Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody

Einsatz von Steroiden zur Steigerung der liposomalen Transfektion in Steroidrezeptor exprimierenden Brustkrebszellen *in vitro* und in einem *in vivo* Mausmodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Adriane J.K. Schagemann
aus Dorsten

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Köster

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Schwandner

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.2013

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.08.2013

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 4

2 Einführung und Grundlagen 6

2.1 Krebs 6

2.1.1 Pathogenese 6

2.2 Mammakarzinom 8

2.2.1 Epidemiologie 8

2.2.2 Therapie 9

2.3 Gentherapie 10

2.3.1 Definition 10

2.3.2 geschichtlicher Abriss 11

2.3.3 somatische Gentherapie 12

2.3.4 virale vs. non-virale Transfektion 12

2.3.5 nukleärer Import 14

2.3.6 Steroidrezeptoren 16

3 Fragestellung 18

4 Materialien und Methoden 19

4.1 Allgemein 19

4.1.1 Gene, Plasmide und Vektoren 19

4.1.2 Klonierung von Plasmiden 19

4.1.2.1 DNA-Restriktion 19

4.1.2.2 Agarosegelelektrophorese 20

4.1.2.3 Gelelution 20

4.1.2.4 Dephosphorylierung 20

4.1.2.5 Ligation der Plasmid-DNA 20

4.1.2.6 Transformation von E. coli 20

4.1.2.7 Bakterienanzucht 21

4.1.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA 21

4.2 Zellversuch 22

4.2.1 Zellkultur 22

4.2.2 Transfektion von T47-D mit Testsubstanzen 22

4.2.3 Transfektion von T47-D mit und ohne PRE-Sequenzen 23

4.2.4 Transfektion von T47-D unter Einfluss mehrerer Testsubstanzen 23

4.2.5 Luciferaseassay 23

4.2.6 Statistische Auswertung 23

4.3 Tierversuch 24
4.3.1 Versuchsaufbau 24
4.3.2 Gentransfercocktail 25
4.3.3 Anästhesie 25
4.3.4 Applikationsarten 26
4.3.5 Euthanasie und Organentnahme 26
4.3.6 Aufbereitung der Organe 27
4.3.7 Nachweismethoden 28
4.3.7.1 Luciferaseassay 28
4.3.7.2 RT-PCR 28
4.3.7.3 Northern Blot 28
4.3.7.4 PCR 29
5 Ergebnisse 30
5.1 Klonierung der Transfektionsplasmide 30
5.2 Zellversuch 30
5.2.1 Zellkultur 30
5.2.2 Transfektion von T47-D mit Testsubstanzen 31
5.2.3 Transfektion von T47-D mit und ohne PRE 32
5.2.4 Transfektion von T47-D mit zwei Testsubstanzen 33
5.3 Tierversuch 34
5.3.1 Nachweis der Plasmid-DNA in der PCR 34
5.3.2 Nachweis von mRNA in der RT-PCR 34
5.3.3 Nachweis von m-RNA im Northern Blot 35
5.3.4 Luciferaseassay 35
6 Diskussion 36
7 Zusammenfassung 45
8 Literaturverzeichnis 46
9 Danksagung 52
10 Anhang 53
10.1 Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren 53
10.2 Publikationen 54

2 Einführung und Grundlagen

Kontext der vorliegenden Arbeit ist die Therapie gynäkologischer Malignome. Die höchste Mortalität und Inzidenz von Malignomen bei Frauen weist das Mammakarzinom auf. Die Entwicklung einer sicheren, nebenwirkungsarmen und effektiven Therapie zur gezielten Behandlung des Mammakarzinoms wäre somit von unschätzbarem gesundheitsökonomischem aber auch individuell prognostischem Wert. Ein hoffnungsvoller Ansatz ist die somatische non-virale Gentherapie, wobei die Transfektionseffizienz durch extra- und intrazellulären Barrieren limitiert wird. Die liposomale Transfektion und die Modulation mit Steroiden stellen einen potentiellen Ansatz zur Transfektionsoptimierung dar.

2.1 Krebs

Die unkontrollierte Vermehrung einzelner Zellen bildet die Grundlage für maligne Erkrankungen, die sowohl bei Mensch und Tier als Krebs bezeichnet werden. Die Medizin befasste sich mit dem Krebs der Brustdrüse nachweislich schon im Altertum. Eine der frühesten Überlieferungen findet sich im *Papyrus Ebers* aus dem 15. Jahrhundert v. Chr., welches sich lehrbuchartig mit ärztlichem Tun beschäftigte. Es bestehen Aufzeichnungen aus der Zeit des Hippokrates (460 - 375 v. Chr.), aus denen hervorgeht, dass man - nicht direkt auf die Brustdrüse bezogen - schon zwischen gutartigen und bösartigen Geschwulsten unterschied. Mit *Karkinoma* bezeichnete man bereits damals die bösartige Geschwulst.

2.1.1 Pathogenese

Der menschliche Körper besteht aus 10^{12} - 10^{14} Zellen. Im Laufe eines menschlichen Lebens werden $\sim 10^{16}$ Zellen unbrauchbar und durch neue ersetzt. Grundlegend hierbei ist, dass jede Zelle nur aus einer anderen Zelle entstehen kann. Des Weiteren erfordert die Entwicklung gewebe- und organspezifischer Zellen ein hohes Maß an Differenzierung. Diese Differenzierung bedingt die wesentlichen Unterschiede in Form und Anordnung, Inhalt und Funktion, Proliferationsrate und -fähigkeit der einzelnen Zellen und definiert somit die Aufgaben dieser [9].

Wichtig bei der Entstehung neuer Zellen ist die Aufrechterhaltung des Fließgleichgewichtes, welches besagt, dass die Zahl der neu gebildeten Zellen, die der Verlorengegangenen nicht übersteigt. Werden an einer Stelle zu viele Zellen produziert, können sich diese teilweise oder vollständig der Regulation entziehen, und es entstehen entweder benigne Wucherungen oder maligne Geschwulste. Dabei gilt, genau wie für die

physiologische Proliferation von Geweben, dass ein Tumor aus *einer* neoplastisch veränderten Zelle entsteht und somit ein Klon ist.

Bezeichnend für ein Tumorgewebe ist aber nicht nur eine erhöhte Proliferationsrate, sondern auch die Unfähigkeit der Differenzierung. Demnach gilt, je schneller und undifferenzierter ein Gewebe wächst, desto maligner ist es. Weitere, wesentliche Parameter zur Dignität eines Tumorgewebes sind die Ausdehnung des Wachstums, Zellgrenzen einhaltend oder durch infiltrierendes Wachsen, diese überschreitend, sowie die Ausbildung von Absiedelungen - Metastasen [9].

Für die Entstehung eines Malignoms sind häufig tumorspezifische Risikofaktoren oder Kanzerogene ursächlich. Zu nennen sind u.a. Rauchen, Ernährungsgewohnheiten, Drogenabusus, Schadstoffbelastung der Umwelt und berufliche Exposition, infektiöse Erreger und ionisierende Strahlung [10-13]. Genetischen Faktoren wird eine gesicherte Beteiligung an der Entstehung bösartiger Neubildungen von Auge, Darm, Brust und Eierstöcken zugesprochen. Eine genetische Vorbelastung bedingt 5 - 10% aller Krebsfälle [14].

2.2 Mammakarzinom

2.2.1 Epidemiologie

Führend bezüglich Inzidenz (Abbildung 1) und Mortalität (Abbildung 2) beim weiblichen Geschlecht ist das Mammakarzinom. Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (RKI) mit der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) [8] sowie das Deutsche Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gesellschaft (DKFZ) [1] stellen aufbereitete Daten und Trends zu Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms und Interpretationen dieser zur Verfügung [15]:

Brustkrebs ist mit rund 72.000 Neuerkrankungen jährlich die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Das Mammakarzinom tritt in jüngerem Alter auf als die meisten anderen Krebsarten. Die Hälfte der betroffenen Frauen erkrankt vor dem 65. Lebensjahr; jede zehnte Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 45 Jahre.

2008 erkrankten etwa doppelt so viele Frauen an Brustkrebs im Vergleich zu 1980. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate stieg seitdem um etwa 50%. Trotz der gestiegenen Erkrankungszahlen sterben heute aber weniger Frauen an Brustkrebs als noch vor 20 Jahren. Durch therapeutische Fortschritte haben sich die Überlebenschancen deutlich verbessert.

Zwischen 2005 und 2009 wurde in Deutschland schrittweise ein flächendeckendes Mammografie-*Screening* eingeführt. Erste Effekte spiegeln sich nun in den Daten der

Brustkrebs bei Frauen	2008	Prognose 2012
Neuerkrankungen	71660	74500
standardisierte Erkrankungsrate / 100000	123,1	124,7
Sterbefälle	17209	
standardisierte Sterberate / 100000	24,6	
5-Jahres-Prävalenz	273000	
rel. 5-Jahresüberlebensrate	86%	

Abbildung 1
Epidemiologie des Mammakarzinoms bei Frauen; Auswertungen des ZfKD im RKI für das Jahr 2008 sowie Prognose für das Jahr 2012 (standardisierte Erkrankungs- und Sterberate pro 100.000 Personen - altersstandardisiert nach Europastandard. Graphik modifiziert nach [8])

epidemiologischen Krebsregister wider. Simultan zur Einführung des Mammografie-*Screenings* erreichten die epidemiologischen Krebsregister in Deutschland Flächendeckung. Basierend auf diesen Erfassungen schätzte das ZfKD die Neuerkrankungsraten für Brustkrebs bei Frauen, auch einzelner Tumorstadien, in verschiedenen Altersgruppen. In der Altersgruppe 50 - 69 Jahre war etwa ab 2006 ein steiler Anstieg der Neuerkrankungsraten zu finden. Dieser Anstieg in der entsprechenden Altersgruppe ist vor allem darauf zurückzuführen, dass seit Einführung des *Screenings* mehr Tumoren in frühen Stadien entdeckt wurden. Bislang spiegeln die Krebsregisterdaten also einen zu erwartenden Effekt des Früherkennungsprogramms wider.

Übergeordnetes Ziel des Mammografie-*Screenings* ist es, die Brustkrebssterblichkeit langfristig zu senken. Ein solcher Effekt wird jedoch wahrscheinlich nicht vor dem Jahr 2015 in den Daten erkennbar sein. Erste Hinweise könnten sich jedoch schon früher zeigen: Wenn die Inzidenz der fortgeschrittenen Brustkrebsstadien sinkt, wäre dies ein erster Anhaltspunkt für einen Erfolg des *Screenings*.

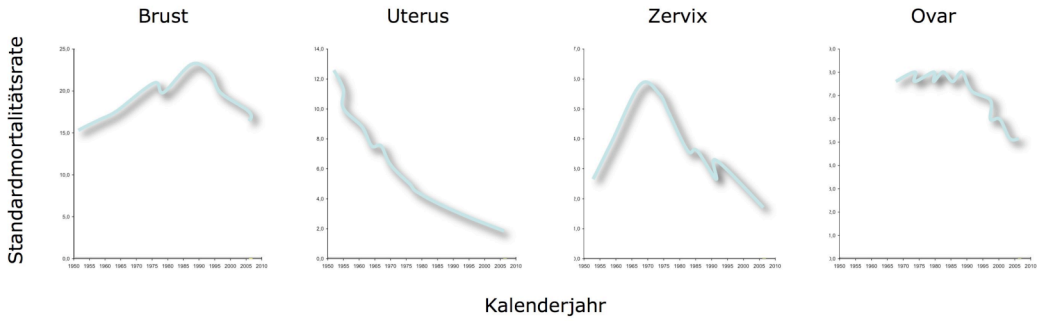

Abbildung 2
Säkulare Entwicklung der Mortalität der vier häufigsten gynäkologischen Malignome nach Berechnungen des DKFZ für das Jahr 2010 (Graphik modifiziert nach [1]).

2.2.2 Therapie

Die Modalitäten Chirurgie, Radiatio, Chemotherapie und die neoadjuvante Therapie sind zur Behandlung gynäkologischer Malignome allgemein anerkannt [16]. Die antihormonelle Therapie stellt einen Ansatz auf molekularer Ebene dar, wobei der Erfolg einer ablativen endokrinen Therapie maßgeblich von der Expression spezifischer Rezeptoren abhängig ist [17]. Nach Bestimmung des Steroidrezeptorstatus des Tumorgewebes können spezifische therapeutische Schritte eingeleitet und zudem prognostische Aussagen gemacht werden. Einsatz in der endokrinen Therapie des Mamma-

karzinoms finden die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) Tamoxifen und Fulvestrant, Gestagene, Aromataseinhibitoren und GnRH-Analoga.

Klinisch ist das Mammakarzinom eine heterogene Erkrankung. Auf der Basis von mRNA-Expressionsprofilen kann das Mammakarzinom in drei Haupttypen eingeteilt werden [18-20]: (i) den luminalen Typ mit den Subgruppen A und B, (ii) den humanen-epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER 2) exprimierenden Typ und (iii) den *basal-like* Typ; jeweils mit spezifischer Ansprechbarkeit auf Hormon- (luminaler und *basal like* Typ) oder Chemotherapie (luminaler Typ Subgruppe B > A). Eine spezifische Therapie für HER 2 positiven Brustkrebs gibt es in Form monoklonaler Antikörper (Trastuzumab), die die gesteigerte Stoffwechselaktivität und Teilungsrate der Krebszellen supprimieren. B*asal-like* Typen exprimieren regelhaft weder Östrogen- und Progesteronrezeptoren, noch den Wachstumsfaktorrezeptor HER 2. Daher wird eine Subgruppe dieser auch *triple-negativ* genannt. Sie sind stark proliferierend und haben trotz hoher Sensitivität für Chemotherapien eine schlechte Prognose.

Eine detaillierte Übersicht gängiger Therapiealgorithmen gewährt der Artikel von Gerber *et al.* [21]. Grundsätzlich gilt, dass die individuelle Lebensqualität und -Erwartung, sowie das persönliche Rezidivrisiko und die Tumorcharakteristik in die therapeutischen Überlegungen mit einzubeziehen sind. Dies erklärt, dass der Reduktion systemischer Nebenwirkung und einer breiten Anwendbarkeit bei hoher Effizienz und Sicherheit ein großer Stellenwert zukommt. Ein potentieller Ansatz könnte hier die gezielte non-virale Gentherapie und deren Modulation durch Steroide sein, welche in den folgenden Kapiteln näher ausgeführt werden.

2.3 Gentherapie

2.3.1 Definition

Das Einbringen von Genen in Zellen oder Gewebe, um durch Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu erzielen, wird als Gentherapie bezeichnet. Bei der systemischen Arzneimitteltherapie durchströmt das verabreichte Medikament in gleich hoher Konzentration den gesamten Körper. Die regionale Applikation kann sowohl systemische Nebenwirkungen verringern, zum andern den gewünschten therapeutischen Effekt vorwiegend im Zielorgan auslösen. Dieser Umstand kann durch das gezielte Einbringen von Genen erreicht werden. Neben Vorteilen bei der Lokalisation besteht die Möglichkeit, die Genexpression an eine genaue, zeitlich begrenzbare Steuerung zu koppeln, z.B. durch die Wahl steuerbarer Promotoren [22]. Die Genthe-

rapie ist somit eine molekulare Form der Arzneimitteltherapie, welche versucht, Störungen am Ursprungsort zu korrigieren.

