolgte bei diesen Versuchen mit Selektionsdruck in kleinen Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25  $\text{cm}^2$ . Als Transfektionssystem wurde das Liposom T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) mit einer Ladung von 5/2 (+/-) und einer pDNA-Menge von 8  $\mu\text{g}$  ausgewählt. Als Plasmid wurde pEGFP-C2, welches das Resistenzgen Neo, enthält verwendet und nach erfolgreicher Transfektion eine Selektion mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G418) ermöglicht.

In Anlehnung an die Experimente zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden 5 ml der Zellsuspension 24h vor Versuchsbeginn mit einer Zellzahl von  $1,0 \cdot 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Die Lipoplexe wurden, wie bereits in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, hergestellt und nach dem Waschschrift in die Zellkulturflasche pipettiert. Durch mehrmaliges vorsichtiges schwenken der Zellkulturflasche wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf den Zellen verteilt. 4h nach Versuchsbeginn wurde Medium mit Serum zugegeben, sodass die Endkonzentration an Serum 10% betrug. Am darauffolgenden und jeden 2 Tag erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Die Flasche wurde für weitere 5 Tage im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen erstmalig passagiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt, wobei das Medium durch Selektivmedium ersetzt wurde. Dieses enthielt anstelle von Gentamycin im normalen Kulturmedium das Antibiotikum G418 in einer Arbeitskonzentration von

400 µg/ml. Zur Kontrolle wurde eine Passage der Zellen mitgeführt, welche analog behandelt, aber nicht mit pEGFP-C2 transfiziert wurden. Die transfizierten Zellen wurden über mehrere Monate mit dem Selektionsmedium unter sonst gleichen Kulturbedingungen wie nicht transfizierte Zellen kultiviert. Die Kontrolle mit nicht transfizierten Zellen welche ebenfalls mit Selektionsmedium kultiviert wurde, wurde nach 7 Tagen entfernt, da die Zellen abgestorben waren.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 Charakterisierung von Lipid- und Lipoplexformulierungen

Zur Partikelgrößenanalyse der Lipid- und Lipoplexformulierungen wurde in dieser Arbeit die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) verwendet. Die Bestimmung des Zeta-Potentials erfolgt durch Ermittlung der elektrophoretischen Mobilität der Partikel mit Hilfe der Mikroelektrophorese und der Laser-Doppler-Anemometrie. Die Messungen wurden am Zetasizer Nano-ZS der Firma Malvern durchgeführt.

##### Photonenkorrelationsspektroskopie

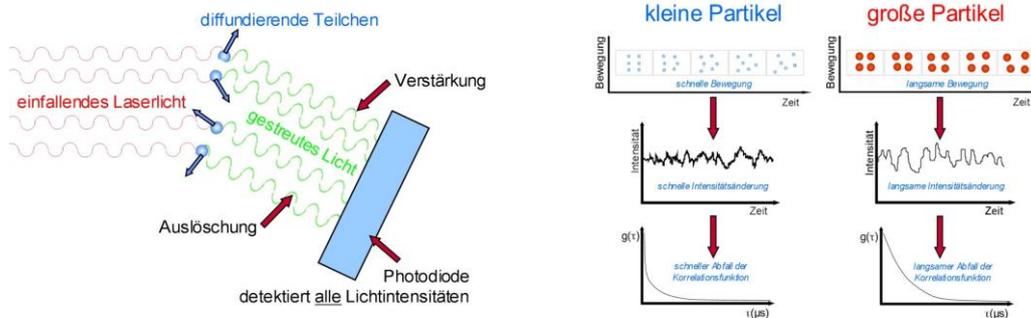
Die Bestimmung der Partikelgröße mit der PCS ist ein hochauflösendes Laserstreulichtverfahren. Der Messbereich für die Partikelgröße liegt dabei zwischen 3 nm und 3 µm. Bei der PCS werden Laserlichtstrahlen in eine Dispersion von Partikeln gesendet. Das Licht wird von den sich bewegenden Partikeln zurückgestreut und anschließend detektiert. Unter der Annahme von kugelförmigen Partikelformen wird mittels des Diffusionskoeffizient über die STOKES-EINSTEIN-Gleichung (siehe Gleichung 6) die Partikelgröße berechnen.<sup>[159]</sup>

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 6}$$

d	hydrodynamischer Durchmesser [m]
k	Boltzmann-Konstante $1,3806504 \cdot 10^{-23} \text{ [(kg} \cdot \text{m}^2)/(\text{K} \cdot \text{s}^2)]$
D	Diffusionskoeffizient [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]
$\eta$	Viskosität [ $\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$ ]
T	absolute Temperatur [K]

Das Prinzip der PCS beruht dabei auf der Messung von Schwankungsgeschwindigkeiten der Streulichtintensität; dabei schwankt die Intensität des gestreuten Lichtes bei kleinen Teilchen

schneller als bei großen Teilchen. Die schnelle Diffusion der kleinen Teilchen bewirkt also ein sich schnell änderndes Interferenzspektrum während der Intensitätsmessung. Größere Partikel, welche ihre Position langsamer verändern, weisen während der Messung geringere Unterschiede bzw. Schwankungen in der Lichtintensität auf.<sup>[160-161]</sup>



**Abb. 10: links:** Interferenz von Lichtstrahlen ausgehend von diffundierenden Partikeln, **rechts:** Intensitätsänderung und Korrelationsfunktion von kleinen und großen Partikeln<sup>[160]</sup>

Die Detektion erfolgte in der Rückwärtsstreuung bei einem Winkel von  $173^\circ$ . Die Seitwärtsstreuung wird bei dieser Messanordnung nicht mehr mitgemessen. Im Gegensatz zu früheren Messanordnungen im  $90^\circ$  Winkel erlaubt die Detektion in der Rückwärtsstreuung konzentriertere Proben zu vermessen.<sup>[162]</sup>

Neben der Ermittlung der Partikelgröße wurden die Proben auch auf ihre Größenverteilung hin untersucht. Als Parameter ist in dieser Arbeit der Polydispersitätsindex (PDI), angegeben. Der PDI, kalkuliert nach ISO 13321:1996E, stellt dabei ein Maß für die Breite der Verteilung dar und beschreibt den mathematischen Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion.<sup>[163]</sup> Monodisperse Proben haben einen PDI von unter 0,1 bis 0,2. Von einer engen Größenverteilung der Dispersion kann bei einem PDI bis 0,3 ausgegangen werden. Ist der Index größer als 0,3 enthält die Probe unterschiedliche Partikelgrößen und es muss von einer breiten Verteilung der Probe ausgegangen werden. Ab einem PDI von 0,5 gilt die Probe als nicht mehr auswertbar.<sup>[163]</sup>

### Mikroelektrophorese und Laser-Doppler-Anemometrie

Die Ermittlung des Zeta-Potentials erfolgt durch die Bestimmung der Teilchengeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die Teilchengeschwindigkeit wird als elektrophoretische Mobilität in  $\mu\text{m/s}$  bezogen auf eine Feldstärke von  $1\text{ V/cm}$  gemessen und kann in das Zeta-Potential umgerechnet werden. In dieser Arbeit wurde für die Umrechnung die SMOLUCHOWSKI Gleichung (Gleichung 8) zugrunde gelegt, welche sich aus der HENRY Gleichung (Gleichung 7) durch Einsetzen des Korrekturfaktors ( $f_{ka}=1,5$ ) ergibt. Der Korrekturfaktor beschreibt das Verhältnis von Teilchenradius zu Dicke der diffusen Schicht.<sup>[164-165]</sup>

*HENRY Gleichung:*

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f_{ka}}{3\eta} \quad \text{Gleichung 7}$$

*SMOLUCHOWSKI Gleichung:*

$$\mu_e = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad \text{Gleichung 8}$$

$\mu_e$	elektrophoretische Mobilität [ $\text{m}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ ]
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante [ $\text{s}^4 \cdot \text{A}^2/\text{m}^3 \cdot \text{kg}$ ]
$\zeta$	Zeta-Potential [V]
$\eta$	Viskosität [ $\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$ ]
$f_{ka}$	Korrekturfaktor

Für die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität wird an der Kapillarzelle eine Spannung angelegt, die daraus resultierende Bewegung geladener Teilchen zu den Elektroden wird mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie ermittelt. Dabei kreuzen sich zwei kohärente Laserstrahlen in der Küvette und bilden im Schnitt ein Interferenzstreifenmuster. Beim Durchqueren eines Partikels durch dieses Hell-Dunkel-Muster kommt es zur Fluktuation des Interferenzmusters. Dieses fluktuierende Signal wird von den Photodetektoren erfasst und ist proportional zur Geschwindigkeit der Partikel.<sup>[162,166]</sup>

### Probenvorbereitung

Für die Charakterisierung der Partikelgröße und Partikelladung der Lipidformulierungen wurden 20  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Liposomendispersion (1 mg/ml) in 1000  $\mu\text{l}$  milliQ Wasser in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß verdünnt und kurz gevortext. Die Dispersion wurde anschließend zur Bestimmung der Partikelgröße vollständig in eine Einmalküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm überführt. Auf Blasenfreiheit in der Küvette wurde geachtet. Die Zeta-Potentialbestimmung und eine sich anschließende Partikelgrößenmessung erfolgten in einer gefalteten Kapillarzelle. Dafür wurden 750  $\mu\text{l}$  der Verdünnung blasenfrei in die Zelle überführt.

Für die Ermittlung der Partikelgröße und Partikelladung der Lipoplexe wurde das entsprechende Volumen der Liposomendispersion (1 mg/ml) in 125  $\mu\text{l}$  milliQ-Wasser verdünnt und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. 3,75  $\mu\text{g}$  pDNA (pCMV·SPORT- $\beta\text{gal}$ ) wurden ebenfalls in 125  $\mu\text{l}$  milliQ-Wasser verdünnt und anschließend vorsichtig dazu pipettiert sowie durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Die Mischung wurde analog zu den

Transfektionsversuchen (siehe 3.2.3.2) zur Bildung der Lipoplexe 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 750 µl milliQ-Wasser zugegeben und die Probe in die entsprechende Messzelle (siehe oben) überführt und am Zetasizer Nano-ZS vermessen.

#### Geräteparameter

Wenn nicht anders angegeben wurden folgende Parameter zur Messung der Partikelgröße oder Partikelladung am Zetasizer Nano-ZS eingestellt:

##### *Partikelgrößenmessung:*

Temperatur / Equilibrierungszeit	25°C / 120 s
Dispersionsmedium / Viskosität / RI	Wasser / 0,8872 mPa·s / 1,330
Dispersionsviskosität = Probenviskosität	
Attenuator	automatisch
Messposition	automatisch
Anzahl der Messungen	3
Anzahl Durchläufe je Messung	10
Zeit pro Durchlauf	20 s

##### *Partikelladungsmessung:*

Temperatur / Equilibrierungszeit	25°C / 120
Dispersionsmedium / Viskosität / RI / Dielektrizitätskonstante	Wasser / 0,8872 mPa·s / 1,330 / 78,5 F/m
Dispersionsviskosität = Probenviskosität	
Modell	SMOLUCHOWSKI
Anzahl der Messungen	3
Anzahl Durchläufe je Messung	15
Stromspannung	50 V, entsprechend 10 V/cm

Die Partikelgrößen sind in dieser Arbeit, wenn nicht anders ausgewiesen, als z-Average-Werte (Durchmesser) in nm angeben. Dieser Wert stellt den Intensitätsmittelwert aus den Signalintensitäten dar und ist nicht massen- oder anzahlgewichtet.

Die Zeta-Potentiale sind in dieser Arbeit, wenn nicht anders angeben, in mV dargestellt. Es wurde darauf geachtet eine Konduktivität zwischen 20 und 50 µS/cm einzuhalten, gegebenenfalls wurde diese mittels 1 M NaCl-Lösung auf 50 µS/cm eingestellt.

### 3.3.2 Untersuchung mittels Asymmetrischer-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Die fluoreszenzmarkierte Lipidformulierung T14diLys/DOPE/SD-E14Rho6G 1/2/0,01 (n/n/n) wurde weiterhin mittels Asymmetrischer-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) und einer anschließenden Fluoreszenzintensitätsmessung der dabei gesammelten Fraktionen charakterisiert. Die Analytik wurde im Hause durch Frau Dr. J. Kuntsche, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg mittels einer A4F der Firma Wyatt Technology durchgeführt. Die Liposomendispersion wurde durch das Eclipse<sup>®</sup> Separations-System analysiert. Die Trennung der Partikel erfolgte in einem trapezförmigen Kanal (Höhe 350 µm, Länge 265 mm, maximale Breite 21 mm) welcher mit einer regenerierten Cellulosemembran (MWCO 5 kDa, Nadir) ausgestattet war. Zur Verdünnung der Probe und als Elutionsmittel diente gereinigtes, filtriertes Wasser (Porengröße 0,1 µm) welches mit 0,02% (m/V) Natriumthiazid konserviert wurde. 100 µl einer 1 mg/ml Liposomendispersion wurde in den Trennkanal während der Fokussierung eingespritzt und anschließend mit konstanter Detektions-Flussrate von 1 ml/min und variierender Querströmung eluiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Astra Softwareversion 4.90. Das Eluat wurde über einen Zeitraum von 50 min in Eppendorfgefäßen aufgefangen, dabei wurde das Gefäß jede Minute gewechselt. Die Fluoreszenzintensitäten der gesammelten Proben wurden anschließend am Plattenreader bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen.

### 3.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Untersuchungen erfolgten durch Herrn Dr. S. Drescher, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg und PD Dr. A. Meister, Institut für Chemie, MLU, Halle-Wittenberg. Als Proben wurden Liposomendispersionen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, hergestellt und auf eine Konzentration von 0.05 mg/ml Gesamtlipid mit zuvor sterilfiltrierten milliQ-Wasser verdünnt. Zur Untersuchung von Lipoplexstrukturen wurde die entsprechende Menge an pDNA (pCMV·SPORT-βgal) zur Herstellung von Lipoplexen mit unterschiedlichen (+/-)-Ladungsverhältnissen verwendet. Dabei wurde bei gleicher Lipidmenge lediglich die pDNA-Menge variiert. Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend weiterverarbeitet. Im Anschluss wurden 5 µl der Probenlösung auf ein mit Formvar-Film beschichtetes Kupfer-Grid aufgetragen und für 1 bis 2 Minuten darauf ruhen gelassen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde im Anschluss daran vorsichtig mit Filterpapier geplottet. Für die Kontrastierung wurde das Grid dann auf einen Tropfen (ca. 5 µl) Uranylacetat (1%ig) für 1 bis 2 Minuten inkubiert. Danach wurde das Grid vorsichtig abgenommen und die überschüssige Flüssigkeit erneut mit Filterpapier gleichmäßig von mehreren

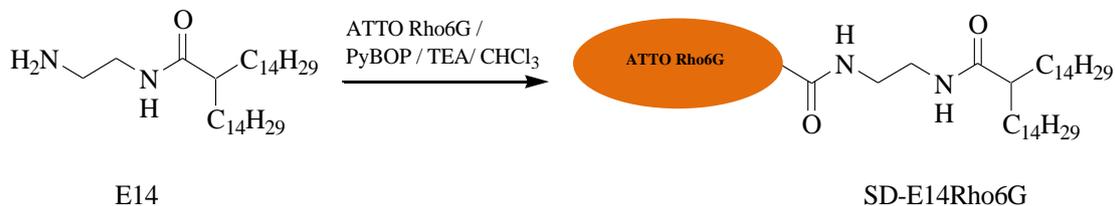
Seiten abgezogen. Die Probe wurde dann für 8 bis 24h bei RT getrocknet und anschließend am Mikroskop EM 900 der Firma Zeiss, in Kooperation mit Dr. G. Hause, Biozentrum, MLU, Halle-Wittenberg betrachtet.

### 3.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

#### 3.4.1 Fluoreszenzmarkierung

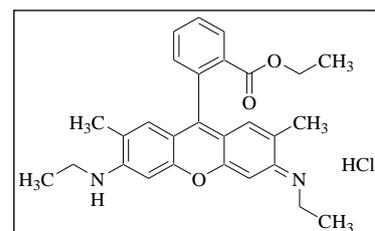
##### 3.4.1.1 Lipid

Die Lipidmarkierung wurde von Herrn Dr. S. Drescher, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg durchgeführt. Dabei wurde das Lipid E14 mit ATTO Rho6G (ATTO-TEC GmbH) konjugiert (siehe **Abb. 11**).



**Abb. 11:** Darstellung von SD-E14Rho6G

Die Kupplung erfolgte über eine Amidbindung, welche zwischen der freien Aminogruppe am Lipid und der Carboxylgruppe am Farbstoff ausgebildet wurde. Die Reinigung erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie mit einer 2 mm dicken Kieselgel-60 DC-Platte der Firma Merck. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Ammoniak 90/25/1 (V/V/V). Das Fluoreszenzlabel basiert, laut Hersteller ATTO-TEC GmbH, auf dem Farbstoff Rhodamin 6G (siehe **Abb. 12**) und hat ein Anregungsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 560 nm.



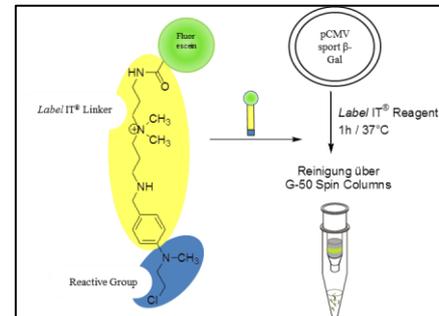
**Abb. 12:** Struktur von Rhodamin 6G

##### 3.4.1.2 pDNA

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Markierungsstrategien für die pDNA verwendet. Zum einen erfolgte eine kovalent Markierung mittels Fluoreszein unter Verwendung des Label IT<sup>®</sup> Nucleic Acid Labeling Kit der Firma Mirus und zum anderen wurde die pDNA mit dem Interkalator YOYO<sup>®</sup>-1 Jodid (Invitrogen<sup>™</sup>) angefärbt.

### Kovalente DNA Markierung mittels Fluoreszein

Die kovalente Markierung erfolgte in einem Mischungsverhältnis von 1/1 (V/m) Label zu DNA nach dem Standardprotokoll. Dabei resultiert eine Fluoreszenzmarkierung laut Hersteller von einem Label aller 20-60 Basenpaare. Für die Markierung wurden 5 µg pDNA pCMV·SPORT-βgal mit 5 µl Label IT<sup>®</sup> Reagent laut Vorschrift in 50 µl 1×Labeling Puffer A gemischt und für eine Stunde im Dunklen bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte über eine Microspin Säule, welche zunächst durch gründliches Vortexen und anschließenden Zentrifugieren vorbereitet wurde. Danach wurde der Ansatz vorsichtig, ohne die Gelschicht zu beschädigen auf die Säule pipettiert und bei 735×g für 2 min zentrifugiert. Im Durchlauf wurde somit die gereinigte fluoreszenzmarkierte pDNA erhalten, wobei laut Hersteller eine 100%ige Rückgewinnung der DNA angenommen werden kann. Das Label IT<sup>®</sup> Reagent besteht aus drei Regionen, dem Fluorophor (in diesem Fall Fluoreszein), dem Linker, welcher über elektrostatische Wechselwirkung die Interaktion des Labels mit der DNA ermöglicht und der reaktiven Alkylierungsgruppe, die eine kovalente Bindung zu Heteroatomen innerhalb der Nucleinsäuren eingeht (siehe **Abb. 13**). Das Anregungsmaximum liegt bei 492 nm und das Emissionsmaximum bei 518 nm.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung der kovalenten pDNA Markierung<sup>[1]</sup>

### DNA Interkalation mit YOYO<sup>®</sup>-1 Jodid

Für weitere Untersuchungen wurde die pDNA mit einem Interkalator markiert. Die Interkalation wurde mit dem dimeren Cyanin-Farbstoff YOYO<sup>®</sup>-1 Jodid der Firma Invitrogen<sup>™</sup> durchgeführt. Als Berechnungsgrundlage dienten die Herstellerangaben für DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese, wobei eine Reduzierung der Markierungsdichte von angegebenen 5/1 auf 50/1 Basenpaaren zu Farbstoffmolekül, vorgenommen wurde. Zunächst wurde die Fluorophor-Stammlösung auf 10 µM mit TE-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 10 µg pDNA (pCMV·SPORT-βgal) gelöst in 10 µl TE-Puffer in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und 30 µl der Fluoreszenzfarbstoffverdünnung zupipettiert und durch mehrmaliges vorsichtiges auf und ab pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde für 60 min bei RT im Dunklen inkubiert. Um überschüssige Farbstoffmoleküle zu entfernen wurde die pDNA mittels Alkoholfällung gereinigt. Dafür wurden der Ansatz mit 3 M Natriumacetatlösung (Endkonzentration: 0,3 M NaCH<sub>3</sub>COO) und 0,7 Volumenanteile Isopropanol versetzt, vorsichtig gemischt und anschlie-

ßend bei 10000rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 70%igem Ethanol nachgewaschen, erneut zentrifugiert, anschließend für 10 min getrocknet und schließlich in 10 µl TE-Puffer aufgenommen. Die markierte pDNA wurde bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert. Das Markierungsreagenz hat laut Hersteller, gebunden an dsDNA, ein Absorptionsmaximum von 491 nm und ein Fluoreszenzmissionsmaximum von 509 nm.

### **3.4.1.3 Membranfärbung**

Zur Lokalisation der markierten Lipoplexe war es nötig die Zellen zu visualisieren. Dabei wurde deren Zellmembran durch Färbung mittels Weizenkeimagglutinin (WGA)-Komplexes: WGA, Alexa Fluor® 633 Konjugat sichtbar gemacht. WGA ist ein Lektin, welches spezifisch an *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylneuraminsäure bindet. Da diese Zuckerstrukturen Bestandteile von Biomembranen sind können, mittels des WGA-Konjugats, Membranstrukturen eukaryotischer Zellen detektiert werden.<sup>[167-168]</sup>

Die Markierung erfolgte an lebenden Zellen mit einer Arbeitskonzentration an Konjugat von 5 µg/ml in PBS. Die Zellen wurden zunächst 2-mal mit PBS gespült, bevor das Konjugat zupipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt um überschüssiges Markierungsreagenz zu entfernen. Das Anregungsmaximum des WGA, Alexa Fluor® 633 Konjugates liegt bei 632 nm und dessen Emissionsmaximum bei 647 nm.

## **3.4.2 Zellkulturuntersuchung mit fluoreszenzmarkierten Proben**

Zur Vorbereitung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die COS-7 Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Dafür wurden die Deckgläser vor Verwendung für 2 h in 70%igem Ethanol eingelegt, danach mit einem fusselfreien Tuch abgewischt, im Anschluss 2-mal mit bidestilliertem Wasser gespült und autoklaviert. Für die Zellkulturversuche wurden die Deckgläser nach der Reinigung einzeln auf den Boden von 6-Well Platten gelegt und bearbeitet. Eine Modifikation der Oberfläche war nicht von Nöten, sodass 250 µl der Zellsuspension (Gewinnung siehe Kapitel 3.2.3.1) mit einer Zellzahl zwischen  $5,0 \cdot 10^4$  und  $1,0 \cdot 10^5$  Zellen/ml direkt auf das Deckglas ausgesät werden konnte. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden das Medium und die überschüssigen Zellen vorsichtig vom Deckglas abgesaugt und die angewachsenen Zellen mit 2,5 ml frischem Medium versorgt. Nach 16-24 h erreichten die Zellen auf dem Deckglas eine 70-80%ige Konfluenz und standen für weitere Versuche zur Verfügung.

### **3.4.2.1 Transfektion**

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem markierten Liposom T14diLys/DOPE/SD-E14Rho6G (1/2/0,01(n/n/n)) bei einem Ladungsverhältnis von 5/2 (+/-) mit einer pDNA Konzentration von 0,5 µg pro Deckglas. Die pDNA wurde zuvor, wie bereits beschrieben mit Fluoreszein, kovalent oder mit dem Interkalator YOYO<sup>®</sup>-1 Jodid markiert. Für die Präparation der Lipoplexe wurden 2,4 µl der Liposomendispersion (1 mg/ml) und 0,5 µg pDNA, je in 20 µl Medium (ohne Serum), gemischt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf 80 µl mit Medium (ohne Serum) aufgefüllt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert, welche zuvor 1-mal mit PBS gespült wurden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

Um den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Lipoplexen näher zu untersuchen wurden die Transfektionsexperimente nach 2, 6, und 24h abgestoppt. 4h nach Versuchsbeginn wurde generell der Transfektionsansatz von den Zellen vorsichtig abgesaugt und durch frisches Medium mit einer Serumkonzentration von 10% ersetzt und weiter inkubiert. Zu den genannten Zeitpunkten wurde die Lösung über den Zellen vorsichtig abgesaugt und die Zellen 2-mal mit je 3 ml PBS gespült. War für weitere Untersuchungen eine Membranfärbung dieser Zellen notwendig, so wurde diese vor der Fixierung der Zellen wie oben beschrieben durchgeführt.

### **3.4.2.2 Fixierung und Einbettung**

Die verwendete 1×Fixierlösung (2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd) wurde frisch vor Gebrauch aus der 10×Fixierlösung durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Im Anschluss an den Waschschritt nach der Transfektion (siehe 3.4.2.1) wurden 2 ml dieser Lösung vorsichtig zu den Zellen pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert; anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml kaltem PBS Puffer zum Abstoppen der Reaktion. Zur Entfernung von Rückständen wurden die Zellen noch 2-mal mit PBS gewaschen und schließlich auf dem Objektträger mit einem Tropfen Aquatex<sup>®</sup> präpariert. Die Probe wurde für 15 min an der Luft getrocknet und bis zur Betrachtung, jedoch maximal 4Tage, unter Lichtausschluss bei +4°C gelagert.

### **3.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

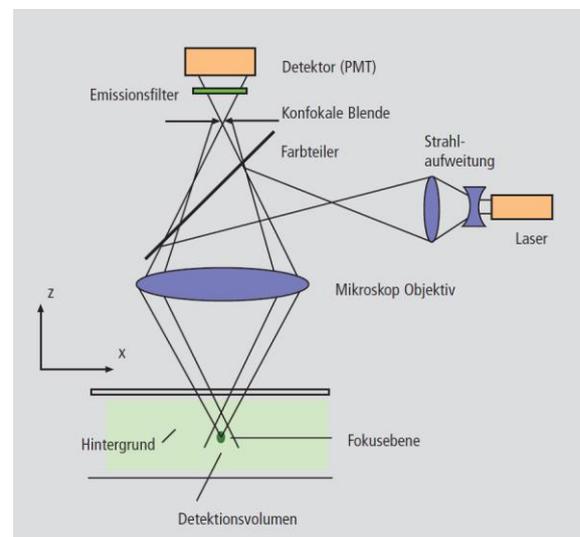
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. J. Vogel, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg aufgenommen. Die Untersuchungen erfolgten dabei an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) 710 der Firma Carl-Zeiss, Jena mit möglichen Anregungswellenlängen von 458, 488, 514, 543 und 633 nm. Es handelt sich dabei um ein inverses Mikroskop (AxioObserver.Z1) mit schnellem z-Scanningtisch zur Aufnahme

von unterschiedlichen Objektebenen. Die Steuerung und Auswertungen erfolgten mittels der Zeiss Software ZEN2008. Für die Bildaufnahmen wurden  $40\times$  und  $63\times$  Plan-Apochromat Objektive verwendet. Nachstehend (**Tab. 10**) sind die verwendeten Fluoreszenzlabel und die damit markierte Struktur tabellarisch zusammengefasst.

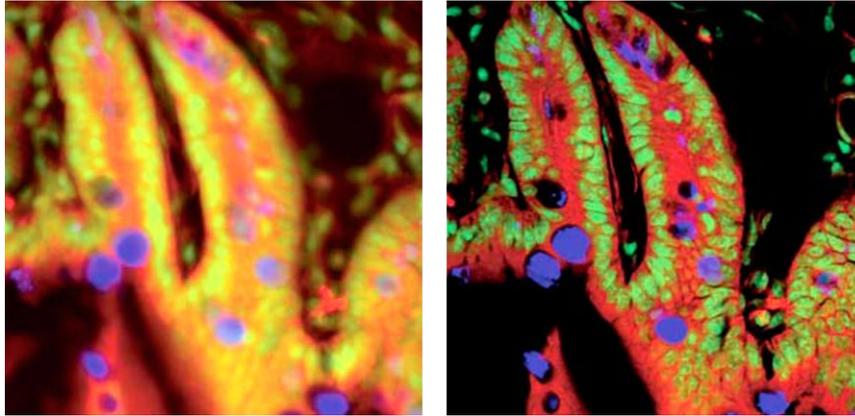
**Tab. 10:** Zusammenfassung der verwendeten Fluoreszenzlabel und der damit markierten Strukturen

Fluoreszenzlabel	$\lambda_{\max}$ Ex. [nm]	$\lambda_{\max}$ Em. [nm]	Anregungs-laser [nm]	markierte Struktur	FRET-Zuweisung
YOYO <sup>®</sup> -1 Jodid	491	509	488	pDNA	Donor
Label IT <sup>®</sup> Fluorescein	492	518	488	pDNA	Donor
ATTO Rho6G	535	560	543	Liposom	Akzeptor
WGA, Alexa Fluor <sup>®</sup> 633	632	647	633	Plasma-membran	

Das Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie beruht auf einem rasterhaften, punktuellen Abgreifen des zu untersuchenden Objekts unter Verwendung eines Laserstrahls. Dieser wird durch eine Lochblende (Pinhole) auf das Präparat fokussiert und dann über einen Strahlenteiler (Spiegel) auf die Mikroskopoptik umgelenkt (**Abb. 14**). Das von dem Objekt ausgehende Licht wird dann wieder zurück durch die Optik auf den Spiegel, und damit auf den Strahlenteiler gelenkt. Von dort fällt das Licht wieder durch eine Lochblende. Beide Lochblenden liegen in optisch konjugierten Punkten, sodass die Lichtwege gleich lang sind. Damit tritt durch die Detektionslochblende größtenteils nur Licht, welches aus der Brennebene des Präparates stammt. Dieses Prinzip steht im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei dem auch Signale aus anderen Ebenen mit erfasst werden und somit das Bild diffus erscheinen lassen. Durch Reduktion des Streulichtanteils ermöglicht die konfokale Mikroskopie eine erhöhte Tiefenschärfe (siehe **Abb. 15**).<sup>[2]</sup>



**Abb. 14:** Strahlengang eines konfokalen LSM<sup>[3]</sup>

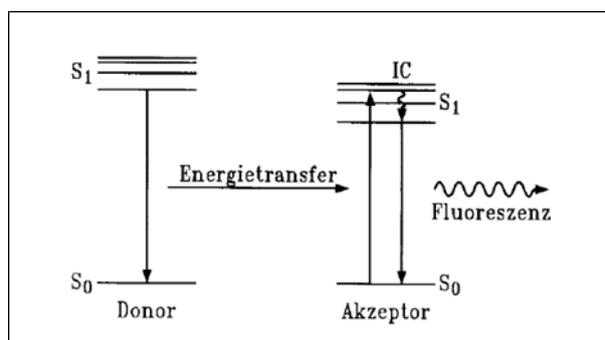


**Abb. 15:** Abbildungen eines dreifach gefärbten Zellverbands **links:** nichtkonfokale Darstellung **rechts:** konfokale Darstellung<sup>[3]</sup>

Für Co-Lokalisationsuntersuchungen mehrfachmarkierter Proben wurde ein „Linear Fluorescence Unmixing“ durchgeführt. Diese Funktion ermöglicht eine spektrale Entmischung der verwendeten Fluorophore wodurch gemischte Signale getrennt werden.<sup>[169]</sup> Zur Vorbereitung des „Linearen Unmixing“ wurden zunächst einzelmarkierte Proben der verwendeten Fluorophore angefertigt und ein Referenzspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs in der Probe aufgenommen. Nach Aufnahme einer mehrfachmarkierten Probe generierte dann die Funktion des „Linearen Fluorescence Unmixing“ unter Verwendung der Referenzspektren ein Bild, in welchem die Überlappungen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe durch die Software zurückgerechnet wurden.

### 3.4.3.1 FRET-Verfahren

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), benannt nach seinem Entdecker Theodor Förster (1946), bezeichnet den Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren deren Anregungs- und Emissionsspektren sich überlappen (siehe **Abb. 16**). Dabei wird die Anregungsenergie durch intermolekulare Dipol-Dipol-Kopplung vom Donor-Molekül auf das Akzeptormolekül übertragen und regt dieses dabei zur Fluoreszenz an. Bei einem optimalen FRET-Paar sollte das Emissionsspektrum des Donors stark mit dem Anregungsspektrum des



**Abb. 16:** Jablonski-Diagramm für Förster-Energietransfer<sup>[2]</sup>

Akzeptors überlappen, gleichzeitig aber der Akzeptor nicht bei der Anregungswellenlänge des Donors angeregt werden. Des Weiteren erfolgt der Transfer nur wenn sich die beiden Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander befinden ( $< 10\text{ nm}$ ). Diese Voraussetzung macht man

sich in der Molekularbiologie zu nutzen, um Molekül-Interaktionen und Abstandsveränderungen von Molekülen im Nanometerbereich zu untersuchen.<sup>[170]</sup> Zur Bestimmung des FRET-Signals im Untersuchungsmaterial können verschiedenen Methoden verwendet werden. Für fixierte Proben eignen sich Bleich-Methoden bei denen entweder der Akzeptor oder der Donor gebleicht werden und die Fluoreszenzintensitätsänderungen ermittelt werden. Weitere Methoden, auf die im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen werden soll, sind das „Sensitized Emission“ oder die Fluoreszenz-Lebensdauer-Messung (FLIM). Diese Verfahren eignen sich für die FRET-Detektion an lebenden Zellen. In Rahmen dieser Arbeit wurden FRET-Untersuchungen unter Verwendung des Akzeptor-Bleich-Verfahrens durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Fluoreszenzintensität des Donors vor und nach dem Bleichen des Akzeptors bestimmt. Bei Vorliegen einer FRET-Situation erhöhte sich die Donor-Intensität, da das Akzeptor-Fluorophor keine Energie mehr vom Donor-Fluorophor aufnehmen kann und somit die Energie vollständig dem Donor zur Verfügung steht.

#### FRET-Messung mittels Akzeptor-Bleich-Verfahren

Nach der Aufnahme eines Fluoreszenzbilds am LSM wurden in diesem die Regionen mit den Lipoplexten markiert. Die Software ermöglichte gezielt die ausgewählten Bereiche wie nachstehend beschrieben zu Bleichen. Für das Akzeptor-Bleichen-Verfahren wurde eine Zeitserie von insgesamt 8 Bildern am LSM aufgenommen, 4 davon erfolgten vor dem Bleichschritt und 4 danach. Der Bleichschritt zwischen dem 4. und 5. Bild erfolgte mit 50 Scans einer 100%igen Intensität des 543 nm-Anregungslasers. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe vor und nach dem Bleichschritt ermittelt und mittels geeigneter Software ausgewertet.

### **3.5 Statistische Methoden**

Zur statistischen Absicherung der Transfektions- und Viabilitätsdaten erfolgten die Untersuchungen am Zellkulturmodell an  $n \geq 3$  unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden dabei an unterschiedlichen Zellpassagen sowie verschiedenen Tagen erhalten. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwert mit Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben. Ausreißer wurden mit dem Test nach Grubbs ermittelt, dabei wurde ein Signifikanzniveau von 95% festgelegt. Für Angaben der Signifikanz erfolgte die Analysen mittels Varianzermittlung (ANOVA) und Bonferroni's multiplem Vergleichstest. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  zugrunde gelegt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Transfektions- und Zytotoxizitätsstudien

Die Testung neuartiger kationischer Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren und auf Basis einer Gemini-Grundstruktur für den nicht-viralen Gentransfer erfolgte am Zellkulturmodell. Dafür wurden zunächst aus den kationischen Transfektionslipiden unter Zuhilfenahme der neutralen Helferlipide DOPE oder Cholesterol Liposomen formuliert. DOPE erwies sich bei der Liposomenpräparation unter den beschriebenen Bedingungen als geeignetes Helferlipid. Bei Präparationen mit Cholesterol kam es vermehrt zu Ausflockungen und stark getrübbten Dispersionen, was auf sehr große Partikel und eine ungenügende Bildung von Liposomen schließen ließ.

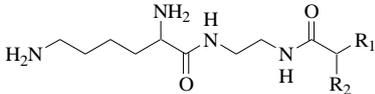
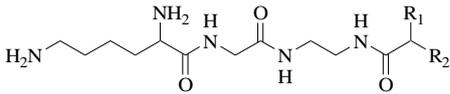
Beginnend mit der Charakterisierung und Differenzierung der Transfektionsleistung unterschiedlicher kationischer Lipide wurde zunächst bei der Liposomenbildung DOPE in einem Verhältnis von 1/2 (n/n) präferiert und dieses System hinsichtlich der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität an Hep-G2 Zellen untersucht. Für eine umfangreiche Charakterisierung der neuen Lipide wurde eine Auswahl dieser mit weiteren Lipid/Helferlipid-Verhältnissen erprobt und für eine bessere Bewertung der erhaltenen Transfektionsleistung neben den Hep-G2 Zellen auch an A549 und COS-7 Zellen getestet. Alle ermittelten Transfektionsdaten sind tabellarisch im Anhang aufgeführt, die folgenden Daten stellen lediglich eine Auswahl dar.

#### 4.1.1 Kationische Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren

##### 4.1.1.1 *Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren mit Ethylendiamin-Spacer (E-Reihen-Lipide)*

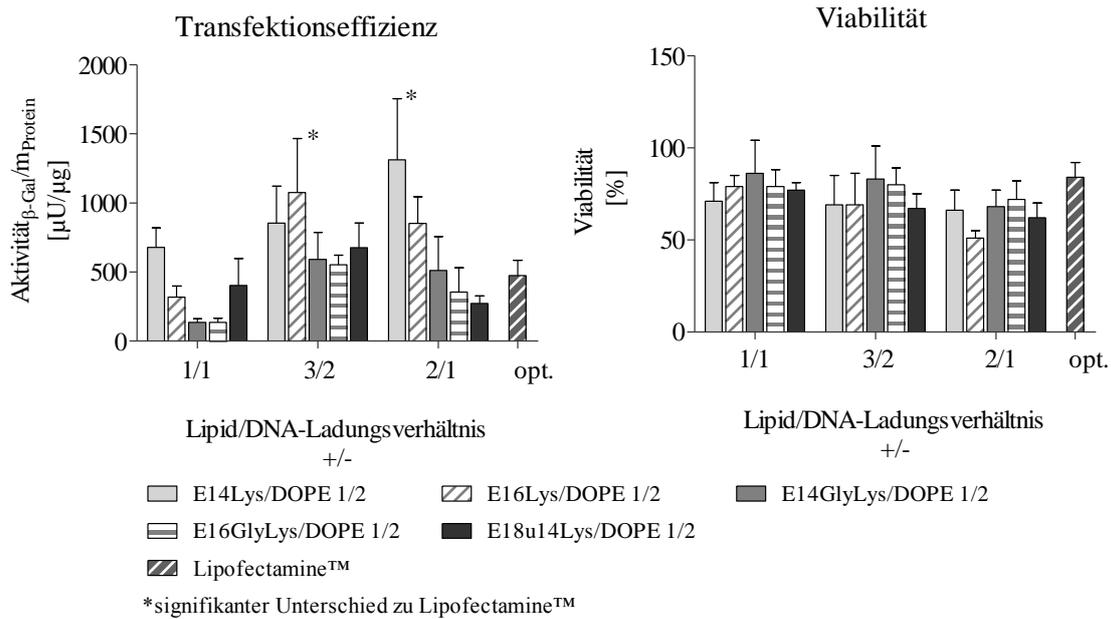
Die nachfolgenden kationischen Lipide wiesen als Verbindungstück zwischen hydrophilen und hydrophoben Molekülteil einen Ethylendiamin-Spacer auf. Um auf Struktur-Wirkungsbeziehungen eingehen zu können, wurde die Kettenlänge der Verbindungen E14Lys, E16Lys (als Vertreter mit gesättigten Kohlenwasserstoffketten) und E18u14ys (als Vertreter mit einfach ungesättigter Kette) bei sonst gleichbleibenden Strukturen variiert. Als Kopfgruppe diente, bei den in **Tab. 11** aufgeführten Lipiden, die basische Aminosäure Lysin. Weiterhin wurden Lipide mit einer Dipeptidstruktur im Spacer der Moleküle untersucht (E14GlyLys und E16GlyLys).

Tab. 11: Chemische Strukturen der E-Reihen-Lipide

Lipidstruktur	R1	R2	Abkürzung
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	E14Lys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	E16Lys
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> Δ <sup>9</sup>	E18u14Lys
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	E14GlyLys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	E16GlyLys

Das Lipid E14Lys wurde bereits, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Langner, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg, auf seine Transfektionsleistung getestet. Die Testung erfolgte dabei an NIH 3T3 Zellen (Fibroblastenzellen der Maus) mit unterschiedlichen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen sowie (+/-)-Ladungsverhältnissen. Die Transfektionssysteme mit E14Lys zeigten dabei eine höhere Transfektionseffizienz bezogen auf die Referenzsubstanz Lipofectamine™.<sup>[125]</sup> Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden in dieser Arbeit weitere Transfektionslipide auf Basis  $\alpha$ -verzweigter Säureamide getestet. Zur besseren Bewertung der Transfektionseigenschaften dieser Systeme wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Zelllinien verwendet, wobei zwei davon humane Zelllinien waren.

In **Abb. 17** sind die Ergebnisse der Transfektions- und Viabilitätsuntersuchungen der E-Reihen-Lipide sowie der Referenzsubstanz Lipofectamine™ an Hep-G2 Zellen dargestellt. Es wurden repräsentativ drei verschiedene Ladungsverhältnisse für die Lipoplexpräparation ausgewählt und der höchsten ermittelten Effizienz von Lipofectamine™ gegenübergestellt. Die maximale Transfektionseffizienz wurde dabei von jedem System bei einem anderen (+/-)-Ladungsverhältnis erreicht. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit für jeden Transfektionsvektor das optimale (+/-)-Ladungsverhältnis empirisch zu ermitteln.



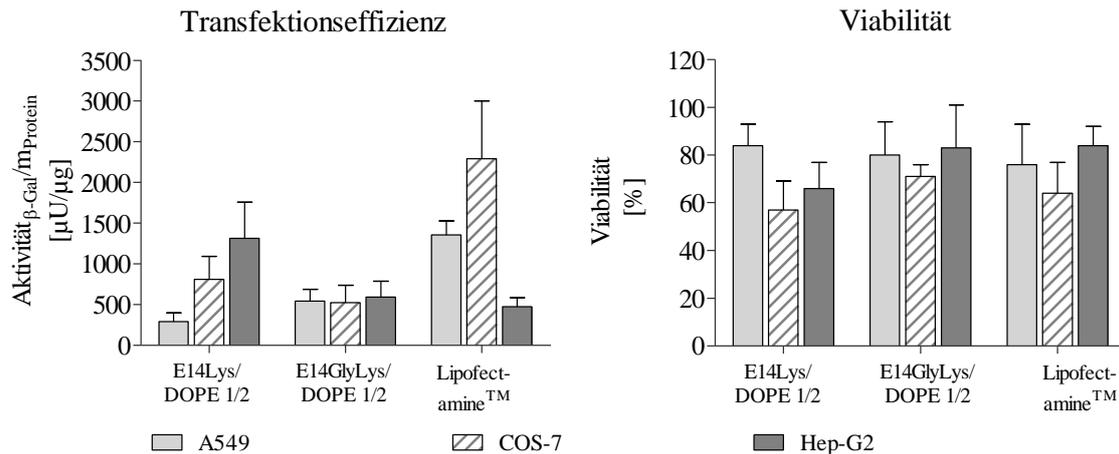
**Abb. 17:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der E-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ;  $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Eine signifikant bessere Transfektionseffizienz gegenüber Lipofectamine™ erzielten E14Lys und E16Lys. Die höchste  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in dieser Lipid-Reihe wurde mit E14Lys bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 2/1 bestimmt. Weiterhin ist der **Abb. 17** zu entnehmen, dass die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Länge und des Sättigungsgrades von Kohlenwasserstoffketten wie folgt sinkt: diC14 > diC16 > C18 $\Delta$ 9-C14. Auch andere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dem Einfluss des hydrophoben Molekülteils auf die Transfektionseffizienz. So untersuchten KOYNOVA et al. den Kettenlängeneinfluss von kationischen Phosphatidylcholin-Derivaten.<sup>[171]</sup> Dabei stellten sie, analog zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, eine Transfektionssteigerung mit Abnahme der Kettenlänge fest. Weiterhin konnten sie eine Zunahme der Transfektionseffizienz bei ungesättigten Verbindungen ermitteln. Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Mit der ungesättigten Verbindung E18u14Lys wurde keine Steigerung der Transfektionseffektivität erreicht. Auch die Testung weiterer DOPE Stoffmengenanteile in der Lipidformulierung oder die Verwendung von Cholesterol als Helferlipid führte nicht zur gewünschten Steigerung der Transfektionsrate (Daten siehe Anhang).

Die Analyse der Transfektionsdaten zeigte bei den Dipeptidverbindungen E14GlyLys und E16GlyLys eine Verringerung der Effizienz im Vergleich zu den strukturanalogen Lipiden ohne Glycin. Als möglichen Grund kann man die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwi-

schen den räumlich benachbarten Peptidbindungen und eine möglicherweise damit verbundene schlechtere Komplexierung der pDNA diskutieren.

Das nachfolgende Diagramm (**Abb. 18**) zeigt die Zellkultursergebnisse einer Auswahl von E-Reihen-Lipide an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen. Dabei weist die Darstellung das jeweils beste (+/-)-Ladungsverhältnis der Transfektionssysteme für jede Zelllinie und die dazugehöriger Ergebnisse des Viabilitätstests auf.



**Abb. 18:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Transfektionslipide E14Lys und E14GlyLysin in Kombination mit dem neutralen Helferlipid DOPE in einem Verhältnis von 1/2 (n/n) an A549, COS-7 und Hep-G2; Zellen im jeweils optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Wie aus **Abb. 18** entnommen werden kann, waren die Transfektionseffizienzen der neuen kationischen Lipide an den Zelllinien A549 und COS-7 niedriger als die der Referenzsubstanz Lipofectamine™. Die höhere  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität an Hep-G2 Zellen kann möglicherweise durch morphologische Unterschiede der einzelnen Zelllinien erklärt werden. Hepatozyten sind an zahlreichen Stoffwechselprozessen z.B. dem Fettsäuremetabolismus beteiligt. Sie besitzen Aufnahmemechanismen für Fettsäuren, welche eine bessere Penetration der Lipidformulierungen auf Basis verzweigter Fettsäuren in Hep-G2 Zellen gegenüber den beiden anderen Zelllinien erklären kann.<sup>[172]</sup> Die Verwendung von Fettsäuren in Nanopartikeln und die damit verbundene gesteigerte Aufnahme der Partikel in Leberzellen wurde bereits in der Literatur diskutiert.<sup>[173-174]</sup>

#### 4.1.1.2 Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren mit Putrescin Spacer (P-Reihen-Lipide)

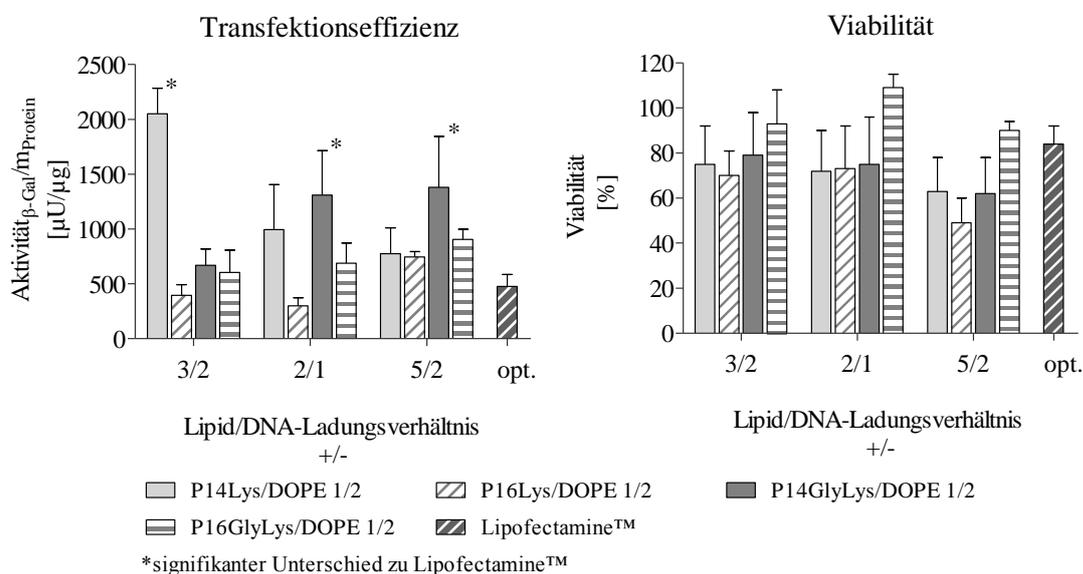
Bei den folgenden Verbindungen (siehe **Tab. 12**) diente 1,4-Diaminobutan (Putrescin) als Abstandshalter zwischen dem hydrophilem und dem hydrophobem Teil der Lipide. Damit

wurde der Spacer im Vergleich zu dem Ethylendiamin-Spacer um 2 Kohlenstoffatome verlängert. Analog zu den bereits vorgestellten Lipiden der E-Reihe wurden hier ebenfalls Lipide mit unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffketten sowie der Dipeptid-Struktur, bestehend aus Glycin und Lysin, getestet. Als Kopfgruppenelement zur Komplexbildung der pDNA diente erneut die basische Aminosäure Lysin.

**Tab. 12:** Chemische Strukturen der P-Reihen-Lipide

Lipidstruktur	R1	R2	Abkürzung
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	P14Lys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	P16Lys
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	P14GlyLys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	P16GlyLys

In der nachstehenden Abbildung (**Abb. 19**) sind die Ergebnisse der Transfektions- und Viabilitätsuntersuchungen der P-Reihen-Lipide gegenüber der Referenzsubstanz Lipofectamine™ dargestellt.

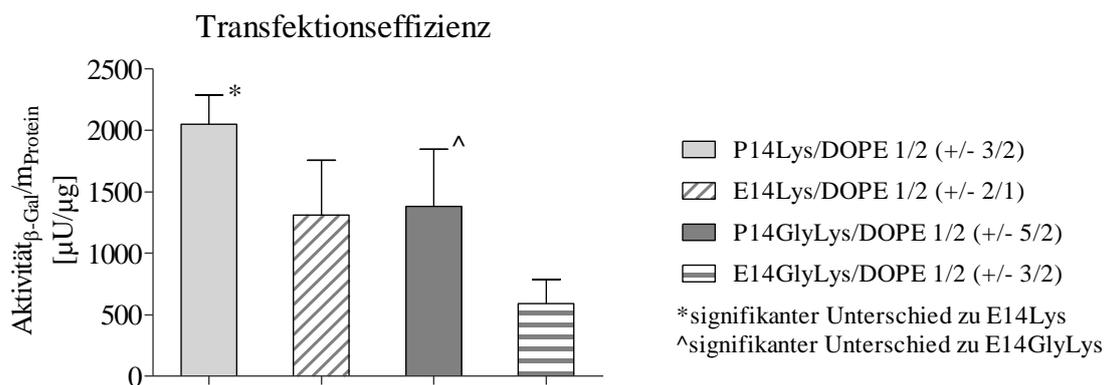


**Abb. 19:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der P-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ;  $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Bei den P-Reihen-Lipiden erreichten die Lipidformulierung von P14Lys und P14GlyLys mit DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n) eine signifikant bessere Transfektionsrate an Hep-G2 Zellen.

Die höchste Transfektionseffizienz wurde von P14Lys bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 3/2 und bei P14GlyLys von 5/2 erreicht. Dies verdeutlicht erneut die Notwendigkeit des empirischen Ermitteln des optimalen Ladungsverhältnisses für jedes Lipofektionssystem. Weiterhin zeigten sich die Dipeptidverbindungen dieser Untersuchungsreihe als nicht effizienter im Vergleich zu deren Strukturanalogen Verbindungen (siehe **Abb. 19**). So ist bei den Ergebnissen mit P14GlyLys gegenüber P14Lys eine Abnahme der Transfektionseffizienz zu verzeichnen und bei den beiden Transfektionslipiden P16Lys und P16GlyLys konnte kein signifikanter Unterschied in den Transfektionseffizienzen ermittelt werden. P16GlyLys zeichnet sich lediglich durch eine gute Verträglichkeit aus, so lagen die Viabilitätswerte der hier dargestellten Ladungsverhältnissen über 90%.

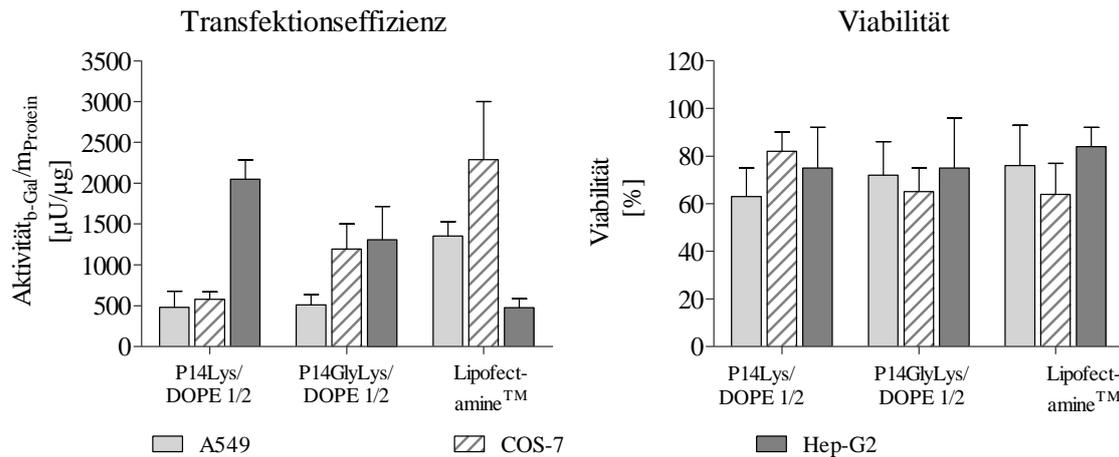
Die Modifikation der P-Reihen-Lipide in Bezug auf die E-Reihen-Lipide – durch Einführen eines C4-Spacer als Abstandshalter zwischen positiv geladenen Kopfgruppe und hydrophoben Kettenteil – führte bei P14Lys und P14GlyLys im Vergleich zu den analogen Verbindungen der E-Reihe zu einer Steigerung der Transfektionsleistung um 30-50% (siehe **Abb. 20**).



**Abb. 20:** Transfektionseffizienz der P-Reihen-Lipiden im Vergleich mit E-Reihen-Lipiden an Hep-G2 Zellen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ;  $p \leq 0,05$

Arbeiten von OBATA et al. zur Untersuchung des Einflusses der Spacerlänge kationischer Lipide auf deren Transfektionseffizienz ergaben ähnliche Ergebnisse. Auch sie konnten, beim Vergrößern des Abstands zwischen polarer Kopfgruppe und lipophilen Kettenteil eine Steigerung der Effizienz feststellen.<sup>[60]</sup>

Wie schon die Transfektionslipide der E-Reihe zeigen auch die der P-Reihe eine verminderte Effizienz an den Zelllinien A549 und COS-7 gegenüber der Referenzsubstanz, wie aus dem nachstehenden Balkendiagramm entnommen werden kann (**Abb. 21**).



**Abb. 21:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von P14Lys und P14GlyLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen im jeweils optimierten Ladungsverhältnis;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Die gute Transfektionsleistung von P14Lys an den Hep-G2 Zellen konnte nicht an den beiden weiteren getesteten Zelllinien bestätigen werden. Auch die Lipoplexformulierung mit P14GlyLys konnte nicht die Transfektionsrate der Referenzsubstanz Lipofectamine™ an den A549 und COS-7 Zellen erreichen. Somit zeigt sich erneut, dass der Grad der Transfektion durch verschiedenste Einflussfaktoren bestimmt wird und dabei neben den physikochemischen Eigenschaften der Lipide, den verwendete genetischen Material auch der Zelltyp eine entscheidende Rolle spielt.<sup>[137,175]</sup>

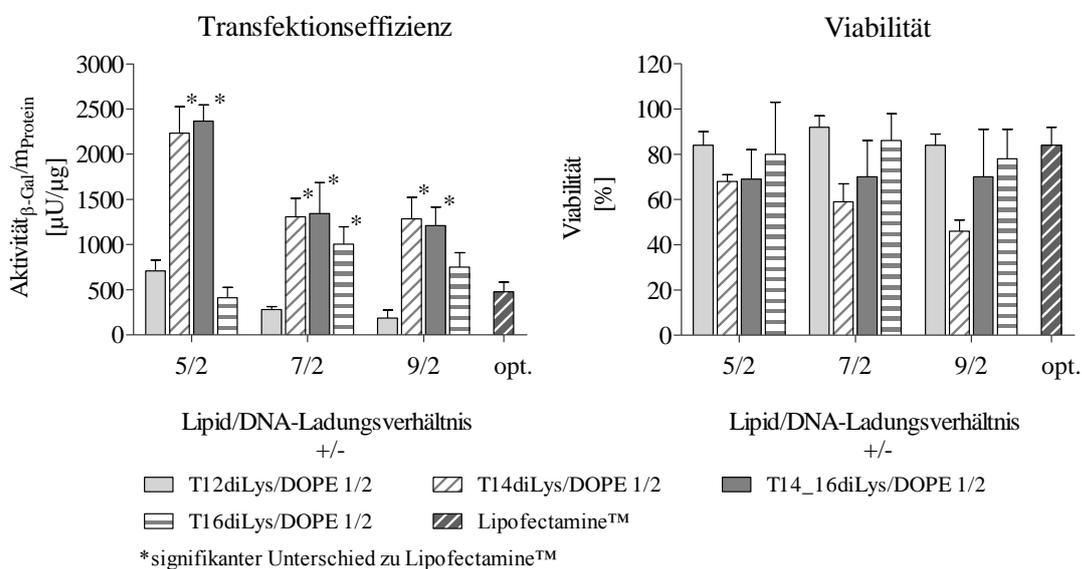
#### 4.1.1.3 Transfektionslipide auf Basis verzweigter Fettsäuren mit Tris(2-aminoethyl)amin als Spacer (T-Reihen-Lipide)

Diese Transfektionslipide weisen einen verzweigten Spacer, bestehend aus Tris(2-aminoethyl)amin, zwischen hydrophilen und hydrophoben Molekülteil auf. Dieser ermöglichte den Einbau von 2 Lysinmolekülen als polare Kopfgruppe. Somit stehen vier primäre Aminogruppen als mögliche positive Ladungen zur Komplexierung der Nukleinsäuren zur Verfügung. Die nachfolgenden Lipide (siehe **Tab. 13**) unterscheiden sich hinsichtlich ihres hydrophoben Molekülteils, welcher zwischen 24 und 32 C-Atomen variiert.

Tab. 13: Chemische Strukturen der T-Reihe Lipide

Lipidstruktur	R1	R2	Abkürzung
	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	T12diLys
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	T14diLys
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	T14_16diLys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	T16diLys

Im Vergleich zu den linear angeordneten Kopfgruppen der E- und P-Reihen-Lipide konnte mittels der T-Reihen-Lipide die Transfektion gesteigert werden. Der Einfluss der Kopfgruppenfunktion auf die Transfektionseffizienz wird in einem späteren Kapitel (4.1.3) noch detaillierter erläutert. An dieser Stelle sollte nochmals der Kettenlängeneinfluss der kationischen Lipide auf die Transfektionsrate betrachtet werden. Bei den T-Reihen-Lipiden wurden dabei zusätzlich Strukturen mit C12-Ketten sowie unsymmetrischen Kettenlängen, wie im Beispiel von T14\_16diLys, untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden graphisch dargestellt (siehe **Abb. 22**).



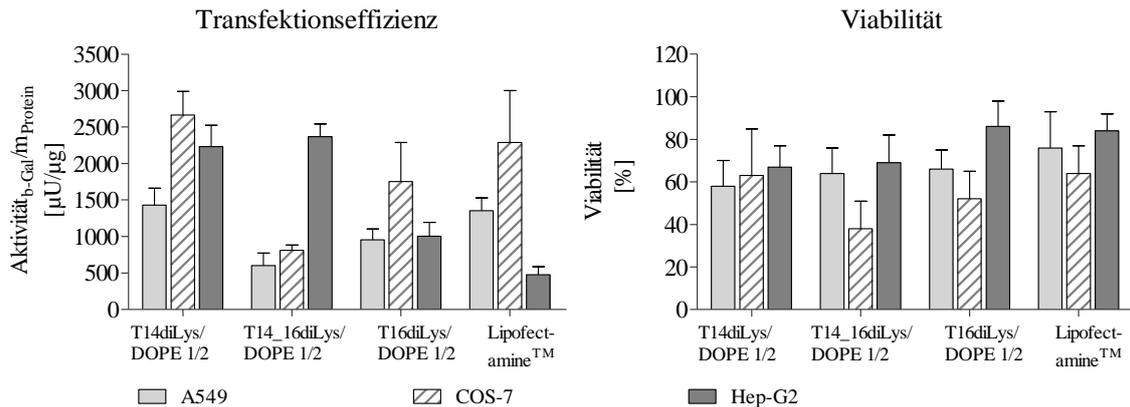
**Abb. 22:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der T-Reihen-Lipide an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ;  $p < 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Signifikant bessere Transfektionsergebnisse als die der Referenzsubstanz konnten für alle Lipide der T-Reihe ermittelt werden. Einzige Ausnahme stellte T12diLys dar, welches lediglich die Transfektionsrate von Lipofectamine™ erreichte. Die Lipide T14diLys und

T14\_16diLys waren in dieser Reihe die besten Vektoren und übertrafen die Transfektionseffizienz von Lipofectamine™ bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 5/2 um das 5-fache. Die Bewertung der Transfektionseffizienz in Bezug auf den Einfluss des hydrophoben Lipidbereiches der vorliegenden Arbeit konnten Untersuchungen von FELGNER et al. bestätigen. Sie ermittelten ebenfalls die höchste Effizienz bei einer Kettenlänge von 14 C-Atomen in einer vergleichenden Studie mit strukturanalogen kationische Lipide welche unterschiedlich lange gesättigte Kohlenwasserstoffketten aufwiesen.<sup>[50]</sup>

Weiterhin zeigen die MTT Ergebnisse von T14diLys, dass mit steigender Konzentration an kationischen Lipid die Verträglichkeit des Vektors vermindert war. So erreichte die Viabilität der Zellen bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 9/2 gerade noch 50%. Dabei konnte beobachtet werden, dass die gut transfizierenden Vektoren häufig höhere zellschädigende Wirkungen gegenüber weniger guten Systemen zeigten. Die erhöhte Toxizität der Vektorsysteme könnte sowohl durch Zellmembranschäden, ausgelöst durch Interaktionen der verwendeten Lipide mit den Membranlipiden, als auch von Abbauprodukten der kationischen Lipide hervorgerufen werden.<sup>[176]</sup> Eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen muss aber nicht zwangsweise nur auf toxische Effekte der kationischen Lipide zurückzuführen sein. So konnten Studien belegen, dass kationische Lipide und pDNA allein nur geringe toxische Effekte auf Zellen zeigten, hingegen die Kombination beider als Lipoplex die Toxizität signifikant steigerte.<sup>[177]</sup> Die Autoren wiesen an transfizierten Zellen eine erhöhte Aktivität bestimmter Gene nach. Vor allem Gene, welche an regulatorischen Prozessen, wie der Apoptose, beteiligt sind, waren aktiviert. Es ist somit denkbar, dass Störungen im genetischen Material der Zellen, ausgelöst durch die eingebrachte Fremd-DNA, durchaus zum Zelltod dieser führen kann. Weiterhin kann vermutet werden, dass das Absinken der Viabilität ebenso auf das gebildete Genprodukt zurückzuführen ist und sich negativ auf das Wachstum und die Vitalität der Zellen auswirkt.

Für weitere Untersuchungen wurden die Lipide der T-Reihe, analog zu den bereits beschriebenen Lipiden der E- und P-Reihe, an den beiden anderen Zelllinien getestet. Dabei zeigte sich auch bei den Lipiden der T-Reihe erneut eine Affinität zu Hep-G2 Zellen (siehe **Abb. 23**).



**Abb. 23:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys, T14\_16diLys und T16diLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen im jeweils optimierten Ladungsverhältnis;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Im Gegensatz zu den Lipiden der E- und P-Reihe konnte mit T14diLys ein Transfektionslipid ermittelt werden, welches vergleichbar gute Ergebnisse wie die Referenz (Lipofectamine™) an A549 Zellen erzielte und tendenziell an COS-7 besser transfizierte.

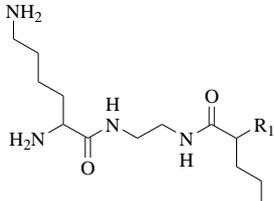
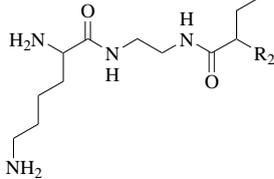
Die guten Transfektionseigenschaften von T14\_16diLys, welche an den Hep-G2 Zellen ermittelt wurden, konnten sich jedoch nicht an den beiden weiteren Zelllinien bestätigen, im Gegenteil: zusätzlich zu der geringen Effizienz an den COS-7 Zellen wurde eine erhöhte Toxizität dieses Vektors ermittelt.

#### 4.1.2 Kationische Transfektionslipide mit einer Gemini-Grundstruktur

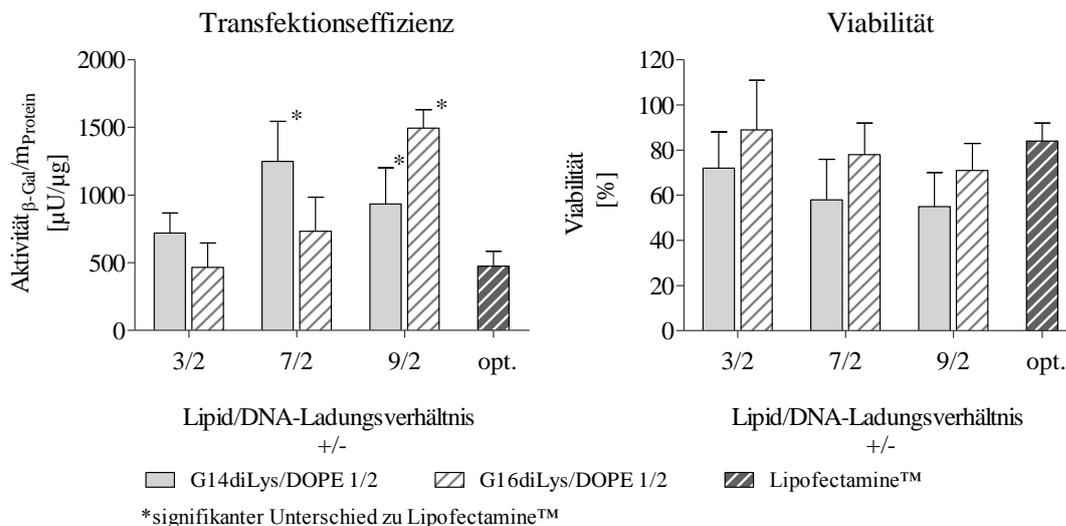
Eine weitere Gruppe neuartiger kationischer Transfektionslipiden stellen die Lipide der Gemini-Reihe dar. In der Literatur wird die Fähigkeit der Gemini-Strukturen als effektive Genfähren beschrieben. Gemini-Lipide sind in der Lage DNA in einem ausreichend hohen Maße zu binden.<sup>[46]</sup>

Der Spacer der hier verwendeten Lipide besteht aus einer C4-Grundstruktur. Die polaren Kopfgruppen werden wiederum durch die Aminosäure Lysin gebildet. Die hydrophobe Alkylkette der beiden sonst strukturanalogen Verbindungen unterscheidet sich hinsichtlich der Kettenlänge (siehe **Tab. 14**).

**Tab. 14:** Chemische Strukturen der Gemini-Lipide

Lipidstruktur	R1	R2	Abkürzung
	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	G14diLys
	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	G16diLys

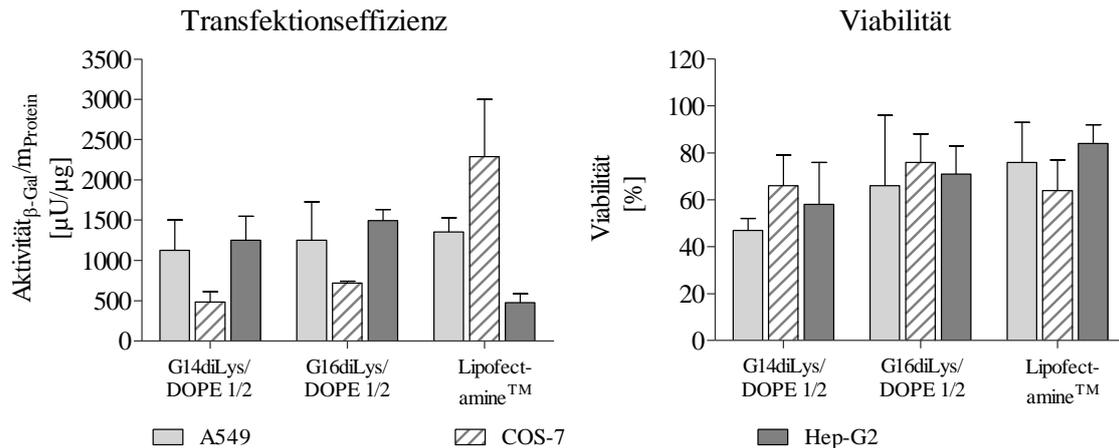
Um die Effektivität der vorgestellten Gemini-Lipide zu untersuchen, wurden wiederum Transfektions- und Zytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind dem folgenden Diagrammen zusammengefasst (**Abb. 24**).