2.3.2 geschichtlicher Abriss

Im letzten Jahrhundert wurden für die Gentherapie entscheidende molekularbiologische Grundlagen entdeckt [22]: Den Anfang machte zweifelsohne O.T. Avery, der 1944 bewies, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Speichersubstanz der Erbinformation ist. 1953 beschrieben J. Watson und F. Crick die Doppelhelixstruktur der DNA. Darauf basierend wurde die Tripletstruktur des genetischen *Codes* entschlüsselt. Als weiteren Baustein wurde im selben Jahr die Botenribonukleinsäure (mRNA) als Informationsträger auf dem Weg vom Gen zum Protein entdeckt. 1974 revolutionierte die erstmalige Klonierung eukaryotischer Gene in bakterielle Plasmide die Vermehrung und Untersuchung von Genen. In den folgenden fünf Jahren konnten Techniken zur Sequenzierung von DNA entwickelt, sowie die ersten Krebsgene entdeckt werden. Eine erste Sequenz des menschlichen Genoms wurde im Jahre 2001 publiziert [23, 24].

Die erste klinische Gentherapie am Patienten führte 1990 der amerikanische Wissenschaftler F. Anderson an einem damals vierjährigen Mädchen durch. Hierbei wurde der schwere Immundefekt Adenosindesaminasemangel (ADA) mit Infusionen autologer T-Lymphozyten, in die ein normales, funktionsfähiges ADA-Gen eingebracht worden war, therapiert. Im Jahre 2001 waren es bereits 3.400 Patienten, die in mehr als 530 Gentherapiestudien behandelt wurden [22], ein Jahr später bereits 106 Gentherapiestudien und 96 Patienten (Abbildung 3) mehr [7]. In Deutschland wurde erstmalig 1994 eine Gentherapiestudie initiiert; vier Jahre später die klinische Wirksamkeit von Gentherapie bei Hämophilie B und Immundefizienz nachgewiesen [22].

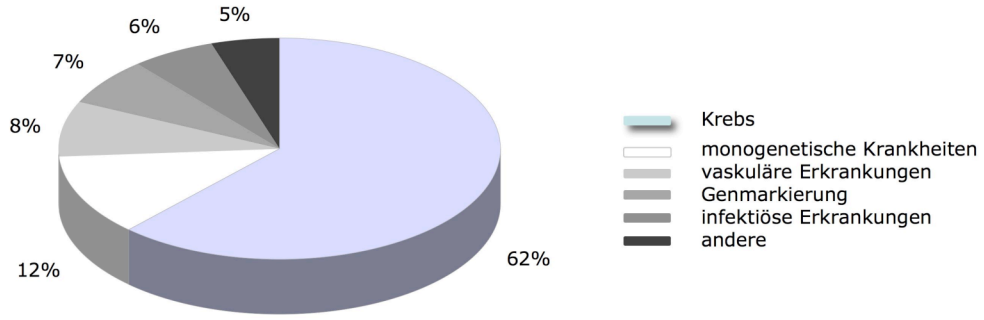

Abbildung 3
Schematische Übersicht über die unterschiedlichen Einsatzgebiete von insgesamt 636 Gentherapiestudien an 3496 Patienten im Jahre 2002 (Graphik modifiziert nach [7]).

2.3.3 somatische Gentherapie

Bislang werden klinische Gentherapiestudien zur Behandlung von malignen Erkrankungen, monogenen Erbkrankheiten, Infektionen und kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. Der größte Anteil der Studien widmet sich den Neoplasien [22]. Es existieren fünf Strategien des somatischen Gentransfers zur Therapie von Malignomen [25], (i) die Substitutionsgentherapie, bei der ein defektes oder mutiertes Gen ersetzt wird, (ii) die *antisense*-Therapie, mit der die Transkription von Onkogenen oder für das Tumorwachstum wesentlicher Co-Faktoren blockiert wird, (iii) das Einbringen von Resistenzgenen zur Erhöhung der Widerstandskraft gesunder Zellen und (iv) durch Modulation des Immunsystems, die Erhöhung der Immunogenität von Tumorzellen.

Der fünfte Therapieansatz (v), die Suizidgentherapie, ist Basis der vorliegenden Arbeit.

Der Effekt des Suizidgens besteht darin, ein Enzym zu kodieren, welches in der Zelle durch Gentransfer gebildet wird und z. B. die Umwandlung systemisch applizierter, nicht-toxischer Metabolite, sog. *prodrugs*, in toxisch wirkende Substanzen bewirkt. Der therapeutisch gewünschte Effekt ist der daraus folgende Tod der Zielzelle [25]: In der praktischen Anwendung dieses Therapieansatzes gilt es, einige große Hindernisse zu überwinden. Zum einen die Wahl des besten Vektors, wobei folgende Ansprüche gestellt werden: (i) hohe Effizienz, womit das Einbringen in eine ausreichende Anzahl von Zielzellen gemeint ist, (ii) die Aufnahme des Vektors in sich nicht teilende Zellen, da die Teilungsaktivität in fast allen humanen Geweben gering ist, (iii) eine genügend hohe Aufnahmekapazität von DNA sowie eine ausreichend lange Genexpression, (iv) eine hohe Sicherheit des Vektors, sprich keine direkt pathogene Wirkung und das Ausbleiben von schädlichen Langzeitwirkungen und fehlende Immunogenität. Höchst wünschenswert darüber hinaus ist eine hohe Selektivität des Vektors, d.h. das Therapiegen ausschließlich in die Zielzellen einzubringen.

Die beiden Vektorklassen sind grob unterteilt in viral oder non-viral. Eine besondere Herausforderung für den non-viralen Gentransfer stellt der nukleäre Import der DNA über die nukleäre Pore in den Zellkern dar (s.u.). Bei der viralen Transfektion nutzt man die genuine Fähigkeit der Viren, die Transportsysteme der Zielzelle selbst, zum Einschleusen der viralen DNA in den Zellkern.

2.3.4 virale vs. non-virale Transfektion

Auf Seiten der viralen Vektoren kommen Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Retroviren und Lentiviren zum Einsatz. Ausschlaggebend für die Wahl eines viralen Vektors

ist die evolutionär erworbene Fähigkeit der Viren, ihr Genom in infizierte Wirtszellen einzubringen [22]. Addierend zu dieser natürlichen Fähigkeit wird der therapeutische Effekt erzielt, in dem man die zur Virusvermehrung nötigen Gene mit molekularbiologischen Methoden entfernt und durch Therapiegene ersetzt.

Die o.g. Viren haben spezifische Vor- und Nachteile. Bei den zuerst verwendeten Retroviren bestand der Vorteil der dauerhaften Integration ins Genom der Wirtszelle und somit einer andauernden Wirkung. Nachteilig hierbei aber ist, dass die Integration ins Genom ungerichtet erfolgt, und Gene, die für die Teilung der Zelle relevant sind, aktiviert oder ausgeschaltet werden könnten. Außerdem beschränkt sich die Aufnahmekapazität der Retroviren auf ca. 10 kB, und sie integrieren sich nur in teilungsaktive Tumore und hämatopoetische Stammzellen [26]. Den Retroviren gegenüber stehen die Adenoviren. Zwar erzielen diese nur eine vorübergehende Genexpression, da sie ihr Genom nicht in die Zielzelle integrieren. Dafür können sie aber größere DNA-Fragmente aufnehmen und auch in ruhende Zellen transfizieren. Die Möglichkeit der gezielten Integration in das Wirtszellengenom besteht bei den Adeno-assoziierten Viren, die an einen definierten Ort im Chromosom 19 integrieren. Sie bedürfen zur Replikation einer Co-Infektion mit Adeno- oder Herpesviren [26].

Seitens der non-viralen Gentherapie wurde eine Reihe verschiedener Vehikelstrategien entwickelt, alle vor dem Hintergrund, eine ausreichende Menge Nukleinsäuren, über die extra- und intrazellulären Barrieren bis in die Zellen des Zielgewebes zu bringen. Gängige Applikationswege sind intravenöse, intramuskuläre, intraperitoneale, subcutane, subdermale, intratumorale und intraarterielle Injektionen, oder die Inhalation [27]. Je nach Zielkompartiment (Zytoplasma oder Zellkern) und dem therapeutischen Ansatz (Transkription oder Transfektion) werden Plasmide, DNA Vaccine, *antisense* Oligos oder Ribosomen, mRNA oder RNA Polymerase/cDNA Transporter für die Gene genutzt [27-29].

Abhängig von der Art der Nukleinsäure und dem angesteuerten Gewebe müssen spezifische Vehikel konstruiert werden. Ein etabliertes Beispiel sind kationische Lipide in Kombination mit sog. Helferlipiden, wobei der zugrunde liegende Mechanismus der liposomalen Transfektion noch nicht in Gänze bekannt ist [30-32]. Kehrseite des non-viralen Gentransfers ist die niedrige Transfektionsrate bzw. die methodisch anspruchsvolle Transfektion an sich [33]. Hindernisse stellen u.a. die physiologischen und morphologischen Barrieren der Magendarmpassage bei oraler Verabreichung [34], die Inhibierung durch Bestandteile des Serums [35], oder die Resistenz bestimmter Zelllinien gegenüber der gewünschten Transfektion dar [36]. Die größte Schwachstelle der

liposomalen Transfektion ist der nukleäre Import. Daher soll dieser sowie Möglichkeiten, diesen zu optimieren, im Weiteren näher erläutert werden.

2.3.5 nukleärer Import

Viele intrazelluläre Barrieren sind bis zur endgültigen, angestrebten Transkription zu überwinden (Abbildung 4). Zunächst muss der Vektor die Zellmembran passieren. Die rezeptorvermittelte Bindung an die Zellmembran ist derzeit wohl am besten verstanden [37]. Wird der Vektor zusätzlich mit bestimmten Liganden kombiniert, kann diese Bindung effizienter und zelltypenspezifischer werden. Nun folgt die energieabhängige Invagination durch Endozytose, der subsequente Transit als Endosom durch die Zellmembran [38, 39]. Die Freisetzung der DNA aus dem Endosom in das Zytoplasma mittels endosomaler Degradation geschieht bei veränderten pH-Bedingungen in den

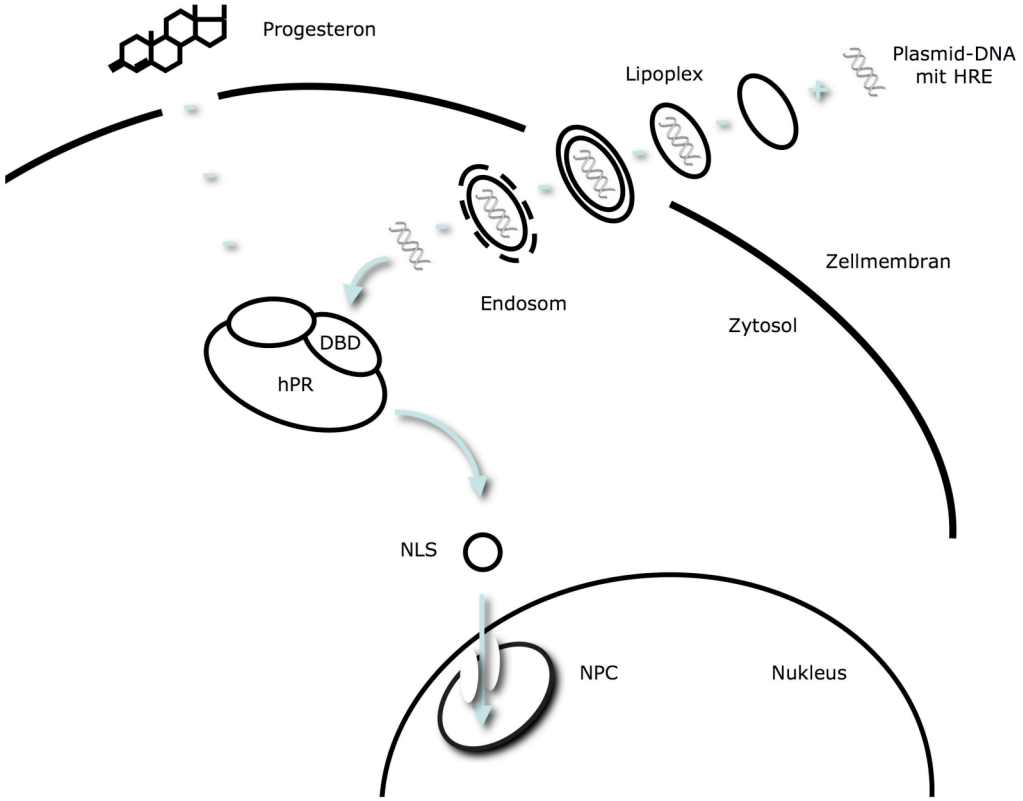

Abbildung 4
Modell einer steroidvermittelten Verstärkung der liposomalen Transfektion: kationische Lipide erleichtern die Überwindung der Zellmembran (Lipoplex). Nach endosomaler Degradation bindet die Plasmid-DNA an die *DNA binding domain* (DBD) des Hormonrezeptors, in diesem Fall der humane Progesteronrezeptor (hPR), wobei diese Bindung durch in das Plasmid integrierte *hormone responsive elements* (HRE) verstärkt wird. Nach Aktivierung des Hormonrezeptors durch das entsprechende Steroid migriert dieser als *nuclear targeting signal* (NLS) tragendes Protein nach Bindung an Importine durch die nukleäre Pore (NPC). Dabei wird die gebundene Plasmid-DNA co-transportiert (Graphik modifiziert nach [2-6]).

Endosomen. Bleibt die DNA hingegen in den Endosomen eingeschlossen, so würde sie lysosomal degradiert werden [40]. Nun gilt es, durch das Zytosol bis zum Nukleus zu gelangen, ohne dabei von Nukleasen degradiert zu werden.

Der nun folgende nukleäre Import stellt den wohl größten Limitierungsfaktor der non-viralen Gentherapie dar [41, 42]. Dieser Transfer scheint in proliferierenden Zellen aufgrund einer temporär durchlässigen Zellkernhülle einfacher zu sein, als in ruhenden Zellen [43-45]. Moleküle <10 kDa können passiv durch die nukleäre Pore diffundieren [46]. Nukleäre Poren sind Proteinkomplexe (NPC) aus mehreren hundert Proteinen, den Nukleoporinen, mit einem Molekulargewicht von ca. 50 MDa, die einen selektiven Transport von wasserlöslichen Molekülen durch die Kernmembran ermöglichen. NPCs haben einen dreiteiligen Aufbau mit einer zentralen Domäne, zytoplasmatischen und nukleären Ringen. Wie von Alber *et al.* [47, 48] zusammengefasst, besteht die Hälfte der NPCs aus einem Gerüst, welches die gekrümmte Oberfläche der Kernmembran bedeckt, und in welchem die eigentlichen nukleären Poren eingebettet sind. Die selektive aber dynamische Transportbarriere formt sich aus acht, die Innenseite des Gerüstes auskleidenden, Proteinkomplexen. In Abhängigkeit von Zelltyp und –zyklus bedecken ca. 2×10^3 nukleäre Poren eine Vertebratenzelle. Molekülen mit einem Gewicht >45 kDa bzw. DNA-Fragmenten >250 bp bleibt der Weg über die Pore versperrt; es sei denn, sie besitzen ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches von Mitgliedern der Importin bzw. Karyopherin Superfamilie erkannt wird (*nuclear targeting*) [49, 50].

NLS werden kategorisch in klassische und nicht-klassische Sequenzen eingeteilt. Klassische NLS ähneln dem des Simian Virus 40 *large tumor antigen* (SV40 T-ag). Der konventionelle, NLS-vermittelte nukleäre Import beinhaltet die Erkennung von NLS durch die α-Untereinheit des Importin α/β Heterodimers [51]. Der Komplex wird daraufhin in den zentralen Kanal der NPCs, welcher eine Länge von bis zu 200 nm und einen funktionellen Durchmesser von ca. 9 nm hat (Durchmesser des NPC: ca. 120 nm), und von dem angenommen wird, dass er expandieren kann, und somit in das Nukleosol transportiert [52]. Jede Pore kann ca. 1.000 aktive und/oder passive Translokationen pro Sekunde durchführen, wobei der exakte Mechanismus, wie von Wagstaff *et al.* [53] zusammengefasst, letztlich noch unbekannt ist; es existieren lediglich diverse Modelle. Auf der Innenseite der Kernmembran angekommen, wird der Importin-Komplex energieabhängig wieder entfernt [54, 55].