**Abb. 24:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Gemini-Lipide G14diLys und G16diLys an Hep-G2 Zellen; Darstellung von drei verschiedenen Ladungsverhältnissen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ;  $p \leq 0,05$ ; (Referenz: Lipofectamine™, optimiertes Ladungsverhältnis)

Beide Lipide zeigten in der liposomalen Formulierung mit DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n) eine signifikant bessere Transfektionsleistung im Vergleich zur Referenz. Für das Erreichen der höchsten Effizienz wurden unterschiedliche Ladungsverhältnisse der Lipoplexe bestimmt: So erreichte die Formulierung von G14diLys bereits bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 7/2 im Lipoplex die maximale Transfektionsrate. Im Gegensatz dazu musste bei der strukturanalogen Verbindung G16diLys der Lipoplex ein (+/-)-Ladungsverhältnis von 9/2 aufweisen,

um die maximale Transfektionsrate zu erreichen. Weiterhin zeigte sich tendenziell eine erhöhte Toxizität von G14diLys gegenüber G16diLys bei allen dargestellten Ladungsverhältnissen. Die Verträglichkeit beider Vektoren sinkt mit zunehmender Konzentration an kationischem Lipid. Auch die Gemini-Lipide wurden an allen drei Zelllinien auf ihre Transfektion und Toxizität hin untersucht, die Ergebnisse sind nachfolgend kurz zusammengefasst (siehe **Abb. 25**).



**Abb. 25:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von G14diLys und G16diLys an A549, COS-7 und Hep-G2 Zellen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$ ; (Referenz: Lipofectamine<sup>TM</sup>, optimiertes Ladungsverhältnis)

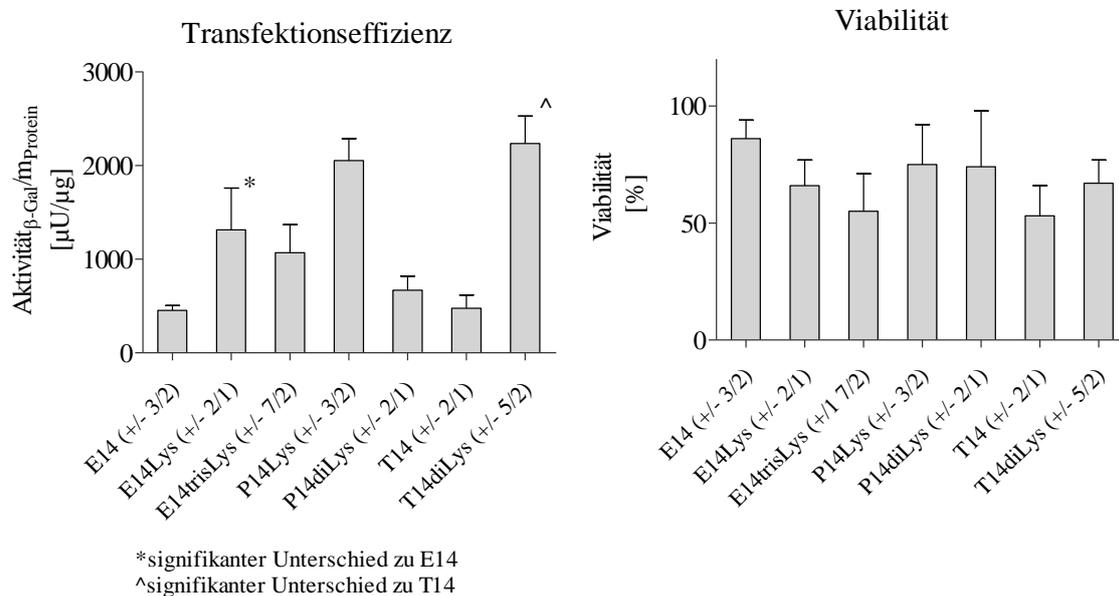
Bei den Gemini-Lipiden wurde neben der signifikant besseren Effizienz an Hep-G2 Zellen auch eine vergleichsweise gute Transfektion an A549 Zellen erreicht. Jedoch zeigten die Verbindungen auch ein erhöhtes zytotoxisches Potential, so sank die Viabilität der Lipidformulierung mit G14diLys an den A549 Zellen auf unter 50%. Die Transfektionseffizienz der Vektoren an COS-7 Zellen konnte nur ein unzureichendes Maß von ca. 20-30% der Referenzsubstanz erreichen.

#### 4.1.3 Einfluss der Kopfgruppe kationischer Lipidformulierungen auf die Transfektionseffizienz

Wie bereits aus den oben dargestellten Ergebnissen hervorgeht, spielen nicht nur Kettenlänge und Spacer für die Effizienz der Lipide eine wichtige Rolle, sondern vor allem auch die Struktur und Anordnung der ladungstragenden Kopfgruppe. So ist die treibende Kraft der Lipoplexbildung die elektrostatische Anziehung zwischen den positiv geladenen Kopfgruppen der kationischen Lipide und der negativ geladenen DNA. Um diese Anziehungskraft und damit die Effektivität der DNA-Komplexierung zu verstärken, liegt es nahe, die Ladung im Lipidmolekül durch Einführung weiterer basischer Strukturelemente zu erhöhen. Im Folgenden



ladungstragende Kopfgruppe, sowie weiterer Lipide mit größeren Kopfgruppenstrukturen aus der E- und P-Reihe (E14trisLys, P14diLys) sind nachfolgend dargestellt (**Abb. 26**).



**Abb. 26:** Darstellung der Transfektions- und Viabilitätsuntersuchungen kationischer Transfektionslipide mit verschiedenen Kopfgruppenstrukturen, dargestellt sind die Ergebnisse der jeweiligen Liposomenformulierung mit DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n), im optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis, an Hep-G2-Zellen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$

Die Transfektionseffizienz der Lipide E14 und T14 konnte durch Erhöhen der Anzahl an protonierbaren basischen Aminogruppen mittels Lysin als Kopfgruppe verbessert werden. Dabei erfolgte eine signifikante Steigerung der Effizienz bei dem Lipid E14 im Vergleich zu E14Lys um das Dreifache und bei den verzweigt angeordneten Kopfgruppen (T-Reihen-Lipide) sogar um das 5-fache (siehe **Abb. 26**). Die Transfektionslipide E14trisLys und P14diLys zeigten jedoch keine Steigerung der Transfektionsrate durch die zusätzlichen Lysinmoleküle in der Kopfgruppe gegenüber ihren Strukturanaloga E14Lys und P14Lys. Im Gegenteil, die Effizienz dieser Vektoren sank im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen. Damit zeigte sich, dass nicht immer eine höhere Anzahl an protonierbaren Gruppen im Lipidmolekül ein Garant für eine Steigerung der Effizienz des Transfektionssystems ist.<sup>[52,54]</sup>

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die Lipide mit verzweigt angeordneten Lysinmolekülen als effektiver erwiesen als die Verbindungen mit linearer angeordneter Kopfgruppe. So zeigte P14diLys eine geringere Effizienz als T14diLys. Die verzweigte Anordnung der Kopfgruppe, bedingt durch den Tris(2-aminoethyl)amin-Spacer, ermöglicht wahrscheinlich eine bessere Zugänglichkeit der positiven Ladung. Die 4 primären Aminogruppen, welche für die Komplexierung der pDNA zur Verfügung stehen, können somit durch den größeren Ab-

stand zueinander die Kondensierung der DNA erleichtern, sowie die protektive Wirkung gegen Nukleasen erhöhen.<sup>[179]</sup>

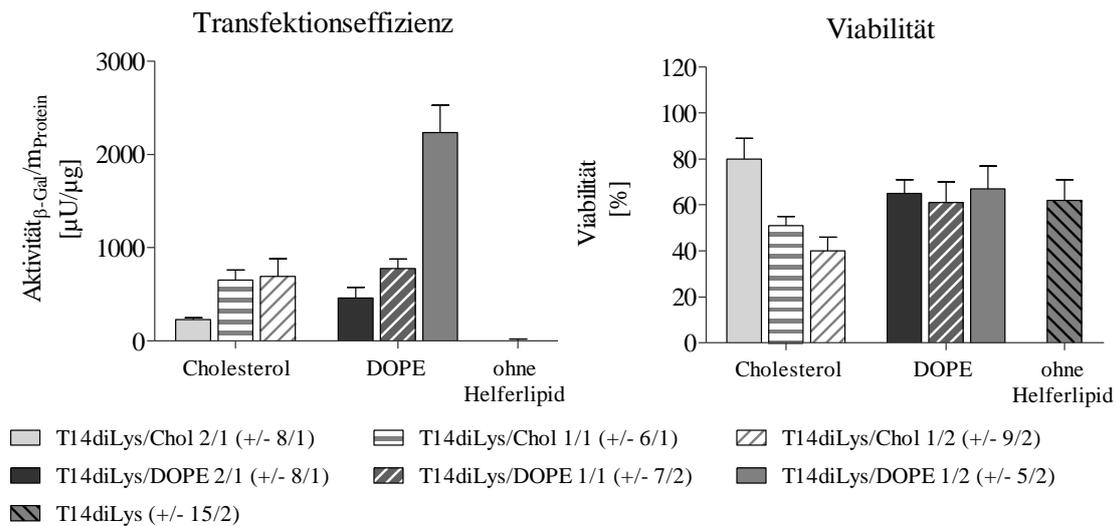
Wenn man neben der Effizienz auch die Viabilität der Systeme vergleicht, fällt auf, dass bei der Erhöhung der Anzahl an primären Aminogruppen im Molekül der E-Reihen-Lipide eine kontinuierliche Zunahme der toxischen Wirkung der Substanzen auf die Zellen zu verzeichnen war, obwohl die eingesetzte Stoffmenge an kationischen Lipid in der Reihenfolge E14 > E14Lys > E14trisLys im dargestellten Ladungsverhältnis sinkt ( $n_{\text{kat.Lipid}}$  pro Well je Ladungsverhältnis können dem Anhang entnommen werden). Im Gegensatz dazu konnte bei den P-Reihen-Lipiden kein Einfluss der Anzahl an primären Aminogruppen im Lipidmolekül auf die Viabilität ermittelt werden. Bei den T-Reihen-Lipiden zeichnete sich tendenziell sogar ein besseres Überleben der Zellen durch einführen der Lysin-Kopfgruppe ab.

#### 4.1.4 Einfluss des Helferlipids auf die Transfektionseffizienz

Die meisten Lipidformulierungen für den nicht-viralen Gentransfer weisen neben dem kationischen Transfektionslipid auch eine neutrale Helferlipidkomponente auf, die in unterschiedlichen Verhältnissen der Formulierung beigemischt wird. Häufig verwendete Helferlipide sind dabei das neutrale Phospholipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und Cholesterol. Wie bereits eingehend erwähnt ist DOPE in der Lage invers-hexagonale Phasen ( $H_{II}$ ) auszubilden und fördert besonders im sauren pH-Bereich die Fusion von Lipoplexen mit Membranlipiden, was eine Destabilisierung der Endosomenmembran und damit die Freisetzung des Lipoplexes, und somit auch der DNA, aus dem Endosom fördert.<sup>[180-181]</sup> DOPE zeigte sich als effizientes Helferlipid bei In-vitro-Untersuchungen. Im Gegensatz dazu stehen jedoch In-vivo-Untersuchungen in denen DOPE als ineffektiv beschrieben wurde.<sup>[182-183]</sup>

Cholesterol als amphiphiles Molekül kann sich durch seine OH-Gruppe in Lipidmembranen einlagern und durchspannt etwa die Hälfte der Dicke eines Bilayers.<sup>[184]</sup> Cholesterol erhöht die Lipidordnung in Membranen, bewahrt aber gleichzeitig deren Fluidität und Diffusionsrate. Diese Eigenschaften bergen für die In-vivo-Anwendung Vorteile. So wurde belegt, dass die Verwendung von Cholesterol als Helferlipid die Zirkulationszeit der Lipoplexe im Blutkreislauf erhöht und somit in In-vivo-Experimenten bessere Transfektionsraten im Vergleich zu DOPE erzielt werden konnte.<sup>[184-185]</sup>

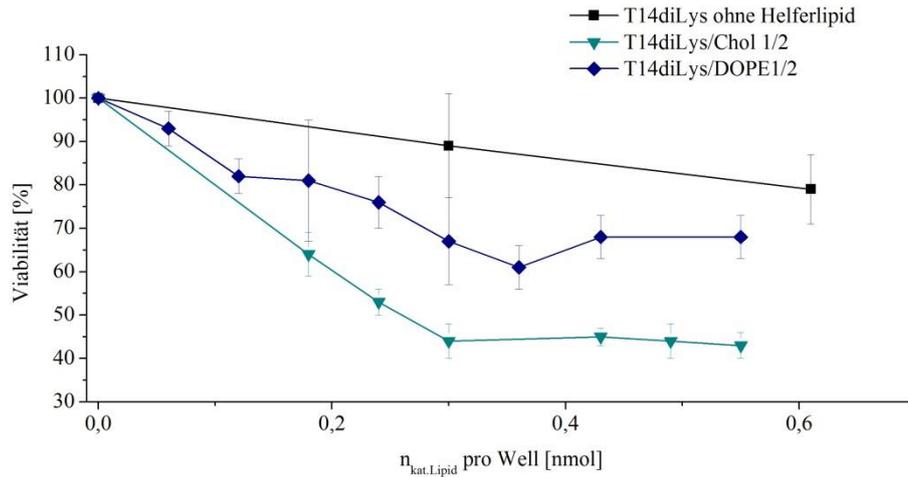
Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit des verwendeten Helferlipids wurden Untersuchungen mit Cholesterol und DOPE in verschiedenen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen durchgeführt. In der folgenden Abbildung (**Abb. 27**) sind die Transfektionsergebnisse von T14diLys mit DOPE und Cholesterol sowie ohne Helferlipid dargestellt.



**Abb. 27:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys mit DOPE und Cholesterol in verschiedenen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen, sowie ohne Helferlipid mit optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis an Hep-G2 Zellen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$

Ohne Helferlipid zeigte sich T14diLys als ineffektiver Gentransfervektor. Diese Beobachtung stimmt mit den aus der Literatur bekannten Erkenntnissen überein. Die Effizienz von T14diLys als Transfektionssystem wurde in Abhängigkeit des verwendeten Helferlipids und dessen eingesetzte Menge gesteigert. Wie aus **Abb. 27** hervorgeht, zeigten die Vektoren mit Cholesterol, gegenüber denen mit DOPE bei gleichen Stoffmengenverhältnissen, eine geringere Transfektionseffizienz. Besonders deutlich wurde die Überlegenheit von DOPE bei einem Verhältnis von 1/2 ( $n_{\text{kat.Lipid}}/n_{\text{DOPE}}$ ). Die Effizienz erhöhte sich um das 3-fache gegenüber dem vergleichbaren System mit Cholesterol.

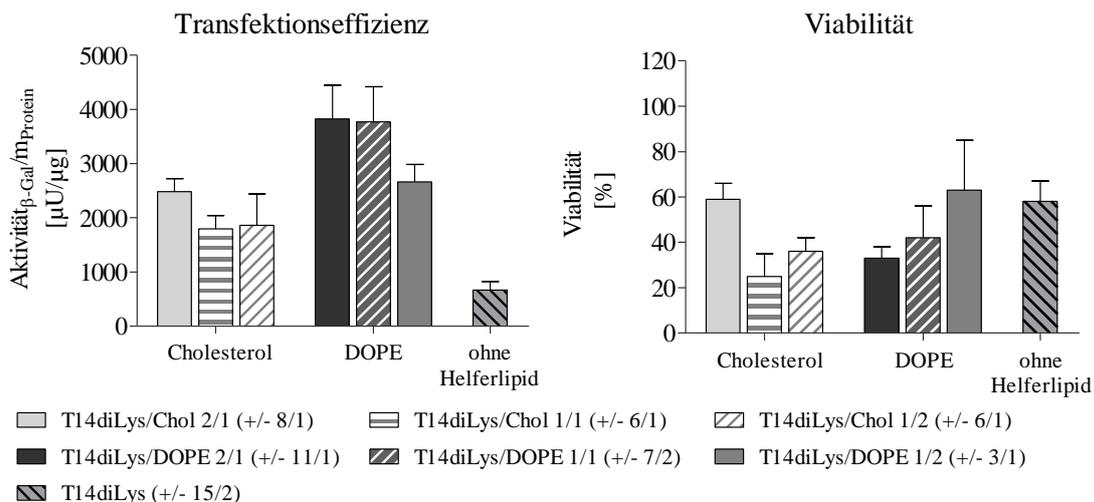
Neben der geringeren Effizienz als DOPE, hatten die Formulierungen mit Cholesterol zusätzlich eine stärkere schädigende Wirkung auf die Zellen. Dabei sank die Viabilität bei einem Stoffmengenverhältnis von 1/2 ( $n_{\text{kat.Lipid}}/n_{\text{Cholesterol}}$ ) auf unter 50%. Hingegen wiesen die Formulierungen mit DOPE eine Viabilität auf, welche vergleichbar mit der Lipidformulierung ohne Helferlipid war. Allerdings ist anzumerken, dass die Ergebnisse mit unterschiedlichen Stoffmengen an kationischen Lipid erhalten wurden. Daher wurden die Viabilitäten der Mischungen mit DOPE und Cholesterol von 1/2 ( $n/n$ ) im Folgenden gegen die eingesetzte Stoffmenge an kationischem Lipid je Well dargestellt.



**Abb. 28:** Darstellung der Viabilitätsdaten der Lipoplexformulierungen von T14diLys mit DOPE und Cholesterol im Verhältnis 1/2 (n/n) an Hep-G2 Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Stoffmenge an kationischem Lipid je Well

Wie aus **Abb. 28** zu entnehmen ist, nahm die Viabilität der Zellen mit zunehmender Stoffmenge an eingesetztem Lipid ab. Dabei beeinflusste die Formulierung ohne Helferlipid die Zellviabilität am geringsten, gefolgt von der Formulierung mit DOPE. Die höchste toxische Wirkung übten die Lipoplexe mit Cholesterol aus. Dabei sank die Viabilität der Zellen im Vergleich zu nichtbehandelten auf ca. 40% ab.

Der Einfluss des Helferlipides auf die Transfektion wurde weiterhin an COS-7 Zellen untersucht. Dabei konnte die gute Transfektionsleistung der Lipidformulierungen mit DOPE bestätigt werden, wie folgendes Balkendiagramm (**Abb. 29**) zeigt.



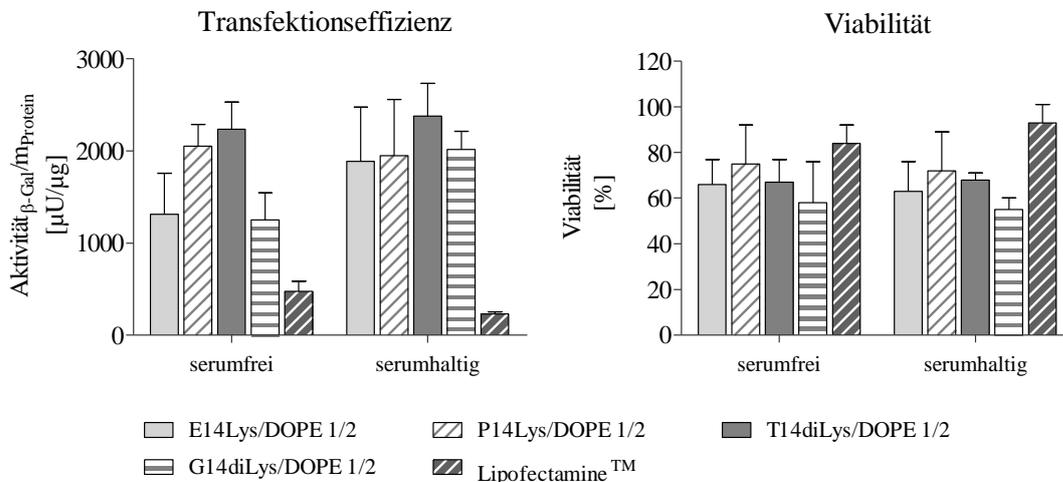
**Abb. 29:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse von T14diLys mit DOPE und Cholesterol in verschiedenen Lipid/Helferlipid-Verhältnissen sowie ohne Helferlipid mit optimierten (+/-)-Ladungsverhältnis an COS-7 Zellen;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$

Auffällig ist, dass T14diLys ohne Helferlipid bereits in einem, wenn auch nur geringem Maße, COS-7 Zellen transfizieren konnte. Die Effizienz wurde durch die Verwendung von Cho-

lesterol und DOPE als Helferlipide gesteigert, wobei erneut bessere Transfektions- und Viabilitätsergebnisse mit DOPE als Helferlipid erzielt werden konnte.

#### 4.1.5 Serumeinfluss auf die Transfektionseffizienz

Der Einfluss von Serum auf die Transfektionsleistung der neuen Transfektionslipide sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Daher wurden ausgewählte Transfektionssysteme ohne ein serumfreies Inkubationsintervall auf ihre Effizienz hin getestet. Die Präparation der Lipoplexe erfolgte zunächst ohne Serum, um die Komplexierung der pDNA zu gewährleisten. Nach 15-minütiger Inkubation von pDNA und Lipidformulierung wurde im anschließenden Verdünnungsschritt (wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben) Serum zugeben. Die Endkonzentration an Serum betrug 10%. Im Folgenden sind einzelne Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe dargestellt (**Abb. 30**). Die vollständigen Daten befinden sich im Anhang. Die Ergebnisse der Transfektionseffizienz stellen jeweils die empirisch ermittelten besten (+/-)-Ladungsverhältnisse der einzelnen Transfektionssysteme und die dazugehörigen Viabilitäten dar.



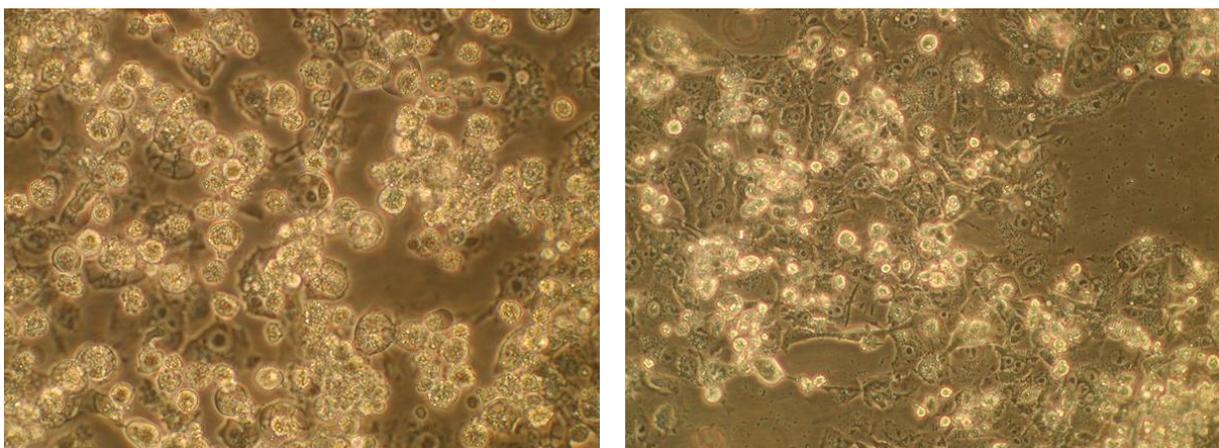
**Abb. 30:** Transfektions- und Viabilitätsergebnisse ausgewählter Transfektionslipide mit dem Helferlipid DOPE im Verhältnis 1/2 (n/n), an Hep-G2 Zellen, mit und ohne serumfreies Inkubationsintervall;  $\bar{x} \pm s$ ;  $n \geq 3$

Die Referenzsubstanz Lipofectamine™ zeigte bei den Versuchen ohne serumfreies Inkubationsintervall eine Erniedrigung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Die Aktivität sank auf 50% im Vergleich zu den Ergebnissen mit serumfreiem Inkubationsintervall. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Lipidformulierungen der kationischen Lipide auf Basis verzweigter Fettsäuren und der Gemini-Lipide als serumstabil. Die Transfektionseffizienz wurde nicht durch die Anwesenheit von Serum erniedrigt. E14Lys und G14diLys zeigten sogar tendenziell eine Steigerung der Transfektionsrate. Die Toxizität wurde dabei nicht signifikant beeinflusst.

#### 4.1.6 Untersuchungen zum stabilen Einbau von pDNA

Transfektionsuntersuchungen welche in einem Zeitraum von 12 bis 72 Stunden erfolgen zählen zu den transienten Assays. Da in der Regel die DNA-Aufnahme in diesem Zeitraum abgeschlossen ist gleichzeitig aber der DNA-Abbau durch Nukleasen beginnt, wird die eingebrachte DNA nach kurzer Zeit wieder aus der Zelle entfernt. Die transiente Transfektion ist somit zeitlich begrenzt und führt größtenteils nicht zu einer chromosomalen Integration der Fremd-DNA.<sup>[150,186]</sup> Für viele molekularbiologische Fragestellungen ist es jedoch nötig eine neue, stabile Zelllinie mit einer chromosomalen Integration der gewünschten Fremd-DNA zu etablieren. Die Transfektionsprotokolle für einen stabilen Einbau basieren dabei häufig auf den Standardprotokollen zur transienten Transfektion, wobei als Expressionsvektor meist pDNA mit einem Selektionsmarker, welcher eine Antibiotikaresistenz vermittelt, verwendet wird. Nur Zellen welche das Resistenzgen erfolgreich in das Genom eingebaut haben wachsen in einem Medium mit dem spezifischen Antibiotikum, nicht transfizierte Zellen sterben hingegen ab.

Um neben dem Screening neuartiger kationischer Lipide auf ihre Transfektionsleistung auch eine Untersuchung zum stabilen Einbau mit Selektionsmedium durchzuführen, wurden mittels des Transfektionssystems T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) und der pDNA pEGFP-C2, Hep-G2 Zellen transfiziert und anschließend mit Selektionsmedium kultiviert (siehe Kapitel 3.2.4). Die Untersuchungen der transfizierten und nichttransfizierten Hep-G2 Zellen, welche bereits 7 Tage mit Selektionsmedium kultiviert wurden, ergaben folgende mikroskopische Bilder (siehe **Abb. 31**).

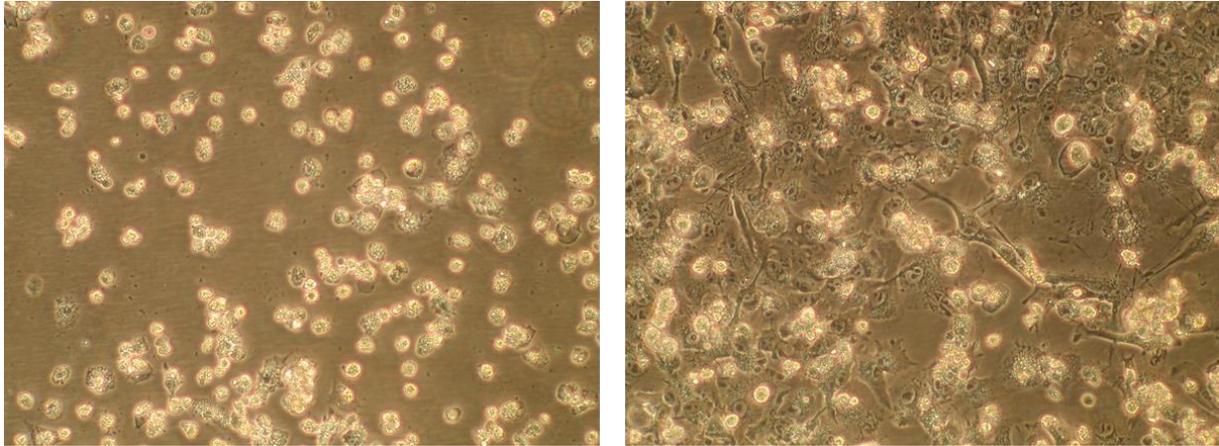


**Abb. 31:** Selektionsversuche; 7 Tage nach Kultivierung mit Selektionsmedium, **links:** Kontrolle der nicht transfizierten Zellen Vergrößerung 1:400, **rechts:** transfizierte Hep-G2 Zellen; Vergrößerung 1:200

In **Abb. 31** ist zu erkennen, dass sich die Zellen nach ca. 7 Tagen durch Schädigung des Antibiotikums teilweise vom Untergrund abzulösen begannen. Eine stärker zellschädigende Wir-

kung von G418 war bei der Kontrollreihe ersichtlich. Wie links in der **Abb. 31** zu erkennen ist, lösten sich mehr Zellen als bei der transfizierten Probe vom Untergrund ab.

Durch Weiterkultivierung mit Selektionsmedium wurden die unterschiedlichen Auswirkungen des Antibiotikums auf die beiden Zellkulturen immer deutlicher (siehe **Abb. 32**).



**Abb. 32:** Selektionsversuche; 10 Tage nach Kultivierung mit Selektionsmedium, **links:** Kontrolle der nicht transfizierten Zellen, **rechts:** transfizierte Hep-G2 Zellen; Vergrößerung 1:200

Während sich bei den transfizierten Zellen langsam ein geschlossener Zellrasen ausbildete (**Abb. 32**, rechts), waren bei der nichttransfizierten Kontrollreihe durch die schädigende Wirkung von G418 immer mehr Lücken und kuglig geformte Zellen zu erkennen (links). Die Zellen ohne Resistenzgen wuchsen nach 10 Tagen nicht mehr adhären am Kulturgefäß. Nach 14 Tagen lösten sich auch die restlichen Zellen der Kontrollreihe von der Zellkulturflasche ab. Die Kultur wurde somit verworfen. Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte über 5 Monate. Von einer klonalen Selektion wurde abgesehen, da eine genetisch einheitliche Zelllinie für diese Fragestellung nicht notwendig erschien.

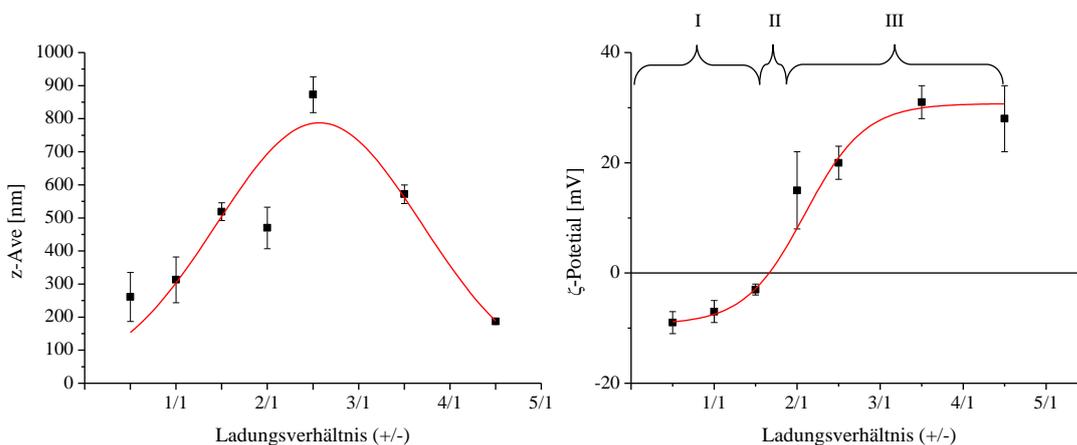
Die Untersuchungen zeigen, dass ein Transfektionsprotokoll für die stabile Transfektion mittels kationischer Lipide auf Basis  $\alpha$ -verzweigter Fettsäureamide aufgestellt werden konnte.

## 4.2 Charakterisierung von Lipid- und Lipoplexformulierungen

Neben der Ermittlung von Transfektionseffizienzen und Zytotoxizitäten der Lipidformulierungen auf die Zellkulturen wurden diese hinsichtlich ihrer Partikeleigenschaften charakterisiert. Für die Bestimmung der Partikelgrößen sowie der Partikelgrößenverteilung wurden PCS-Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Partikelgrößenbestimmung herangezogen, wodurch zusätzlich Informationen über die Partikelformen erhalten werden konnten. Um Aussagen über die Partikeloberflächenladung zu erhalten, wurde das Zeta-Potential mittels Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt.

#### 4.2.1 Bestimmung von Partikelgrößen und Zeta-Potential ausgewählter Lipid- und Lipoplexformulierungen

Die Charakterisierungen zur Ermittlung von Strukturveränderungen nach Zugabe von pDNA zur Lipidformulierung wurde mit T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) durchgeführt. Diese Formulierung wurde ausgewählt, da sie (wie in Kap. 4.1.1.3 belegt) gute Transfektionsleistungen erzielte. Bei der Analyse dieses Transfektionssystems zeigte sich zudem eine ladungsabhängige Transfektionseffizienz, wobei positiv geladene Lipoplexe eine bessere Transfektionseffizienz gegenüber Partikeln mit negativer Nettoladung aufwiesen (graphische Darstellung siehe Anhang). Diese Beobachtung geht mit Literaturangaben einher, wobei für die bessere Transfektionsleistung der positiv geladenen Lipoplexe eine stärkere Interaktion mit den Zellmembranen der Zielzellen im Vergleich zu Lipoplexen mit negativer Ladung diskutiert wurde.<sup>[73,187]</sup> Weiterhin ging aus den Transfektionsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit hervor, dass die Transfektionseffizienz kontinuierlich bis zu einem bestimmten Ladungsverhältnis anstieg. Ein weiteres Erhöhen des Lipidanteils im Lipoplex bewirkte jedoch dann keine Steigerung der Effizienz mehr. Auch diese Beobachtung stimmen mit Angaben aus der Literatur überein.<sup>[181]</sup> Die Herstellung der einzelnen Lipoplexe bei unterschiedlichen (+/-)-Ladungsverhältnissen erfolgte, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Anschließend wurden diese am Zetasizer Nano-ZS vermessen und die erhaltenen Partikelgrößen sowie Zeta-Potentiale in Abhängigkeit vom (+/-)-Ladungsverhältnis graphisch dargestellt (siehe **Abb. 33**).



**Abb. 33:** Graphische Darstellung zur Partikelcharakterisierung der Lipoplexe von T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) mit pCMV·SPORT-βgal; **links:** Partikelgröße in Abhängigkeit vom (+/-)-Ladungsverhältnis, Gauß-Fit; **rechts:** ζ-Potential in Abhängigkeit vom (+/-)-Ladungsverhältnis, nicht lineare Kurvenanpassung, Boltzmann (Parameter der Kurvenanpassungen siehe Anhang)

Es zeigte sich, dass mit steigendem Ladungsverhältnis der Durchmesser der Lipoplexe bis zum Erreichen eines Maximum von ca. 900 nm bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 5/2 anstieg. Durch weitere Erhöhung der positiven Ladung im Lipoplex (durch Erhöhung des

Lipidanteils in der Formulierung) sank die Größe der Partikel schließlich auf 200 nm ab. Diese Partikelgröße entsprach annähernd dem Partikeldurchmesser der Lipoplexe bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/2. (siehe **Abb. 33**, links). Die Untersuchungen des Zeta-Potentials im Vergleich zum (+/-)-Ladungsverhältnis ergaben drei Regionen in welche die Partikelladung eingeteilt werden konnte (siehe **Abb. 33**, rechts). Zunächst waren die Partikel aufgrund der noch nicht vollständig komplexierten DNA negativ geladen (Region I). Durch Erhöhen des Anteils an kationischen Lipid im Lipoplex stieg die Partikelladung an, sodass die Kurve bei einem Verhältnis von ca. 2/1 die y-Achse schnitt (Region II). Anschließend stieg das Zeta-Potential im positiven Bereich weiter und näherte sich bei 30 mV dem Potential der Liposomendispersion (ohne pDNA) an (Region III). Im Gegensatz zu anderen Arbeiten war das Kurvenmaximum der Partikelgröße und der Ladungsneutralpunkt jedoch nicht deckungsgleich: die Werte differierten um ca. 0,5 (+/-)-Einheiten.<sup>[188]</sup> Des Weiteren erreichte der Vektor den theoretischen Ladungsneutralpunkt nicht bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/1 sondern erst zwischen 3/2 und 2/1. Zu erklären ist diese Beobachtung möglicherweise durch folgenden Sachverhalt: Für die Berechnung des (+/-)-Ladungsverhältnisses wurde für das Lipid T14diLys (mit 4 primären Aminogruppen) 4 positive Ladungen pro Molekül angenommen. Wahrscheinlich sind jedoch nicht alle Aminogruppen an der Komplexierung der pDNA beteiligt, sodass das berechnete (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/1 vom experimentell bestimmten Ladungsneutralpunkt abweicht und somit mehr kationisches Lipid, zur vollständigen Komplexierung der pDNA benötigt wurde.

#### **4.2.2 Vergleichende Untersuchungen zur Partikelgröße: Partikelgrößenanalyse mittels PCS und Transmissionselektronenmikroskopie**

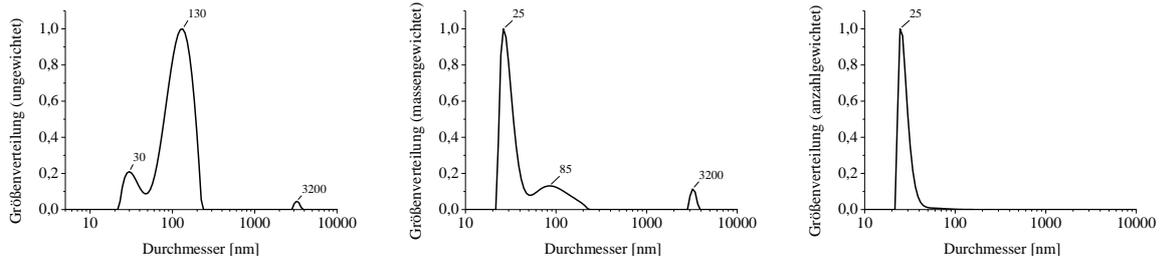
Für weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Partikeleigenschaften von Lipid- und Lipoplexformulierungen auf Basis verzweigter Fettsäuren wurde exemplarisch die Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) und verschiedene Lipoplexe dieser Formulierung neben der Analyse mittels PCS auch mit der Transmissionselektronenspektroskopie (TEM) analysiert.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete PCS ist eine vielverwendete Methode zur Charakterisierung von Nanopartikeln hinsichtlich Größe und Größenverteilung.<sup>[159]</sup> Dabei beruht die Ermittlung der Partikelgröße auf einer zeitabhängigen Messung von Intensitätsfluktuationen der Streulichtsignale. Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgt über eine Autokorrelationsfunktion, welche den dynamischen Prozess der Diffusionsbewegung der Partikel, aufgrund der BROWN'schen Molekularbewegung, beschreibt. Aus dem konditionellen Diffu-

sionskoeffizienten kann dann mit Hilfe der STOKES-EINSTEIN-Beziehung der hydrodynamische Teilchenradius errechnet werden (siehe Kapitel 3.3.1). Für monodisperse Partikel gilt ein exponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion durch Vorliegen einer reinen Translationsbewegung der Teilchen. Polydisperse Systeme hingegen enthalten unterschiedlich große Teilchen, welche entsprechend ihrer Größe verschiedene Diffusionskoeffizienten besitzen. Dadurch kann die Korrelationsfunktion nicht mehr durch eine einfache Exponentialfunktion ausgedrückt werden, sondern stellt eine Überlagerung vieler Exponentialfunktionen dar.<sup>[189]</sup> Für die Annäherung an diese komplexe Funktion existieren verschiedene methodische Ansätze welche von STOCK und RAY ausführlich auf Vor- und Nachteile diskutiert wurden.<sup>[190]</sup> Die von Malvern für die Berechnung der mittleren Teilchengröße (z-Average-Wert) verwendete Kumulantenanalyse ist eine vergleichsweise einfache Methode zur Annäherung der Autokorrelationsfunktion und ist strenggenommen nur auf monodisperse Systeme anwendbar.<sup>[159,163]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kumulantenanalyse als Standardmethode zur Auswertung der Autokorrelationsfunktionen verwendet und der mittlere Partikeldurchmesser als z-Average-Wert sowie der PDI als Maß für die Partikelgrößenverteilung angegeben. Der PDI-Wert einiger Lipid- und Lipoplexformulierungen wies jedoch auf eine polydisperse Partikelgrößenverteilung hin ( $PDI > 0,25$ ). Daher wurden im Folgenden für die Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) und deren Lipoplexe mit den (+/-)-Ladungsverhältnissen 1/2, 2/1 und 9/2, zusätzlich zu den ermittelten z-Average-Werten, die ungewichteten, massengewichteten und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungskurven dargestellt. Als Berechnungsgrundlage für die Partikelgrößenverteilungskurven diente ein exponentieller Fit (Fit-Modell siehe Anhang). Weiterhin wurden die Partikelgrößen aus der PCS-Analyse mit den erhaltenen (TEM)-Aufnahmen der einzelnen Proben verglichen.

Lipidformulierung: T14diLys/DOPE 1/2 (n/n)

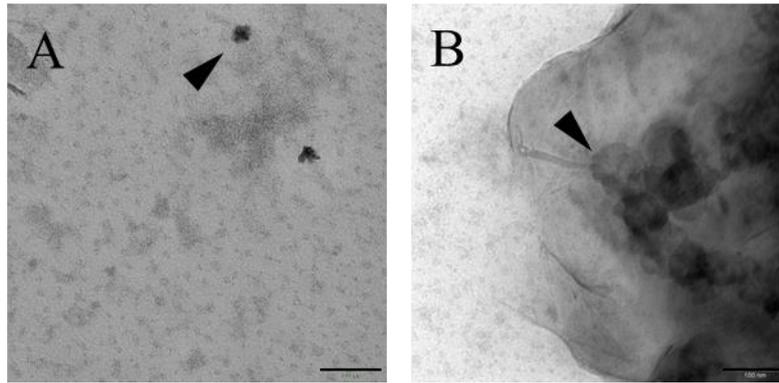
Für die Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) wurden positiv geladene Partikel ( $\zeta$ -Potential:  $38 \pm 6$  mV) mit einem z-Average-Wert von  $81 \pm 21$  nm und einem PDI von 0,26 bestimmt. Die Partikelgrößenanalyse ergab für die ungewichtete Größenverteilungskurve drei Partikelpopulationen mit den Maxima bei 30, 130 und 3200 nm (**Abb. 34**, links).



**Abb. 34:** Partikelgrößenverteilung der Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) als ungewichtet, massengewichtete und anzahl-gewichtete Darstellung (von links nach rechts)

Die höchste Peakintensität der ungewichteten Größenverteilungskurve wurde bei dem mittleren Peak (130 nm) ermittelt. Im Vergleich dazu verschob sich die Lage der höchsten Peakintensität bei der massengewichteten Darstellung zum ersten Peak, welcher in dieser Verteilungskurve bei 25 nm lag (siehe **Abb. 34**, mittlere Darstellung). Die zweite Partikelpopulation wurde in dieser Darstellung bei 85 nm mit einer Peakintensität von ca. 0,2 bestimmt. Der dritte Peak blieb unverändert bei einem Partikeldurchmesser von 3200 nm. Für die anzahl-gewichtete Darstellung der Partikelgrößenverteilung wurde lediglich ein schmaler Peak, dessen Maximum bei 25 nm lag ermittelt (siehe **Abb. 34**, rechte Darstellung). Die Verschiebung der Peakintensitäten liegt in der Umrechnung der Verteilungskurven begründet (Berechnungsgrundlage siehe Anhang). So ist für monodisperse Proben die Umrechnung der ungewichteten Partikelgrößenverteilung zur massen- sowie anzahl-gewichteten Verteilung relativ unproblematisch. Anders gestaltet sich dies bei polydispersen Proben, in welchen sowohl kleine als auch große Partikel enthalten sind. So bewirken größere Partikel eine höher prozentuale Streulichtintensität bei der ungewichteten Partikelgrößenverteilung als kleine Partikel. Nach der Umrechnung zur massen- und anzahl-gewichteten Verteilung fallen größere Partikel nicht mehr so stark ins Gewicht. Im Allgemeinen ist die Angabe von massen- oder anzahl-gewichteten Partikelgrößenverteilungen für polydisperse Proben repräsentativer als die der ungewichteten Angabe.

Zur Überprüfung der erhaltenen z-Average-Werte sowie der Größenverteilungskurven, wurden TEM-Aufnahmen der beschriebenen Liposomen angefertigt. Dies ermöglichte neben der Abschätzung der Partikelgröße auch eine Vorstellung über die Form der Partikel zu erlangen (siehe **Abb. 35**).



**Abb. 35:** TEM-Aufnahmen der Liposomen T14diLys/DOPE 1/2 (n/n); Proben mit Uranylacetat (1%) kontrastiert; Balken entspricht 100 nm

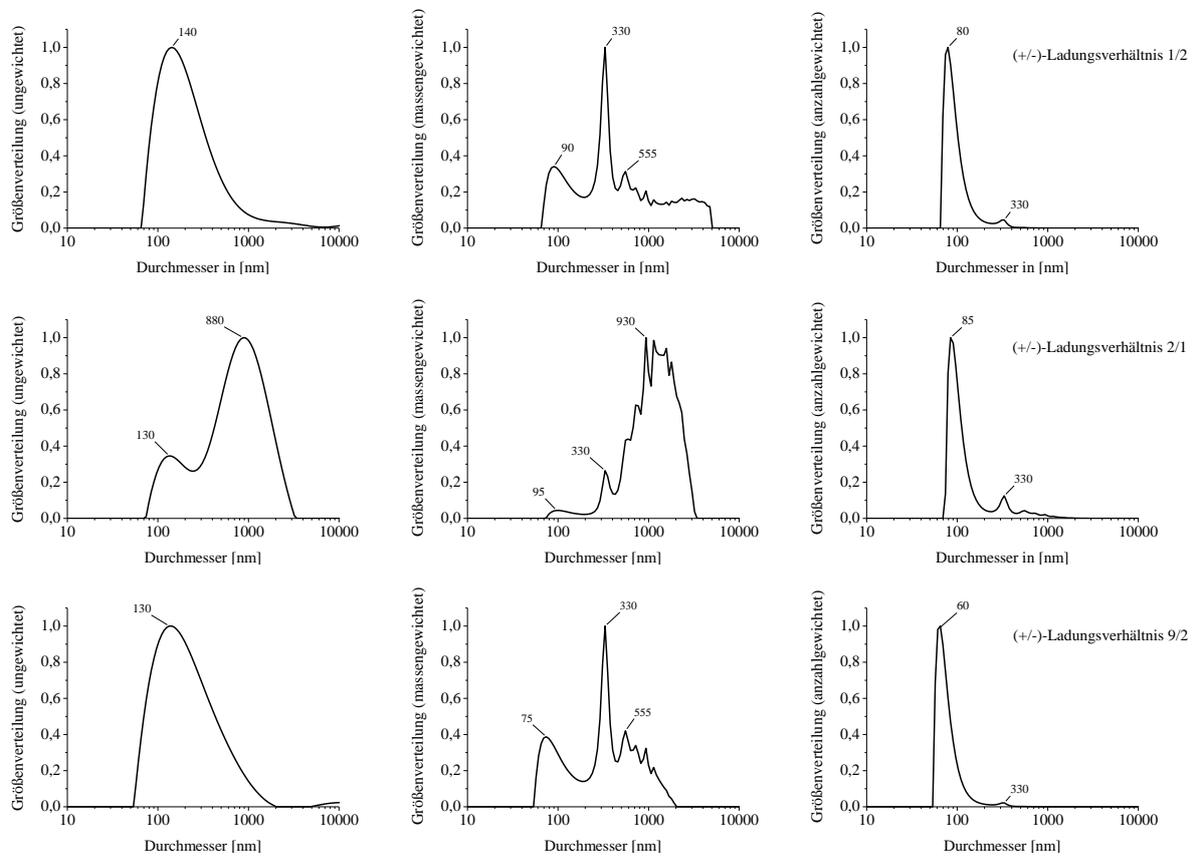
Wie in **Abb. 35** zu erkennen ist, zeigten die Aufnahmen der Liposomendispersion des kationischen Lipids T14diLys in einem 1/2 (n/n) Mischungsverhältnis mit DOPE kleine Aggregate mit einer Größe von etwa 30 nm (**Abb. 35**, Bild A). Weiterhin sind in Bild A sehr kleine diffus verteilte Aggregate erkennbar, welche entweder auf die Präparation mit Uranylacetat zurückzuführen sind, oder reines DOPE bzw. kationisches Lipid darstellen. Das Vorhandensein von mizellaren Lipidaggregaten kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da mittels der DLS keine Partikelgrößen unter 10 nm ermittelt werden konnten. Größere Strukturen mit einer Partikelgröße von ca. 60 nm konnten lediglich im Randbereich des Grids auffindig gemacht werden (**Abb. 35**, Bild B). Dies ist vermutlich auf die Präparation der Probe zurückzuführen. So können, durch die Probenpräparation die Liposomen an den Randbereich gezogen worden sein.

Im Vergleich der beiden Partikelgrößenanalysen zeigte sich, dass die Partikelgrößenbestimmung mittels DLS unter Angabe des z-Average-Wertes größere Werte als die der mikroskopischen Methode lieferte. Auch die ungewichtete Größenverteilung zeigt bei größeren Partikeln die maximale Peakintensität. Am besten stimmen die massen- und anzahlgewichteten Verteilungskurven mit den mikroskopischen Aufnahmen überein.

Lipoplexformulierungen: T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) / pCMV-SPORT-βgal bei den (+/-)-Ladungsverhältnissen von 1/2, 2/1 und 9/2

Für das Vektorsystem T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) mit pDNA wurden bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/2 negativ geladene Partikel ( $\zeta$ -Potential:  $-9 \pm 2$  mV) mit einem z-Average-Wert von  $261 \pm 74$  nm und einem PDI von 0,25 bestimmt. Durch Erhöhen der positiven Ladung konnten bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 2/1 positiv geladene Partikel ( $\zeta$ -Potential:  $15 \pm 7$  mV) mit einem z-Average-Wert von  $470 \pm 63$  und einem PDI von 0,50 bestimmt. Beim weiteren Erhöhen der positiven Ladung nahm die Lipoplexgröße ab. So wurde bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 9/2 ein z-Average-Wert von  $187 \pm 7$  nm mit einem

PDI von  $0,36$  sowie ein Zeta-Potential von  $28 \pm 6$  mV ermittelt. Im Folgenden sind die ungewichteten, massengewichteten und anzahlgewichteten Größenverteilungskurven (von links nach rechts) dieser Proben dargestellt (**Abb. 36**).

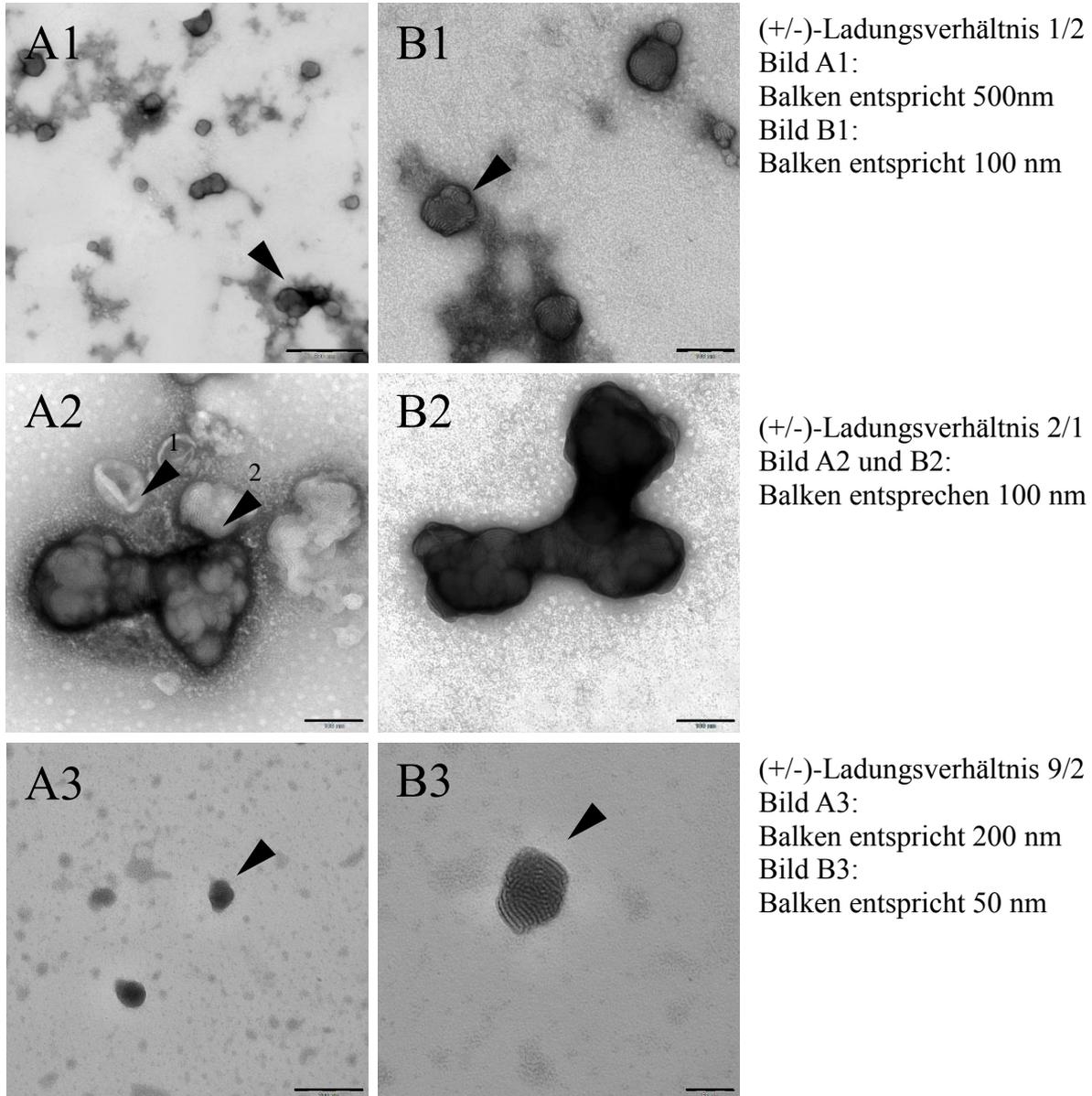


**Abb. 36:** Darstellung der Partikelgrößenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe: T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) / pCMV-SPORT- $\beta$ gal bei den (+/-)-Ladungsverhältnissen 1/2, 2/1 und 9/2 (von **oben** nach **unten**), Größenverteilung als ungewichtete, massengewichtete und anzahlgewichtete (von **links** nach **rechts**)

Die ungewichteten Verteilungskurven aller drei Proben zeigen eine breite Verteilung, was auf polydisperse Proben schließen lässt und die ermittelten PDI-Werte bestätigt. Die Verteilungskurven der Proben mit einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/2 und 9/2 ähneln sich, wobei in der massengewichteten Darstellung die drei höchsten Peakintensitäten bei 90 bzw. 75 nm, 330 und 555 nm ermittelt wurden. Die ungewichtete Verteilungskurve bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 2/1 (**Abb. 36**, Mitte, linker Graph) lässt zwei Partikelpopulationen bei 130 und 880 nm vermuten. Auch die massengewichtete Darstellung dieser zeigte eine sehr breite Verteilung mit großen Partikeln. Die anzahlgewichtete Darstellung hingegen zeigte einen Haupt-Peak bei 85 nm und mehrere kleine Partikelgrößenpopulationen ab 330 nm.

Die TEM-Aufnahmen des Lipoplexes bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 1/2 bestätigten das Vorhandensein von Partikeln unterschiedlicher Größen (siehe **Abb. 37**, Bilder A1, B1). So wurden neben kleineren Aggregaten mit einer Größe um 100 nm auch Partikel mit Größen über 300 nm ermittelt. In **Abb. 37** (Bild A1 und B1) weisen die Pfeile auf Überstrukturen der

Lipoplexe hin. Die Kontrastierung der Komplexe lässt dabei eine lamellare Struktur der Lipoplexe vermuten. Weiterhin konnte eine beginnende clusterartige Anordnung Lipid/DNA-Aggregate beobachtet werden. Somit konnte mittels der TEM-Aufnahme eine Vorstellung über Lipoplexgröße und -form erhalten werden.



**Abb. 37:** TEM-Aufnahmen der Lipoplexe T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) / pCMV-SPORT-βgal, (+/-)-Ladungsverhältnissen (von **oben** nach **unten**): 1/2, 2/1 und 9/2; Proben mit Uranylacetat (1%) kontrastiert

Die TEM-Aufnahmen der Lipoplexe bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 2/1 (**Abb. 37** Bilder A2 und B2) zeigen sehr unterschiedliche Strukturen. So weist Pfeil 1 in Bild A2 auf ein durch Trocknung geplatzt Liposom hin, welches vermutlich nicht an der Komplexierung der DNA beteiligt war. Weiterhin sind Aggregate, in denen erneut die multilamellare Struktur der Lipoplexe vermutet werden kann (Pfeil 2), erkennbar. In Bild B2 sind deutlich Regionen mit stark komplexierter DNA zu erkennen. In diesen Aggregaten kann ein nahezu vollständi-

ger Ladungsausgleich vermutet werden, sodass sich die Partikel aufgrund fehlender elektrostatischer Abstoßung zu großen clusterförmigen Aggregaten zusammen lagern. Wie schon mit der PCS-Analyse konnten auch mit Hilfe der TEM-Aufnahmen mehrere Partikelpopulationen in der Probe ermittelt werden. Dabei scheinen die großen clusterförmigen Strukturen anteilig in der Probe vorzuherrschen. Diese Beobachtungen stimmen somit mit den Angaben der ungewichteten und der massengewichteten Partikelgrößenverteilung am besten überein.

Die Analyse der Lipoplexe mit einem hohen Überschuss an kationischem Lipid im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Menge ((+/-)-Ladungsverhältnis von 9/2) wiesen kleinere Partikel als die Probe bei einem (+/-)-Ladungsverhältnis von 2/1 auf. Es wurde mittels der mikroskopischen Aufnahme aus **Abb. 37** (Bild A3 und B3) ein Größenbereich der Lipoplexe von ca. 100 nm ermittelt. Bild B3 zeigt erneut eine scheinbar multilamellare Struktur des Lipid/DNA-Komplexes. Clusterartige Strukturen mit einer Partikelgröße > 500 nm, wie die ungewichtete und massengewichtete Verteilungskurve zunächst vermuten ließ, wurden jedoch nicht ermittelt.

Mittels der PCS konnte in dieser Arbeit auf Strukturveränderungen der Lipidformulierung bei der Lipoplexbildung hingewiesen werden. Jedoch ist diese Analysenmethode, besonders bei polydispersen Systemen sowie nicht sphärischen Partikeln, allein nicht aussagekräftig und bedarf daher weiterer Methoden zur Strukturaufklärung von Partikeln. So konnte mit den in dieser Arbeit gezeigten TEM-Aufnahmen eine Vorstellung über Form und Größe der Lipidaggregate sowie der Lipoplexe des Transfektionssystem T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) gewonnen werden. Weitere Methoden zur Partikelcharakterisierung, wie Röntgenbeugungsanalysen, können zusätzlich zur Strukturaufklärung, insbesondere der Lipoplexe beitragen.

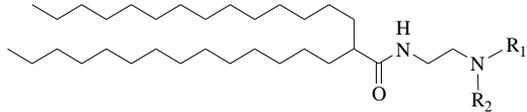
### 4.3 Fluoreszenzmikroskopische Zellkulturuntersuchungen

Neben den Transfektionsuntersuchungen zur Effizienz der neuen Vektoren und der Partikelcharakterisierung der Lipid/DNA-Komplexe wurden auch Studien zur Aufnahme der Lipoplexe und deren Lokalisation in der Zelle vorgenommen, wobei unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Lipoplex am konfokalen LSM untersucht wurden. Dabei wurden Interaktionen der Lipoplexe mit den Zellmembranen beobachtet sowie zeitabhängige Untersuchungen zum Verbleib der Lipid/DNA-Partikel in den Zellen und deren Umgebung durchgeführt. Weiterhin sollte die intrazelluläre Freisetzung der pDNA von dem Trägersystem untersucht werden. Dafür wurde die Laser-Scanning-Mikroskopie in Kombination mit FRET-Messungen unter Zuhilfenahme des Akzeptor-Bleich-Verfahren verwendet (siehe Kapitel 3.4.3.1).

### 4.3.1 Systemauswahl für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Lipoplexaufnahme wurden an der Zelllinie COS-7 durchgeführt. Die Wahl des Vektorsystems basierte auf Zellkulturuntersuchungen zur Transfektionseffizienz und fiel auf die gut transfizierende Lipidformulierung T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) (siehe Kapitel 4.1.1.3). Um eine positive Lipoplexgesamtladung zu gewährleisten wurde in der vorliegenden Arbeit ein (+/-)-Ladungsverhältnis von 5/2 für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet (siehe Partikelcharakterisierung im Anhang). Die fluoreszenzmarkierte Liposomenformulierung T14diLys/DOPE/SD-E14Rho6G im Verhältnis 1/2/0,01 (n/n/n) wurde durch Zugabe des fluoreszenzmarkierten Lipids SD-E14Rho6G bei der Liposomenpräparation, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, hergestellt. Um möglichen Problemen der Mischbarkeit des fluoreszenzmarkierten Lipids in das liposomale System zu vermeiden wurde ein Lipid für die Markierung ausgewählt, welches, wie das Transfektionslipid T14diLys, zu den verzweigten Fettsäuren gehört und die gleiche Kettenlänge aufweist.

**Tab. 16:** Chemische Strukturen der Lipide E14, T14diLys und SD-E14Rho6G

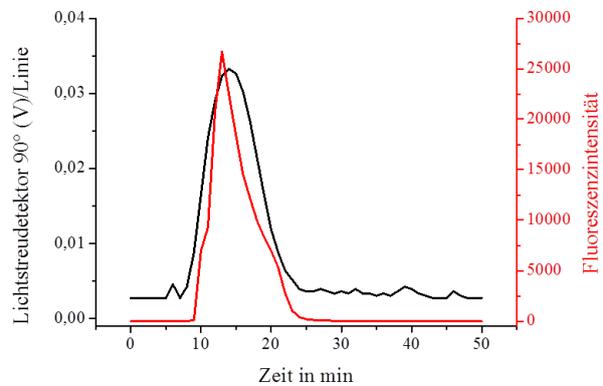
Lipidstruktur	R1	R2	Abkürzung
	H	H	E14
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH-Lys	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH-Lys	T14diLys
	H	CO-Rho6G	SD-E14Rho6G

Weiterhin sollten Mehrfachmarkierungen des Moleküls vermieden werden. Da die Kupplung des Fluoreszenzfarbstoffs ATTO Rho6G laut Hersteller (ATTO-TEC GmbH) über die Ausbildung einer Amidbindung zwischen freien Aminogruppen und dem *N*-Hydroxysuccinimidyl-Ester des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgt, wurde für die Synthese ein Lipid mit nur einer freien primären Aminogruppe favorisiert.<sup>[191]</sup> Die Wahl fiel auf das Lipid E14 (Struktur siehe **Tab. 16**), welches mit dem Fluoreszenzlabel ATTO Rho6G umgesetzt wurde (Kap. 3.4.1.1).

Das liposomale System wurde mittels A4F, welche selbst komplexe Lipidformulierungen über einen breiten Partikelbereich aufzutrennen vermag, analysiert.<sup>[192]</sup> Das erhaltene Eluat wurde zeitabhängig fraktioniert und anschließend fluoreszenzphotometrisch vermessen. Die Ergebnisse der beiden Analysen sind in **Abb. 38** graphisch dargestellt, die Originalkurven der A4F befinden sich im Anhang. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten der gesammelten

Fraktionen stiegen kontinuierlich im zeitlichen Verlauf mit den Streulichtsignalen der Partikel an. Die maximal ermittelte Fluoreszenzintensität wurde jedoch leicht zeitlich versetzt zur maximalen Streulichtintensität ermittelt.

Dennoch konnte von einem Einbau des markierten Lipids ausgegangen werden, da außerhalb des Lichtstreusignals der Partikel keine Fluoreszenz gemessen wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden weiterhin zur Bestimmung der Partikelgröße, Partikelanzahl und Partikelgrößenverteilung am Zetasizer Nano-ZS untersucht. Am Streulichtmaximum (Fraktion zum Zeitpunkt  $t = 16$  min) wurde eine Partikeldurchmesser von 77 nm und ein PDI von 0,05 ermittelt. Die vollständigen Daten befinden sich im Anhang. Im Vergleich von markierter und nicht-markierter Lipidformulierung ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den Partikelgrößen ermitteln (Daten siehe Anhang).



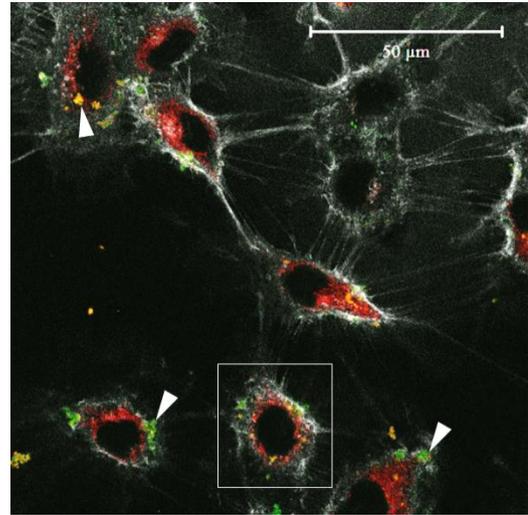
**Abb. 38:** Darstellung der Lichtstreu- und Fluoreszenzintensitäten der Lipidformulierung: T14diLys/DOPE/SD E14Rho6G 1/2/0,0 (n/n/n) in Abhängigkeit der Elutionszeit an der A4F

#### 4.3.2 Lipoplex-Aufnahmestudien unter Verwendung von kovalent markierter pDNA

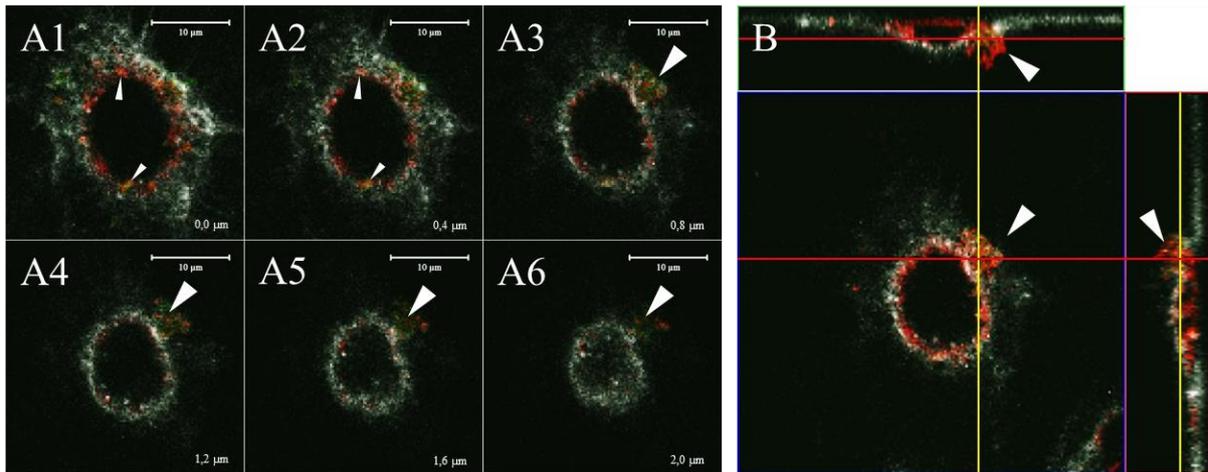
Ein Teil der Lipoplex-Aufnahmestudien wurde unter Verwendung von kovalent markierter pDNA durchgeführt. Als Markierungsreagenz diente das Label IT<sup>®</sup> Nucleic Acid Labeling Reagens 5-Carboxy Fluoreszein der Firma Mirus. Eine kovalente Markierung des Plasmids wurde angestrebt, um unspezifische Wechselwirkungen des Markierungsreagenz mit zelleigenen DNA- oder RNA-Strukturen zu minimieren. Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurde zusätzlich eine Membranfärbung mittels WGA, Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 Konjugat durchgeführt. Dies ermöglichte eine Lokalisation der markierten Lipid- und DNA-Strukturen in Bezug zur Zelle vorzunehmen. Die Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den mikroskopischen Bildern farblich wie folgt dargestellt:

- Fluoreszein (pDNA) = grün
- Rho6G (Lipid) = rot
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (Zellmembran) = weiß

Nach sechsstündiger Inkubation der Zellen mit den Lipoplexen und einer anschließenden Zellfixierung konnten im mikroskopischen Bild Lipid- und pDNA-Strukturen sowohl internalisiert als auch extrazellulär beobachtet werden (siehe **Abb. 39**, Pfeile). Diese Aufnahme repräsentiert ein generiertes Bild nach dem „Linearen Unmixing“ und zeigt neben einfach markierten Strukturen auch Co-Lokalisationen von pDNA und Lipid (gelbe Strukturen). Die grünen Aggregate im unteren Bereich der Abbildung weisen wahrscheinlich auf eine unzureichende Komplexierung der pDNA durch die Lipidformulierung hin, wodurch eine zelluläre Aufnahme nicht möglich erscheint. Weiterhin zeigen die meisten Zellen dieser Abbildung eine diffuse Verteilung des Lipidfarbstoffs Rho6G. Die zytosolische Verteilung der Lipidformulierung kann nach der endozytotischen Aufnahme der Lipoplexe und Freisetzung aus dem Endosom sowie nach dem Lösen von der pDNA erfolgt sein. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff durch Metabolisierung vom Lipid gespalten wurde und in der Zelle frei vorlag. Im Folgenden wurde eine Zelle aus **Abb. 39** (weiße Box) vergrößert und in verschiedenen Schnittebenen dargestellt (siehe **Abb. 40**)



**Abb. 39:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA 6 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label Fluoreszein (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß), die Pfeile weisen sowohl auf internalisierte als auch auf extrazelluläre Lipoplexstrukturen hin



**Abb. 40:** Vergrößerter Ausschnitt aus **Abb. 39**: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA, 6 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label Fluoreszein (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß); **Bilder A1-A6:** Schnitte durch die z-Ebene, **Bild B:** simultane Darstellung von allen drei Raumrichtungen

Der erste Ausschnitt in **Abb. 40** (links: A1-6) zeigt sechs Schnittebenen einer COS-7 Zelle durch die z-Ebene im Abstand von je  $0,4\ \mu\text{m}$ . In den Bildern A1 und A2 deuten die Pfeile auf intrazelluläre Lipid und Lipoplex-Strukturen im Randbereich der Zelle hin. In den Fluoreszenzbildern A3 bis A6 deutet der Pfeil auf ein großes Lipoplex-Aggregat, welches mit der Zellmembran auf der extrazellulären Seite interagiert. Deutlicher ist die Beteiligung der Membran an dieser Interaktion in **Abb. 40**, Bild B zu erkennen. In diesem Bild wurden alle drei Raumebenen dargestellt. Der Lipoplex scheint gerade in die Zelle aufgenommen zu werden. Um detailliertere Aufnahmen zu erhalten, wurde diese Region erneut gescannt. Dieser Vorgang führte jedoch zu einer stark geminderten Intensität des pDNA-Labels aufgrund des starken Photobleichens von Fluoreszein. Durch diese Problematik wurde auf eine kovalente Markierung der pDNA mit Fluoreszein verzichtet und die Untersuchung mit dem Interkalator YOYO®-1 Jodid fortgesetzt.