Zusammenfassend besteht also bei der non-viralen Transfektion das größte Problem darin, Fremd-DNA von der Größe eines Plasmids in den Nukleus zu verbringen. Dies steht im Gegensatz zur viralen Transfektion, bei der die Viren den nukleären Import

selbst durch in der Hülle enthaltene NLS gewährleisten. Aufgrund der beschriebenen Nachteile einer viralen Transfektion gilt es daher, die Effizienz der non-viralen Transfektion zu verbessern; u.a. durch Elektroporation, oder kovalente und non-kovalente Bindungen von DNA an NLS-beinhaltende Proteine (Transkriptionsfaktoren) oder Peptide, z.B. an einen non-viralen Vektor oder die DNA selbst. Ein Beispiel für ein NLS-tragendendes nukleäres Protein sind Steroidrezeptoren.

2.3.6 Steroidrezeptoren

Steroidrezeptoren sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, deren zelluläre Funktion es ist, die Expression ihrer Zielgene zu regulieren [56]. Die Regulation der Transkription geschieht allgemein durch die Wechselwirkung von Proteinen und den Promotorbereichen ihrer Zielgene. Steroidrezeptoren können abhängig von ihrer intrazellulären Verteilung in Abwesenheit von Liganden in drei Gruppen eingeteilt werden [57]: (i) ausschließlich nukleär lokalisierte Rezeptoren, wie z.B. Östrogenrezeptoren, (ii) zwischen Nukleus und Zytoplasma translozierende Rezeptoren, die durch Bindung ihrer Liganden im Nukleus zu finden sind, wie Mineralocorticoid- und Progesteronrezeptoren, (iii) überwiegend zytoplasmatisch lokalisierte Rezeptoren, die nur nach Ligandenbindung in den Nukleus transportiert werden, wie Glucocorticoid- und Androgenrezeptoren.

Steroidrezeptoren setzen sich aus folgenden Domänen zusammen: (i) N-terminale Regulatordomäne, (ii) DNA-Bindedomäne (DBD) bestehend aus zwei charakteristischen Motiven, die eine spezifische Nukleotidsequenz auf der DNA, nämlich das *hormon responsive element* (HRE), bindet, (iii) variable Verbindungsdomäne, (iv) Ligandenbindungsdomäne (LBD), also die spezifische Bindungsstelle für das entsprechende Steroid, und (v) eine variable C-terminale Domäne.

HRE sind Abschnitte im Bereich der Nukleotidsequenz von Promotoren bestimmter Gene, die als Bindungsstelle für nukleäre Hormonrezeptoren dienen. HRE bestehen - soweit bekannt - überwiegend aus hexameren *tandem repeats*, deren Sequenz, Polarität und Abstand die Identität des jeweiligen HRE definieren. Steroidrezeptoren sind somit intrazelluläre Rezeptoren, die die Signaltransduktion der Steroide in die Zelle ermöglichen. Die vorliegende Arbeit basiert maßgeblich auf dem humanen Progesteronrezeptor (hPR) mit seinen Isoformen A (PRA) und B (PRB), wobei PRA die trunkierte Form von PRB ist, der C-terminal 164 Aminosäuren fehlen. In Anwesenheit von Agonisten zeigen die Isoformen abhängig vom verwendeten Promotor unterschiedliche Transkriptionsaktivität [58]. Lim *et al.* [2] beschrieben, dass der PRB hauptsächlich im

Nukleus zu finden ist, aber der PRA in Abwesenheit von Liganden sowohl eine nukleäre als auch zytoplasmatische Komponente hat, und dass bei Bindung mit einem Liganden eine Translokation in den Nukleus erfolgt [57].

Steroide wiederum setzen sich in Form des Grundgerüstes Cyclopentanoperhydrophenantren, dem sog. Gonan oder früher Steran, aus 18 - 30 C-Atomen zusammen. Länge, Seitenketten, funktionelle Gruppen und Doppelbindungen bedingen die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften der Steroide. Ihre Wirkung entfalten sie durch die Bindung an entsprechende Rezeptoren der Zielzellen. Steroide werden in der Leber inaktiviert und im Rahmen der Biotransformation in eine wasserlösliche Form überführt. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Niere, in geringerem Maße über den Darm; hierbei spielt zudem der enterohepatische Kreislauf eine wichtige Rolle.

3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die liposomale Transfektion von T47-D Brustkrebszellen durch Zugabe unterschiedlicher Steroidhormone und Cholesterol *in vitro* zu steigern (Teil 1 der Arbeit). Grundlage war die Annahme, dass Steroidhormone über die Bindung an das HRE ihres Rezeptors diesen aktivieren, mit der Folge einer Migration des Rezeptors in den Nukleus (Abbildung 4) [2]. Elementarer Baustein dieses Vorganges sind die NLS der Hormonrezeptoren, welche an Importine binden und ihren Rezeptor durch die nukleäre Pore schleusen [3]. Nach Bindung von Plasmid-DNA an die DBD des Hormonrezeptors könnte dann die gewünschte Plasmid-DNA co-transportiert werden. Hieraus leitete sich die erste Fragestellung ab:

- Ist eine Verstärkung der liposomalen Transfektion von T-47D Brustkrebszellen durch Zugabe unterschiedlicher Steroidhormone bzw. Cholesterol möglich?

Sollte dies der Fall sein, so wären gynäkologische Malignome mit hoher Steroidrezeptorexpression wie z.B. das Mamakarzinom ideale Zielgewebe für eine gerichtete, steroidvermittelte non-virale Gentherapie. Durch die zusätzliche Integration von HRE in das Plasmid könnte zudem die Anbindung an die DBD des aktivierten Hormonrezeptors verstärkt werden [4-6]. Hieraus leitete sich die zweite Fragestellung ab:

- Kann der Co-Transport von Plasmid-DNA durch zusätzliche Integration eines HRE in das Plasmid und über eine konsekutiv verstärkte Anbindung an die DBD des Hormonrezeptors gesteigert werden?

Die dritte Fragestellung leitete sich aus dem Wissen ab, dass Steroidhormone und Cholesterol auf demselben chemischen Grundgerüst aufbauen, was folgende Vermutung zuließe:

- Beruht der Effekt von Steroidhormonen und Cholesterol auf die liposomale Transfektion von T-47D Zellen auf demselben Mechanismus, oder liegt ein Synergismus der einzelnen Testsubstanzen vor?

Auf dem Boden der erfolgreichen *in vitro* Versuche schloss sich ein vorläufiges *in vivo* Experiment mit dem übergeordneten Ziel an, eine *DNA-Tablette* zu entwickeln, mit der an einem hormonrezeptorpositiven Malignom erkrankte Frauen gezielt, ohne die Gefahr systemischer Nebenwirkungen, durch intratumorale Giftung therapiert werden könnten (Teil 2 der Arbeit).

4 Materialien und Methoden

4.1 Allgemein

4.1.1 Gene, Plasmide und Vektoren

Als Reportergen fungierte das Gen der Firefly Luciferase (*luc*), das zusammen mit der SV40-Polyadenylierungs- und der *enhancer*-Region aus dem Plasmid pGL3-Promotor (Promega, Mannheim/GER) in zwei verschiedene Expressionsvektoren für Eukaryonten kloniert wurde. Die Vektoren pTGFG95 und pTGFG0 (Octagene GmbH, Martinsried/GER) enthielten jeweils einen CMV-Promotor, und pTGFG95 beinhaltete im Gegensatz zu pTGFG0 fünf Sequenzabschnitte für PRE (Abbildung 5). Mit dem CMV-Promotor wurde das Gen *luc* konstitutiv exprimiert.

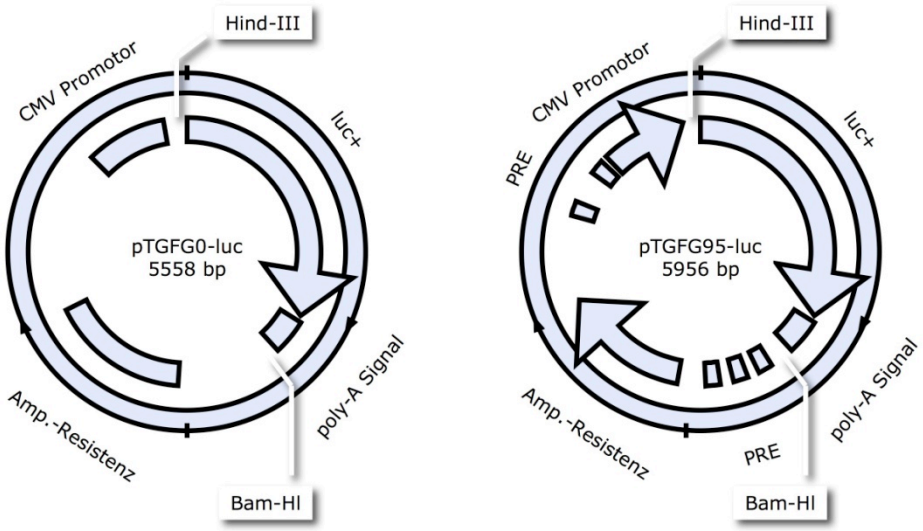

Abbildung 5
Graphik der applizierten Vektoren pTGFG0 (links) und pTGFG95 (rechts). Beide Vektoren enthielten jeweils einen CMV-Promotor, mit dem das Gen *luc* konstitutiv exprimiert wurde. pTGFG95 enthielt zusätzlich fünf Sequenzabschnitte für *progesteron responsive elements* (PRE), die die Bindung der Plasmid-DNA an den Progesteronrezeptor verstärken sollten.

4.1.2 Klonierung von Plasmiden

4.1.2.1 DNA-Restriktion

Je eine definierte Menge der Plasmid-DNA von PTGFG0 (1,3 µl), PTGFG95 (1,0 µl) und PGLluc (1,5 µl) wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III und React 2 Puffer in einem Eppendorf Tube und H_2O ad 20 µl vermischt. In einem zweiten Restriktionsschritt

wurde das Enzym BamH I verwendet. Zum Anpassen des benötigten Puffermilieus wurden 2,5 µl 4 M NaCl und 1,7 µl H_2O hinzugegeben. Die Restriktionen erfolgten entsprechend des Herstellerprotokolls (New England Biolabs, Ipswich, MA/USA).

4.1.2.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) mit 25 ng/ml Ethidiumbromid verwendet. Als DNA-Längenstandard wurde die 1 Kb DNA-Leiter (Life Technologies, Darmstadt/GER) aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, wobei die DNA Banden durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar wurden.

4.1.2.3 Gelelution

Die Elution aus dem Gel erfolgte mittels Qiaquick-Gel-Extraktions-Kit gemäß des Herstellerprotokols (Qiagen, Hilden/GER).

4.1.2.4 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der Vektorenenden mittels alkalischer Phosphatase (CIP; New England BioLabs) nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls durchgeführt.

4.1.2.5 Ligation der Plasmid-DNA

50 ng Plasmid-DNA und die 3-fache molare Menge der DNA-*inserts* wurden in TE-Puffer (pH 7,6) in einem Gesamtvolumen von 7,5 µl bei 45 °C in einem Wasserbad für 5 min inkubiert und dann im Eisbad abgekühlt. Es wurden dann 1,0 µl 5 mM ATP sowie 1,0 µl 10x Bakteriophage T4-DNA-Ligasepuffer und 0,1 Weiss-Unit T4-DNA-Ligase (Life Technologies) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.1.2.6 Transformation von E. coli

Die Transformation erfolgte in $DH_5\alpha^{TM}$ *competent cells* (Life Technologies) analog zum Herstellerprotokoll. Die Kontrolltransfektion zur Bestimmung der Transfektionseffizienz enthielt 0,1 µg/ml pUC19. Von den Zellen wurden jeweils 100 µl in Tubes vermischt. Im Kontrollansatz wurden 5,0 µl pUC19 mit 100 µl $DH_5\alpha^{TM}$ vermischt. In zwei Transformationsmischungen wurden jeweils 1,0 µl der Ligationsansätze mit pTGFG0luc oder

pTGFG95luc zu 100 µl $DH_5\alpha^{TM}$ gegeben und vermischt. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe von 10 mM Tris HCl (pH 7,5) und 1 mM Na_2EDTA. Beide Ansätze wurden auf Eis für 30 min inkubiert. In einem Wasserbad wurden die Ansätze für 45 s auf 42 °C erhitzt und danach für 2 min auf Eis gelagert. Nun erfolgte die Zugabe von 0,9 ml S.O.C. Medium (Life Technologies; 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, $MgSO_4$ x7 H_2O 10 mM, MCl 10 mM, Glucose 20 mM). Das Transformationsgemisch wurde bei 225 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert. Die Kulturen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit S.O.C. Medium vermischt und 100 µl der transformierten Lösungen auf LB-Agar-Platten mit 10 mg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht inkubiert. Sichtbar gewachsene Kolonien wurden in Flüssigkulturen angezogen, deren Plasmid-DNA isoliert, restringiert und auf einem Agarosegel analysiert (s.u.).

4.1.2.7 Bakterienanzucht

Mit einer Platinöse wurde eine Bakterienkolonie von einer Selektionsplatte abgenommen, in 2,0 ml LB-Medium resuspendiert und für 5 – 8 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit dem selektiven Antibiotikum Ampicillin mit 20 µl der oben inkubierten Suspension beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert.

4.1.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der DNA aus den Zellen erfolgte mittels Endofree-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen) dem Herstellerprotokoll entsprechend. 100 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 6.000 Upm pelletiert. Das isolierte DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und bei 10.000 Upm für 5 – 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei RT für 5 – 20 min luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer; pH 7,5) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch.

4.2 Zellversuch

4.2.1 Zellkultur

Die Brustkrebszellinie T47-D von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen/GER bezogen. Für die Zellkultur wurde das Wachstumsmedium RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe/GER) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; PAA Laboratories, Cölble) und Streptomycin/Penicillin (Invitrogen) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre aus Luft mit 5% CO_2 in einem Brutschrank.

4.2.2 Transfektion von T47-D mit Testsubstanzen

Für die Transfektion wurden 2×10^5 T47-D Zellen pro *well* (24-*well* Platten) mit Wachstumsmedium ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Bei 70% Konfluenz wurden die Kulturen mit PBS gewaschen, und 0,5 ml frisches Medium ohne FCS und Antibiotika wurde zugegeben. Auf einer Transfektionsplatte wurden vier Kulturen als Kontrollansatz ausschließlich mit DOTAP (1 mg/ml N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-Trimethylammoniumpropan-Methylsulfat; Roth, Karlsruhe/GER) oder zusätzlich Cyclodextrin (100 mg/ml Stammlösung; Sigma) in einer Konzentration adäquat zu den Testsubstanzen behandelt. Je vier weitere Kulturen pro Konzentration wurden mit den Testsubstanzen (Progesteron, Östrogen, Hydrocortison, Testosteron) behandelt. Die Steroidhormone (26 mM Stammlösung in Cyclodextrin solubilisiert; Sigma) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in den DOTAP Ansatz integriert, bevor DNA und DOTAP vermischt wurden. Hierfür wurden 2,5 µg DNA und 12,5 µg DOTAP jeweils in 50 µl Transfektionsmedium OPTI-MEM (Gibco, Carlsbad, CA/USA) aufgefüllt und anschließend miteinander auf 100 µl vermischt. Nach exakt 15 min Inkubation und Ausbildung der Lipoplexe bei RT wurden hiervon jeweils 20 µl auf die einzelnen Kulturen aufgetropft. Nach weiteren 20 h Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch Zellkulturmedium (s.o.) ersetzt.

4.2.3 Transfektion von T47-D mit und ohne PRE-Sequenzen

In diesem Versuchsteil wurden T47-D Brustkrebszellen in einem Ansatz mit dem Plasmid pTGFG0luc-control transfiziert, und als Vergleichsansatz eine Transfektion mit dem Plasmid pTGFG95luc durchgeführt. Letzteres ist Träger von 5 PRE-Sequenzabschnitten. Die Transfektion erfolgte analog zu Absatz 4.2.2.

4.2.4 Transfektion von T47-D unter Einfluss mehrerer Testsubstanzen

In diesem Versuchsteil wurde Progesteron *mit* Cholesterol mit der jeweils substanzspezifisch höchstwirksamsten Konzentration, wie unter Absatz 4.2.2 ermittelt. Die Transfektion erfolgte analog zu Absatz 4.2.2.

4.2.5 Luciferaseassay

48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, und die Zellen in jeweils 100 µl Reporter-Lysispuffer (Promega) pro *well* gelöst, in flüssigem N_2 bei -80 °C in Eppendorf Gefäßen schockgefroren, und nach Auftauen bei 3.000 x g für 10 min zentrifugiert. Jeweils 10 µl Überstand wurden in *wells* einer 96-*well* Platte pipettiert und unmittelbar vor der Messung in einem Plattenluminometer (Lumicount, Messzeit: 1 s; Packard, Ontario, USA) mit 50 µl Luciferase-Assayreagenz (Promega) vermischt. Mittelwerte wurden aus vier Transfektionsansätzen berechnet.

4.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das One-Way-Anova Verfahren verwendet mit dem Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test als Post-hoc-Test. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0{,}01$ angenommen. Werte aus vier Transfektionen pro Konzentration wurden gemittelt, und die Versuche mindestens drei Mal wiederholt.

4.3 Tierversuch

4.3.1 Versuchsaufbau

Für den Tierversuch verwendeten wir C57 *black six* Mäuse (n=10; Alter: 6 Wochen; Gewicht: 18 – 20 g; Charles River, Sulzfeld/GER). Die Tiere wurden im Tierstall des UK S-H, Campus Lübeck gehalten. Die Versuche fanden unter tierärztlicher Überwachung statt. Die Tierversuche wurden durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein mit dem Aktenzeichen V252-72241-122-10 (22-2/10) am 15. Juni 2001 genehmigt (siehe Anhang).

Der Applikationsart entsprechend wurden die Versuchstiere (je n=5) randomisiert. Die Buchstaben IV und PO erklären die Art der Applikation: IV für intra-venös und PO für per-orales Cocktailschlunden. Mit darauf folgenden arabischen Zahlen definierten wir die entnommenen Organe bzw. Proben (Abbildung 6). Diese wurden später portioniert weiteren Untersuchungen zugeführt. Als CTRL definierten wir eine Kontrollmaus, welche ohne jegliche Applikation euthanasiert wurde, und deren Organproben jeweils bei den einzelnen Messungen als Kontrollwerte genutzt wurden. Beispiel: Somit entsprach die Kennziffer IV-3-12 der Lunge einer Maus, der ein Gentransfercocktail i.v. appliziert wurde.

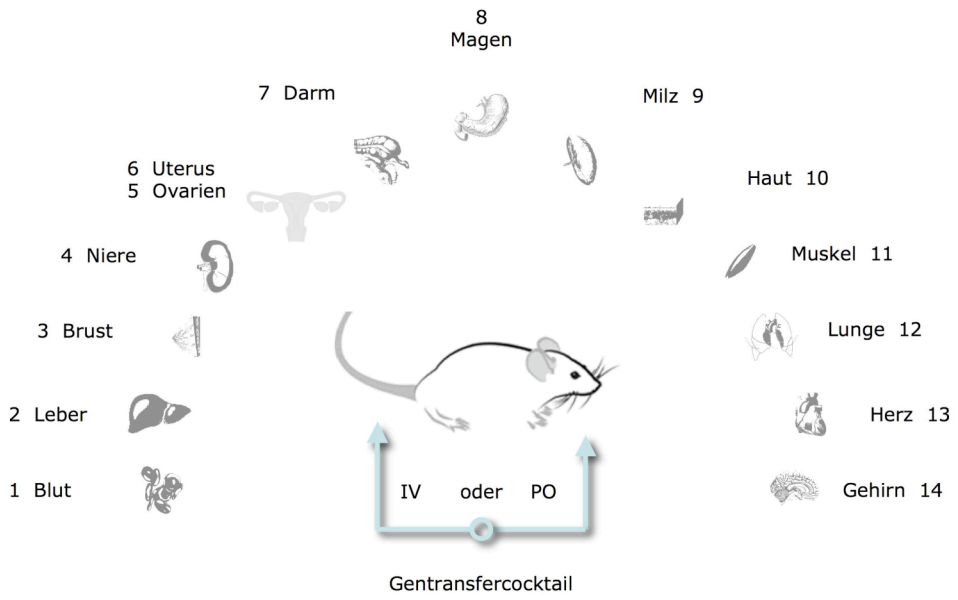

Abbildung 6
Den Versuchstieren, die entweder intra-venös (Maus IV-1 bis 5), per-oral (Maus PO-1 bis 5) oder keinen (CTRL Maus) Gentransfer erhalten hatten, wurden 14 Organe bzw. Proben entnommen, welche entsprechend nummeriert wurden (1 bis 14).

4.3.2 Gentransfercocktail

Zur Herstellung des oralen Gentransfercocktails wurde eine Utrogest® Kapsel (Dr. Kade, Berlin/GER) mit einem Skalpell geöffnet. Mit der Pipette wurden 50 µl des Inhalts entnommen und auf eine sterilisierte Petrischale transferiert. Dann wurden 2 µl DNA pTGFG95luc mit der Konzentration 5 µg/µl und 10 µl eines rekombinant hergestellten Progesteronrezeptors vom Typ A (PR-A) beigefügt und zu einem homogenen Cocktail vermischt. Diese wurde mit einer Insulinspritze aufgenommen zur Applikation gebracht.

Die Herstellung des intra-venösen Gentransfercocktails mit dem *in vivo* Liposomen Transfektionsreagenz (20 mM DOTAP:Cholesterol [1:1 *molar ratio*] mit 5% Glucose extrudiert; Sigma) erfolgte basierend auf dem Herstellerprotokoll. Wir vermischten 43 µg der Plasmid-DNA PGL3 (Promega) in einem Eppendorf Gefäß zuerst in 220 µl 5% steriler Glucose und dann mit 120 µl 4 mM DOTAP. Diese 340 µl wurden in eine Insulinspritze aufgenommen und in die Schwanzvene der jeweiligen Maus injiziert.

4.3.3 Anästhesie

Die i.v. Applikation erfolgte grundsätzlich in Allgemeinanästhesie. 4 h zuvor wurde den Tieren das Futter entzogen. Wasser war durchgängig verfügbar. Zur Narkosedurchführung wurde auf dem Boden einer, zur adäquaten Überwachung, gläsernen Ganzkörperkammer eine in Ethylether (Sigma) getränkte Kompresse gelegt. Die Maus wurde daraufhin in das Gefäß gesetzt, und dieses mit einem gläsernen Deckel verschlossen. Es wurde auf eine Prämedikation verzichtet, sodass die Mäuse ein kurzes Exzitationsstadium bis zum Ausfall des Stellreflexes durchliefen. Der Ausfall des Stellreflexes wurde durch ein Drehen der Kammer festgestellt und nach ca. 3 min erreicht.

Nach erfolgter Applikation (s.u.) wurden die Mäuse im Käfig für 4 h unter eine Wärmelampe gelegt. Der klinische Zustand wurde regelmäßig kontrolliert. Die IV Mäuse zeigten sich *post interventionem* zu jeder Zeit in einem klinisch sehr guten, stabilen Zustand. Die PO Mäuse zeigten mit einer Latenz von ca. 1 h eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes.

4.3.4 Applikationsarten

Im Rahmen des per-oralen Cocktailschlundens wurden die narkotisierten Mäuse aus der Kammer genommen und mit einer Hand im Nacken und an der Rückenhaut fixiert. Hierdurch konnte die Maus in eine gestreckte Position gebracht werden, sodass Kopf, Hals und Rücken eine annähernd gerade Linie bildeten. Der Katheteranteil einer zuvor befüllten Schlundsonde (Plastikanteil eines 23 Gauge Venenverweilkatheters, konnektiert mit einer 1 ml Spritze; Braun, Melsungen/GER) wurde per-oral bis in die Speiseröhre vorgeschoben. In der Sonde befanden sich ca. 50 µl des zu applizierenden Cocktails bei einem Todvolumen von ca. 20% im Katheter. Der Katheter wurde vor der Applikation entlüftet. Der Stempel der Spritze wurde langsam niedergedrückt und somit der gesamte Spritzeninhalt nach gastral entleert.

Für die intra-venöse Applikation des Gentransfercocktails wurden die narkotisierten Mäuse aus der Kammer herausgenommen und in eine gläserne Röhre, welche die Ventilation der Tiere nicht beeinträchtigt, gelegt, sodass der Schwanz am proximalen Ende fixiert der Injektion frei zugänglich war. Es folgt die gründliche Desinfektion mit Cutasept (Bode Chemie, Hamburg/GER). Die Injektion wurde mit einer 26 Gauge Injektionsnadel und einer 1 ml Insulinspritze vorgenommen. Nach positiver Blutaspiration wurden der Gentransfercocktail in die seitliche Schwanzvene langsam injiziert.

4.3.5 Euthanasie und Organentnahme

Beide Versuchsgruppen wurden 24 h nach Applikation des Gentransfercocktails beendet. Hierfür erfolgte eine zweite Allgemeinanästhesie (s.o.) sowie eine Euthanasie mittels Genickbruch. Danach wurde die Mäuse auf einer Styroporunterlage 4-Punkt fixiert. Es folgten Desinfektion des ventralen Rumpfes mit Cutasept und Setzen eines 4 cm langen Hautschnittes in cranio-caudaler Richtung mit dem Skalpell. Bei keinem der Versuchstiere konnte die Brustdrüse makroskopisch identifiziert werden. Abpräparation von Haut mit Fell, dieses wurde beidseitig lateral mit Nadeln an der Unterlage fixiert. Nun zunächst Blutentnahme (1,0 ml) aus dem Herzen mittels o.g. i.v.-Set; Aufbewahrung des Materials in Eppendorf Tubes. Dann explorative Lapara- und Thorakotomie mittels Schere und Pinzette. Anschließend Organentnahmen: von den paarigen Organen wurden beide entnommen, die unpaaren in der Mitte halbiert und getrennt voneinander aufbewahrt. Auf die Entnahme der Brustdrüse musste bei fehlender Darstellbarkeit verzichtet werden. Nun Darstellung eines 0,5 x 0,5 cm messenden Hautlappens des ventralen Rumpfes, dieser wurde scharf abgetrennt, vom Fell separiert und halbiert. Darstellung der Oberschenkeladduktoren beidseits, und Entnahme einer jeweils ca. 3 mm langen Muskelprobe. Entfernen der Fixierungsnadeln und

Lagern der Maus auf dem Bauch. Desinfektion des Kopffells mit Cutasept. Nun wurde ein Längsschnitt von occipital nach frontal gesetzt und das Fell mit der Haut nach lateral gezogen. Am Occiput folgte mit der Präparierschere die Trepanation von lateral nach medial; danach wurde von occipital nach frontal die Kalotte in der Mittellinie durchgeschnitten und die Knochenhälften zu den Seiten weggeklappt. Das nun sichtbare Gehirn wurde vorsichtig aus dem Schädel gehoben und in Höhe der Medulla oblongata vom Rückenmark abgetrennt. Aufbewahrung der Organe jeweils in Eppendorf Tubes mit Kennung entsprechend Abbildung 6. Die entnommenen Proben wurden entweder sofort Messprotokollen zugeführt, oder in flüssigem N_2 schock- und danach bei -80 °C bis zur endgültigen Durchführung der Messungen eingefroren.

4.3.6 Aufbereitung der Organe

Die Aufarbeitung der einzelnen Organe bzw. Proben jedes Versuchstieres erfolgte nach u.g. Protokollen. Einige Proben wurden zur Lagerung eingefroren. In anderen Arbeitsansätzen wurden die Organe direkt für die Messungen aufbereitet. Hierbei verwendeten wir drei unterschiedliche Methoden, konnten aber in vergleichenden Messungen diesbezüglich keine Unterschiede verzeichnen.

Aufbereitung Nr. 1: Bei dieser Methode wurden die Organe jeweils mit 500 µl RLB (Promega) von Hand gepottert, dann 2,5 µl PMSF (Merck, Darmstadt/GER) hinzugefügt und kurz geschüttelt. Nach Zugabe von 150 µl Glo Lysis Buffer (Promega) wurde das Lysats in ein Eppendorf Gefäß überführt, welches in N_2 schockgefroren wurde. Im Anschluss bei 4 °C und 1.300 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet verworfen. In einigen Messungen wurde das Pellet ebenfalls verwendet.

Aufbereitung Nr. 2: Bei dieser Art der Aufbereitung wurden die in einem Röhrchen in N_2 schockgefrorenen Organe in einer Metallschale (auf Trockeneis stehend) unter N_2 gemörsert. Das entstandene Pulver wurde in einem Tube mit 500 µl Glo Lysis Buffer geschüttelt und anschließend mit 1 µl PMSF, in einem anderen Versuch mit 1 µl Aprotinin (Sigma), in einem weiteren mit beiden Zusätzen vermischt und dann geschüttelt. Es folgte erneutes Schockgefrieren und danach drei Zyklen *freeze and thaw* bei -70 °C. Im Anschluss wurde das Lysat gemessen und das Pellet mit 300 µl Glo Lysis Puffer relysiert und dann ebenfalls gemessen.

Aufbereitung Nr. 3: Hier wurden die Organproben mit 500 µl RLB vermischt, dann mit 150 µl Glo Lysis Buffer in ein Eppendorf Tube überführt und mit 1 µl Aprotinin und 1 µl

PMSF vermengt. Es folgte Schockgefrieren und Auftauen in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Proben wurden dann bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden Lysat und Pellet gemessen.

4.3.7 Nachweismethoden

4.3.7.1 Luciferaseassay

Den oben genannten Aufbereitungsmethoden entsprechend wurde jeweils eine definierte Menge der erhaltenen Lysate oder der Pellets mit Luciferaseassay Reagenz (Promega) gemischt und sofort oder wiederholt nach 5 min im Plattenluminometer gemessen. Begleitend zu jeder Messung wurde eine Standardreihe mit dem Luciferaseassay (10^{-6}) im jeweiligen Puffer wie folgt verdünnt: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400.

4.3.7.2 RT-PCR

Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurde nach dem RNA Isolierungsprotokoll des Qiagen-Kits RNA aus den Organen Leber der CTRL Maus, der Lunge der IV-1 und IV-2 Mäuse, sowie Dünndarm der PO-1 Maus isoliert. Für einen weiteren Versuch wurden später Leber und Lunge der PO-1 Maus, Leber der IV-3 Maus, Leber, Lunge und Gehirn der CTRL Maus ebenfalls isoliert; als Nullwert wurde RNA aus einer nicht transfizierten Maus verwendet. Aus der gewonnenen RNA wurden jeweils 5 µl, nach Angaben des Herstellers (Gibco) mittels SuperScript™II reverse Transcriptase zu cDNA für den weiteren Verbrauch verwandelt. Für die reverse Transkription wurde entweder ein Oligo-dT-Primer oder ein spezifischer Primer komplementär zu dem Promega-Plasmid (Promega rv3: CTA GCA AAA TAG GCT GTC cc) verwendet. Die spezifischen PCR-Primer waren luc-left-67 (5”-GGA GAG CAA CTG CAT AAG GC-3”) und luc-right-492 (5”-CAT CGA CTG AAA TCC CTG GT-3”; MWG-Biotech, Martinsried/GER). Anschließend wurde die RT-PCR mit einer Pfx-Polymerase über insgesamt 36 Zyklen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente in einer Verdünnung von 1:100.000 die DNA PGL-*control*; als Negativkontrolle ein Ansatz ohne *template* nur mit den beiden Primern.