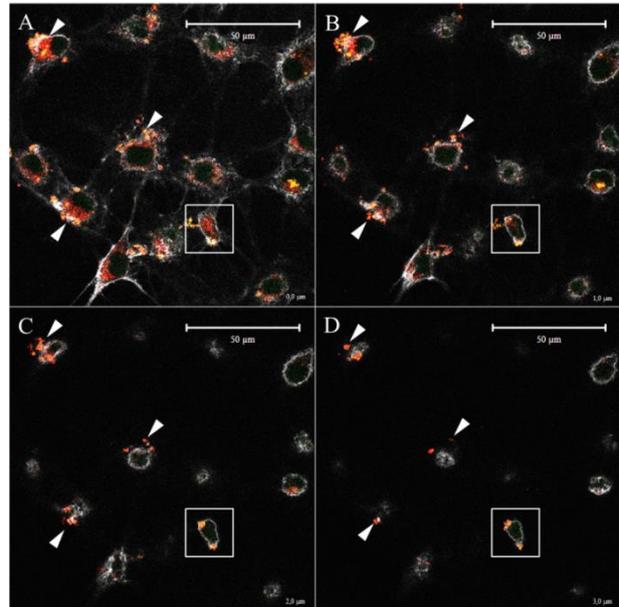
### 4.3.3 Aufnahmestudien mit YOYO®-1 Jodid markierter pDNA

Der kationische, dimere Cyanin-Farbstoff YOYO®-1-Jodid wird nicht kovalent an DNA gekoppelt, sondern „schiebt“ sich zwischen die DNA-Stränge. Durch die Interkalation wird die planare Konformation des Farbstoffs stabilisiert was in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert.<sup>[193]</sup> Die positive Ladung des Moleküls führt zusätzlich zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der DNA und bewirkt somit die Ausbildung eines besonders stabilen Farbstoff-Nucleinsäure Komplexes. Ein Abdissoziieren des Interkalators vom Plasmid/YOYO®-1 Komplex und die Interaktion mit anderen in der Zelle enthaltenen Nucleinsäuren wird somit minimiert.<sup>[194-195]</sup> Um die Wechselwirkung der Lipoplexe

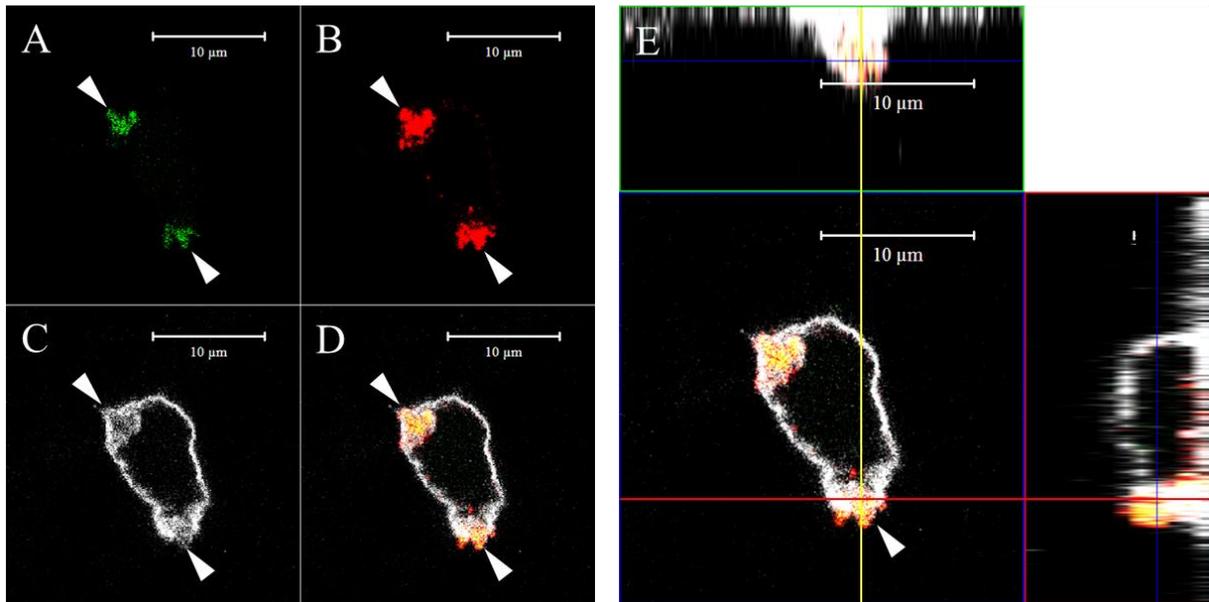
mit der Zellmembran näher zu untersuchen wurde eine Inkubationszeit von 2 h ausgewählt. Weiterhin erfolgten mikroskopische Aufnahmen nach 6 und 24 h, welche den zeitlichen Verbleib der pDNA und der Lipidformulierung aufdecken sollten. Analog zu den bereits beschriebenen Aufnahmen wurden die Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wie folgt dargestellt:

- YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid (pDNA) = grün
- Rho6G (Lipid) = rot
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (Zellmembran) = weiß

In **Abb. 41**, welche die Transfektion nach zweistündiger Inkubation zeigt, weisen die Pfeile auf extrazelluläre Lipoplexe hin. Diese scheinen mit der Zellmembran zu interagieren. Weiterhin konnte, wie bereits bei den Versuchen mit Fluoreszein markierter pDNA beschrieben, eine beginnende Anreicherung der Lipidmarkierungen (rot) in einigen Zellen beobachtet werden. Dabei sind sowohl vesikuläre Verteilungen als auch diffuse Fluoreszenzbereiche erkennbar. Erneut sind verschiedene Schnittebenen (**Abb. 41** Bild A-D) der Aufnahme im Abstand von je 1  $\mu\text{m}$  dargestellt. Bild A zeigt die Schnittebene, welche sich unmittelbar an der Wachstumsfläche der Zellen befand. In dieser Ebene sind deutlich das adhärenzte Wachstum dieser Zellkultur und die Zell-Zell-Interaktion durch Membranausstülpungen erkennbar. Die Darstellung der einzelnen Schnittebenen ermöglicht die Lokalisation der Lipid/DNA-Aggregate. Es ist in den Bildern B bis D gut zu erkennen, dass sich die Lipoplexe größtenteils in der Nähe der Zelle befinden, jedoch noch nicht internalisiert wurden. Um die Interaktion der Lipoplexe mit der Zytoplasmamembran hervorzuheben wurde ein Ausschnitt dieser Abbildung (Schnittebene C, weiße Box) in **Abb. 42** vergrößert dargestellt.

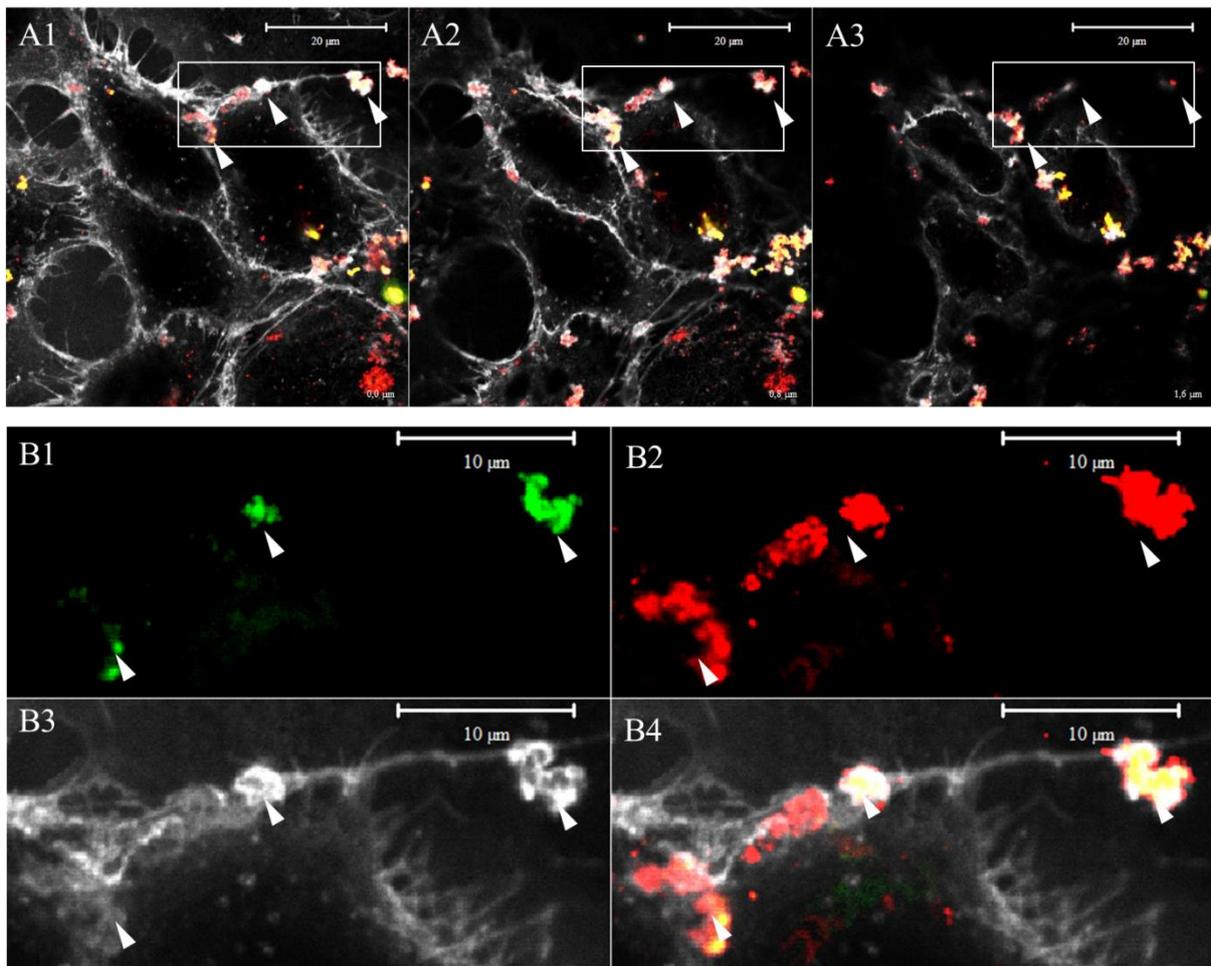


**Abb. 41:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid markierter pDNA 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (weiß) **Bilder A-D:** Schnitte durch die z-Ebene (Abstand 1  $\mu\text{m}$ )



**Abb. 42:** Vergrößerter Ausschnitt aus **Abb. 41:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid markierter pDNA 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (weiß); **Bild A:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid, **Bild B:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, **Bild C:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor<sup>®</sup> 633, **Bild D:** Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten; **Bild E:** Mischbild mit simultaner Darstellung aller drei Raumrichtungen

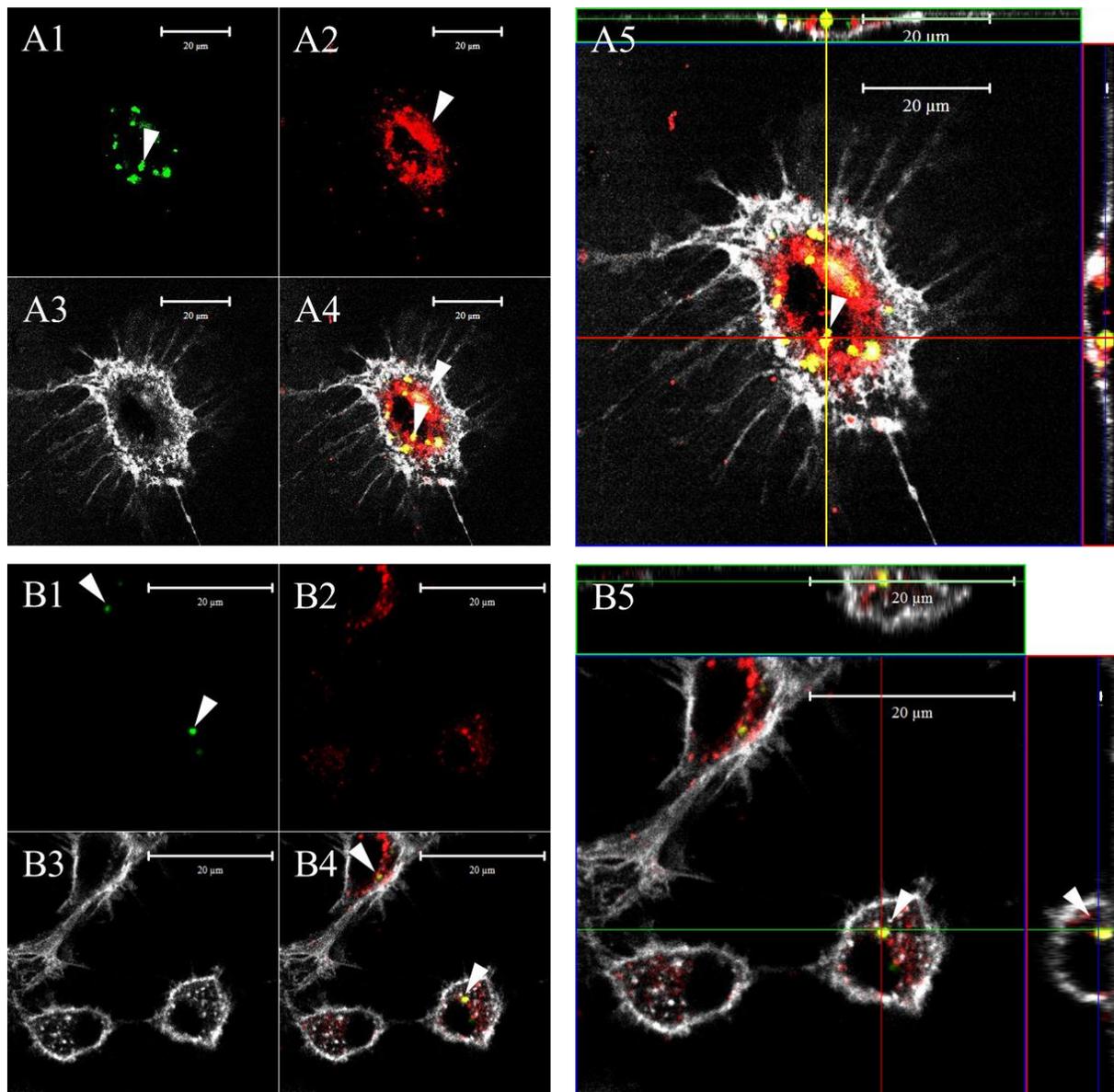
Die Fluoreszenzbilder A-D in **Abb. 42** zeigen neben der Überlagerung aller Fluoreszenzfarbstoffe (Bild D) auch die einzelnen Strukturen. So ist in Bild A lediglich die Intensität des pDNA-Farbstoffs, in Bild B die des Lipid-Farbstoffs und in Bild C die des Membranlabels dargestellt. Die Pfeile in Bild C weisen auf die Membranabschnitte, in welchen der Lipoplex vorliegt, hin (vergleiche dazu Bild A, B). Im Gegensatz zur restlichen, scharf abgegrenzten Membranstruktur zeigte die Membranfärbung in diesem Bereich eine flächig aufgeworfene, diffuse Struktur auf. Dies weist auf eine mögliche Membraninteraktion mit den Lipid/DNA-Komplexen hin. Durch die räumliche Darstellung dieses Ausschnitts in Bild E ist die Membran-Lipoplex-Wechselwirkung deutlich zu erkennen. Die Aufnahme zeigt den Lipoplex im Moment der zellulären Aufnahme, wobei die Membran den Lipoplex fast vollständig zu umschließen scheint. Diese Membran-Lipoplex-Interaktionen konnten auch an anderen Stellen des Untersuchungsmaterials gefunden werden (siehe **Abb. 43**).



**Abb. 43:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid markierter pDNA, 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (weiß); **Bilder A1-A3:** Schnittebenen in z-Richtung im Abstand von 0,8 µm; **Bilder B1-B4:** vergrößerte Darstellung aus **Bild A1** (weißer Kasten); **Bild B1:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid, **Bild B2:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, **Bild B3:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor<sup>®</sup> 633, **Bild B4:** Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten

Die obere Bildreihe (A1-A3) in **Abb. 43** zeigt, beginnend von der Wachstumsfläche, drei Schnittebenen eines COS-7 Zellausschnitts im Abstand von je 0,8 µm. Die Pfeile dieser Bildreihe weisen auf Membranausstülpungen, welche mit den Lipoplexen interagieren, hin. Die untere Bildreihe repräsentiert einen vergrößerten Ausschnitt aus Bild A und ermöglicht somit einen detaillierteren Einblick in diese Interaktion. Die Membranausstülpungen, sogenannte Filopodien oder Lamellipodien, sind an der Bewegung und an der Substrataufnahmen von sich langsam bewegenden Zellen, wie Fibroblasten (COS-7 Zellen), beteiligt. Nach Berührung mit Substrat können sich Adhäsionsplaques ausbilden.<sup>[196]</sup> Möglicherweise stellt das große Aggregat am rechten Bildrand in den Bildern B1-4 eine solche Interaktion der Zellmembran mit dem Lipoplex dar und repräsentiert damit eine frühe Wechselwirkung der Membran mit Lipid/DNA-Aggregaten vor der eigentlichen zellulären Aufnahme.

Die fortgeschrittene Internalisierung der Lipid/DNA-Komplexe ist in der folgenden Abbildung (**Abb. 44**) dargestellt.



**Abb. 44:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an COS-7 Zellen mit YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid markierter pDNA, 6 (**Bilderserie A**) und 24 h (**Bilderserie B**) nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label Rho6G (rot), pDNA-Label YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid (grün), Membran-Label Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (weiß); **Bilder A1 und B1:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid, **Bilder A2 und B2:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Rho6G, **Bilder A3 und B3:** Einzeldarstellung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor<sup>®</sup> 633, **Bilder A4 und B4:** Mischbild aller drei Fluoreszenzintensitäten, **Bilder A5 und B5:** Mischbild mit simultaner Darstellung aller drei Raumrichtungen

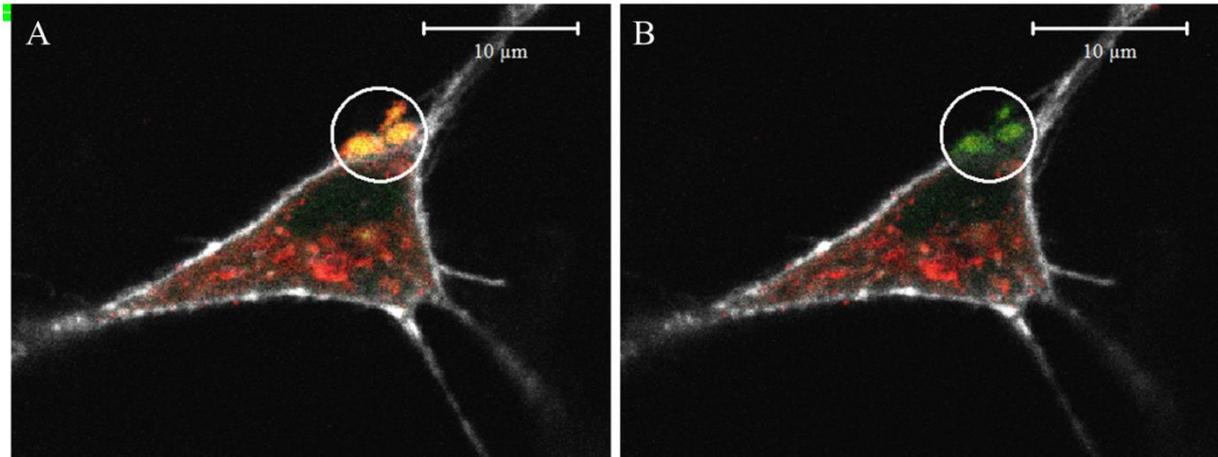
Die Aufnahmen, die in **Abb. 44** gezeigt sind, wurden nach 6 (Bildreihe A) bzw. 24 Stunden (Bildreihe B) Inkubation der COS-7 Zellen mit den Lipoplexen erhalten. Bild A1 zeigt internalisierte pDNA-Strukturen, wobei außerhalb der Zelle keine Lipoplexe mehr beobachtet werden konnten, sodass zu diesem Zeitpunkt die Lipoplexaufnahme abgeschlossen erscheint. Der Pfeil in Bild A2 weist erneut auf eine diffuse Verteilung der Lipidfärbung (Rho6G-Intensität) hin, welche sich nach sechsständiger Transfektion über nahezu das gesam-

te Zelllumen verteilt hat. Die drei-dimensionale Darstellung in Bild E zeigt die Lage eines Lipoplexes, welcher sich im Zellinneren befindet. Nach 24-stündiger Inkubation sind in der mikroskopischen Ansicht nur noch vereinzelte markierte Strukturen erkennbar. Gründe können u.a. Verdünnungseffekte durch das Zellwachstum aber auch Alterungs- und Zersetzungs-vorgänge der Fluoreszenzfarbstoffe sein. Dennoch zeigt der Pfeil in **Abb. 44** Bild B1 auf ein internalisiertes Aggregat. Wie bereits bei den Aufnahmen nach 6 Stunden wurden auch in diesem Fluoreszenzbild keine Lipid/DNA-Strukturen außerhalb der COS-7 Zellen ermittelt.

#### **4.3.4 Lipoplexuntersuchungen am Zellkulturmodell mittels FRET-Messung unter Zuhilfenahme des Akzeptor-Bleich-Verfahrens**

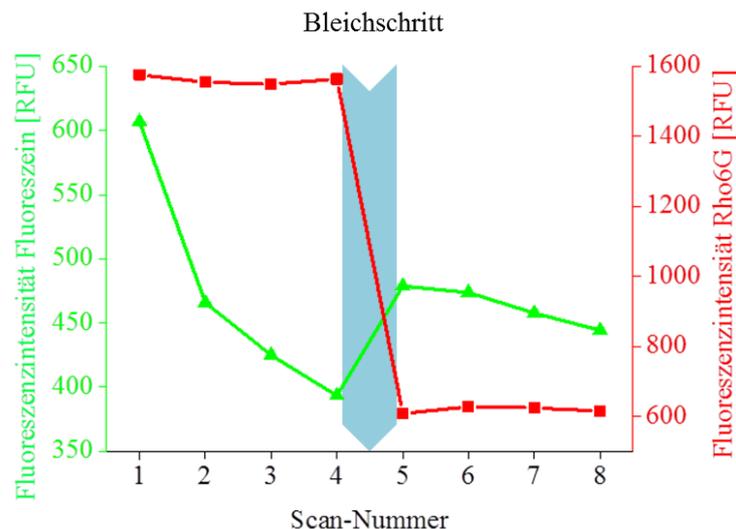
Um weitere Informationen über die Freisetzung der pDNA aus dem Transportsystem nach zellulärer Aufnahme zu erhalten, wurde versucht mittels des Akzeptor-Bleich-Verfahrens eine FRET-Situation am LSM zu ermitteln. FRET wird in der Literatur als potentielle Methode zur Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen beschrieben, wobei Abstandsmessungen zwischen dem Fluoreszenzlabel der DNA und den fluorophorhaltigen Lipiden erfolgten.<sup>[197]</sup> Weiterhin wurde FRET bereits zur Aufklärung von intrazellulären Freisetzungsvorgängen der Nukleinsäuren aus nicht-viralen Vektoren verwendet.<sup>[170]</sup>

Als Donor diente in der vorliegenden Arbeit Fluoreszein (pDNA-Label) und als Akzeptor ATTO Rho6G (Fluoreszenzlabel des Lipids). Es wurden 8 Scans einer definierten Bildregion mit Lipoplex durchgeführt und die Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt. Zwischen dem 4. und 5. Scan erfolgte ein Bleichschritt durch Einstrahlen von Laserlicht bei einer Wellenlänge von 543 nm. Beim Vorliegen einer FRET-Situation sollte nach dem Bleichen des Akzeptors keine weitere Energie des Donor-Moleküls auf das Akzeptor-Molekül übertragen werden und somit die Fluoreszenzintensität des Donors steigen (Theorie FRET: siehe Kapitel 3.4.3.1). Die folgende Abbildung zeigt eine COS-7 Zelle nach 2-stündiger Inkubation mit markierten Lipid/pDNA-Komplexen (**Abb. 45**).



**Abb. 45:** FRET-Messung an COS-7 Zellen mit kovalent markierter pDNA, 2 h nach Transfektion, fixierte Zellen, Lipid-Label ATTO Rho6G = Akzeptor (rot), pDNA-Label Fluoreszein = Donor (grün), Membran-Label Alexa Fluor® 633 (weiß); Verfahren: Akzeptor-Bleich-Verfahren; **Bild A:** zeigt den ersten Scan von 8 (vor dem Bleichschritt); **Bild B:** zeigt den fünften Scan (Fluoreszenzintensitäten nach dem Bleichschritt); die Fluoreszenzaufnahmen, sowie die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten zu allen 8 Scans befinden sich im Anhang

Bild A in **Abb. 45** stellt die Situation nach dem 1. Scan (vor dem Bleichschritt) dar. Dabei sind die beide Fluoreszenzfarbstoffe (Lipid- (rot) und DNA-Label (grün)) durch Auftreten einer Mischfarbe (gelb) deutlich zuerkennen (siehe weißer Kreis). Bild B zeigt den 5. Scan, wobei diese Aufnahme direkt nach dem Bleichschritt erfolgte. In der mikroskopischen Aufnahme ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität des Lipid-Label ATTO Rho6G (rot) stark gesunken ist und nur noch die Fluoreszenz des pDNA-Label Fluoreszein (grün) gezeigt werden kann. In **Abb. 46** wurden die Fluoreszenzintensitäten von Fluoreszein und ATTO Rho6G bei den jeweiligen Scans graphisch dargestellt.



**Abb. 46:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von ATTO Rho6G und Fluoreszein aus der markierten Bildregion in **Abb. 45** in Abhängigkeit der durchgeführten Scans

Wie der **Abb. 46** zu entnehmen ist, nimmt die Intensität des Fluorophors ATTO Rho6G nach dem Bleichen von rund 1500 auf 600 RFU ab. Somit konnte von einem erfolgreichen

Akzeptorbleichen ausgegangen werden. Die Fluoreszenzintensitäten des Donors (Fluoreszein) zeigten direkt nach dem Bleichschritt einen Anstieg. So wurde bei Scan Nummer 4 eine Intensität von 400RFU und bei Scan Nummer 5 eine von 480 ermittelt. Das starke Photobleichen von Fluoreszein (welches bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurde) und die damit verbundene Abnahme der Fluoreszenzintensität zwischen dem 1. und 4. Scan verhinderte jedoch die Ermittlung eines signifikanten Anstiegs der Donorfluoreszenz über die gesamte Scananzahl. Das Vorliegen einer FRET-Situation konnte somit nicht eindeutig belegt werden. Es ist weiterhin fraglich, ob das Scheitern dieses Versuchs ausschließlich auf die Fluoreszenzeigenschaft des Donors zurückzuführen ist. Weitere Hürden, wie ein zu großer Abstand zwischen den Fluorophoren aufgrund einer zu geringen Markierungsdichte, oder ein von vornherein zu großer Abstand zwischen den markierten Strukturen bedingt durch die Lage der Markierungen im Lipoplex sollten nicht außer Acht gelassen werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Möglichkeit einer kausalen Therapie von genetisch bedingten Erkrankungen mittels somatischer Gentherapie setzte zu Beginn große Hoffnungen in diese Behandlungsstrategie. Nach einer anfänglichen Euphorie ließen jedoch herbe Rückschläge Ende des 20. und Anfang dieses Jahrhunderts eine schnelle Markteinführung von Gentherapeutika unrealistisch erscheinen. Dennoch ist der in Aussicht stehende Nutzen bei einer erfolgreichen Gentherapie, insbesondere für seltene und schwerwiegende Erkrankungen, der Antrieb zur Weiterentwicklung dieses Behandlungsansatzes. So gelang es – vor allem in den letzten 10 Jahren – durch intensive Forschung zu Wirkprinzipien sowie Studien zur Aufklärung von Nebenwirkungen den therapeutischen Gentransfer zu verbessern.

Das reine genetische Material kann, aufgrund seiner Ladung, allein meist nicht in ausreichend hohem Maße in das gewünschte Gewebe integriert werden. Für einen effektiven Transfer der therapeutischen Nukleinsäuren bedarf es daher eines geeigneten Vektors. Die virusassoziierten Genfähren stellen, begründet durch ihre hohe Transfektionseffizienz, derzeit den größten Anteil in klinischen Studien dar. Die viralen Vektoren bergen jedoch erhebliche Risiken, wie starke Immunreaktionen, Insertionsmutagenese, sowie die Produktion vermehrungsfähiger infektiöser Viren. Daher richtet sich die Forschung auf die Entwicklung nicht-virale Genfähren, wobei vor allem der Polymer- und der Lipid-vermittelte Gentransfer zunehmend an Bedeutung gewinnen. Seit der ersten Anwendung von kationischen Lipiden für den nicht-viralen Gentransfer durch FELGNER et al. stehen diese Strukturen im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Neben einer sicheren und reproduzierbaren Qualität bei der Herstellung bietet diese Substanzklasse zahlreiche Möglichkeiten zur strukturellen Variabilität. Diese Eigenschaft, kombiniert mit Erkenntnissen aus molekular- und zellbiologischer Grundlagenforschung zur Gentransfektion sowie physikochemischen Charakterisierungen der Genfähren, eröffnet die Möglichkeit einen effektiven und sicheren Vektor zu entwickeln.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden neuartige Transfektionslipide, basierend entweder auf  $\alpha$ -verzweigten Fettsäureamiden bzw. auf 2,2'-alkylierten 1,8-Octandisäuren (Gemini-Lipiden), auf ihre Effizienz am Zellkulturmodell untersucht. Das Screening umfasste 26 Lipide, welche in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit den Helferlipiden DOPE oder Cholesterol verwendet wurden. Die Untersuchungen erfolgten zunächst an humanen Leberkarzinomzellen (Hep-G2 Zellen), wobei vielversprechende Lipidformulierungen ergänzend an einer humanen Lungenkarzinomzelllinie (A549 Zellen) sowie einer Nierenepithelzelllinie aus der Grünen Meerkatze (COS-7 Zellen) getestet wurden. Dies ermöglichte eine bessere Beurteilung der erhaltenen Transfektionsdaten.

Mit den neuartigen kationischen Lipiden auf Basis  $\alpha$ -verzweigter Fettsäureamide sowie den Gemini-Lipiden konnte im Allgemeinen an den Hep-G2 Zellen die Transfektionsrate der Referenzsubstanz Lipofectamine™ erreicht oder sogar übertroffen werden. Dabei erwies sich das Helferlipid DOPE als geeigneter im Vergleich zu Cholesterol. Dies zeichnete sich schon bei der Formulierung der Liposomen ab. Neben einer verminderten Tendenz zur Liposomenbildung (auftreten von Ausflockungen und getrübbten Formulierungen) bei der Verwendung von Cholesterol war die Transfektionseffizienz im Vergleich zu den Systemen mit DOPE als Helferlipid erniedrigt. Diese Erkenntnis geht mit früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Langner, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg für Lipide auf Basis verzweigter Fettsäuren einher.<sup>[136]</sup> Zusätzlich wurde für die Formulierungen mit Cholesterol eine stärker schädigende Wirkung auf die Zellen ermittelt.

Als besonders effektive Genfähren erwiesen sich die Lipide E14Lys, P14Lys und T14diLys, wobei letztgenanntes als bestes Lipid aus den vorliegenden Untersuchungen hervorging. T14diLys erreichte neben einer signifikant besseren Transfektionseffizienz als Lipofectamine™ an Hep-G2 auch die Transfektionsraten der Referenzsubstanz an COS-7 und A549. Durch die strukturelle Vielfältigkeit der für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Lipide lassen sich folgende Beobachtungen zu Struktur-Transfektionseffizienz-Beziehungen zusammenfassen:

- Ein größerer Abstand zwischen hydrophoben und hydrophilen Molekülteil führte bei den P-Reihen-Lipiden (C4-Spacer) im Vergleich zu den E-Reihen-Lipiden (C2-Spacer) zu einer Steigerung der Transfektionsrate.
- Die Dipeptidstruktur im Spacer der kationischen Lipide bewirkte keine Erhöhung der Transfektionseffizienz.
- Die Lipide mit Tris(2-aminoethyl)amin-Spacer (T-Reihen-Lipide) erwiesen sich als effektivere Genfähren im Vergleich zu den P- und E-Reihen-Lipiden.
- Die Transfektionseffizienzen der Lipide mit Lysin als ladungstragende Kopfgruppe waren generell höher als die der Strukturanalogen ohne Lysin (Bsp.: T14 vs. T14diLys).
- Nicht jede Erhöhung der Anzahl an basischen Gruppen im Lipidmolekül führte zwangsweise zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz. So konnte keine bessere Transfektionsrate bei E14trisLys im Vergleich zu E14Lys oder bei P14diLys im Vergleich zu P14Lys ermittelt werden.
- Lipide mit verzweigt angeordneten Lysinmolekülen erwiesen sich als effektivere Genfähren gegenüber ihren Strukturanalogen mit linear angeordneter Kopfgruppe.

- Die höchste Transfektionsleistung einer homologen Reihe wurde mit dem Lipid, welches einen diC14 Kettenteil aufwies ermittelt. Die ungesättigte Verbindung dieser Untersuchungsreihe erwies sich dabei als weniger effektiv. Da jedoch nur eine ungesättigte Verbindung getestet wurde, sollte der Einfluss von ungesättigten Kohlenwasserstoffketten im hydrophoben Molekülteil kationischer Lipide auf die Transfektionseffizienz an weiteren Lipiden untersucht werden.
- Bei den Lipiden mit einer Gemini-Grundstruktur lagen die Transfektionseffizienzen der beiden strukturanalogen Verbindungen im optimierten Verhältnis auf annähernd demselben Niveau, wobei die höchste ermittelte Effizienz bei G14diLys bereits bei einem niedrigeren (+/-)-Ladungsverhältnis ermittelt werden konnte als bei G16diLys.