4.3.7.3 Northern Blot

Die RNA für den Northern Blot wurde nach dem Protokoll von QIAGEN, Hilden aus den Mäusen isoliert. Der Northern Blot wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Als RNA-Längenstandard wurde eine RNA Leiter von Gibco eingesetzt. Die Gele wurden,

um die RNA nicht zu zerstören, nicht in Ethidiumbromid gefärbt und nur sehr kurz unter UV Licht gehalten. Die DNA für die Sonde wurde, wie unter Absatz 4.1.2.1 aufgeführt, mit den Enzymen Hind III und Xba I aus der DNA PGL (2,11 µg/µl) geschnitten. Die Sonde wurde unter Verwendung des *Megaprime DNA labelling system* (Amersham Life Science, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire/GB) mit radioaktivem Phosphor (P^{32}) markiert, um die Expression der Luciferase mRNA zu detektieren.

4.3.7.4 PCR

Die DNA wurde mittels Qiagen DNA Isolierungs Kit aus den Organen der Versuchstiere isoliert. Aus der Leber der CTRL Maus und der IV-1 Maus, sowie aus Blut der IV-1 Maus erfolgte die Isolierung auch mittels peqLab E.Z.N.A. Blood DNA Kit (Erlangen/GER), und aus dem Magen-, Dünndarm- und Rectuminhalt einer PO Maus mittels Qiamp Stool Kit (Qiagen).

Beispielhaft folgt ein Reaktionsansatz für o.g. DNA: in sterile Eppendorfgefäße wurden je 2 µl DNA pipettiert (Positivkontrolle: 1 µl 1:100000 PGL3), dann 1 µl Primer left (1:50), 1 µl Primer right (1:50), dNTP 1 µl, Taq Polymerase 0,5 µl, H_2O 36,8 µl und 5 µl PCR Puffer (jeweils 1 µl: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, Deoxynukleotidmix). Die PCR wurde im Thermocycler durchgeführt. Es wurden 36 Temperaturzyklen mit folgenden Temperaturen durchgeführt: Denaturierung: 5 min bei 95 °C, 30 s bei 94 °C, Annealing: 30 s bei 62 °C, Synthese: 60 s bei 72 °C, Aufbewahrungstemperatur: 4 °C. Die erhaltenen PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und fotografiert.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung der Transfektionsplasmide

Die Plasmide, die für die Transfektionsversuche verwendet wurden, konnten erfolgreich kloniert werden (Abbildung 7).

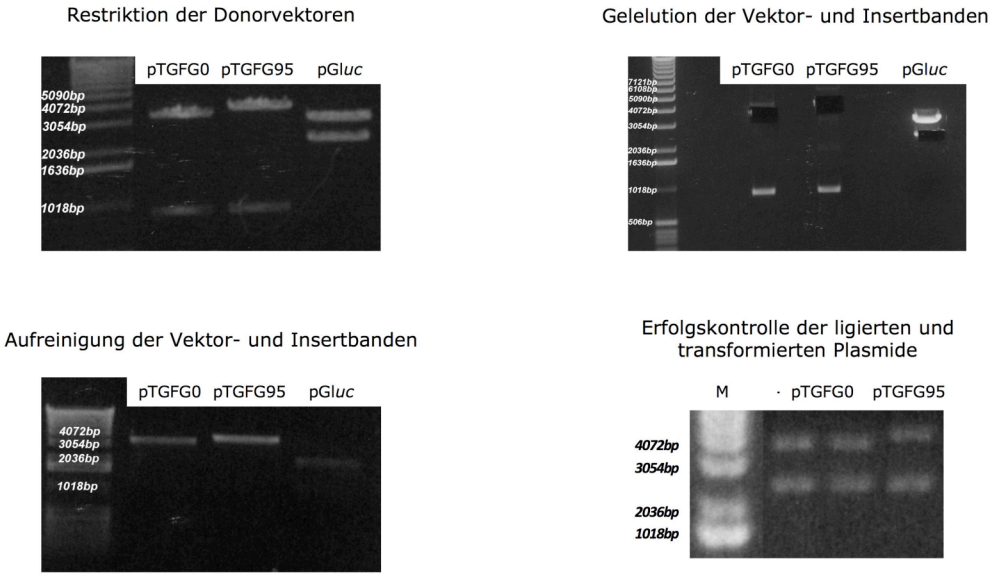

Abbildung 7
Die Einzelschritte der Klonierung der Transfektionsplasmide sind, wie im Methodenteil beschrieben (4.1.2.2) die gelelektrophoretische Auftrennung nach der (4.1.2.1) Restriktion der Donorvektoren, (4.1.2.3) die Gelelution der Vektor- und Insertbanden mit anschließender Aufreinigung der Vektor- und Insertbanden. Diese wurden dann (4.1.2.4) dephosphoryliert, (4.1.2.5) ligiert und (4.1.2.6) in kompetente E. coli transformiert. Die durch (4.1.2.7) Bakterienanzucht vervielfältigten Plasmide wurden dann aus den E.coli (4.1.2.8) isoliert, und die photographisch dokumentierte Erfolgskontrolle der ligierten und transformierten Plasmide analysiert.

5.2 Zellversuch

5.2.1 Zellkultur

Mikroskopisch konnte ein homogenes Wachstum der primären 2D *in vitro* Zellkultur beobachtet werden. Innerhalb weniger Stunden adhärierten die Zellen an der Kunststoffoberfläche. Eine ca. 70%ige Konfluenz der T47-D Zellen konnte nach konstant 48 h beobachtet werden - dies war unabhängig vom Ansatz der Kulturen. Die Zugabe der Transfektionsagenzien bzw. der Transfektionsansatz an sich mit zumindest temporärer Unterbrechung der Standardkulturbedingungen führte zu keiner signifikanten Reduktion der Zellviabilität noch zur Ablösung der Zellen von der Kunststoffoberfläche.

5.2.2 Transfektion von T47-D mit Testsubstanzen

48 h nach der Transfektion wurde zunächst der Einfluss der Testsubstanzen Progesteron, Östrogen, Hydrocortison und Testosteron in unterschiedlicher Konzentration auf den DOTAP Transfektionsansatz mittels Luciferaseassay untersucht.

Durch die Zugabe von 20 µM Progesteron konnte eine Steigerung der DOTAP Transfektion auf den Faktor 5,17 erzielt werden (Abbildung 8). Mit 20 µM Progesteron wurde die stärkste Steigerung der DOTAP Transfektion gemessen. Für die anderen Testsubstanzen ist ebenfalls die Dosis mit der jeweils größten Wirkung angegeben. Nach Zugabe der Testsubstanzen Testosteron (100 µM, Faktor 3,87), Östrogen (100 µM, Faktor 2,77), oder Hydrocortison (200 µM, Faktor 2,0) konnte in allen Fällen eine gesteigerte Transfektion gemessen werden ($p < 0{,}01$).

Die Trägersubstanz Cyclodextrin in jeweils korrespondierenden Konzentrationen hatte in keinem Fall eine Steigerung der DOTAP Transfektion zur Folge.

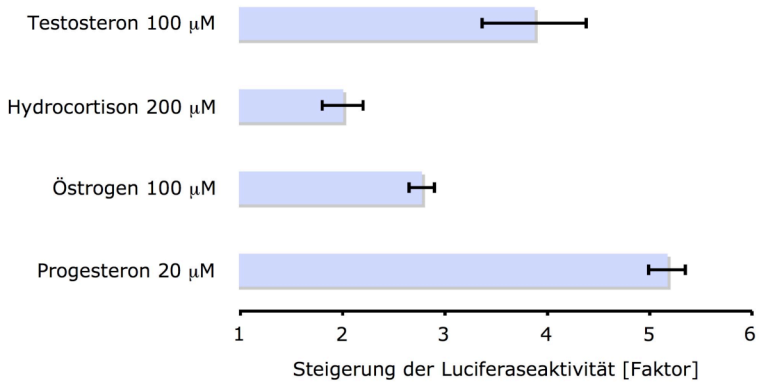

Abbildung 8
Steigerungsraten der DOTAP Transfektion von T47-D Zellen durch verschiedene Steroide. Die Graphik zeigt die Werte der jeweils höchsten Steigerung der Luciferaseaktivität die durch die einzelnen Testsubstanzen erzielt wurde, und die dafür eingesetzten Konzentrationen. Die Standardabweichungen aus je vier Transfektionen sind als Fehlerbalken dargestellt.

5.2.3 Transfektion von T47-D mit und ohne PRE

Sowohl die Zugabe von Cholesterol als auch die von Progesteron hatte einen Einfluss auf die Transfektion mit DOTAP (Abbildung 9). Beide unterschiedlichen Testsubstanzen führten zu einer Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur reinen DOTAP Transfektion ($p < 0{,}01$). Dabei wurden für Progesteron - konzentrationsunabhängig und unabhängig vom verwendeten Plasmid - höhere Werte als für Cholesterol gemessen ($p < 0{,}01$).

Im Progesteronansatz mit dem Plasmid pTGFG0luc fand sich bei allen Konzentrationen eine nur unwesentlich höhere Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem Plasmid pTGFG95luc als Träger von fünf PRE-Sequenzabschnitten. Unter 50 µM Cholesterol mit dem Plasmid pTGFG95luc zeigte sich eine Steigerung der Luciferaseaktivität um den Faktor 2,8 und mit dem Plasmid pTGFG0luc um den Faktor 2,2 gegenüber der reinen DOTAP Transfektion.

Die größte Steigerung der Luciferaseaktivität konnte nach Zugabe von Progesteron mit einer Konzentration von 20 µM gemessen werden (pTGFG0luc, Faktor 5,1; pTGFG-95luc, Faktor 4,5). Nach Zugabe von Cholesterol konnte die höchste Steigerung ($p < 0{,}01$) der Transfektion mit einer Konzentration von 50 µM erzielt werden (pTGFG0luc, Faktor 2,2; pTGFG95luc, Faktor 2,8). Zudem fand sich für beide Testsubstanzen eine optimale Konzentration, über die hinaus keine weitere Steigerung der Luciferaseaktivität erreicht werden konnte (nicht gezeigt). Die Trägersubstanz Cyclodextrin hatte in keinem Fall eine Steigerung der DOTAP Transfektion zur Folge.

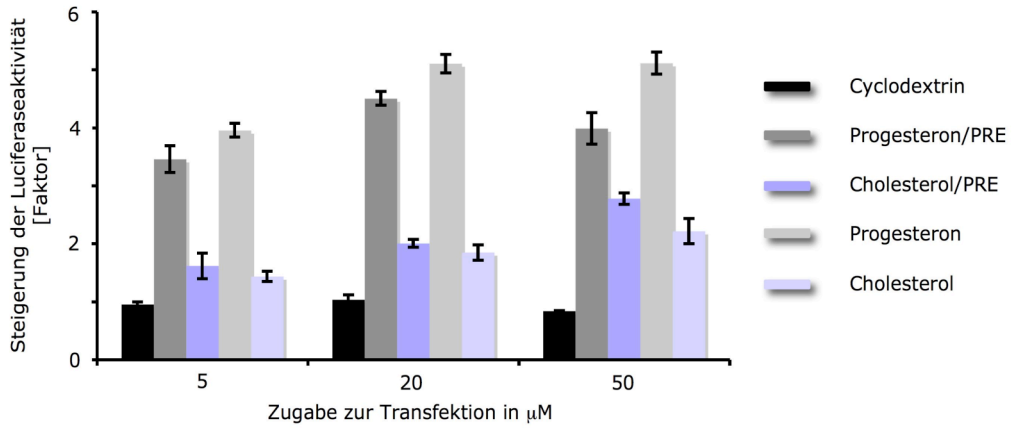

Abbildung 9
Steigerungsraten der DOTAP Transfektion von T47-D Zellen durch Zugabe von Cyclodextrin solubilisiertem Progesteron oder Cholesterol. Weder die einklonierten PRE Sequenzen noch die Trägersubstanz Cyclodextrin hatten einen Einfluss auf die Transfektionsrate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier Transfektionen).

5.2.4 Transfektion von T47-D mit zwei Testsubstanzen

Wie in den vorherigen Versuchen bereits ermittelt, führte die Zugabe von Progesteron oder Cholesterol bei einer bestimmten Konzentration zu einer optimalen Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur reinen DOTAP Transfektion. In diesem Versuch wurden, wie Abbildung 10 zeigt, wiederum durch Zugabe von Progesteron bei 20 µM die höchste Steigerung der Luciferaseaktivität (Faktor 4,51) im Vergleich zur reinen Kontroll-Transfektion erzielt; durch Zugabe von Cholesterol bei 50 µM die höchste Steigerung auf den Faktor 2,84 ($p < 0{,}01$). Somit definierten wir die jeweils substanz-spezifisch höchstwirksamsten Konzentration mit 20 µM für Progesteron und mit 50 µM für Cholesterol.

Bei der Kombination der beiden Substanzen in ihrer jeweils wirksamsten Konzentration konnte eine Anhebung der Luciferaseaktivität um den Faktor 13,1 im Vergleich zur reinen DOTAP Transfektion gemessen werden ($p < 0{,}01$). Die Trägersubstanz Cyclo-dextrin hatte auch in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

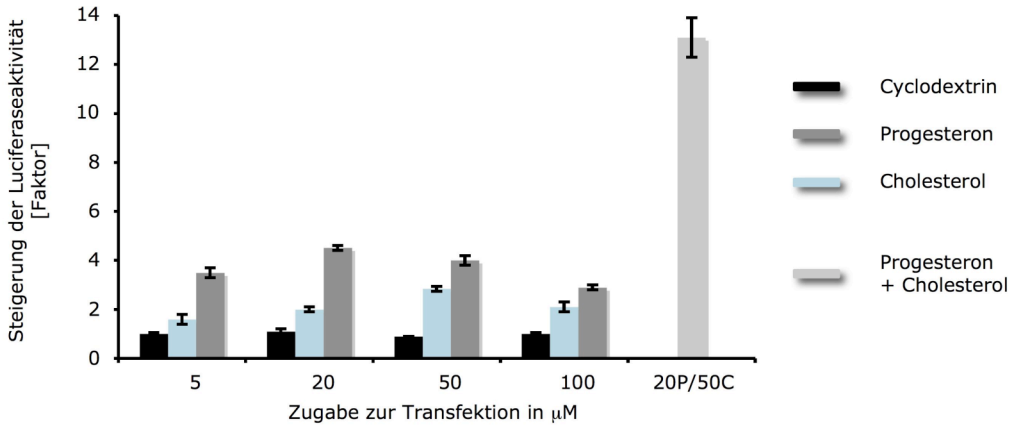

Abbildung 10
Nach der Bestätigung der höchstwirksamsten Konzentrationen von Progesteron (20 µM Progesteron: Faktor 4,51) und Cholesterol (50 µM Cholesterol: Faktor 2,84) auf die reine DOTAP Transfektion fand sich für deren Kombination (20P/50C: 20 µM Progesteron plus 50 µM Cholesterol) eine Steigerung der Luciferaseaktivität um den Faktor 13.1 im Vergleich zur Kontroll-Transfektion. Die Luciferaseaktivität, die aus der reinen DOTAP Transfektion mit der Trägersubstanz Cyclodextrin resultierte, wurde mit dem Wert 1 definiert. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus je vier Transfektionen.

5.3 Tierversuch

5.3.1 Nachweis der Plasmid-DNA in der PCR

Nach i.v. Applikation des Gentransfercocktails konnte mittels PCR in der Lunge der Versuchstiere 2 (IV-2-12) und 3 (IV-3-12), sowie im Blut des Versuchstieres 2 (IV-2-1) *luc* DNA nachgewiesen werden, die der injizierten Plasmid-DNA entspricht. Reproduzierbar, in drei PCR-Läufen, war dieses Ergebnis lediglich für IV-3-12 (Abbildung 11). In den anderen Organen von IV-3 gelang hingegen kein Nachweis von *luc* DNA. Auch in den übrigen Versuchstieren gelang kein Nachweis von *luc* DNA. Dies war unabhängig von der Applikationsart und grundsätzlich unabhängig von den unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden der Organe bzw. Proben.

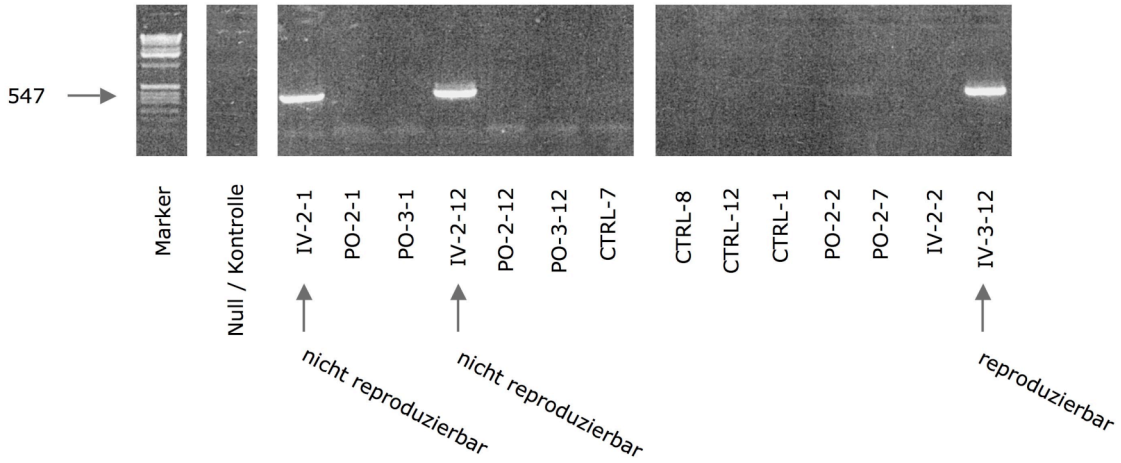

Abbildung 11
Ausgewählte PCR-Nachweise zum Verbleib der transfizierten *luc* DNA (547 bp Bande). Lediglich in der Lunge des Versuchstieres 3 konnte nach i.v. Applikation des Gentransfercocktails reproduzierbar *luc* DNA nachgewiesen werden (IV-3-12). Der Nachweis von *luc* DNA im Blut von Versuchstier 2 (IV-2-1) oder in der Lunge von Versuchstier 2 (IV-2-12) nach i.v. Applikation des Gentransfercocktails war nicht reproduzierbar. In keinem der anderen Versuchstiere inkl. der Kontrollmaus (CTRL = keine Applikation des Gentransfercocktails) gelang der Nachweis von *luc* DNA - unabhängig von Applikationsart oder Aufbereitungsmethode der Proben.

5.3.2 Nachweis von mRNA in der RT-PCR

In keinem der Versuchstiere konnte nach i.v. oder p.o. Applikation des Gentransfercocktails die mRNA des Genes *luc* mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren unabhängig von den unterschiedlichen Organaufbereitungsmethoden.

5.3.3 Nachweis von m-RNA im Northern Blot

In keinem der Versuchstiere konnte nach i.v. oder p.o. Applikation des Gentransfercocktails die mRNA des Genes *luc* mittels Northern Blot (Abbildung 12) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren unabhängig von den unterschiedlichen Organaufbereitungsmethoden.

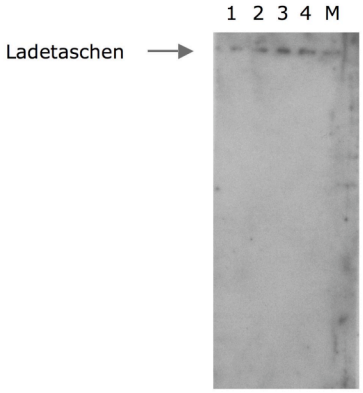

Abbildung 12
Northern Blot zum Nachweis von Luciferase mRNA in transfizierten Mäusen. Die mRNA wurde aus folgenden Geweben isoliert. 1: Lunge von IV-1; 2: Lunge von IV-3; 3: Dünndarm von CTRL; 4: Leber von CTRL, und M: RNA-Längenstandard.

5.3.4 Luciferaseassay

In keinem der Versuchstiere konnte nach i.v. oder p.o. Applikation des Gentransfercocktails die Aktivität des exprimierten Luciferaseproteins mittels Luciferaseassay nachgewiesen werden. Keiner der erzielten Werte für die Luciferaseaktivität waren höher als die Kontrollwerte von Geweben aus der nicht transfizierten Maus. Die Ergebnisse waren unabhängig von den unterschiedlichen Organaufbereitungsmethoden.

6 Diskussion

Seit Beginn der 90er Jahre deutet sich in Deutschland ein erfreulicher Wandel in der Krebslandschaft an. Die altersbereinigte Krebsmortalität für beide Geschlechter geht zurück. Auch die Inzidenzen scheinen nicht weiter anzusteigen. Gleichwohl steigt durch den zu beobachtenden demographischen Wandel einer alternden Bevölkerung die absolute Anzahl der jährlich an Krebs versterbenden Personen. Trotz aller Bemühungen sind Malignome jedoch *noch* die zweithäufigste Todesursache nach den Krankheiten des Kreislaufsystems. Ein bewusstes *noch*, denn wenn sich auf dem Gebiet der Krebsprävention keine ähnlich durchschlagenden Erfolge einstellen wie bei Erkrankungen des Kreislaufsystems, wird Krebs bald die führende Todesursache in Deutschland sein.

Die höchste Mortalität und Inzidenz von Malignomen bei Frauen weist das Mammakarzinom auf. Langzeitdaten des Robert Koch Instituts betonen einen Anstieg der Brustkrebsinzidenz seit den 70er Jahren, während die Mortalität seit der 90er Jahre nur leicht sinkt. Die Entwicklung einer sicheren, nebenwirkungsarmen und v.a. effektiven Therapie zur gezielten Behandlung des Mammakarzinoms, unabhängig von Hormonrezeptorstatus oder der Expression des HER 2, wäre somit von unschätzbarem gesundheitsökonomischem aber insbesondere auch individuell prognostischem Wert.

Ein hoffnungsvoller Ansatz war und ist die Gentherapie und deren Modulation durch Steroide. Dabei werden entweder defekte Gene durch funktionelle ersetzt, oder Tumorzellen gezielt mit ausgewählten Genen transfiziert, sodass es durch *targeting* zu einem Absterben ausschließlich dieser Tumorzelle kommt. Für diesen Gentransfer stehen virale oder non-virale Vektoren zur Verfügung. Obgleich der virale Gentransfer eine hohe Transfektionsrate ermöglicht, birgt er nicht unerhebliche Nachteile, wie z.B. eine mögliche Aktivierung der Immunabwehr, und ein unkalkulierbares Entartungsrisiko [59]. So rückte der sicherere non-virale Gentransfer zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Vor dem Hintergrund, eine ausreichende Nukleinsäuremenge über die extra- und intrazellulären Barrieren bis in das Zielgewebe zu bringen, wurden für die non-viralen Gentherapie verschiedene Vehikelstrategien entwickelt, wobei die Applikation per Injektion oder Inhalation erfolgen kann. Idealerweise sollte der Ansatz der non-viralen Transfektion jedoch oral applizierbar sein, um eine regelmäßige Einnahme zu erleichtern und die *compliance* der Patienten zu erhöhen.

Auf dem Weg zu einer effizienten Transfektion und somit funktionellen Gentherapie sind jedoch Hürden auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene zu überwinden: die Aufnahme in das Zytoplasma der Zielzelle über die Zellmembran, abgesehen von der Möglichkeit einer direkten Injektion nackter DNA (*gene gun*), und der nukleäre Import.

Auch wenn Vektoren die Zellmembran auf unterschiedliche Weise überwinden können, ist die rezeptorvermittelte Bindung an der Zellmembran derzeit wohl am besten verstanden [37]. Bei der viralen Transfektion machen sich die Viren die zellulären Transportsysteme zu Nutze, indem sie an transmembrane Rezeptoren binden, die eine Endozytose ermöglichen, was wiederum eine hohe Transfektionseffizienz bedeutet. Aber auch kationische Liposomen und Polymere unterschiedlicher Zusammensetzung, die mit Peptiden bzw. Wirkstoffen augmentiert werden, können an Rezeptoren der äußeren Zellmembran binden und, so vermuten es Li und Huang [31], die Endozytose verstärken. Regelhaft werden kationische Lipide mit sog. Helferlipiden kombiniert. So ist DOTAP mit Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) *eine* gängige Kombination. Grundvoraussetzung für Effizienz im Zielgewebe ist jedoch eine gute Komplexstabilität sowie Bio- und Pharmaverfügbarkeit. Ist das Zytosol erreicht, ist zudem das Verhältnis von endosomaler zu lysosomaler Degradation von entscheidender Bedeutung für eine effektive Freisetzung der DNA [40]. So ist das dem Zytosol Ausgesetztsein sicher ein weiterer limitierender Faktor in Bezug auf die non-virale Gentherapie. So zeigten Lechardeur *et al.* [60], dass nur 0,02 - 0,1% zytosolischer Plasmid-DNA (Luciferasegen) das Nukleosol erreichten und transkribiert wurden.

Die nächste entscheidende Schnittstelle zu einer effektiven Transfektion stellt der nukleäre Import dar [41, 42], auch wenn der exakte zugrunde liegende Mechanismus noch nicht in Gänze verstanden ist. Moleküle <30 kDa können passiv durch die nukleäre Pore diffundieren. Molekülen mit einem Gewicht >45 kDa bzw. DNA-Fragmenten >250 bp bleibt der Weg über die Pore versperrt, es sei denn sie besitzen ein NLS [49, 50].

Templeton *et al.* [32] belegten eine höhere Effizienz *in vivo* für die Transfektion eines Chloramphenicol / Acetyltransferase (CAT) Plasmids mit DOTAP in Kombination mit Cholesterol im Vergleich zu Kombinationen mit DOPE oder Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB). Für diesen Versuch wurden die o.g. Komplexe in die Schwanzvene von Mäusen injiziert, und der CAT-Gehalt in den Lungen der Versuchstiere wurde analysiert. Auf dem Boden der Ergebnisse folgerten die Autoren, dass die DOTAP / Cholesterol Kombination eine Doppelmembranhülle um die kon-

densierte DNA bildet und auf diese Weise eine größere Komplexstabilität gewährleistet.

Aber auch ohne eine aufwändige Extrusion der beiden Lipide DOTAP und Cholesterol scheint in Cyclodextrin solubilisiertes Cholesterol einen positiven Einfluss auf die DOTAP Transfektion zu haben. Cyclodextrin bildet, auch um hydrophobe Steroidhormone, eine hydrophile Hülle, was eine Applikation in wässrigen Transfektionmedien ermöglicht. Lawrencia *et al.* [30] untersuchten die Transfektionseffektivität von in Methyl-β-Cyclodextrin solubilisiertem Cholesterol in Kombination mit DOTAP oder Superfect oder Fugene auf die Urothelzellinie MB49 *in vitro* sowie auf *in situ* Urothelzellen nach direkter intravesiculärer Komplexinstillation in die Harnblase von Mäusen. Das Reportergen war pCMVlacZ, und an den Endpunkten wurde mittels PCR β-Galaktosidase detektiert. In den MB49 Zellen konnte der DNA-Plasmid-Komplex im Zytoplasma und im Zellkern gefunden werden. In den Versuchstieren wurde β-Galaktosidase bis zu 30 Tage *post transfectionem* in Herz, Lunge, Blase, Leber und Milz nachgewiesen. In der Interpretation der Ergebnisse wurde die gesteigerte Transfektion der cholesterolabhängig vermehrten Aufnahme der DNA in das Zytoplasma und vom diesem in den Zellkern im Sinne einer intrazellulären Aktivität zugeschrieben.

Dieses Eigenschaftenprofil scheint aber auch auf Steroidhormone zuzureffen [61-64]. Unklar ist nur, ob die spezifischen Steroidrezeptoren als Mediator fungieren, und ob Cholesterol und Steroidhormone, die aus dem selben Grundgerüstes Cyclopentanoperhydrophenantren, dem sog. Gonan, zusammensetzt sind, den nukleären Import auf gleiche oder unterschiedliche Weise steigern [61, 63]. Sollte ersteres der Fall sein, so wären gynäkologische Malignome mit hoher Steroidrezeptorexpression, wie z.B. das Mamakarzinom, ideale Zielgewebe für eine gerichtete, steroidverstärkte non-virale Gentherapie. Diesen Überlegungen zugrunde liegend ist das Modell einer steroidverstärkten liposomalen Transfektion wie in Abbildung 4 skizziert [65]. Die Schwachstelle der liposomalen Transfektion, die, wie eingangs beschrieben, den Transport des Plasmids in das Zytosol gewährleistet, ist der nukleäre Import. Hormonrezeptoren werden durch Steroide aktiviert, dimerisieren und migrieren in den Zellkern [2]. Elementarer Baustein dieses Vorganges sind die NLS der Hormonrezeptoren, welche an Importine binden, die den Rezeptor durch die nukleäre Pore in den Nukleus schleusen [3]. Bei dieser Translokation könnte die gewünschte Plasmid DNA co-transportiert werden. Durch die zusätzliche Integration von HRE in das Plasmid könnte zudem die Anbindung an die DNA-Bindedomäne (DBD) des aktivierten Hormonrezeptors verstärkt werden [4]. Analog setzten Rebuffat *et al.* [5, 6] dieses Modell für einen steroidvermittelten Gentransfer um. Die Autoren koppelten ein Glucocorticoid an die gewünschte Plasmid-

DNA und wiesen eine Transfektionssteigerung in glucocorticoidrezeptorexprimierenden Zellen nach.

Vor dem Hintergrund dieser vorangestellten Diskussion entwickelten sich drei Fragestellungen in Bezug auf den in dieser Arbeit dargestellten Zellversuch.

Erstens, ist eine Verstärkung der liposomalen Transfektion von T-47D Zellen durch unterschiedliche Steroide möglich? Ja, eine Verstärkung der DOTAP Transfektion von T-47D Zellen durch die Zugabe unterschiedlicher Steroidhormone ist möglich. So führten die Testsubstanzen Progesteron, Östrogen, Hydrocortison und Testosteron in unseren Versuchen jeweils zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Transfektionsrate. Diese Ergebnisse korrespondieren mit anderen Arbeiten, die insbesondere durch Östrogen eine Transfektionssteigerung unterschiedlicher Zelllinien erzielen konnten [61, 63]. Interessanterweise fanden wir bereits nach Zugabe einer relativ niedrigen Progesteronkonzentration (20 µM) die höchste Transfektionssteigerung im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen mit höchstwirksamsten Konzentration von 50 – 200 µM. Unsere Ergebnisse legen somit nahe, dass, obwohl sich o.g. Steroidhormone aus dem gleichen Grundgerüstes Cyclopentanoperhydrophenantren, dem sog. Gonan, zusammensetzen, ein substanzspezifischer Effekt mit einer höchstwirksamsten Konzentration in Bezug auf die DOTAP Transfektion von T-47D Zellen existiert. Vergleicht man diese Ergebnisse mit der bereits zitierten Arbeit von Lawrencia *et al.* [30], die die DOTAP-Transfektionsrate von Urothelzellen untersuchten und eine Steigerung um den Faktor 3,8 unter Zugabe von 3,5 µM Cholesterol nachwiesen, so muss, selbst unter Berücksichtigung methodischer Abweichungen von unserem Studiendesign, von einer charakteristischen Ansprechbarkeit unterschiedlicher Zellinien ausgegangen werden [66]. Die o.g. Annahmen werden auch durch eine Arbeit von Bernasconi *et al.* [64] gestützt. Die Autoren untersuchten die Transfektionsrate von 3Y1-Firboblasten mit hohem Glucocorticoidrezeptoranteil und von Zervixkarzinomzellen (HeLa) und fanden erstaunlicherweise eine deutliche Transfektionssteigerung bereits nach Zugabe von lediglich 20 nM Hydrocortison.