Die toxikologischen Untersuchungen zu den Gentransfervektoren zeigten bei den E-Reihen-Lipiden eine Abhängigkeit der Toxizität auf die Anzahl der protonierbaren Stickstoffgruppen. So sankt die Viabilität der Zellen mit zunehmender Anzahl an basischen Gruppen im Molekül. Für die P- und T-Reihen-Lipide wurde dieser Zusammenhang jedoch nicht beobachtet. Bei den Lipiden mit verzweigt angeordneter Kopfgruppe wirkte sich das Einführen von Lysin und damit einer größeren Anzahl an basischen Gruppen im Molekül sogar positiv auf die Viabilität aus. Weiterhin zeigten gut transfizierende Vektoren häufig eine höhere zellschädigende Wirkung verglichen mit weniger effektiven Systemen. Die erhöhte Toxizität der Vektorsysteme könnte sowohl durch Zellmembranschäden, ausgelöst durch Interaktionen der Vektorlipide mit den Membranlipiden, als auch von Abbauprodukte der kationischen Lipide hervorgerufen worden sein. Es ist weiterhin denkbar, dass Störungen im genetischen Material der Zellen, ausgelöst durch die eingebrachte Fremd-DNA, zur Apoptose der Zellen führen können. Ein weiterer Grund für das Absinken der Viabilität könnte das gebildete Genprodukt ( $\beta$ -Galactosidase) sein, welches sich vermutlich negativ auf das Wachstum und die Vitalität der Zellen auswirkt.

Weiterhin konnte eine Stabilität der Transfektionssysteme auf Basis verzweigter Fettsäuren sowie der Lipide mit einer Gemini-Grundstruktur an den Hep-G2 Zellen gegenüber Serum ermittelt werden.

Neben den Screening auf Transfektionseffizienz und Zytotoxizität der neuen Vektoren nach 48 bzw. 24h mit dem Plasmid pCMV·SPORT- $\beta$ gal, wurde mit dem Transfektionssystem T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) und dem Plasmid pEGFP-C2 die langfristige Genexpression an

Hep-G2 Zelle untersucht. Mit diesem Versuchsaufbau konnten transfizierte Hep-G2 Zellen, mittels Selektionsmedium, über 5 Monate kultiviert werden.

Eine umfangreiche Partikelcharakterisierung hinsichtlich Größe sowie Größenverteilung, Form und Oberflächenladung wurde mit den Liposomen- und Lipoplexformulierungen des Transfektionssystem T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) durchgeführt. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, konnte auch für diesen Vektor mittels PCS-Analyse unterschiedliche Partikelgrößen in Abhängigkeit des Lipid/DNA-Ladungsverhältnisses festgestellt werden. Diese strukturellen Veränderungen der Aggregate durch Zugabe von pDNA sowie die Abhängigkeit der Partikelgröße und Verteilung zum Ladungsverhältnis konnten mittels der Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. Da die PCS-Analyse nur von sphärischen Partikeln ausgeht, ermöglichte die mikroskopische Methode zusätzlich zur Partikelgrößenbestimmung einen visuellen Einblick in die Form der Lipid- bzw. Lipid/DNA-Formulierungen zu erhalten. Die in der vorliegenden Arbeit vermutete lamellare Struktur der Lipoplexe ließe sich durch weitere Methoden zur Partikelcharakterisierung, wie Röntgenbeugungsanalysen, unterstützen und bietet somit Ansatz für zukünftige Arbeiten.

Kenntnisse zu Internalisierungsvorgängen nicht-viraler Vektoren auf Basis kationischer Lipide können zum Verständnis der Lipofektion und zur Optimierung dieser Genfähren beitragen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopische Zellkulturuntersuchungen zur Aufnahme und Internalisierung der Lipid/DNA-Komplexe durchgeführt. Das für diese Untersuchungen markierte Lipid (SD-E14Rho6G) wurde erfolgreich in das Transfektionssystem T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) integriert und ermöglichte die Lokalisation der Lipidformulierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Transfektion. Neben der Lipidmarkierung erfolgte zusätzlich eine kovalente Markierung der pDNA mittels Fluoreszein. Da es während der mikroskopischen Betrachtung der so markierten Proben zum starken Photobleichen von Fluoreszein kam, erfolgten weitere Untersuchungen mit dem Interkalator YOYO<sup>®</sup>-1-Jodid. Die Verwendung des Membran-Labels (WGA, Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 Konjugat) zur Lokalisation der Zellen ermöglichte ferner die Ermittlung von Wechselwirkungen der Lipoplexe mit den Zellmembranen. Dabei konnten frühe Wechselwirkungen der Membran mit Lipid/DNA-Aggregaten vor der eigentlichen zellulären Aufnahme beobachtet werden. Mit den FRET-Untersuchungen der Lipoplexe am Zellkulturmodell konnten jedoch keine weiteren Informationen über die Freisetzung der pDNA aus dem Carrier-System nach zellulärer Auf-

nahme erhalten werden, da keine eindeutige FRET-Situation unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen ermittelt wurde.

Zusammenfassend ermöglichen die Ergebnisse der vorliegende Dissertationsschrift die Bewertung neuartiger, nicht-viraler Transfektionssysteme auf Basis  $\alpha$ -verzweigten Fettsäureamide sowie 2,2'-alkylierten 1,8-Octandisäuren hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz und Zytotoxizität. Weiterhin leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Strukturaufklärung kationischer Transfektionssysteme auf Basis  $\alpha$ -verzweigten Fettsäureamide. Ferner bieten die Erkenntnisse der vorliegenden Schrift Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten zur Ermittlung von Wechselwirkungen zwischen Lipid/DNA-Komplexen und Zellmembranen sowie zur Untersuchung von Internalisierungsvorgängen während des Transfektionsvorgangs.

## 6 Literatur

- [1] Mirus (2006) Label IT® Nucleic Acid Labeling Kits. *Protocol ML002*, 1-6.
- [2] Winter, R.; Noll, F. et al. (2011) Methoden der Biophysikalischen Chemie; Vieweg und Teubner Verlag / Springer Fachmedien GmbH: Wiesbaden
- [3] Wilhelm, S.; Gröbler, B. et al. (2001) Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. *Mikroskopie von Carl Zeiss: 45-0029 d/09.03*.
- [4] Langer, B.; Cichutek, K. (2011) Klinische Anwendung der Gentherapie. Bisherige Erfahrungen und Zukunft. *Pharm. Unserer Zeit: 40*, 254-262.
- [5] Xu, Y.; Francis C. Szoka, J. (1996) Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry: 35*, 5616-5623.
- [6] Büning, H. (2011) Gentherapie – Was ist das? “Heilen” mit Genen. *Pharm. Unserer Zeit: 40*, 194-201.
- [7] Evans, C. H.; Gouze, E. et al. (2006) Gene therapeutic approaches—transfer in vivo. *Adv. Drug Delivery Rev.: 58*, 243-258.
- [8] Baum, C.; Schambach, A. et al. (2007) Gentherapie der SCID-X1. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz: 50*, 1507-1517.
- [9] Kohn, D. B.; Candotti, F. (2009) Gene Therapy Fulfilling Its Promise. *The new england journal of medicine: 360*, 518-521.
- [10] Lentze, M. J. (2007) Pädiatrie: Grundlagen und Praxis; Springer Medizin Verlag: Heidelberg
- [11] (2012) European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval. *European Medicines Agency Press Office: EMA/CHMP/474664*.
- [12] Ylä-Herttua, S. (2012) Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol. Ther.: 20*, 1831-1832.
- [13] Gaudet, D.; Méthot, J. et al. (2012) Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr. Opin. Lipidol.: 23*, 310-320.
- [14] Peng, Z. (2005) Current Status of Gene Therapy in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Hum. Gene Ther.: 16*, 1016–1027.
- [15] Wilson, J. M. (2005) Gene Therapy: The First Commercial Gene Therapy Product. *Hum. Gene Ther.: 16*, 1014.
- [16] Zhang, S.; Zhao, B. et al. (2007) Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J. Controlled Release: 123*, 1-10.
- [17] Förstermann, U. (2003) Gentherapie: Erste Erfolge – viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Deutsches Ärzteblatt International: 100*, 314.
- [18] Hacein-Bey-Abina, S.; Garrigue, A. et al. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *Journal of Clinical Investigation: 118*, 3132-3142.
- [19] <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (2012) Clinical Trials Database. *J. Gene Med.*
- [20] Somia, N.; Verma, I. M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet: 1*, 91-99.
- [21] Zhang, S.; Xu, Y. et al. (2004) Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Controlled Release: 100*, 165-180.
- [22] Gao, X.; Kim, K.-S. et al. (2007) Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *AAPS J.: 9*, E92-E104.
- [23] Laemmli, U. K. (1975) Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc Natl Acad Sci USA: 72*, 4288-4292.
- [24] Wu, G. Y.; Wu, C. H. (1988) Receptor-mediated Gene Delivery and Expression in Vivo. *J. Biol. Chem.: 362*, 14621-14624.

- [25] Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. (2009) Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.*: **109**, 259-302.
- [26] Boussif, O.; Lezoualc'h, F. et al. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **92**, 7297-7301.
- [27] Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. (2009) Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*: **109**, 259-302.
- [28] Yamashiro, D. J.; Fluss, S. R. et al. (1983) Acidification of Endocytic Vesicles by an ATP-dependent Proton Pump. *The Journal of Cell Biology*: **97**, 929-934.
- [29] Sonawane, N. D. (2003) Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *J. Biol. Chem.*: **278**, 44826-44831.
- [30] Fischer, D.; Bieber, T. et al. (1999) A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity. *Pharm. Res.*: **16**, 1273-1279.
- [31] Choi, Y. H.; Liu, F. et al. (1998) Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J. Controlled Release*: **54**, 39-48.
- [32] Fischer, D.; Fahr, A. (2011) Nichtvirale Gentransfer-Arzneimittel. Therapie mit synthetischen Vektoren. *Pharm. Unserer Zeit*: **40**, 212-219.
- [33] Dass, C. R.; Choong, P. F. M. (2006) Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: In vivo proof of applicability. *J. Controlled Release*: **113**, 155-163.
- [34] Lasic, D. D. (1998) Novel applications of liposomes. *Tibtech*: **16**, 307-321.
- [35] Felgner, P. L.; Gadek, T. R. et al. (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **84**, 7413-7417.
- [36] Lasic, D. D.; Templeton, N. S. (1996) Liposomes in gene therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.*: **20**, 221-266.
- [37] Leventis, R.; Silviu, J. R. (1990) Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta*: **1023**, 124-132.
- [38] Gao, X.; Huang, L. (1991) A Novel Cationic Liposome Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **179**, 280-285.
- [39] Ruyschaert, J. M.; Elouahabi, A. et al. (1994) A Novel Cationic Amphiphile for Transfection of Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **203**, 1622-1628.
- [40] Zuhorn, I. S.; Oberle, V. et al. (2002) Phase Behavior of Cationic Amphiphiles and Their Mixtures with Helper Lipid Influences Lipoplex Shape, DNA Translocation, and Transfection Efficiency. *Biophys. J.*: **83**, 2096-2108.
- [41] van der Woude, I.; Wagenaar, A. et al. (1997) Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **94**, 1160-1165.
- [42] Behr, J.-P.; Demeneix, B. et al. (1989) Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **86**, 6982-6986.
- [43] Heath, T.; Li, Y. et al. (2006) A Highly Efficient Approach for the Synthesis of Cationic Lipid DOSPA. *Synlett*: **2006**, 2284-2286.
- [44] Vigneron, J.-P.; Oudrhiri, N. et al. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids: Efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **93**, 9682-9686.
- [45] Kirby, A. J.; Camilleri, P. et al. (2003) Gemini-Tenside: neue synthetische Vektoren zur Gentransfektion. *Angew. Chem.*: **115**, 1486-1496.
- [46] Karlsson, L. (2002) Compaction of DNA by Gemini Surfactants: Effects of Surfactant Architecture. *J. Colloid Interface Sci.*: **252**, 290-296.

- [47] Cherezov, V.; Qiu, H. et al. (2002) Biophysical and Transfection Studies of the diC14-Amidine/DNA Complex. *Biophys. J.*: **82**, 3105-3117.
- [48] Solodin, I.; Brown, C. S. et al. (1995) A Novel Series of Amphiphilic Imidazolium Compounds for in Vitro and in Vivo Gene Delivery. *Biochemistry*: **34**, 13537-13544.
- [49] Heyes, J. A.; Niculescu-Duvaz, D. et al. (2002) Synthesis of Novel Cationic Lipids: Effect of Structural Modification on the Efficiency of Gene Transfer. *J. Med. Chem.*: **45**, 99-114.
- [50] Felgner, J. H.; Kumar, R. et al. (1994) Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations. *J. Biol. Chem.*: **269**, 2550-2561.
- [51] Balazs, D. A.; Godbey, W. T. (2011) Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Delivery*: **2011**, 1-12.
- [52] Labas, R.; Beilvert, F. et al. (2009) Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. *Genetica*: **138**, 153-168.
- [53] Obata, Y.; Suzuki, D. et al. (2008) Evaluation of Cationic Assemblies Constructed with Amino Acid Based Lipids for Plasmid DNA Delivery. *Bioconjugate Chem.*: **19**, 1055-1063.
- [54] Karmali, P. P.; Kumar, V. V. et al. (2004) Design, Syntheses and In Vitro Gene Delivery Efficacies of Novel Mono-, Di- and Trilysinated Cationic Lipids: A Structure-Activity Investigation. *J. Med. Chem.*: **47**, 2123-2132.
- [55] Lv, H.; Zhang, S. et al. (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Controlled Release*: **114**, 100-109.
- [56] Rajesh, M.; Sen, J. et al. (2007) Dramatic Influence of the Orientation of Linker between Hydrophilic and Hydrophobic Lipid Moiety in Liposomal Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.*: **129**, 11408-11420.
- [57] Ahmed, O. A. A.; Adjimatera, N. et al. (2005) N4,N9-Dioleoyl Spermine Is a Novel Nonviral Lipopolyamine Vector for Plasmid DNA Formulation. *Pharm. Res.*: **22**, 972-980.
- [58] Dileep, P. V.; Antony, A. et al. (2001) Incorporation of oxyethylene units between hydrocarbon chain and pseudoglycerol backbone in cationic lipid potentiates gene transfection efficiency in the presence of serum. *FEBS Lett.*: **509**, 327-331.
- [59] Zhi, D.; Zhang, S. et al. (2012) Synthesis and biological activity of carbamate-linked cationic lipids for gene delivery in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **22**, 3837-3841.
- [60] Obata, Y.; Saito, S. et al. (2009) Plasmid DNA-encapsulating liposomes: Effect of a spacer between the cationic head group and hydrophobic moieties of the lipids on gene expression efficiency. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*: **1788**, 1148-1158.
- [61] Karmali, P. P.; Chaudhuri, A. (2007) Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. *Med. Res. Rev.*: **27**, 696-722.
- [62] Matulis, D.; Rouzina, I. et al. (2002) Thermodynamics of Cationic Lipid Binding to DNA and DNA Condensation: Roles of Electrostatics and Hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.*: **124**, 7331-7342.
- [63] Liu, D.; Ren, T. et al. (2003) Cationic Transfection Lipids. *Curr. Med. Chem.*: **10**, 1307-1315.
- [64] Heyes, J.; Palmer, L. et al. (2005) Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J. Controlled Release*: **107**, 276-287.
- [65] Ilies, M. A.; Seitz, W. A. et al. (2006) Lipophilic Pyrylium Salts in the Synthesis of Efficient Pyridinium-Based Cationic Lipids, Gemini Surfactants, and Lipophilic Oligomers for Gene Delivery. *J. Med. Chem.*: **49**, 3872-3887.

- [66] Biswas, J.; Bajaj, A. et al. (2011) Membranes of Cationic Gemini Lipids based on Cholesterol with Hydroxyl Headgroups and their Interactions with DNA and Phospholipid. *J. Phys. Chem. B*: **115**, 478-486.
- [67] Bhattacharya, S.; Bajaj, A. (2007) Membrane-Forming Properties of Gemini Lipids Possessing Aromatic Backbone between Hydrocarbon Chains and the Cationic Headgroup. *J. Phys. Chem.*: **111**, 13511-13519.
- [68] Rao, N. M.; Gopal, V. (2006) Cell Biological and Biophysical Aspects of Lipid-mediated Gene Delivery. *Biosci. Rep.*: **26**, 301-324.
- [69] Hama, S.; Akita, H. et al. (2006) Quantitative Comparison of Intracellular Trafficking and Nuclear Transcription between Adenoviral and Lipoplex Systems. *Mol. Ther.*: **13**, 786-794.
- [70] Liu, F.; Huang, L. (2002) Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Controlled Release*: **78**, 259-266.
- [71] Horobin, R. W.; Weissig, V. (2005) A QSAR-modeling perspective on cationic transfection lipids. 1. Predicting efficiency and understanding mechanisms. *J. Gene Med.*: **7**, 1023-1034.
- [72] May, S.; Ben-Shaul, A. (2004) Modeling of cationic lipid-DNA complexes. *Curr. Med. Chem.*: **11**, 151-167.
- [73] Elouahabi, A.; Ruyschaert, J. (2005) Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol. Ther.*: **11**, 336-347.
- [74] Kreiss, P.; Cameron, B. et al. (1999) Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.*: **27**, 3792-3798.
- [75] Pozharski, E.; MacDonald, R. C. (2003) Lipoplex Thermodynamics: Determination of DNA-Cationic Lipid Interaction Energies. *Biophys. J.*: **85**, 3969-3978.
- [76] Pector, V. (2000) Biophysical and Structural Properties of DNA diC14-amidine Complexes INFLUENCE OF THE DNA/LIPID RATIO. *J. Biol. Chem.*: **275**, 29533-29538.
- [77] Felgner, P. L.; Ringold, G. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*: **337**, 387-388.
- [78] Sternberg, B.; Sorgib, F. L. et al. (1994) New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.*: **356**, 361-366.
- [79] May, S.; Ben-Shaul, A. (1997) DNA-Lipid Complexes: Stability of Honeycomb-Like and Spaghetti-Like Structures. *Biophys. J.*: **73**, 2427-2440.
- [80] Gershon, H.; Ghirlando, R. et al. (1993) Mode of Formation and Structural Features of DNA-Cationic Liposome Complexes Used for Transfection. *Biochemistry*: **32**, 7143-7151.
- [81] Gustafsson, J.; Arvidson, G. et al. (1995) Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim. Biophys. Acta*: **1235**, 305-312.
- [82] Rädler, J. O.; Koltover, I. et al. (1997) Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science*: **275**, 810-814.
- [83] Miller, A. D. (1998) Cationic Liposomes for Gene Therapy. *Angew. Chem., Int. Ed.*: **37**, 1768-1785.
- [84] Koltover, I.; Salditt, T. et al. (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*: **281**, 78-81.
- [85] Zidovska, A.; Evans, H. M. et al. (2009) Liquid crystalline phases of dendritic lipid-DNA self-assemblies: lamellar, hexagonal, and DNA bundles. *J Phys Chem B*: **113**, 3694-3703.

- [86] Ewert, K. K.; Evans, H. M. et al. (2006) A columnar phase of dendritic lipid-based cationic liposome-DNA complexes for gene delivery: hexagonally ordered cylindrical micelles embedded in a DNA honeycomb lattice. *J Am Chem Soc*: **128**, 3998-4006.
- [87] Ewert, K. K.; Zidovska, A. et al. (2010) Cationic Liposome–Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA. *Top Curr Chem*: **296**, 191-226.
- [88] Golan, S.; Aytar, B. S. et al. (2011) Influence of Biological Media on the Structure and Behavior of Ferrocene-Containing Cationic Lipid/DNA Complexes Used for DNA Delivery. *Langmuir*: **27**, 6615-6621.
- [89] Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V. et al. (2000) Factors Governing the Assembly of Cationic Phospholipid-DNA Complexes. *Biophys. J.*: **78**, 1620-1633.
- [90] Pozharski, E. V.; MacDonald, R. C. (2007) Single Lipoplex Study of Cationic Lipoid–DNA, Self-Assembled Complexes. *Mol. Pharmaceutics*: **4**, 962-974.
- [91] Ulrich, A. (2002) Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Biosci. Rep.*: **22**, 129-150.
- [92] Koynova, R.; Tenchov, B. (2010) Cationic Lipids: Molecular Structure/Transfection Activity Relationships and Interactions with Biomembranes. *Top Curr Chem*: **296**, 51-93.
- [93] Dias, R.; Antunes, F. et al. (2002) DNA-lipid systems. A physical chemistry study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*: **35**, 509-522.
- [94] Zuhorn, I. S.; Visser, W. H. et al. (2002) Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochim. Biophys. Acta*: **1560**, 25-36.
- [95] Zelphati, O.; Uyechi, L. S. et al. (1998) Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid-oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta*: **1380**, 119-133.
- [96] Li, L.; Song, H. et al. (2011) Gene transfer efficacies of serum-resistant amino acids-based cationic lipids: Dependence on headgroup, lipoplex stability and cellular uptake. *Int. J. Pharm.*: **408**, 183-190.
- [97] Fumoto, S. (2005) Interaction with Blood Components Plays a Crucial Role in Asialoglycoprotein Receptor-Mediated in Vivo Gene Transfer by Galactosylated Lipoplex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: **315**, 484-493.
- [98] Guo, X.; Huang, L. (2012) Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.*: **45**, 971-979.
- [99] Immordino, M. L.; Dosio, F. et al. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomed.*: **1**, 297-315.
- [100] Torchilin, V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discovery*: **4**, 145-160.
- [101] Bruckheimer, E.; Harvie, P. et al. (2003) In vivo efficacy of folate-targeted lipid–protamine–DNA (LPD-PEG-Folate) complexes in an immunocompetent syngeneic model for breast adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther.*: **11**, 128-134.
- [102] Xu, L.; Anchordoquy, T. (2011) Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: Challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *J. Pharm. Sci.*: **100**, 38-52.
- [103] Harvie, P.; Dutzar, B. et al. (2003) Targeting of Lipid-Protamine-DNA (LPD) Lipopolyplexes Using RGD Motifs. *J. Liposome Res.*: **13**, 231-247.
- [104] Hashida, M.; Nishikawa, M. et al. (2001) Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.*: **52**, 187-196.
- [105] Audouy, S.; Hoekstra, D. (2001) Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo. *Mol. Membr. Biol.*: **18**, 129-143.

- [106] Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **93**, 12349-12354.
- [107] Dass, C. R. (2002) Vehicles for oligonucleotide delivery to tumours. *J. Pharm. Pharmacol.*: **54**, 3-27.
- [108] Sahay, G.; Alakhova, D. Y. et al. (2010) Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release*: **145**, 182-195.
- [109] Zabner, J.; Fasbender, A. J. et al. (1995) Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid. *J. Biol. Chem.*: **270**, 18997-19007.
- [110] Zuhorn, I. S.; Engberts, J. B. F. N. et al. (2006) Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.*: **36**, 349-362.
- [111] Zuhorn, I. S.; Kalicharan, R. et al. (2002) Lipoplex-mediated Transfection of Mammalian Cells Occurs through the Cholesterol-dependent Clathrin-mediated Pathway of Endocytosis. *J. Biol. Chem.*: **277**, 18021-18028.
- [112] Prasad, T. K.; Rangaraj, N. et al. (2005) Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. *FEBS Lett.*: **579**, 2635-2642.
- [113] Khalil, I. A.; Kogure, K. et al. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev*: **58**, 32-45.
- [114] Rejman, J.; Bragonzi, A. et al. (2005) Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.*: **12**, 468-474.
- [115] Wong, A. W.; Scales, S. J. et al. (2007) DNA Internalized via Caveolae Requires Microtubule-dependent, Rab7-independent Transport to the Late Endocytic Pathway for Delivery to the Nucleus. *J. Biol. Chem.*: **282**, 22953-22963.
- [116] Rejman, J.; Oberle, V. et al. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*: **377**, 159-169.
- [117] Zelphati, O.; Francis C. Szoka, J. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **93**, 11493-11498.
- [118] Leal, C. I.; Ewert, K. K. et al. (2011) Nanogyroids Incorporating Multivalent Lipids: Enhanced Membrane Charge Density and Pore Forming Ability for Gene Silencing. *Langmuir*: **27**, 7691-7697.
- [119] Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. (2002) On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *J Membr Biol*: **189**, 167-179.
- [120] Wrobel, I.; Collins, D. (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*: **1235**, 296-304.
- [121] Guo, X.; Szoka, F. C. (2003) Chemical Approaches to Triggerable Lipid Vesicles for Drug and Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.*: **36**, 335-341.
- [122] Tarahovsky, Y. S.; Koynova, R. et al. (2004) DNA Release from Lipoplexes by Anionic Lipids: Correlation with Lipid Mesomorphism, Interfacial Curvature, and Membrane Fusion. *Biophys. J.*: **87**, 1054-1064.
- [123] Chen, H.; Zhang, H. et al. (2012) Novel pH-sensitive cationic lipids with linear ortho ester linkers for gene delivery. *Eur. J. Med. Chem.*: **52**, 159-172.
- [124] Zhang, X.-X.; McIntosh, T. J. et al. (2012) Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie*: **94**, 42-58.
- [125] Schulze, I. C., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006.
- [126] Medina-Kauwe, L. K.; Xie, J. et al. (2005) Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.*: **12**, 1734-1751.
- [127] Cornelis, S.; Vandenbranden, M. et al. (2002) Role of Intracellular Cationic Liposome-DNA Complex Dissociation in Transfection Mediated by Cationic Lipids. *DNA Cell Biol.*: **21**, 91-97.
- [128] Morille, M.; Passirani, C. et al. (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*: **29**, 3477-3496.

- [129] Munkonge, F. (2003) Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.*: **55**, 749-760.
- [130] Eguchi, A.; Furusawa, H. et al. (2005) Optimization of nuclear localization signal for nuclear transport of DNA-encapsulating particles. *J Control Release*: **104**, 507-519.
- [131] Aris, A.; Villaverde, A. (2003) Engineering nuclear localization signals in modular protein vehicles for gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun*: **304**, 625-631.
- [132] Brisson, M.; Tseng, W. C. et al. (1999) Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Hum Gene Ther*: **10**, 2601-2613.
- [133] Brunner, S. (2002) Overcoming the Nuclear Barrier: Cell Cycle Independent Nonviral Gene Transfer with Linear Polyethylenimine or Electroporation. *Mol. Ther.*: **5**, 80-86.
- [134] Brunner, S.; Sauer, T. et al. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.*: **7**, 401-407.
- [135] Escriou, V.; Carrière, M. et al. (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J. Gene Med.*: **3**, 179-187.
- [136] Heinze, M., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010.
- [137] Ma, B.; Zhang, S. et al. (2007) Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Controlled Release*: **123**, 184-194.
- [138] Lieber, M.; Smith, B. et al. (1976) A Continuous Tumor-Cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells. *Int. J. Cancer*: **17**, 62-70.
- [139] Gluzman, Y. (1981) SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell*: **23**, 175-182.
- [140] Knowles, B. B.; Howe, C. C. et al. (1980) Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. *Science*: **209**, 497-499.
- [141] Aden, D. P.; Fogel, A. et al. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*: **282**, 615-616.
- [142] Li, X.; Yang, Y. et al. (2002) TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*: **416**, 345-347.
- [143] Technologies<sub>(TM)</sub>, L. Plasmid pCMV·SPORT-bgal. *Vector Information: Doc. Rev.* **091197**.
- [144] Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K. et al. (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- [145] Chalfie, M.; Tu, Y. et al. (1994) Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*: **263**, 802-805.
- [146] Inouye, S.; Tsuji, F. I. (1994) Aequorea green fluorescent protein Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.*: **341**, 277-280.
- [147] Bar-Nun, S.; Shneyour, Y. et al. (1983) G-418, An Elongation Inhibitor of 80 S Ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*: **741**, 123-127.
- [148] Wagman, G. H.; Testa, R. T. et al. (1974) Antibiotic G-418, a New Micromonospora-Produced Aminoglycoside with Activity Against Protozoa and Helminths: Fermentation, Isolation, and Preliminary Characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*: **6**, 144-149.
- [149] Clark, D. P. (2006) Molecular Biology - Das Original mit Übersetzungshilfe - Understanding the Genetic Revolution; Spektrum Akademischer Verlag: München
- [150] Mülhardt, C. (2009) Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics; 6. Auflage ed.; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- [151] Laboratories, C. (1997) pEGFP-C2 Vector Information. *Protocol PT3051-5: Version PR7Y574*.

- [152] Gassen, H. G.; Schrimpf, G. (1999) *Gentechnische Methoden*; 2. Auflage ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg
- [153] QIAGEN® (2000) *QIAGEN® Plasmid-Handbuch*.
- [154] Maniatis, T.; Fritsch, E. F. et al. (1987) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: New York
- [155] Lindl, T.; Bauer, J. (1994) *Zell- und Gewebekultur*; 3. Auflage ed.; Gustav Fischer Verlag: Stuttgart
- [156] Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*: **65**, 55-63.
- [157] Rehm, H.; Letzel, T.; Verlag, S. A., Ed.; Springer Link: Heidelberg, 2010.
- [158] Smith, P. K.; Krohn, R. I. et al. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid'. *Anal. Biochem.*: **150**, 76-85.
- [159] Pecora, R. (2000) Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanopart. Res.*: **2**, 123-131.
- [160] Keck, C. M.; Müller, R. H. In *Moderne Pharmazeutische Technologie*; Freie Universität Berlin, 2009.
- [161] Hendrix, M.; Leipertz, A. (1984) Photonenkorrelationsspektroskopie Hochauflösende optische Spektroskopie. *Phys. Unserer Zeit*: **3**, 68-75.
- [162] Malvern (2004) Zetasizer Nano Series User Manual. *MAN017*.
- [163] Malvern-Instruments In *DLS technical note*, <http://www.malvern.de/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>; Vol. MRK656-01.
- [164] *Zetapotenzial und Partikelladung in der Laborpraxis*; Müller, R. H., Ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1996.
- [165] Hinze, F.; Ripperger, S. et al. (1999) Praxisrelevante Zetapotentialmessung mit unterschiedlichen Meßtechniken. *Chem. Ing. Tech.*: **71**, 338-347.
- [166] Miller, J. D.; Yalamanchili, M. R. (1992) Surface Charge of Alkali Halide Particles As Determined by Laser-Doppler Electrophoresis. *Langmuir*: **8**, 1464-1469.
- [167] Wright, C. S. (1984) Structural Comparison of the Two Distinct Sugar Binding Sites in Wheat Germ Agglutinin Isolectin II. *J. Mol. Biol.*: **178**, 91-104.
- [168] Wood, J. G.; Byrd, F. I. et al. (1981) Lectin cytochemistry of carbohydrates membranes of rat cerebellum on cell. *J. Neurocytol.*: **10**, 149-159.
- [169] *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*; Kraus, B.; Ziegler, M. et al., Eds., 2007.
- [170] Breunig, M.; Lungwitz, U. et al. (2006) Fluorescence resonance energy transfer: Evaluation of the intracellular stability of polyplexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*: **63**, 156-165.
- [171] Koynova, R.; Tenchov, B. et al. (2009) Hydrophobic Moiety of Cationic Lipids Strongly Modulates Their Transfection Activity. *Mol. Pharmaceutics*: **6**, 951-958.
- [172] Nelson, D.; Cox, M. (2001) *Lehninger Biochemie*: Berlin
- [173] Yu, B.; Hsu, S.-H. et al. (2012) Lipid nanoparticles for hepatic delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*: **33**, 5924-5934.
- [174] Li, L.; Wang, H. et al. (2010) Polymer- and lipid-based nanoparticle therapeutics for the treatment of liver diseases. *Nano Today*: **5**, 296-312.
- [175] Kim, S.-W.; Ogawa, T. et al. (2004) Efficacy and cytotoxicity of cationic-agent-mediated nonviral gene transfer into osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*: **71A**, 308-315.
- [176] Friend, D. S.; Papahadjopoulos, D. et al. (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*: **1278**, 41-50.

- [177] Nguyen, L. T.; Atobe, K. et al. (2007) Complex Formation with Plasmid DNA Increases the Cytotoxicity of Cationic Liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*: **30**, 751-757.
- [178] Antipina, M. N.; Schulze, I. et al. (2009) Physical-Chemical Properties and Transfection Activity of Cationic Lipid/DNA Complexes. *ChemPhysChem*: **10**, 2471-2479.
- [179] Lee, E. R.; Marshall, J. et al. (1996) Detailed Analysis of Structures and Formulations of Cationic Lipid for Efficient Gene Transfer to the Lung. *Hum. Gene Ther.*: **7**, 1701-1717.
- [180] Zhou, X.; Huang, L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta*: **1189**, 195-203.
- [181] Farhood, H.; Serbina, N. et al. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta*: **1235**, 289-295.
- [182] Hong, K.; Zheng, W. et al. (1997) Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett.*: **400**, 233-237.
- [183] Templeton, N. S.; Lasic, D. D. et al. (1997) Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotech*: **15**, 647-652.
- [184] Mouritsena, O. G.; Zuckermannb, M. J. (2004) What's So Special About Cholesterol? *Lipids*: **39**, 1101-1113.
- [185] Meekel, A. A. P.; Wagenaar, A. et al. (2000) Synthesis of Pyridinium Amphiphiles Used for Transfection and Some Characteristics of Amphiphile/DNA Complex Formation. *Eur. J. Org. Chem.*: **2000**, 665-673.
- [186] Alam, J.; Cook, J. L. (1990) Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*: **188**, 245-254.
- [187] Rehman, Z.; Sjollem, K. A. et al. (2012) Nonviral gene delivery vectors use syndecan-dependent transport mechanisms in filopodia to reach the cell surface. *ACS Nano*: **6**, 7521-7532.
- [188] Amenitsch, H.; Caracciolo, G. et al. (2011) Existence of hybrid structures in cationic liposome/DNA complexes revealed by their interaction with plasma proteins. *Colloids Surf., B*: **82**, 141-146.
- [189] Streib, J. (1988) Partikelgrößenbestimmung mit der Photonen-Korrelations-Spektroskopie. *Chem. Ing. Tech.*: **60**, 138-139.
- [190] Stock, R. S.; Ray, W. H. (1985) Interpretation of Photon Correlation Spectroscopy Data: A Comparison of Analysis Methods. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*: **23**, 1393-1447.
- [191] (2009) Recommended Procedures for Labeling. *ATTO-TEC GmbH*.
- [192] Kuntsche, J. (2011) Untersuchungen von parenteralen Fetteulsionen mittels Asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4). [www.analytik-news.de](http://www.analytik-news.de).
- [193] Netzel, T. L.; Nafisi, K. et al. (1995) Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains. *J. Phys. Chem.*: **99**, 17936-17947.
- [194] Rye, H. S.; Yue, S. et al. (1992) Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res.*: **20**, 2803-2812.
- [195] Glazer, A. N.; Peck, K. et al. (1990) A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: Application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **87**, 3851-3855.
- [196] Lodish, H.; Berk, A. et al. (2001) *Molekulare Zellbiologie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Berlin

- [197] Madeira, C.; Loura, L. M. S. et al. (2003) Characterization of DNA/Lipid Complexes by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biophys. J.*: **85**, 3106-3119.