Zweitens, beruht die o.g. Wirkung der chemisch ähnlich aufgebauten Steroidhormone *und* Cholesterol auf die DOTAP Transfektion von T-47D Zellen auf einem identischen Mechanismus? Um dies weiter zu untersuchen, kombinierten wir Progesteron *und* Cholesterol mit der jeweils substanzspezifisch höchstwirksamsten Konzentration, die abermals bestimmt wurde. 20 µM Progesteron erbrachten eine Steigerung der Luciferaseaktivität um den Faktor 4,51 im Vergleich zur reinen DOTAP Transfektion; die Zugabe von 50 µM Cholesterol eine Steigerung um den Faktor 2,84, deren Kom-

bination eine Anhebung der Luciferaseaktivität um den Faktor 13,1. Diese Ergebnisse lassen auf einen voneinander unabhängigen Effekt von Steroidhormonen und Cholesterol auf die liposomale Transfektion von T-47D Zellen schließen, was auch für andere Zelllinien wie z.B. Mcf-7 Brustkrebszellen zuzutreffen scheint [66]. Zudem scheint dieser synergistische Effekt auch auf die Addierung von Cholesterol mit anderen Steroidhormonen (Östrogen, Hydrocortison und Testosteron) zuzutreffen [67]. Die Kombination einzelner Steroide miteinander führte hingegen in keinem Fall zu einer synergistischen Steigerung der Transfektion.

Drittens, kann der Co-Transport von Plasmid-DNA durch zusätzliche Integration eines *hormone responsive elements* (HRE) in das Plasmid und dann über eine verstärkte Anbindung an die DBD des Hormonrezeptors gesteigert werden? Nein, zwar hatte wie vorbeschrieben sowohl die Zugabe von Cholesterol als auch die von Progesteron einen steigernden Einfluss auf die DOTAP Transfektion von T-47D Zellen, wir fanden jedoch keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Transfektion mit dem Plasmid pTGFG0luc und der Verwendung des Plasmids pTGFG95luc als Träger von 5 PRE-Sequenzabschnitten. Im Progesteronansatz mit dem Plasmid pTGFG0luc fand sich zwar eine höhere Luciferaseaktivität als mit dem Plasmid pTGFG95luc, jedoch waren diese Ergebnisse nur leicht unterschiedlich. So war uns eine Verstärkung der steroidvermittelten liposomalen Transfektion, deren Wert über dem durch Cholesterol erreichten lag, und für die eine zusätzliche Aktivierung und Translokation von Hormonrezeptoren verantwortlich sein könnte, durch die Integration eines spezifischen HRE nicht möglich. Unsere Ergebnisse werden gestützt durch eine Studie von Braun *et al.* [68], die zeigten, dass eine Integration von Glucocorticoid *responsive elements* (GRE) in das Plasmid nicht für eine Transfektionssteigerung durch Zugabe von Dexamethason zu glucocorticoidrezeptorexprimierenden Zellen erforderlich war. Unwahrscheinlich ist ebenso, dass, auch wenn die theoretische Bedeutung dieses Mechanismus nicht zu leugnen ist [66], die o.g. Steroidvermittelten liposomalen Transfektionssteigerung lediglich durch Aktivierung und Translokation von Steroidrezeptoren erzielt wird, da eine Sättigung des Mechanismus sicher bereits im nanomolaren Bereich zu erwarten wäre. In unseren Versuchen waren jedoch Konzentrationen im mikromolaren Bereich notwendig, um verwertbare Daten zu erheben. So muss u.a. auch ein steroidvermittelter Effekt auf die Fluidität der Zellmembran in Betracht gezogen werden, wie er für die Wirksamkeit des Cholesterols vermutet wird [65]. Dennoch weisen ausgewählte Studien auf eine Hormonrezeptorbeteiligung hin. Wiseman *et al.* [61] zeigten in ihren Versuchen eine spezifische Wirkung des β-Estradiols gegenüber dem unwirksamen α-Estradiol. Bernasconi *et al.* [64] fanden eine Transfektionssteigerung durch an Rezeptoren bindendes Kortisol, keinen Effekt jedoch für das nicht bindungsfähige

Kortison. Jain *et al.* [63] lokalisierten in ihren Versuchen den Hauptteil der Plasmid-DNA im Zytosol wenn kein Östrogen supplementiert wurde, nach Zugabe des Steroids gelang der Nachweis auch im Nukleus. Weitere Versuche wären notwendig, auch unter Egalisierung methodischer Abweichungen, um die einzelnen Mechanismen zu differenzieren, und auch den Einfluss der von uns in jedem Falle in das Plasmid integrierten SV40 *enhancer* Region und dem CMV-Promotor weiter zu untersuchen. Die Entscheidung zur Integration dieser beiden Sequenzen fiel, da klassische NLS dem SV40 T-ag ähneln. Das SV40 T-ag NLS arbeitet synergistisch mit Serin, was zu einer 100-fachen Steigerung der Importin α/β Erkennung führen kann [69, 70]. So ist abschließend zu vermuten, dass die steroid- aber auch cholesterolvermittelte Steigerung der liposomalen Transfektion von T-47D Zellen multifaktoriell ist, und auch hier eine Sättigung eintreten kann. Denn für beide Testsubstanzen fanden wir eine optimale Konzentration, über die hinaus keine weitere Steigerung der Luciferase-aktivität nachgewiesen werden konnte.

Auf dem Boden der erfolgreichen *in vitro* Versuche war die übergeordnete Idee des anschließenden Tierversuches die Entwicklung einer *DNA-Tablette*, mit der, an einem hormonrezeptorpositiven Malignom erkrankte Frauen, gezielt, ohne die Gefahr systemischer Nebenwirkungen, durch intratumorale Giftung therapiert werden könnten. Doch auch *in vivo* gelten die Kehrseite des non-viralen Gentransfers, die niedrige Transfektionsrate bzw. die anspruchsvolle Transfektion an sich [33]. Hindernisse stellen u.a. die physiologischen und morphologischen Barrieren der Magendarmpassage [34], die Inhibierung durch Bestandteile des Serums [35], oder die Resistenz bestimmter Zelllinien gegenüber der gewünschten Transfektion dar, wobei die Lipoplexbildung diesbezüglich der limitierende Faktor zu sein scheint [36].

Unser oraler Gentransfercocktail beinhaltete 50 µl Utrogest®, 2 µl DNA pTGFG95luc mit einer Konzentration von 5 µg/µl und 10 µl hPR. Dem für den Menschen zugelassenen Utrogest®, welches neben dem körpereigenen Gelbkörperhormon identischen Hormon Progesteron - zur Hormonersatztherapie des klimakterischen Syndroms nach natürlicher oder iatrogener Menopause eingesetzt - auch raffiniertes Erdnussöl, Gelatine und Glycerol enthält, wurden zwei Funktionen zugedacht: zum einen sollte durch das enthaltene Progesteron der hPR aktiviert werden. Mit den PRE-Sequenzabschnitten auf dem Plasmid pTGFG95luc sollte eine gesteigerte progesteronbasierte Transfektion erzielt werden. Ebenfalls auf dem Vektor enthalten war eine SV40 *enhancer* Region. Laut Dean *et al.* [71] ist diese Sequenz in der Lage, an im Zytosol lokalisierte Transskriptionsfaktoren zu binden und hierdurch in den Nukleus co-transportiert zu werden. Theoretisch könnte durch diese Verbindung das zu trans-

skribierende Gen, in unserem Fall das Gen der Firefly-Luciferase, einen erleichterten nukleären Import erfahren. Durch die im Utrogest® enthaltenen Zusatzstoffe sollte darüber hinaus eine ungestörte Magendarmpassage und hohe Resorptionsrate erzielen werden. Utrogest® wird beim Menschen eine gute Verträglichkeit attestiert; als Nebenwirkungen werden genannt u.a. Schläfrig- und Mattigkeit (1/10-100), Magendarmbeschwerden (1/100-1.000) und sehr selten anaphylaktische Reaktionen und Synkopen (<1/10.000). Wenn auch keine einheitlichen, belastbaren Daten über die Magendarmpassage der Maus vorliegen, ist anzunehmen, dass die Magendarmpassage, obgleich von Geschlecht und Konstitution des Individuums, sowie Zusammensetzung der Nahrung abhängig, nach spätestens 24 h abgeschlossen ist [72]. Dennoch gelang, trotz unterschiedlicher Aufbereitungs- und Nachweismethoden, in keiner der oral transfizierten Mäuse der Nachweis des aktivierten Genes *luc*; weder auf Nukleotid- noch Proteinebene. Um herauszufinden, ob eine verlängerte Resorptionszeit Einfluss auf die Transfektionsrate haben könnte, hätte die Versuchszeit über 24 h hinaus verlängert werden müssen. Dieser Lösungsansatz verbot sich jedoch aufgrund einer akuten Verschlechterung des Allgemeinzustandes inkl. abdomineller Symptomatik nach per-oraler Applikation des Gentransfercocktails. Da die p.o. Versuche vor diesem Hintergrund zwingend abgebrochen werden mussten, kann über den Einfluss von im Serum enthaltenen Inhibitoren oder eine Transfektionsresistenz (s.o.) nur spekuliert werden.

Um die schwer beherrschbaren Variablen intestinale Verträglichkeit, Passage und Resorption auszuschließen, entschieden wir uns für einen Versuch der intra-venösen Verabreichung. Doch auch bzgl. einer intravenösen Applikation sind technische Grundvoraussetzungen zu erfüllen und Hürden auf dem Weg zu einer effektiven Transfektion zu überwinden. Interaktionen mit Blut- und Serumbestandteilen müssen berücksichtigt werden, ein hämolytischer Effekt ausgelöst durch den Transfektionscocktail muss verhindert werden [73]. Und es bedarf einer geeigneten Trägersubstanz, um nicht in der Leber abgebaut oder vom Immunsystem egalisiert zu werden [74]. Unser intra-venöser Gentransfercocktail setzte sich aus 43 µg pGL- Plasmid-DNA in der Konzentration 0,354 µg/µl, 5%iger Glucose und 4 mM DOTAP zusammen. Nach sicherer intra-venöser Injektion gelang uns in der Lunge *einer* Maus der reproduzierbare Nachweis der Plasmid-DNA. Dass diesem Ergebnis ein embolisches Geschehen zugrunde liegt, ist vor dem Hintergrund des guten klinischen Zustandes des Tieres unwahrscheinlich. Ob die DNA nur in einer Lungenhälfte nachweisbar war, was die These einer Embolie wiederum erhärten könnte, ist retrospektiv nicht mehr nachzuvollziehen. Wie auch immer, auch wenn bzgl. der intra-venösen Applikation technische Schwierigkeiten eingeräumt werden müssen, ist auffällig, dass Delgado *et al.* [73],

auch unter Verwendung eines anderen Vektors, ebenfalls der Gennachweis eines grün fluoreszierenden Proteins in der Lunge von Mäusen gelang sowie in Leber und Milz. Diese Beobachtung wiederum steht in Analogie zu den bereits diskutierten Versuchen von Lawrencia *et al.* [30]. Die Autoren untersuchten die Transfektionseffektivität von in methyl-β-cyclodextrin solubilisiertem Cholesterol in Kombination mit DOTAP oder den Transfektionsmedien Superfect oder Fugene auf *in situ* Urothelzellen nach direkter intravesiculärer Komplexinstillation in die Harnblase von Mäusen. Das Reportergen war pCMVlacZ, und an den Endpunkten wurde mittels PCR β-Galaktosidase detektiert. In den Versuchstieren wurde β-Galaktosidase bis zu 30 Tage *post transfectionem* natürlich in Blase aber auch Herz, Lunge, Leber und Milz nachgewiesen. So kann in Zusammenschau unserer und letztgenannter Ergebnisse spekuliert werden, ob die Lunge im Rahmen des intra-venösen Gentransfers das *erste* Erfolgsorgan darstellt, bzw. ob Abbauprozesse in der Leber oder das nachgeschaltete Immunsystem der Milz, wie ebenfalls von Dash *et al.* [74] formuliert, entscheidende Schnittstellen darstellen. Sind sie es nicht, oder nicht signifikant, so muss die Stabilität unseres Vektors, und die Fähigkeit systemisch zu zirkulieren und das Zielorgan zu erreichen, in Frage gestellt werden [75].

Non-virale wie auch virale Vektoren könnten z.B. von einer Beschichtung mit synthetischen, hydrophilen Polymeren [75] oder von einer Zusammensetzung im Sinne eines funktionellen, biodegradierbaren Vektors mit guter Puffer- und DNA-Bindungskapazität [76] profitieren. Auch natürliche Polymere wie lipidbasierte Trägersubstanzen sind Gegenstand der Wissenschaft. Das theoretische Grundprinzip dieser *biologischen* Vektoren umfasst eine chemische Modifikation bzw. ein *vector engineering* mit dem Ziel eines biologischen Designs, z.B. mit DNA bindenden Proteinen, sowie einer spezifischen Freisetzungskinetik zwecks Optimierung der Genzustellung, zellulärem *uptake* und Transfektionseffizienz [77]. Abgesehen hiervon muss, dies gilt aber natürlich auch für andere Applikationswege, das Design des Vektors auf das Zielgewebe mit seinen inherenten Eigenschaften und Barrieren, abgestimmt sein. Um z.B. die Bluthirnschranke zu überwinden finden u.a. sog. *trojan horse* Liposome Einsatz, die einen peptidähnlichen monoklonalen Antikörper enthalten, der an endogene Rezeptoren der Bluthirnschranke bindet, was wiederum Transzytose durch die Bluthirnschranke, Endozytose in die Gehirnzellen und nukleären Import vermittelt [78]. Die Vektor- und Polymerforschung ist jedoch ein weites, unausgeschöpftes Feld, es geht weit über den Focus der vorliegenden Arbeit hinaus und soll daher nicht Gegenstand weiterer Diskussion sein.

Schlussfolgernd ist - obgleich auf dem Boden offener Fragen und noch unüberwindbarer methodischer Schwierigkeiten - grundsätzlich zu konstatieren, dass die Idee eines effektiven non-viralen Gentransfers einer geeigneten Trägersubstanz bedarf. Der Trend geht hin zum Einsatz biodegradierbarer Nanopartikel unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheit mit charakteristischen Eigenschaften bzgl. Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit, Toxizität und Komplexstabilität, optimierter Freisetzungskinetik nicht nur von Genen sondern auch von medikamentösen Wirk- oder Impfstoffen, und organ- bzw. zellspezifischem *targeting* [79, 80].

Doch trotz oder gerade aufgrund der wissenschaftlichen Fortschritte bleibt die orale, non-virale Transfektion die attraktivste und anspruchsvollste Applikationsart zugleich [33].