## Anhang

Ergebnisse der Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen mit serumfreien Intervall an den Zelllinien A549, COS-7 und Hep-G2

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse							
		( +/- )- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid</sub> / Well	A549		COS-7		Hep-G2			
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]		
1	E12/DOPE 1/2	1/2	0,24	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	218 ± 36	97 ± 11		
		1/1	0,49					389 ± 42	82 ± 10		
		3/2	0,73					364 ± 87	77 ± 10		
		2/1	0,97					281 ± 22	78 ± 12		
2	E12Lys/DOPE 1/2	1/2	0,12	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	32 ± 25	79 ± 11		
		1/1	0,24					88 ± 6	82 ± 10		
		3/2	0,36					102 ± 33	77 ± 10		
		2/1	0,49					169 ± 21	78 ± 12		
3	E14/DOPE 1/2	1/2	0,24	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	179 ± 66	85 ± 7		
		1/1	0,49					319 ± 63	82 ± 3		
		3/2	0,73					454 ± 52	86 ± 8		
		2/1	0,97					433 ± 40	79 ± 2		
4	E14GlyLys/DOPE 1/2	1/2	0,12	148 ± 101	98 ± 8	177 ± 76	92 ± 10	75 ± 38	92 ± 18		
		1/1	0,24	308 ± 185	85 ± 10	454 ± 172	82 ± 8	135 ± 25	86 ± 18		
		3/2	0,36	432 ± 101	88 ± 10	492 ± 321	80 ± 12	591 ± 196	83 ± 18		
		2/1	0,49	540 ± 148	80 ± 14	523 ± 214	71 ± 5	510 ± 247	68 ± 9		
5.1	E14Lys/DOPE 2/1	3/2	0,36	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	288 ± 94	60 ± 17	214 ± 202	73 ± 14
		3/1	0,73					377 ± 79	50 ± 15	197 ± 188	65 ± 17
		9/2	1,09					230 ± 113	43 ± 14	188 ± 148	72 ± 16
		6/1	1,46					264 ± 66	44 ± 19	189 ± 63	62 ± 18

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/-)-Ladungsverhältnis	$n_{\text{kat.Lipid/Well}}$	A549		COS-7		Hep-G2	
	Lipid/Helferlipid (n/n)			Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]
5.2	E14Lys/DOPE 1/1	1/1	0,24	nicht ermittelt		454 $\pm$ 50	65 $\pm$ 19	372 $\pm$ 247	81 $\pm$ 6
		2/1	0,49			466 $\pm$ 64	62 $\pm$ 17	408 $\pm$ 208	72 $\pm$ 15
		3/1	0,73			518 $\pm$ 80	44 $\pm$ 17	446 $\pm$ 251	63 $\pm$ 16
		4/1	0,97			418 $\pm$ 32	48 $\pm$ 14	347 $\pm$ 55	59 $\pm$ 21
5.3	E14Lys/DOPE 1/2	1/2	0,12	54 $\pm$ 42	83 $\pm$ 16	105 $\pm$ 51	90 $\pm$ 5	150 $\pm$ 106	95 $\pm$ 21
		1/1	0,24	826 $\pm$ 379	86 $\pm$ 6	313 $\pm$ 128	90 $\pm$ 7	679 $\pm$ 141	71 $\pm$ 10
		3/2	0,36	280 $\pm$ 87	83 $\pm$ 2	420 $\pm$ 120	73 $\pm$ 13	855 $\pm$ 267	69 $\pm$ 16
		2/1	0,49	288 $\pm$ 109	84 $\pm$ 9	644 $\pm$ 230	80 $\pm$ 2	1312 $\pm$ 445	66 $\pm$ 11
		5/2	0,61	nicht ermittelt		628 $\pm$ 191	68 $\pm$ 13	1071 $\pm$ 416	56 $\pm$ 13
		7/2	0,85			809 $\pm$ 282	57 $\pm$ 12	1209 $\pm$ 486	53 $\pm$ 15
5.4	E14Lys/Chol 2/1	3/2	0,36	nicht ermittelt		15 $\pm$ 3	82 $\pm$ 28	124 $\pm$ 87	92 $\pm$ 7
		3/1	0,73			104 $\pm$ 54	48 $\pm$ 12	154 $\pm$ 97	76 $\pm$ 24
		9/2	1,09			106 $\pm$ 20	48 $\pm$ 18	123 $\pm$ 21	64 $\pm$ 10
		6/1	1,46			64 $\pm$ 23	44 $\pm$ 16	52 $\pm$ 27	65 $\pm$ 8
5.5	E14Lys/Chol 1/2	1/1	0,24	nicht ermittelt		90 $\pm$ 20	67 $\pm$ 6	134 $\pm$ 73	85 $\pm$ 5
		2/1	0,49			261 $\pm$ 49	43 $\pm$ 12	516 $\pm$ 346	48 $\pm$ 1
		3/1	0,73			113 $\pm$ 55	30 $\pm$ 1	348 $\pm$ 65	46 $\pm$ 10
		4/1	0,97			141 $\pm$ 49	26 $\pm$ 1	196 $\pm$ 24	44 $\pm$ 12
6.1	E14trisLys/DOPE 1/2	3/2	0,18	75 $\pm$ 60	93 $\pm$ 9	139 $\pm$ 73	92 $\pm$ 20	536 $\pm$ 266	84 $\pm$ 13
		5/2	0,30	186 $\pm$ 61	77 $\pm$ 14	816 $\pm$ 366	86 $\pm$ 15	830 $\pm$ 357	66 $\pm$ 22
		7/2	0,43	272 $\pm$ 117	71 $\pm$ 7	399 $\pm$ 171	78 $\pm$ 3	1068 $\pm$ 300	55 $\pm$ 16
		9/2	0,55	205 $\pm$ 63	68 $\pm$ 7	451 $\pm$ 179	60 $\pm$ 20	976 $\pm$ 220	46 $\pm$ 16
6.2	E14trisLys/Chol 1/1	2/1	0,24	14 $\pm$ 3	71 $\pm$ 8	nicht ermittelt		11 $\pm$ 5	60 $\pm$ 4
		4/1	0,49	18 $\pm$ 4	58 $\pm$ 5			7 $\pm$ 6	47 $\pm$ 7
		6/1	0,73	29 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4			98 $\pm$ 12	50 $\pm$ 3
		8/1	0,97	86 $\pm$ 13	49 $\pm$ 3			53 $\pm$ 35	40 $\pm$ 10

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/)- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid/</sub> Well	A549		COS-7		Hep-G2	
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]
7	E16GlyLys/DOPE 1/2	1/2	0,12	keine TE	91 ± 5	51 ± 53	86 ± 3	35 ± 19	88 ± 9
		1/1	0,24	143 ± 22	83 ± 5	173 ± 25	80 ± 10	135 ± 30	79 ± 9
		3/2	0,36	230 ± 26	82 ± 6	250 ± 85	71 ± 2	552 ± 70	80 ± 9
		2/1	0,49	399 ± 18	76 ± 10	286 ± 49	72 ± 8	354 ± 176	72 ± 10
8	E14_16/DOPE 1/2	1/2	0,12	nicht ermittelt		nicht ermittelt		59 ± 19	85 ± 13
		1/1	0,24					114 ± 25	84 ± 15
		3/2	0,36					114 ± 31	85 ± 13
		2/1	0,49					168 ± 26	82 ± 12
9	E14_16Lys/DOPE 1/2	1/2	0,12	nicht ermittelt		nicht ermittelt		958 ± 264	81 ± 12
		1/1	0,24					1237 ± 233	82 ± 6
		3/2	0,36					1446 ± 243	75 ± 16
		2/1	0,49					500 ± 120	74 ± 2
10	E16/DOPE 1/2	1/2	0,24	nicht ermittelt		nicht ermittelt		16 ± 5	85 ± 8
		1/1	0,49					40 ± 7	85 ± 11
		3/2	0,73					46 ± 5	87 ± 8
		2/1	0,97					57 ± 14	79 ± 11
11	E16Lys/DOPE 1/2	1/2	0,12	keine TE	92 ± 9	51 ± 22	90 ± 4	151 ± 90	86 ± 11
		1/1	0,24	86 ± 19	88 ± 3	378 ± 142	84 ± 8	318 ± 80	79 ± 6
		3/2	0,36	234 ± 77	84 ± 6	360 ± 103	77 ± 13	1075 ± 391	69 ± 17
		2/1	0,49	128 ± 22	74 ± 7	223 ± 52	75 ± 12	852 ± 192	51 ± 4
12.1	E18u14Lys/DOPE 2/1	3/2	0,36	nicht ermittelt		nicht ermittelt		489 ± 36	88 ± 3
		3/1	0,73					459 ± 21	84 ± 3
		9/2	1,09					615 ± 181	75 ± 4
		6/1	1,46					320 ± 36	72 ± 6

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/)- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid</sub> / Well	A549		COS-7		Hep-G2	
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]
12.2	E18u14Lys/DOPE 1/1	1/1	0,24	nicht ermittelt		nicht ermittelt		265 ± 38	90 ± 7
		2/1	0,49					136 ± 6	86 ± 3
		3/1	0,73					374 ± 28	70 ± 5
		4/1	0,97					392 ± 23	66 ± 3
12.3	E18u14Lys/DOPE 1/2	1/2	0,12	nicht ermittelt		144 ± 130	84 ± 8	161 ± 77	77 ± 3
		1/1	0,24			379 ± 90	84 ± 13	403 ± 194	77 ± 4
		3/2	0,36			903 ± 176	74 ± 17	676 ± 178	67 ± 8
		2/1	0,49			444 ± 134	72 ± 16	272 ± 55	62 ± 8
12.4	E18u14Lys/Chol 2/1	3/2	0,36	nicht ermittelt		nicht ermittelt		235 ± 17	83 ± 7
		3/1	0,73					958 ± 117	75 ± 13
		9/2	1,09					769 ± 242	61 ± 8
		6/1	1,46					207 ± 25	57 ± 8
13.1	G14diLys/DOPE 2/1	2/1	0,24	nicht ermittelt		77 ± 28	93 ± 17	56 ± 15	90 ± 15
		4/1	0,49			110 ± 59	76 ± 13	213 ± 94	78 ± 12
		6/1	0,73			286 ± 20	70 ± 2	694 ± 191	73 ± 9
		8/1	0,97			480 ± 95	82 ± 27	385 ± 114	69 ± 7
13.2	G14diLys/DOPE 1/1	3/2	0,18	nicht ermittelt		229 ± 67	70 ± 10	195 ± 68	84 ± 15
		3/1	0,36			335 ± 114	65 ± 4	1056 ± 262	65 ± 4
		7/2	0,43			333 ± 69	59 ± 3	917 ± 186	53 ± 7
		6/1	0,73			428 ± 117	60 ± 5	748 ± 78	51 ± 5
13.3	G14diLys/DOPE 1/2	1/2	0,06	30 ± 8	96 ± 5	nicht ermittelt		44 ± 22	86 ± 7
		3/2	0,18	28 ± 7	93 ± 6	473 ± 114	79 ± 11	720 ± 147	72 ± 16
		5/2	0,30	509 ± 212	51 ± 1	339 ± 104	70 ± 19	1250 ± 295	58 ± 18
		7/2	0,43	1127 ± 376	47 ± 5	482 ± 131	66 ± 13	934 ± 268	55 ± 15
		9/2	0,55	nicht ermittelt		296 ± 59	68 ± 8	618 ± 190	54 ± 0

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/)- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid/</sub> Well	A549		COS-7		Hep-G2	
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]
13.4	G14diLys/Chol 2/1	2/1	0,24	nicht ermittelt		17 ± 12	91 ± 6	35 ± 38	91 ± 8
		4/1	0,49			31 ± 15	77 ± 9	34 ± 28	86 ± 15
		6/1	0,73			50 ± 25	78 ± 11	24 ± 16	88 ± 17
		8/1	0,97			65 ± 27	76 ± 13	38 ± 35	81 ± 18
13.5	G14diLys/Chol 1/2	3/2	0,18	66 ± 35	88 ± 20	91 ± 20	79 ± 2	20 ± 6	78 ± 6
		3/1	0,36	43 ± 15	80 ± 17	318 ± 61	71 ± 2	45 ± 12	54 ± 8
		7/2	0,43	356 ± 65	64 ± 16	320 ± 65	62 ± 1	186 ± 46	49 ± 5
		6/1	0,73	234 ± 54	61 ± 14	238 ± 40	59 ± 1	201 ± 28	42 ± 3
14.1	G16diLys/DOPE 2/1	2/1	0,24	nicht ermittelt		63 ± 7	87 ± 10	58 ± 17	103 ± 13
		4/1	0,49			111 ± 8	75 ± 1	230 ± 17	83 ± 18
		6/1	0,73			218 ± 74	78 ± 10	308 ± 58	94 ± 27
		8/1	0,97			257 ± 91	72 ± 5	455 ± 117	76 ± 17
14.2	G16diLys/DOPE 1/1	3/2	0,18	nicht ermittelt		34 ± 10	103 ± 3	62 ± 18	89 ± 22
		3/1	0,36			239 ± 57	91 ± 9	817 ± 53	78 ± 14
		7/2	0,43			302 ± 56	85 ± 2	1065 ± 146	71 ± 12
		6/1	0,73			361 ± 104	78 ± 1	676 ± 59	64 ± 11
14.3	G16diLys/DOPE 1/2	3/2	0,18	25 ± 11	80 ± 9	278 ± 89	89 ± 11	465 ± 180	89 ± 22
		5/2	0,30	1254 ± 471	66 ± 30	434 ± 151	82 ± 12	734 ± 251	78 ± 14
		7/2	0,43	1161 ± 285	61 ± 28	731 ± 21	76 ± 12	1496 ± 137	71 ± 12
		9/2	0,55	nicht ermittelt		450 ± 135	76 ± 11	895 ± 213	64 ± 11
15	P14diLys/DOPE 1/2	1/1	0,16	109 ± 33	90 ± 3	1009 ± 99	71 ± 11	314 ± 111	89 ± 22
		3/2	0,24	271 ± 89	79 ± 4	866 ± 111	69 ± 5	477 ± 147	77 ± 16
		2/1	0,32	342 ± 95	80 ± 10	742 ± 34	65 ± 10	667 ± 176	74 ± 24
		5/2	0,41	185 ± 35	72 ± 9	569 ± 143	61 ± 7	516 ± 169	64 ± 16

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/)- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid</sub> / Well	A549		COS-7		Hep-G2	
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]
16	P14GlyLys/DOPE 1/2	1/1	0,24	199 ± 46	92 ± 4	1095 ± 314	75 ± 8	412 ± 115	94 ± 22
		3/2	0,36	331 ± 43	86 ± 10	831 ± 301	76 ± 11	668 ± 149	79 ± 19
		2/1	0,49	458 ± 58	80 ± 8	1192 ± 312	65 ± 10	1310 ± 404	75 ± 21
		5/2	0,61	508 ± 125	72 ± 14	535 ± 132	59 ± 11	1381 ± 464	62 ± 16
17	P14Lys/DOPE 1/2	1/1	0,24	200 ± 37	93 ± 18	691 ± 160	84 ± 4	674 ± 147	92 ± 28
		3/2	0,36	360 ± 135	81 ± 16	581 ± 87	82 ± 8	2051 ± 234	75 ± 17
		2/1	0,49	363 ± 163	76 ± 12	404 ± 126	81 ± 8	994 ± 411	72 ± 18
		5/2	0,61	479 ± 197	63 ± 12	506 ± 169	72 ± 6	775 ± 236	63 ± 15
18	P16GlyLys/DOPE 1/2	1/1	0,24	119 ± 18	92 ± 1	357 ± 97	85 ± 8	173 ± 50	107 ± 8
		3/2	0,36	177 ± 56	88 ± 9	563 ± 162	93 ± 10	603 ± 205	93 ± 15
		2/1	0,49	187 ± 50	90 ± 2	1168 ± 69	79 ± 15	688 ± 184	109 ± 6
		5/2	0,61	238 ± 48	85 ± 7	978 ± 202	92 ± 12	905 ± 94	90 ± 4
19	P16Lys/DOPE 1/2	1/1	0,24	79 ± 6	94 ± 2	84 ± 20	81 ± 2	279 ± 102	84 ± 22
		3/2	0,36	204 ± 49	77 ± 9	135 ± 31	73 ± 1	393 ± 101	70 ± 11
		2/1	0,49	92 ± 7	83 ± 6	167 ± 30	73 ± 5	299 ± 74	73 ± 19
		5/2	0,61	108 ± 8	78 ± 8	242 ± 25	75 ± 6	744 ± 50	49 ± 11
20	T12diLys/DOPE 1/2	3/2	0,18	106 ± 30	89 ± 16	nicht ermittelt		49 ± 19	99 ± 3
		5/2	0,30	176 ± 56	81 ± 21			708 ± 122	84 ± 6
		7/2	0,43	144 ± 57	86 ± 23			279 ± 36	92 ± 5
		9/2	0,55	168 ± 71	82 ± 19			188 ± 85	84 ± 5
21	T14/DOPE 1/2	1/1	0,24	247 ± 37	65 ± 10	43 ± 4	47 ± 5	407 ± 98	58 ± 21
		3/2	0,36	381 ± 144	59 ± 8	169 ± 74	42 ± 7	409 ± 62	42 ± 14
		2/1	0,49	659 ± 157	53 ± 10	315 ± 76	40 ± 7	476 ± 141	53 ± 13
		5/2	0,61	138 ± 21	53 ± 10	386 ± 78	28 ± 4	333 ± 136	45 ± 9

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/-)- Ladungs- verhältnis	$n_{\text{kat.Lipid/Well}}$	A549		COS-7		Hep-G2	
	Lipid/Helferlipid (n/n)			Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]
22	T14_16/DOPE 1/2	1/1	0,24	47 $\pm$ 22	70 $\pm$ 16	52 $\pm$ 4	88 $\pm$ 7	12 $\pm$ 4	58 $\pm$ 8
		3/2	0,36	174 $\pm$ 57	59 $\pm$ 5	414 $\pm$ 95	68 $\pm$ 9	287 $\pm$ 41	60 $\pm$ 14
		2/1	0,48	179 $\pm$ 65	65 $\pm$ 15	539 $\pm$ 79	46 $\pm$ 7	370 $\pm$ 89	57 $\pm$ 7
		5/2	0,61	184 $\pm$ 33	61 $\pm$ 18	442 $\pm$ 46	46 $\pm$ 9	314 $\pm$ 86	54 $\pm$ 9
23	T16/DOPE 1/2	1/1	0,24	127 $\pm$ 38	64 $\pm$ 10	42 $\pm$ 20	68 $\pm$ 8	307 $\pm$ 78	68 $\pm$ 18
		3/2	0,36	327 $\pm$ 52	56 $\pm$ 8	170 $\pm$ 32	53 $\pm$ 10	469 $\pm$ 91	56 $\pm$ 13
		2/1	0,49	124 $\pm$ 15	57 $\pm$ 6	334 $\pm$ 72	43 $\pm$ 13	254 $\pm$ 40	58 $\pm$ 15
		5/2	0,61	92 $\pm$ 17	51 $\pm$ 6	324 $\pm$ 60	37 $\pm$ 11	152 $\pm$ 37	48 $\pm$ 7
24.1	T14diLys/ohne Helferlipid	5/2	0,3	nicht ermittelt		193 $\pm$ 53	72 $\pm$ 2	keine TE	89 $\pm$ 12
		5/1	0,61			241 $\pm$ 50	59 $\pm$ 4	keine TE	79 $\pm$ 8
		15/2	0,91			664 $\pm$ 160	58 $\pm$ 9	keine TE	62 $\pm$ 9
		10/1	1,2			627 $\pm$ 83	59 $\pm$ 8	keine TE	51 $\pm$ 6
24.2	T14diLys/DOPE 2/1	3/2	0,18	18 $\pm$ 3	91 $\pm$ 4	nicht ermittelt		11 $\pm$ 8	105 $\pm$ 7
		2/1	0,24	nicht ermittelt		1084 $\pm$ 185	88 $\pm$ 8	39 $\pm$ 24	90 $\pm$ 3
		5/2	0,3	1760 $\pm$ 352	74 $\pm$ 18	nicht ermittelt		57 $\pm$ 29	82 $\pm$ 4
		7/2	0,43	1426 $\pm$ 126	79 $\pm$ 12	nicht ermittelt		202 $\pm$ 34	81 $\pm$ 5
		5/1	0,61	nicht ermittelt		3145 $\pm$ 533	40 $\pm$ 6	183 $\pm$ 21	69 $\pm$ 6
		15/2	0,91	2226 $\pm$ 345	59 $\pm$ 5	nicht ermittelt		213 $\pm$ 51	68 $\pm$ 4
		8/1	0,97	nicht ermittelt		3692 $\pm$ 568	32 $\pm$ 5	461 $\pm$ 114	65 $\pm$ 6
		11/1	1,34			3825 $\pm$ 625	33 $\pm$ 5	145 $\pm$ 51	58 $\pm$ 4
24.3	T14diLys/DOPE 1/1	3/2	0,18	keine TE	90 $\pm$ 7	1069 $\pm$ 147	82 $\pm$ 12	138 $\pm$ 29	74 $\pm$ 14
		5/2	0,24	870 $\pm$ 195	51 $\pm$ 9	2285 $\pm$ 413	59 $\pm$ 16	482 $\pm$ 184	59 $\pm$ 13
		7/2	0,43	1011 $\pm$ 242	38 $\pm$ 5	3724 $\pm$ 910	42 $\pm$ 14	776 $\pm$ 102	61 $\pm$ 9
		9/2	0,55	nicht ermittelt		3772 $\pm$ 646	36 $\pm$ 12	657 $\pm$ 215	58 $\pm$ 8
		15/2	0,91	1081 $\pm$ 154	46 $\pm$ 7	1793 $\pm$ 176	54 $\pm$ 6	577 $\pm$ 186	55 $\pm$ 10

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/-)- Ladungs- verhält- nis	$n_{\text{kat.Lipid/Well}}$	A549		COS-7		Hep-G2	
	Lipid/Helferlipid (n/n)			Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta\text{-Gal}/m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]
24.4	T14diLys/DOPE 1/2	1/2	0,06	nicht ermittelt		nicht ermittelt		41 $\pm$ 17	93 $\pm$ 4
		1/1	0,12	nicht ermittelt		nicht ermittelt		121 $\pm$ 49	82 $\pm$ 4
		3/2	0,18	241 $\pm$ 20	83 $\pm$ 9	717 $\pm$ 115	86 $\pm$ 11	404 $\pm$ 96	81 $\pm$ 14
		2/1	0,24	475 $\pm$ 162	75 $\pm$ 17	1381 $\pm$ 238	69 $\pm$ 7	919 $\pm$ 175	76 $\pm$ 6
		5/2	0,3	800 $\pm$ 105	61 $\pm$ 16	1603 $\pm$ 397	69 $\pm$ 19	2234 $\pm$ 293	67 $\pm$ 10
		3/1	0,36	nicht ermittelt		2666 $\pm$ 321	63 $\pm$ 22	1525 $\pm$ 304	61 $\pm$ 5
		7/2	0,43	1430 $\pm$ 233	1449 $\pm$ 154	2484 $\pm$ 660	56 $\pm$ 14	1309 $\pm$ 202	68 $\pm$ 5
		9/2	0,55	792 $\pm$ 166	844 $\pm$ 75	1006 $\pm$ 177	47 $\pm$ 14	1285 $\pm$ 235	68 $\pm$ 11
24.5	T14diLys/Chol 2/1	3/2	0,18	keine TE	99 $\pm$ 13	nicht ermittelt		3 $\pm$ 4	91 $\pm$ 6
		2/1	0,24	nicht ermittelt		1218 $\pm$ 306	85 $\pm$ 7	19 $\pm$ 17	86 $\pm$ 7
		5/2	0,3	nicht ermittelt		nicht ermittelt		43 $\pm$ 19	80 $\pm$ 6
		5/1	0,61	565 $\pm$ 97	70 $\pm$ 5	1644 $\pm$ 218	64 $\pm$ 7	49 $\pm$ 10	81 $\pm$ 4
		11/2	0,67	107 $\pm$ 33	79 $\pm$ 4	nicht ermittelt		54 $\pm$ 23	80 $\pm$ 9
		8/1	0,97	nicht ermittelt		2481 $\pm$ 242	59 $\pm$ 7	229 $\pm$ 7	78 $\pm$ 5
		17/2	1,03	117 $\pm$ 15	76 $\pm$ 10	nicht ermittelt		59 $\pm$ 30	78 $\pm$ 4
		11/1	1,34	nicht ermittelt		1904 $\pm$ 473	57 $\pm$ 5	97 $\pm$ 41	76 $\pm$ 1
24.6	T14diLys/Chol 1/1	3/2	0,18	117 $\pm$ 23	96 $\pm$ 4	273 $\pm$ 55	71 $\pm$ 13	keine TE	89 $\pm$ 7
		5/2	0,30	757 $\pm$ 135	77 $\pm$ 3	1320 $\pm$ 167	49 $\pm$ 16	keine TE	84 $\pm$ 1
		7/2	0,43	nicht ermittelt		nicht ermittelt		110 $\pm$ 33	82 $\pm$ 6
		9/2	0,55	964 $\pm$ 283	70 $\pm$ 5	1768 $\pm$ 152	29 $\pm$ 10	460 $\pm$ 69	79 $\pm$ 4
		6/1	0,73	nicht ermittelt		1794 $\pm$ 246	25 $\pm$ 10	645 $\pm$ 106	56 $\pm$ 4
		15/2	0,91	1085 $\pm$ 303	70 $\pm$ 10	nicht ermittelt		161 $\pm$ 30	51 $\pm$ 4

Nr.	Liposom	Lipoplex		Transfektions- und Viabilitätsergebnisse					
		(+/)- Ladungs- verhält- nis	n <sub>kat.Lipid</sub> / Well	A549		COS-7		Hep-G2	
				Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]	Aktivität β-Gal/m <sub>Protein</sub> ± s [μU/μg]	Viabilität ± s [%]
24.7	T14diLys/Chol 1/2	3/2	0,18	nicht ermittelt		220 ± 80	82 ± 24	keine TE	64 ± 5
		2/1	0,24			519 ± 83	71 ± 17	86 ± 38	53 ± 3
		5/2	0,3			1036 ± 106	61 ± 14	185 ± 39	44 ± 4
		7/2	0,43			1448 ± 128	50 ± 14	315 ± 39	45 ± 2
		4/1	0,49			1497 ± 254	44 ± 3	626 ± 117	44 ± 4
		9/2	0,55			1552 ± 203	49 ± 18	692 ± 189	43 ± 3
		6/1	0,73			1863 ± 573	36 ± 6	247 ± 29	40 ± 7
		8/1	0,97			1620 ± 496	37 ± 1	181 ± 48	37 ± 4
25	T14_16diLys/DOPE 1/2	3/2	0,18	211 ± 39	88 ± 7	1040 ± 122	52 ± 4	2204 ± 433	87 ± 13
		5/2	0,30	384 ± 89	68 ± 14	620 ± 102	35 ± 10	2366 ± 178	69 ± 13
		7/2	0,43	603 ± 172	64 ± 12	811 ± 72	38 ± 13	1342 ± 343	70 ± 16
		9/2	0,55	458 ± 75	61 ± 10	622 ± 55	29 ± 14	1208 ± 207	70 ± 21
26	T16diLys/DOPE 1/2	3/2	0,18	304 ± 145	77 ± 12	585 ± 181	76 ± 21	260 ± 84	96 ± 21
		5/2	0,30	939 ± 242	66 ± 13	1755 ± 525	52 ± 13	410 ± 117	80 ± 23
		7/2	0,43	952 ± 149	66 ± 9	1117 ± 199	54 ± 10	1006 ± 189	86 ± 12
		9/2	0,55	521 ± 58	68 ± 14	1654 ± 416	49 ± 14	751 ± 158	78 ± 13

Serumversuche: Ergebnisse der Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen ohne serumfreien Intervall an der Zelllinie A549

Nr.	Liposom	Lipoplex	Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Zelllinie A549			
			serumfrei		serumhaltig	
	Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Aktivität $\beta$ -Gal/m <sub>Protein</sub> $\pm s$ [ $\mu$ U/ $\mu$ g]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta$ -Gal/m <sub>Protein</sub> $\pm s$ [ $\mu$ U/ $\mu$ g]	Viabilität $\pm s$ [%]
4	E14GlyLys/DOPE 1/2	3/2	432 $\pm$ 101	88 $\pm$ 12	295 $\pm$ 119	95 $\pm$ 2
		2/1	540 $\pm$ 148	80 $\pm$ 14	382 $\pm$ 152	93 $\pm$ 4
6.1	E14trisLys/DOPE 1/2	3/2	75 $\pm$ 60	93 $\pm$ 9	86 $\pm$ 36	76 $\pm$ 5
		5/2	186 $\pm$ 61	77 $\pm$ 14	257 $\pm$ 61	68 $\pm$ 7
		7/2	272 $\pm$ 117	71 $\pm$ 7	213 $\pm$ 68	68 $\pm$ 7
		9/2	205 $\pm$ 63	68 $\pm$ 7	304 $\pm$ 75	57 $\pm$ 8
16	P14GlyLys/DOPE 1/2	1/1	199 $\pm$ 46	92 $\pm$ 4	55 $\pm$ 27	95 $\pm$ 5
		3/2	331 $\pm$ 43	86 $\pm$ 10	168 $\pm$ 80	92 $\pm$ 4
		2/1	458 $\pm$ 58	80 $\pm$ 8	193 $\pm$ 47	89 $\pm$ 8
		5/2	508 $\pm$ 125	72 $\pm$ 14	603 $\pm$ 208	87 $\pm$ 3
17	P14Lys/DOPE 1/2	1/1	200 $\pm$ 37	93 $\pm$ 18	62 $\pm$ 38	99 $\pm$ 4
		3/2	360 $\pm$ 135	81 $\pm$ 16	157 $\pm$ 23	95 $\pm$ 6
		2/1	363 $\pm$ 163	76 $\pm$ 12	238 $\pm$ 91	93 $\pm$ 8
		5/2	479 $\pm$ 197	63 $\pm$ 12	388 $\pm$ 41	85 $\pm$ 10
18	P16GlyLys/DOPE 1/2	1/1	119 $\pm$ 18	92 $\pm$ 1	45 $\pm$ 18	99 $\pm$ 5
		3/2	177 $\pm$ 56	88 $\pm$ 9	115 $\pm$ 37	96 $\pm$ 2
		2/1	187 $\pm$ 50	90 $\pm$ 2	141 $\pm$ 32	98 $\pm$ 15
		5/2	238 $\pm$ 48	85 $\pm$ 7	169 $\pm$ 6	87 $\pm$ 10
24.4	T14diLys/DOPE 1/2	3/2	241 $\pm$ 20	83 $\pm$ 9	487 $\pm$ 142	93 $\pm$ 10
		5/2	800 $\pm$ 105	61 $\pm$ 16	1201 $\pm$ 254	56 $\pm$ 18
		7/2	1430 $\pm$ 233	58 $\pm$ 12	1449 $\pm$ 154	57 $\pm$ 21
		9/2	792 $\pm$ 166	56 $\pm$ 11	844 $\pm$ 75	56 $\pm$ 18

Serumversuche: Ergebnisse der Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen ohne serumfreien Intervall an der Zelllinie COS-7

Nr.	Liposom	Lipoplex (+/-)- Ladungs- verhältnis	Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Zelllinie COS-7			
			serumfrei		serumhaltig	
	Lipid/Helferlipid (n/n)		Aktivität $\beta$ -Gal/ $m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta$ -Gal/ $m_{\text{Protein}}$ $\pm s$ [ $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ]	Viabilität $\pm s$ [%]
4	E14GlyLys/DOPE 1/2	1/2	177 $\pm$ 76	92 $\pm$ 10	45 $\pm$ 13	83 $\pm$ 5
		1/1	454 $\pm$ 172	82 $\pm$ 8	184 $\pm$ 87	83 $\pm$ 4
		3/2	492 $\pm$ 321	80 $\pm$ 12	444 $\pm$ 156	84 $\pm$ 11
		2/1	523 $\pm$ 214	71 $\pm$ 5	783 $\pm$ 59	81 $\pm$ 6
5.3	E14Lys/DOPE 1/2	1/1	105 $\pm$ 51	90 $\pm$ 5	246 $\pm$ 128	91 $\pm$ 8
		3/2	313 $\pm$ 128	90 $\pm$ 7	483 $\pm$ 146	77 $\pm$ 3
		2/1	420 $\pm$ 120	73 $\pm$ 13	347 $\pm$ 142	77 $\pm$ 17
		5/2	644 $\pm$ 230	80 $\pm$ 2	485 $\pm$ 153	74 $\pm$ 10
6.1	E14trisLys/DOPE 1/2	3/2	139 $\pm$ 73	92 $\pm$ 20	110 $\pm$ 48	89 $\pm$ 9
		5/2	816 $\pm$ 366	86 $\pm$ 15	305 $\pm$ 138	74 $\pm$ 20
		7/2	399 $\pm$ 171	78 $\pm$ 3	976 $\pm$ 365	60 $\pm$ 20
		9/2	451 $\pm$ 179	60 $\pm$ 20	360 $\pm$ 160	54 $\pm$ 18
11	E16Lys/DOPE 1/2	1/2	51 $\pm$ 22	90 $\pm$ 4	123 $\pm$ 20	89 $\pm$ 12
		1/1	378 $\pm$ 142	84 $\pm$ 8	561 $\pm$ 231	79 $\pm$ 11
		3/2	360 $\pm$ 103	77 $\pm$ 13	667 $\pm$ 222	90 $\pm$ 8
		2/1	223 $\pm$ 52	75 $\pm$ 12	624 $\pm$ 32	84 $\pm$ 8
13.3	G14diLys/DOPE 1/2	5/2	473 $\pm$ 114	79 $\pm$ 11	224 $\pm$ 144	70 $\pm$ 3
		5/2	339 $\pm$ 104	70 $\pm$ 19	519 $\pm$ 81	63 $\pm$ 4
		7/2	482 $\pm$ 131	66 $\pm$ 13	342 $\pm$ 61	79 $\pm$ 12
		9/2	296 $\pm$ 59	68 $\pm$ 8	158 $\pm$ 85	61 $\pm$ 2

16	P14GlyLys/DOPE 1/2	1/1	1095 ± 314	75 ± 8	73 ± 5	80 ± 14
		3/2	831 ± 301	76 ± 11	268 ± 23	60 ± 6
		2/1	1192 ± 312	65 ± 10	346 ± 9	58 ± 11
		5/2	535 ± 132	59 ± 11	927 ± 39	52 ± 7
17	P14Lys/DOPE 1/2	1/1	691 ± 160	84 ± 4	783 ± 261	80 ± 8
		3/2	581 ± 87	82 ± 8	825 ± 170	82 ± 15
		2/1	404 ± 126	81 ± 8	405 ± 159	76 ± 9
		5/2	506 ± 169	72 ± 6	518 ± 146	69 ± 7
18	P16GlyLys/DOPE 1/2	1/1	357 ± 97	85 ± 8	368 ± 86	95 ± 3
		3/2	563 ± 162	93 ± 10	1010 ± 242	93 ± 3
		2/1	1168 ± 69	79 ± 15	920 ± 191	86 ± 5
		5/2	978 ± 202	92 ± 12	939 ± 527	88 ± 10
24.4	T14diLys/DOPE 1/2	3/2	717 ± 115	86 ± 11	705 ± 124	81 ± 9
		5/2	1603 ± 397	69 ± 19	1293 ± 208	65 ± 16
		7/2	2484 ± 660	63 ± 21	1433 ± 206	63 ± 21
		9/2	1006 ± 177	47 ± 14	1902 ± 607	57 ± 11