7 Zusammenfassung

Wenn sich auf dem Gebiet der Krebsprävention keine ähnlich durchschlagenden Erfolge einstellen wie bei Herzkreislauferkrankungen, wird Krebs bald die führende Todesursache in Deutschland sein. Die höchste Mortalität und Inzidenz von Malignomen bei Frauen weist das Mammakarzinom auf. Die Entwicklung einer sicheren, nebenwirkungsarmen und effektiven Therapie zur gezielten Behandlung des Mammakarzinoms wäre somit von unschätzbarem gesundheitsökonomischem aber auch individuell prognostischem Wert. Ein hoffnungsvoller Ansatz ist die somatische non-virale Gentherapie, wobei die Transfektionseffizienz durch extra- und intrazelluläre Barrieren limitiert wird. Die liposomale Transfektion erleichtert die Überwindung der Zellmembran; die größte Hürde auf dem Weg zu einer effizienten Transfektion ist jedoch der nukleäre Import von Plasmid-DNA, die zu groß ist und kein nukleäres Lokalisationssignal besitzt. Den nukleären Import gilt es zu optimieren.

Unser Konzept einer steroidverstärkten liposomalen Transfektion von T-47D Brustkrebszellen *in vitro* basierten auf der Vorstellung, dass durch Steroide aktivierte Hormonrezeptoren Plasmid-DNA durch die nukleäre Pore in den Nukleus co-transportieren können, und dass in das Plasmid integrierte *hormone responsive elements* zu einer verstärkten Bindung an die *DNA binding domain* des Hormonrezeptors und somit zu einer höheren Transfektionsrate führen. Anhand der Transfektion von luciferasekodierenden Plasmiden konnten wir für unterschiedliche Steroidhormone und Cholesterol einen substanzspezifischen und konzentrationsabhängigen Effekt auf die liposomale Transfektion von T-47D Zellen im Luciferaseassay nachweisen. Die Integration von *hormone responsive elements* in das zu transfizierende Plasmid führte hingegen zu keiner weiteren Steigerung der Transfektionsrate. Und obgleich Steroide und Cholesterol auf demselben chemischen Grundgerüst aufbauen, was einen identischen Wirkmechanismus nahe legen würde, fanden wir keinen additiven sondern synergistischen Effekt in der Kombination von Progesteron *und* Cholesterol.

Wären unsere Ergebnisse auch auf *in vivo* übertragbar, wären gynäkologische Malignome mit hoher Steroidrezeptorexpression wie z.B. das Mamakarzinom ideale Zielgewebe für eine gerichtete, steroidverstärkte non-virale Gentherapie. So war das übergeordnete Ziel die Entwicklung einer DNA-Tablette, mit der, an einem hormonrezeptorpositiven Malignom erkrankte Frauen, gezielt, nebenwirkumsarm, durch intratumorale Giftung therapiert werden könnten. Das in dieser Arbeit untersuchte Tiermodell mit per-oraler und intra-venöser Applikation eines Gentransfercocktails ist jedoch nicht höher zu bewerten als ein *proof of principle* Versuch.

8 Literaturverzeichnis

1. http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html (Tag des Zugriffs: 12.11.2012).

2. Lim CS, Baumann CT, Htun H, Xian W, Irie M, Smith CL et al. Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. Molecular endocrinology (Baltimore, Md 1999;13:366-375.

3. Li H, Fidler ML, Lim CS. Effect of initial subcellular localization of progesterone receptor on import kinetics and transcriptional activity. Molecular pharmaceutics 2005;2:509-518.

4. Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. Experimental cell research 1999;253:713-722.

5. Rebuffat AG, Nawrocki AR, Nielsen PE, Bernasconi AG, Bernal-Mendez E, Frey BM et al. Gene delivery by a steroid-peptide nucleic acid conjugate. Faseb J 2002;16:1426-1428.

6. Rebuffat A, Bernasconi A, Ceppi M, Wehrli H, Verca SB, Ibrahim M et al. Selective enhancement of gene transfer by steroid-mediated gene delivery. Nature biotechnology 2001;19:1155-1161.

7. Sons W. Gene therapy clinical trials. The journal of gene medicine 2002.

8. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (Tag des Zugriffs: 12.11.2012).

9. Loeffler G, Petrides P. Biochemie und Pathobiochemie. 1998.

10. Boyle P, Veronesi U, Tubiana M, Alexander FE, da Silva F, Denis LJ et al. European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the "Europe Against Cancer Programme" European Code Against Cancer. Eur J Cancer 1995;31A:1395-1405.

11. Boyle P, Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 1995;12:167-181.

12. Boyle P. Tobacco and cancer, the European perspective. Ann Oncol 1995;6:435-437.

13. Boyle D. The Marlboro man is still marching. European heart journal 1995;16:295-296.

14. Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF. Family history of cancer. Annals of the New York Academy of Sciences 1995;768:12-29.

15. GEKID Ru. Krebs in Deutschland 2007/2008 2012;64-67.

16. Friedrich M, Felberbaum R, Tauchert S, Diedrich K. Manual Gynaekologische Onkologie. Berlin: Springer, 2005.

17. Kaufmann M. A review of endocrine options for the treatment of advanced breast cancer. Oncology 1997;54 Suppl 2:2-5.
18. Narod SA. Ten types of breast cancer? Lancet 380:1212-1213.
19. Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. International journal of women's health 4:511-520.
20. Lavasani MA, Moinfar F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review. Journal of biophotonics 5:345-366.
21. Gerber B, Freund M, Reimer T. Recurrent breast cancer: treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life. Deutsches Arzteblatt international 107:85-91.
22. Hallek M, Buening H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendtner CM. Basis of gene therapy: principles and state of development. Internist 2001;42:1306-1308, 1311-1303.
23. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
24. Baltimore D. Our genome unveiled. Nature 2001;409:814-816.
25. Kuball J, Huber C, Schuler M. Gene therapy of solid tumors. Internist 2001;42:1321-1327.
26. Koster F, Finas D, Hauser C, Diedrich K, Felberbaum R. Gentherapie gynaekologischer Malignome. Gynaekologe 2004;37:230-236.
27. Ma H, Diamond SL. Nonviral gene therapy and its delivery systems. Current pharmaceutical biotechnology 2001;2:1-17.
28. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. J Control Release 2002;78:259-266.
29. Singh M, Briones M, Ott G, O'Hagan D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000;97:811-816.
30. Lawrencia C, Mahendran R, Esuvaranathan K. Transfection of urothelial cells using methyl-beta-cyclodextrin solubilized cholesterol and Dotap. Gene therapy 2001;8:760-768.
31. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. Gene therapy 2000;7:31-34.
32. Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. Nature biotechnology 1997;15:647-652.

33. Loo Y, Grigsby CL, Yamanaka YJ, Chellappan MK, Jiang X, Mao HQ et al. Comparative study of nanoparticle-mediated transfection in different GI epithelium co-culture models. J Control Release 160:48-56.
34. Martien R, Loretz B, Schnurch AB. Oral gene delivery: design of polymeric carrier systems shielding toward intestinal enzymatic attack. Biopolymers 2006;83:327-336.
35. Young M, Overlid N, Konopka K, Duzgunes N. Gene therapy for oral cancer: efficient delivery of a 'suicide gene' to murine oral cancer cells in physiological milieu. Journal of the California Dental Association 2005;33:967-971.
36. Lavorini-Doyle C, Gebremedhin S, Konopka K, Duzgunes N. Gene delivery to oral cancer cells by nonviral vectors: why some cells are resistant to transfection. Journal of the California Dental Association 2009;37:855-858.
37. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature 2003;422:37-44.
38. Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P et al. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. Gene therapy 1996;3:1010-1017.
39. Friend DS, Ghildyal N, Austen KF, Gurish MF, Matsumoto R, Stevens RL. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with Trichinella spiralis exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. The Journal of cell biology 1996;135:279-290.
40. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. Pharmacological reviews 2006;58:32-45.
41. Dowty ME, Williams P, Zhang G, Hagstrom JE, Wolff JA. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995;92:4572-4576.
42. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 1980;22:479-488.
43. Feldherr CM, Akin D. Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. Experimental cell research 1993;205:179-186.
44. van der Aa MA, Mastrobattista E, Oosting RS, Hennink WE, Koning GA, Crommelin DJ. The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery. Pharmaceutical research 2006;23:447-459.
45. Vaughan EE, DeGiulio JV, Dean DA. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. Current gene therapy 2006;6:671-681.

46. http://www.uni-heidelberg.de/uni/presse/RuCa1_98/hurt.htm (Tag des Zugriffs: 13.11.2012.
47. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. Nature 2007;450:695-701.
48. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D et al. Determining the architectures of macromolecular assemblies. Nature 2007;450:683-694.
49. Rout MP, Aitchison JD. The nuclear pore complex as a transport machine. The Journal of biological chemistry 2001;276:16593-16596.
50. Poon IK, Jans DA. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? Traffic (Copenhagen, Denmark) 2005;6:173-186.
51. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. Trends in cell biology 2004;14:505-514.
52. Bayliss R, Corbett AH, Stewart M. The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. Traffic (Copenhagen, Denmark) 2000;1:448-456.
53. Ribbeck K, Gorlich D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. The EMBO journal 2001;20:1320-1330.
54. Kutay U, Izaurralde E, Bischoff FR, Mattaj IW, Gorlich D. Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. The EMBO journal 1997;16:1153-1163.
55. Azuma Y, Dasso M. The role of Ran in nuclear function. Current opinion in cell biology 2000;12:302-307.
56. Jensen EV. Steroid hormones, receptors, and antagonists. Annals of the New York Academy of Sciences 1996;784:1-17.
57. Baumann CT, Lim CS, Hager GL. Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. Cell biochemistry and biophysics 1999;31:119-127.
58. Meyer ME, Quirin-Stricker C, Lerouge T, Bocquel MT, Gronemeyer H. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. The Journal of biological chemistry 1992;267:10882-10887.
59. Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. Eur J Pharm Biopharm 2004;57:1-8.
60. Lechardeur D, Lukacs GL. Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. Human gene therapy 2006;17:882-889.

61. Wiseman JW, Goddard CA, Colledge WH. Steroid hormone enhancement of gene delivery to a human airway epithelial cell line in vitro and mouse airways in vivo. Gene therapy 2001;8:1562-1571.
62. Koster F, Felberbaum R, Finas D, Wunsch K, Schulz C, Diedrich K et al. Progesterone and estradiol enhance lipid mediated transfection of Sk-Br-3 mammalian cancer cells. International journal of molecular medicine 2002;9:617-620.
63. Jain PT, Seth P, Gewirtz DA. Estradiol enhances liposome-mediated uptake, preferential nuclear accumulation and functional expression of exogenous genes in MDA-MB231 breast tumor cells. Biochimica et biophysica acta 1999;1451:224-232.
64. Bernasconi AG, Rebuffat AG, Lovati E, Frey BM, Frey FJ, Galli I. Cortisol increases transfection efficiency of cells. FEBS letters 1997;419:103-106.
65. Koster F, Finas D, Saupp A, Schulz C, Diedrich K, Hauser C et al. Enhanced liposomal transfection through the application of sex steroids in gynecological cancer cells. Zentralblatt fur Gynakologie 2003;125:1-5.
66. Koster F, Schroder A, Finas D, Hauser C, Diedrich K, Felberbaum R. Cell-specific enhancement of liposomal transfection by steroids in steroid receptor expressing cells. International journal of molecular medicine 2006;18:1201-1205.
67. Koster F, Finas D, Schulz C, Hauser C, Diedrich K, Felberbaum R. Additive effect of steroids and cholesterol on the liposomal transfection of the breast cancer cell line T-47D. International journal of molecular medicine 2004;14:769-772.
68. Braun S, Jenny C, Thioudellet C, Perraud F, Claudepierre MC, Langle-Rouault F et al. In vitro and in vivo effects of glucocorticoids on gene transfer to skeletal muscle. FEBS letters 1999;454:277-282.
69. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell 1984;39:499-509.
70. Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. Nature 1984;311:33-38.
71. Dean DA, Strong DD, Zimmer WE. Nuclear entry of nonviral vectors. Gene therapy 2005;12:881-890.
72. Dawson NJ. Rate of passage of a non-absorbable marker through the gastrointestinal tract of the mouse (Mus musculus). Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1972;41:877-881.
73. Delgado D, Gascon AR, Del Pozo-Rodriguez A, Echevarria E, Ruiz de Garibay AP, Rodriguez JM et al. Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: in vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. International journal of pharmaceutics 425:35-43.

74. Dash R, Azab B, Shen XN, Sokhi UK, Sarkar S, Su ZZ et al. Developing an effective gene therapy for prostate cancer: New technologies with potential to translate from the laboratory into the clinic. Discovery medicine 11:46-56.
75. Laga R, Carlisle R, Tangney M, Ulbrich K, Seymour LW. Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics. J Control Release.
76. Huang FW, Wang HY, Li C, Wang HF, Sun YX, Feng J et al. PEGylated PEI-based biodegradable polymers as non-viral gene vectors. Acta biomaterialia 6:4285-4295.
77. Lamanna CM, Lusic H, Camplo M, McIntosh TJ, Barthelemy P, Grinstaff MW. Charge-Reversal Lipids, Peptide-Based Lipids, and Nucleoside-Based Lipids for Gene Delivery. Accounts of chemical research.
78. Boado RJ, Pardridge WM. The Trojan Horse Liposome Technology for Nonviral Gene Transfer across the Blood-Brain Barrier. Journal of drug delivery 2011:296151.
79. Petkar KC, Chavhan SS, Agatonovik-Kustrin S, Sawant KK. Nanostructured materials in drug and gene delivery: a review of the state of the art. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems 28:101-164.
80. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. Journal of nanobiotechnology 9:55.

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. em. Dr. med. Diedrich für die Möglichkeit bedanken, vorliegende Arbeit in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck anzufertigen.

Besonders dankbar für Geduld, Unterstützung, Betreuung, Ausbildung und Anleitung bin ich Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Köster.

Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. med. Felberbaum und Priv.-Doz. Dr. med. Finas für das Überlassen des Themas sowie für Ihre Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls C. Schulz und B. Nehls für ihre jederzeit fundierte und darüber hinaus freundschaftliche Anleitung und Hilfe.

10 Anhang

10.1 Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Zuordnung 24
Verw.-Zweck 62
Krank-Art 13
Rechtsvorschr.

Durchschrift

Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten • Postfach 5009 • 24062 Kiel

Ministerium für Umwelt,
Natur und Forsten
des Landes Schleswig-Holstein

Herrn
Dominique Finas
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Lübeck
Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Verp.-Nr. 10 | r | 01

77 M | 30.6.02
– | 30.6.03
– | 30.06.04
– | 30.06.05

Ihr Zeichen / vom	Mein Zeichen / vom	Telefon (0431)	Datum
Antrag vom 15.04.2001	V 252-72241.122-10 (22-2/01)	988-7128 Herr Buttchereit	. Juni 2001

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Finas,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Entwicklung einer gentherapeutisch anwendbaren non-viralen Transfektionstechnik auf der Basis des Progesteronrezeptors unter Ausnutzung seiner Hormon- und DNA-Bindungseigenschaften

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 77 Mäuse verwendet werden.

2. Die Genehmigung ist bis zum 30. Juni 2002 befristet.
   Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

Mercatorstraße 3
24106 Kiel
Telefon 0431 988-0
Telefax 0431 988-7239

Buslinien ab Hauptbahnhof:
11, 500,501,502, 900, 901
-Haltestelle Elendsredder-,
33, 61, 62
-Haltestelle Mercatorstraße-

10.2 Publikationen

Koster F, Finas D, Saupp A, Schulz C, Diedrich K, Hauser C et al. Enhanced liposomal transfection through the application of sex steroids in gynecological cancer cells. Zentralblatt für Gynäkologie 2003;125:1-5