Serumversuche: Ergebnisse der Transfektionsversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen ohne serumfreien Intervall an der Zelllinie Hep-G2

Nr.	Liposom Lipid/Helferlipid (n/n)	Probe (+/-)- Ladungs- verhältnis	Transfektions- und Viabilitätsergebnisse der Zelllinie Hep-G2			
			serumfrei		serumhaltig	
			Aktivität $\beta$ -Gal/m <sub>Protein</sub> $\pm s$ [ $\mu$ U/ $\mu$ g]	Viabilität $\pm s$ [%]	Aktivität $\beta$ -Gal/m <sub>Protein</sub> $\pm s$ [ $\mu$ U/ $\mu$ g]	Viabilität $\pm s$ [%]
4	E14GlyLys/DOPE 1/2	1/2	75 $\pm$ 38	92 $\pm$ 18	74 $\pm$ 33	92 $\pm$ 4
		1/1	135 $\pm$ 25	86 $\pm$ 18	911 $\pm$ 167	85 $\pm$ 7
		3/2	591 $\pm$ 196	83 $\pm$ 18	952 $\pm$ 358	81 $\pm$ 4
		2/1	510 $\pm$ 247	68 $\pm$ 9	1132 $\pm$ 247	71 $\pm$ 7
5.3	E14Lys/DOPE 1/2	1/1	679 $\pm$ 141	71 $\pm$ 10	1465 $\pm$ 547	80 $\pm$ 18
		3/2	855 $\pm$ 267	69 $\pm$ 16	1887 $\pm$ 587	63 $\pm$ 13
		2/1	1312 $\pm$ 445	66 $\pm$ 11	1773 $\pm$ 748	58 $\pm$ 11
		5/2	1071 $\pm$ 416	56 $\pm$ 13	1723 $\pm$ 393	54 $\pm$ 17
6.1	E14trisLys/DOPE 1/2	3/2	536 $\pm$ 266	84 $\pm$ 13	764 $\pm$ 97	72 $\pm$ 6
		5/2	830 $\pm$ 357	66 $\pm$ 22	878 $\pm$ 233	42 $\pm$ 14
		7/2	1068 $\pm$ 300	55 $\pm$ 16	1221 $\pm$ 257	42 $\pm$ 6
		9/2	976 $\pm$ 220	46 $\pm$ 16	1130 $\pm$ 535	33 $\pm$ 4
11	E16Lys/DOPE 1/2	1/2	151 $\pm$ 90	86 $\pm$ 11	990 $\pm$ 80	71 $\pm$ 2
		1/1	318 $\pm$ 80	79 $\pm$ 6	961 $\pm$ 346	48 $\pm$ 7
		3/2	1075 $\pm$ 391	69 $\pm$ 17	1055 $\pm$ 95	55 $\pm$ 8
		2/1	852 $\pm$ 192	51 $\pm$ 4	827 $\pm$ 437	45 $\pm$ 4
13.3	G14diLys/DOPE 1/2	3/2	720 $\pm$ 147	72 $\pm$ 16	72 $\pm$ 30	54 $\pm$ 10
		5/2	1250 $\pm$ 295	58 $\pm$ 18	2014 $\pm$ 199	55 $\pm$ 5
		7/2	934 $\pm$ 268	55 $\pm$ 15	1734 $\pm$ 177	50 $\pm$ 3
		9/2	618 $\pm$ 190	54 $\pm$ 0	663 $\pm$ 55	44 $\pm$ 2

15	P14diLys/DOPE 1/2	1/1	314 ± 111	89 ± 22	440 ± 321	96 ± 9
		3/2	477 ± 147	77 ± 16	1082 ± 274	93 ± 10
		2/1	667 ± 176	74 ± 24	1194 ± 409	94 ± 11
		5/2	516 ± 169	64 ± 16	1164 ± 437	88 ± 3
16	P14GlyLys/DOPE 1/2	1/1	412 ± 115	94 ± 22	1332 ± 209	91 ± 11
		3/2	668 ± 149	79 ± 19	1582 ± 191	78 ± 18
		2/1	1310 ± 404	75 ± 21	1556 ± 446	86 ± 17
		5/2	1381 ± 464	62 ± 16	1627 ± 316	68 ± 16
17	P14Lys/DOPE 1/2	1/1	674 ± 147	92 ± 28	1014 ± 120	88 ± 17
		3/2	2051 ± 234	75 ± 17	1462 ± 421	72 ± 11
		2/1	994 ± 411	72 ± 18	1947 ± 610	72 ± 17
		5/2	775 ± 236	63 ± 15	1401 ± 292	56 ± 9
18	P16GlyLys/DOPE 1/2	1/1	173 ± 50	107 ± 8	368 ± 14	114 ± 23
		3/2	603 ± 205	93 ± 15	1035 ± 202	90 ± 24
		2/1	688 ± 184	109 ± 6	830 ± 170	106 ± 21
		5/2	905 ± 94	90 ± 4	1091 ± 187	90 ± 13
24.2	T14diLys/DOPE 2/1	3/2	11 ± 8	105 ± 7	36 ± 12	96 ± 7
		5/2	57 ± 29	82 ± 4	150 ± 31	92 ± 7
		7/2	202 ± 34	81 ± 5	526 ± 121	83 ± 7
		5/1	183 ± 21	69 ± 6	220 ± 53	81 ± 6
24.3	T14diLys/DOPE 1/1	3/2	138 ± 29	74 ± 14	16 ± 15	92 ± 7
		5/2	482 ± 184	59 ± 13	914 ± 98	70 ± 3
		7/2	776 ± 102	61 ± 9	796 ± 65	67 ± 1
		15/2	577 ± 186	55 ± 10	844 ± 18	55 ± 7
		3/2	404 ± 96	81 ± 14	989 ± 313	84 ± 17
		5/2	2234 ± 293	67 ± 10	2377 ± 355	68 ± 3
		7/2	1309 ± 202	68 ± 5	1509 ± 287	59 ± 8
		9/2	1285 ± 235	68 ± 11	1371 ± 303	46 ± 5

24.7	T14diLys/Chol 1/2	3/2	keine TE	$64 \pm 5$	$96 \pm 13$	$68 \pm 15$
		5/2	$185 \pm 39$	$44 \pm 4$	$225 \pm 16$	$57 \pm 13$
		7/2	$315 \pm 39$	$45 \pm 2$	$566 \pm 63$	$58 \pm 19$
		9/2	$692 \pm 189$	$43 \pm 3$	$1012 \pm 133$	$46 \pm 13$
26	T16diLys/DOPE 1/2	3/2	$260 \pm 84$	$96 \pm 21$	$212 \pm 53$	$91 \pm 4$
		5/2	$410 \pm 117$	$80 \pm 23$	$346 \pm 110$	$81 \pm 9$
		7/2	$1006 \pm 189$	$86 \pm 12$	$872 \pm 216$	$81 \pm 10$
		9/2	$751 \pm 158$	$78 \pm 13$	$682 \pm 117$	$74 \pm 15$

## Ergebnisse der Partikelcharakterisierung von Lipid- und Lipoplexformulierungen

Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
1	E12/DOPE 1/2	Liposomendispersion	161 ± 6	0,29 ± 0,03	44 ± 6
		1/2	145 ± 7	0,18 ± 0,01	-39 ± 6
		1/1	154 ± 10	0,16 ± 0,01	-30 ± 5
		3/2	240 ± 4	0,30 ± 0,02	-23 ± 3
		2/1	296 ± 12	0,46 ± 0,02	-23 ± 4
		3/1	1945 ± 446	0,70 ± 0,14	17 ± 5
2	E12Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	127 ± 3	0,18 ± 0,01	28 ± 4
3	E14/DOPE 1/2	Liposomendispersion	222 ± 14	0,37 ± 0,04	41 ± 4
4	E14GlyLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	113 ± 34	0,29 ± 0,04	45 ± 3
5.1	E14Lys/DOPE 2/1	Liposomendispersion	84 ± 10	0,32 ± 0,05	nicht bestimmt
5.2	E14Lys/DOPE 1/1	Liposomendispersion	66 ± 12	0,34 ± 0,13	nicht bestimmt
5.3	E14Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	94 ± 23	0,32 ± 0,03	40 ± 4
5.4	E14Lys/Chol 2/1	Liposomendispersion	100 ± 30	0,25 ± 0,08	nicht bestimmt
5.5	E14Lys/Chol 1/2	Liposomendispersion	111 ± 12	0,31 ± 0,03	nicht bestimmt

Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
6.1	E14trisLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	78 ± 16	0,27 ± 0,06	23 ± 9
		1/2	134 ± 14	0,27 ± 0,16	-12 ± 5
		3/2	179 ± 7	0,29 ± 0,03	-6 ± 3
		5/2	534 ± 11	0,25 ± 0,01	20 ± 10
		7/2	121 ± 5	0,14 ± 0,01	29 ± 6
		9/2	128 ± 3	0,19 ± 0,02	32 ± 9
6.2	E14trisLys/Chol 1/1	Liposomendispersion	154 ± 4	0,37 ± 0,03	nicht bestimmt
7	E16GlyLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	112 ± 6	0,25 ± 0,01	nicht bestimmt
8	E14_16/DOPE 1/2	Liposomendispersion	178 ± 4	0,32 ± 0,01	45 ± 2
11	E16Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	115 ± 17	0,37 ± 0,05	41 ± 6
12.1	E18u14Lys/DOPE 2/1	Liposomendispersion	64 ± 3	0,23 ± 0,01	nicht bestimmt
12.2	E18u14Lys/DOPE 1/1	Liposomendispersion	50 ± 2	0,28 ± 0,02	nicht bestimmt
12.3	E18u14Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	75 ± 27	0,28 ± 0,04	17 ± 3
		1/2	123 ± 2	0,21 ± 0,03	-22 ± 2
		1/1	186 ± 3	0,26 ± 0,02	-20 ± 2
		3/2	1434 ± 239	0,73 ± 0,13	17 ± 4
		2/1	158 ± 4	0,19 ± 0,01	22 ± 4
12.4	E18u14Lys/Chol 2/1	Liposomendispersion	68 ± 3	0,21 ± 0,01	nicht bestimmt
13.1	G14diLys/DOPE 2/1	Liposomendispersion	116 ± 3	0,35 ± 0,04	37 ± 13

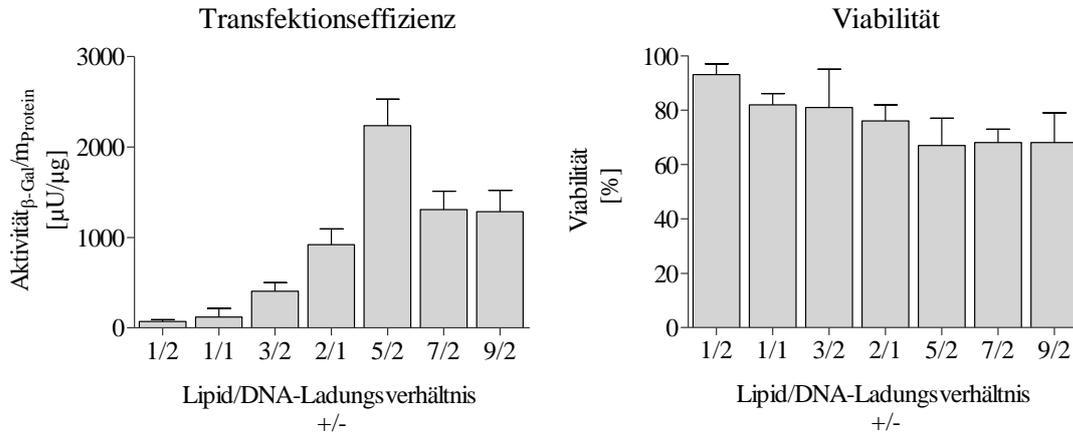
Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
13.2	G14diLys/DOPE 1/1	Liposomendispersion	91 ± 5	0,27 ± 0,02	43 ± 5
13.3	G14diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	92 ± 8	0,33 ± 0,11	49 ± 7
13.5	G14diLys/Chol 1/2	Liposomendispersion	313 ± 6	0,58 ± 0,10	49 ± 4
14.1	G16diLys/DOPE 2/1	Liposomendispersion	226 ± 14	0,40 ± 0,04	nicht bestimmt
14.2	G16diLys/DOPE 1/1	Liposomendispersion	80 ± 9	0,29 ± 0,05	nicht bestimmt
14.3	G16diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	94 ± 31	0,27 ± 0,02	36 ± 7
15	P14diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	83 ± 8	0,31 ± 0,03	29 ± 5
		1/1	112 ± 3	0,43 ± 0,06	-14 ± 5
		3/2	301 ± 6	0,38 ± 0,01	-8 ± 2
		2/1	158 ± 3	0,13 ± 0,09	39 ± 2
		5/2	165 ± 3	0,26 ± 0,01	28 ± 2
16	P14GlyLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	77 ± 7	0,28 ± 0,05	47 ± 15
		1/1	162 ± 2	0,19 ± 0,02	-13 ± 2
		3/2	148 ± 5	0,15 ± 0,02	13 ± 5
17	P14Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	80 ± 5	0,33 ± 0,07	37 ± 6
		1/2	267 ± 2	0,40 ± 0,01	-15 ± 4
		1/1	928 ± 5	0,51 ± 0,04	-10 ± 3
		3/2	230 ± 4	0,43 ± 0,06	22 ± 2
		2/1	206 ± 2	0,14 ± 0,02	32 ± 2
		5/2	115 ± 3	0,15 ± 0,01	33 ± 2

Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
18	P16GlyLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	73 ± 9	0,30 ± 0,06	15 ± 4
19	P16Lys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	88 ± 3	0,25 ± 0,05	39 ± 6
		1/2	160 ± 20	0,17 ± 0,04	-21 ± 3
		1/1	206 ± 8	0,28 ± 0,05	-20 ± 3
		3/2	1322 ± 640	0,54 ± 0,20	11 ± 2
		2/1	209 ± 3	0,24 ± 0,06	23 ± 2
	5/2	141 ± 3	0,11 ± 0,05	29 ± 2	
20	T12diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	83 ± 26	0,36 ± 0,11	nicht bestimmt
21	T14/DOPE 1/2	Liposomendispersion	69 ± 11	0,34 ± 0,07	19 ± 11
		1/2	459 ± 54	0,54 ± 0,10	-18 ± 4
		1/1	513 ± 10	0,64 ± 0,04	-14 ± 3
		3/2	151 ± 5	0,25 ± 0,05	19 ± 2
22	T14_16/DOPE 1/2	Liposomendispersion	77 ± 5	0,47 ± 0,02	32 ± 2
23	T16/DOPE 1/2	Liposomendispersion	162 ± 5	0,43 ± 0,3	21 ± 6
24.1	T14diLys/ohne Helferlipid	Liposomendispersion	121 ± 32	0,36 ± 0,09	41 ± 2

Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
24.2	T14diLys/DOPE 2/1	Liposomendispersion	86 ± 13	0,22 ± 0,01	45 ± 6
		1/2	133 ± 1	0,19 ± 0,01	-11 ± 3
		1/1	181 ± 17	0,21 ± 0,04	-11 ± 7
		3/2	241 ± 35	0,25 ± 0,01	-8 ± 1
		2/1	866 ± 105	0,30 ± 0,04	4 ± 2
		5/1	166 ± 35	0,24 ± 0,09	35 ± 5
		8/1	116 ± 4	0,07 ± 0,09	42 ± 2
		11/1	104 ± 3	0,14 ± 0,03	48 ± 7
24.3	T14diLys/DOPE 1/1	Liposomendispersion	75 ± 12	0,33 ± 0,09	44 ± 4
		1/2	129 ± 3	0,24 ± 0,01	-6 ± 2
		1/1	132 ± 1	0,17 ± 0,01	-8 ± 1
		3/2	450 ± 29	0,45 ± 0,03	-4 ± 2
		2/1	823 ± 105	0,32 ± 0,05	5 ± 1
		5/2	972 ± 29	0,37 ± 0,01	24 ± 1
		7/2	234 ± 6	0,24 ± 0,02	30 ± 1
		9/2	142 ± 1	0,15 ± 0,01	33 ± 2
24.4	T14diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	81 ± 21	0,26 ± 0,04	38 ± 6
		1/2	261 ± 74	0,25 ± 0,05	-9 ± 2
		1/1	313 ± 69	0,30 ± 0,08	-7 ± 2
		3/2	519 ± 27	0,26 ± 0,04	-3 ± 1
		2/1	470 ± 63	0,50 ± 0,04	15 ± 7
		5/2	873 ± 54	0,26 ± 0,04	20 ± 3
		7/2	572 ± 28	0,25 ± 0,04	31 ± 3
		9/2	187 ± 7	0,36 ± 0,02	28 ± 6

Nr.	Liposome Lipid/Helferlipid (n/n)	(+/-)-Ladungsverhältnis	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	Partikelladung Zeta-Potential [mV]
24.5	T14diLys/Chol 2/1	Liposomendispersion	254 ± 56	0,39 ± 0,08	43 ± 3
		1/2	128 ± 2	0,17 ± 0,01	-11 ± 1
		1/1	192 ± 3	0,23 ± 0,01	-13 ± 3
		3/2	558 ± 15	0,53 ± 0,09	-6 ± 2
		2/1	623 ± 25	0,58 ± 0,06	10 ± 3
		5/1	138 ± 3	0,16 ± 0,01	35 ± 2
		8/1	101 ± 5	0,13 ± 0,01	40 ± 4
		11/1	102 ± 2	0,15 ± 0,01	46 ± 8
24.7	T14diLys/Chol 1/2	Liposomendispersion	120 ± 27	0,32 ± 0,11	41 ± 2
		1/2	137 ± 8	0,27 ± 0,08	-8 ± 1
		1/1	164 ± 4	0,22 ± 0,02	-7 ± 2
		3/2	173 ± 3	0,19 ± 0,01	-9 ± 2
		2/1	655 ± 53	0,47 ± 0,01	-1 ± 1
		4/1	186 ± 2	0,17 ± 0,02	39 ± 2
		6/1	157 ± 3	0,28 ± 0,01	38 ± 3
		8/1	136 ± 1	0,29 ± 0,03	45 ± 1
25	T14_16diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	82 ± 14	0,34 ± 0,08	56 ± 5
26	T16diLys/DOPE 1/2	Liposomendispersion	89 ± 9	0,20 ± 0,04	42 ± 5

Graphische Darstellung der Transfektionseffizienz und Viabilität an Hep-G2 Zellen von T14diLys/DOPE 1/2 bei verschiedenen Ladungsverhältnissen.



Parameter der Kurvenanpassung

Beschreibung: Nichtlineare Kurvenanpassung

Modell: Gauss

$$\text{Gleichung: } y=y_0 + (A/(w \cdot \sqrt{(\pi/2)})) \cdot e^{(-2 \cdot ((x-x_c)/w)^2)}$$

	y <sub>0</sub>		x <sub>c</sub>		w		A	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
z-Ave [nm]	11,58623	285,46128	2,56965	0,10114	2,24457	0,98567	2183,06488	1517,5872

	Sigma	FWHM	Höhe	Statistik	
	Wert	Wert	Wert	Chi-Quadr. Reduziert	Kor. R-Quadrat
z-Ave [nm]	1,12228	2,64278	776,021	5,93676	0,92199

Beschreibung: Nichtlineare Kurvenanpassung

Modell: Boltzmann

$$\text{Gleichung: } y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + e^{((x-x_0)/dx)})$$

	A <sub>1</sub>		A <sub>2</sub>		x <sub>0</sub>		dx	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
$\zeta$ -Potential	-9,34502	1,41968	30,75561	2,188	2,09307	0,08988	0,36142	0,05804

Statistik	
Chi-Quadr. Reduziert	Kor. R-Quadrat
0,49126	0,98654

Berechnungsgrundlage der Partikelgrößenverteilungskurven

ALV-Correlator Software Version 3.0:

Regularisierter Exponentialfit

DLS-Exponential ( $g_2(t)$ )

Nicht-lineares Fit-Model:

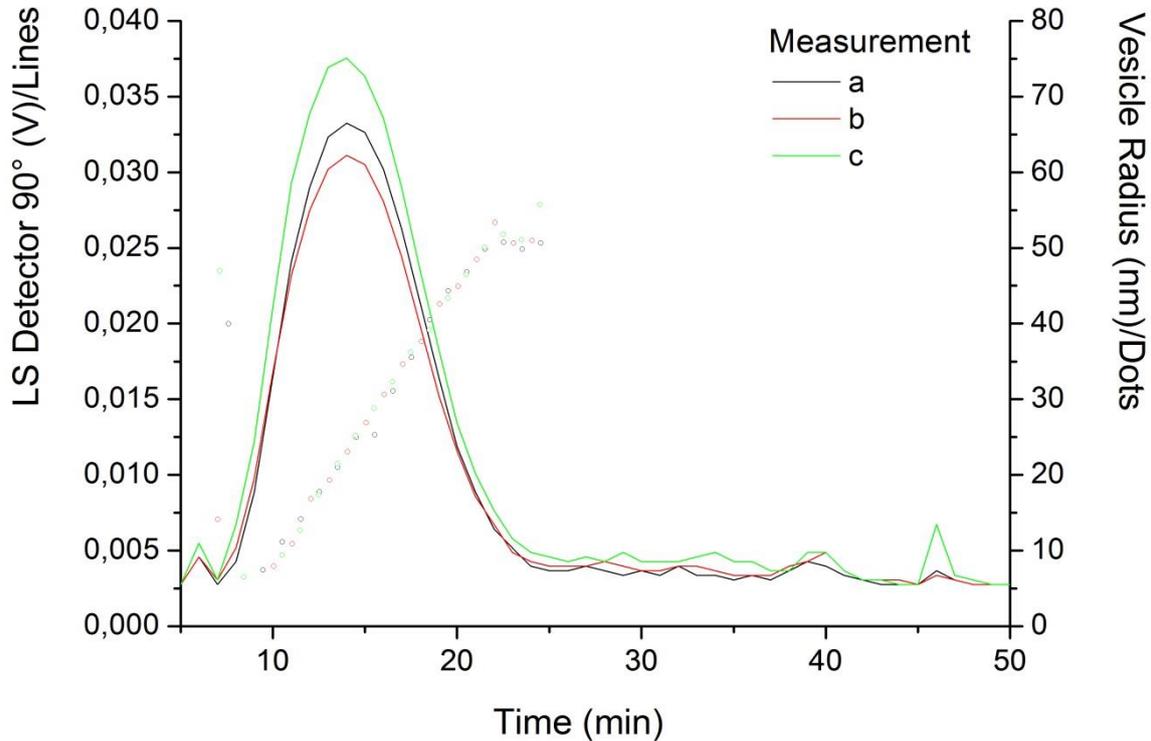
$$g_2(t) - 1 = \left( \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} e^{-\Gamma t} G(\Gamma) d\Gamma \right)^2$$

Kalkulation der massen- und anzahlgewichteten Verteilungskurven

$$c_{i,m} = \frac{c_i}{R_i^3 P(q, R_i)} = \frac{c_i R_i^3}{(\sin(qR_i) - qR_i \cos(qR_i))^2}$$

$$c_{i,a} = \frac{c_i}{R_i^6 P(q, R_i)} = \frac{c_i}{(\sin(qR_i) - qR_i \cos(qR_i))^2}$$

Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der Asymmetrischen-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung, gezeigt sind die Lichtstreuensignale und die Vesikelradien der Lipidformulierung T14diLys/DOPE/SD-E14Rho6G 1/2/0,01 (n/n/n).



Analyse der Partikelgröße, PDI-Werte und Anzahl an Partikeln aus den gesammelten Fraktionen bei der Analyse mittels A4F. Die Messungen erfolgten dabei am Zetasizer Nano-ZS.

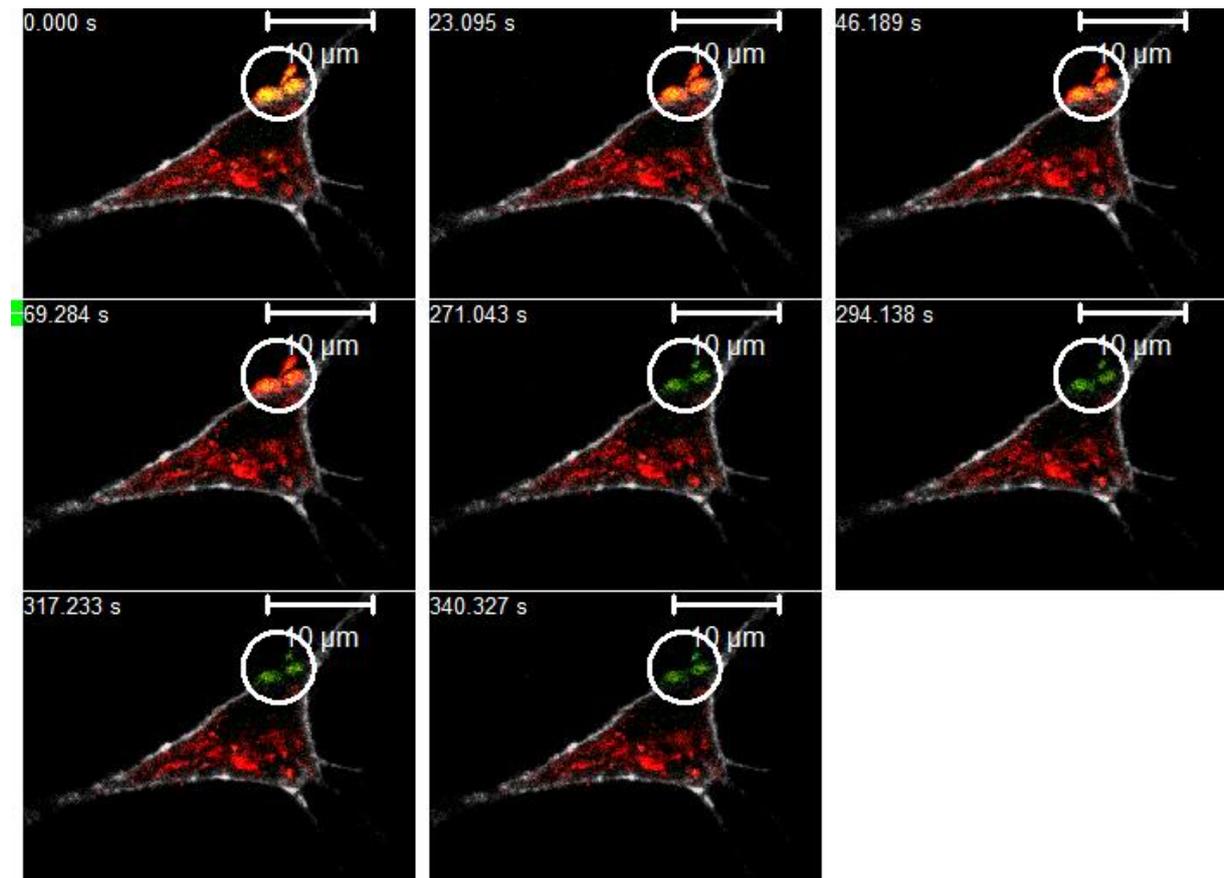
Probe zum Zeitpunkt t in min	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	gezählte Partikel [kcps]
1-5	nicht ermittelbar		
6	129 ± 65,0	0,64 ± 0,31	30 ± 0
7	84 ± 37,2	0,75 ± 0,22	94 ± 6
8	24 ± 0,3	0,15 ± 0,00	155 ± 0
9	28 ± 0,2	0,13 ± 0,00	216 ± 1
10	36 ± 0,1	0,14 ± 0,01	433 ± 0
11	45 ± 0,1	0,12 ± 0,01	200 ± 1
12	52 ± 0,1	0,12 ± 0,01	232 ± 8
13	60 ± 0,1	0,09 ± 0,03	241 ± 0
14	65 ± 0,4	0,03 ± 0,03	253 ± 0
15	71 ± 0,2	0,06 ± 0,01	265 ± 1
16	77 ± 0,9	0,05 ± 0,01	267 ± 0
17	84 ± 0,5	0,08 ± 0,00	250 ± 1
18	94 ± 0,2	0,05 ± 0,02	215 ± 1
19	101 ± 0,6	0,06 ± 0,02	376 ± 1
20	114 ± 0,6	0,12 ± 0,02	359 ± 1
21	128 ± 0,6	0,15 ± 0,01	162 ± 2

Probe zum Zeitpunkt t in min	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI	gezählte Partikel [kcps]
22	138 ± 3,8	0,16 ± 0,01	361 ± 6
23	153 ± 3,1	0,11 ± 0,02	276 ± 4
24	171 ± 0,6	0,02 ± 0,02	133 ± 1
25	174 ± 2,0	0,14 ± 0,02	167 ± 2
26	236 ± 2,5	0,19 ± 0,08	79 ± 5
27	207 ± 6,9	0,16 ± 0,05	105 ± 7
28	243 ± 5,8	0,1 ± 0,1	60 ± 1
29	236 ± 10,5	0,11 ± 0,07	77 ± 7
30	375 ± 5,1	0,96 ± 0,07	81 ± 5
31	283 ± 15,7	0,28 ± 0,21	85 ± 5
32	236 ± 19,3	0,18 ± 0,14	84 ± 8
33	356 ± 26,2	0,58 ± 0,47	130 ± 11
34	nicht ermittelbar		
35	254 ± 8	0,13 ± 0,03	52 ± 1
36	229 ± 12	0,09 ± 0,05	19 ± 1
37	251 ± 4	0,07 ± 0,04	77 ± 1
38-50	nicht ermittelbar		

Partikelgrößenvergleich von markierter und nicht markierter Lipidformulierung, Analyse am Zetasizer Nano-ZS.

Liposomendispersion	Partikelgröße z-Average d [nm]	PDI
T14diLys/DOPE 1/2 (n/n)	81 ± 21	0,26 ± 0,04
T14diLys/DOPE/SD-E14Rho6G 1/2/0,01(n/n/n)	53 ± 10	0,27 ± 0,07

FRET-Untersuchungen mittels Akzeptor-Bleich-Verfahren, Darstellung aller 8 Scans.



Fluoreszenzintensitäten von Fluoreszein und ATTO-Rho6G nach jedem Scan.

Scan-Nummer	Intensität Fluoreszein	Intensität ATTO-Rho6G
1	606.7	1575.7
2	465.9	1553.9
3	424.8	1548.9
4	393.5	1563.3
5	478.8	608.3
6	473.6	627.3
7	457.7	624.4
8	444.4	615.3

## Liste der Veröffentlichungen

### Poster und Vorträge

N. Erdmann, M. Folz, S. Drescher, B. Dobner, A. Langner

Time Dependent Fluorescence Studies of Novel Cationic Liposomes as Gene Delivery Systems in COS-7 Cells

DPhG-Tagung - Innsbruck 2011 (Poster)

C. Wölk, N. Erdmann, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, and B. Dobner

Physicochemical Characterization of Cationic Liposomes for the Use as Gene Transfection Systems.

2. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2011 (Poster)

N. Erdmann, M. Folz, S. Drescher, J. Vogel, T. Groth, B. Dobner and A. Langner

Synthesis, Labeling, and Imaging of Cationic Lipids for the Use in Gene Delivery Systems

Frontiers in Medicinal Chemistry - Saarbrücken 2011 (Poster)

N. Erdmann

Untersuchung der Transfektionseffizienz von neuartigen kationischen Liposomen am Zellkulturmodell

DPhG-Tagung - Braunschweig 2010 (Vortrag)

N. Erdmann, M. Folz, B. Dobner and A. Langner

Novel Cationic Lipids for Non-Viral Gene Delivery - Studies of the Transfection Efficiency on HepG2 Cells

DPhG-Tagung - Jena 2009 (Poster)

M. Folz, N. Erdmann, G. Brezesinski, A. Langner and B. Dobner

Synthesis and Cell-Transfection Properties of Novel Cationic Lipids for Use in Liposomal Gene Delivery

DPhG-Tagung - Bonn 2008 (Poster)

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Andreas Langner für die Überlassung des interessanten Themas, der wissenschaftlichen Betreuung sowie für die gewährten Freiräume bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. Bodo Dobner für die stets freundliche Zusammenarbeit und seinen fachlichen Rat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Simon Drescher für die Bereitstellung des markierten Lipids sowie für die Präparation der TEM-Proben. Außerdem danke ich ihm für die stete Diskussionsbereitschaft, den vielen Tipps und Anregungen, welche maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Manuela Folz danke ich für die Synthese der Transfektionslipide sowie für die vielen netten Gesprächen, welche auch über das berufliche hinausgingen.

Weiterhin danke ich Frau Angela Munk für die Hilfe bei den Zellkulturuntersuchungen und für die liebevolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie bei der Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten. Frau Apothekerin Ina Hebestreit danke ich für die Unterstützung bei der Charakterisierung einzelner Transfektionssysteme.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Groth sowie dessen Mitarbeiter für die Möglichkeit am LSM zu arbeiten und insbesondere an Herrn Dr. Jürgen Vogel für die freundliche Betreuung und Unterstützung an diesem Gerät.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Anette Meister für die Aufnahme der TEM-Bilder.

Ich bin weiterhin Frau Dr. Judith Kuntsche für die Messung an der A4F und für die freundlichen Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biochemische Pharmazie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die schöne Zeit. Allen Kollegen und Kolleginnen des Institutsbereiches Pharmazeutische Chemie und Klinische Pharmazie, die mich während meiner Zeit am Institut unterstützt haben, jedoch namentlich an dieser Stelle nicht erwähnt wurden, danke ich herzlich.

Abschließend danke ich herzlich meinen Eltern und Herrn Dipl. Pharm. Christian Wölk für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Verständnis.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle Stellen, welche ich wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen habe sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere die Arbeit bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt zu haben.

Halle (Saale) im April 2013

Nicole Erdmann

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Nicole Erdmann (Dipl. Pharm.)
Geburtsdatum	23.06.1981
Geburtsort	Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### **beruflicher Werdegang**

seit 12/2011	Angestellte Apothekerin in der Albert-Schweitzer Apotheke, Leipzig
12/2007-11/2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Biochemische Pharmazie (Promotionsstudium)
02/2007-11/2007	Filialleiterin in der Kreuz Apotheke Cunewalde
12/2006-01/2007	Angestellte Apothekerin in der Apotheke zum Hutberg in Herrnhut

### **Hochschulbildung**

09/2011	Erlangen des akademischen Grades Diplom-Pharmazeut
12/2006	Approbation als Apothekerin Praktisches Jahr:
06/2006-11/2006	Kreuz Apotheke, Neugersdorf
12/2005-05/2006	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2000-11/2005	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### **Schulbildung**

09/1992-07/2000	Abitur, Gustav-Theodor-Fechner Gymnasium, Leipzig
09/1988-07/1992	Grundschule, 15. Oberschule Leipzig-Schönefeld