

Aus der Klinik für Strahlentherapie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Dunst

**Kationische Microbubbles steigern den Ultraschall-
vermittelten in-vivo-Gentransfer in Angiosarkom-
Tumore und in die Skelettmuskulatur**

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

vorgelegt von
Cédric Michael Panje
aus Hamburg

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Dunst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler
3. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Cordula Petersen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.05.2014

Promotionskommission der Sektion Medizin

Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart,

lässt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.

Alexander von Humboldt (1769-1859)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gentherapie in der Onkologie.....	1
1.2	Ultraschall-vermittelter Gentransfer	4
1.3	Reporter-gen-Bildgebung und Biolumineszenz.....	9
1.4	Hypothesen und Fragestellung.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Reporter-gen-Plasmide	11
2.2	Microbubbles.....	12
2.3	Zell-Linie für in-vitro-Experimente und Tumorimplantation.....	14
2.4	Versuchstiere	14
2.5	Charakterisierung der Microbubbles nach Größenverteilung und Ladung	14
2.6	Nachweis der nicht-kovalenten DNA-Bindung auf Microbubble-Oberflächen.....	15
2.7	Quantifikation der durch Microbubbles gebundenen DNA-Menge	15
2.8	Nachweis des Schutzes vor Degradation durch DNA-Bindung.....	17
2.9	Ultraschall-vermittelter in-vitro-Gentransfer in Zellkulturen	18
2.10	Ultraschall-vermittelter in-vivo-Gentransfer mit Microbubbles	21
3	Ergebnisse	25
3.1	In-vitro-Charakterisierung der kationischen und neutralen Microbubbles.....	25
3.2	In-vitro-Gentransfer in murine Endothelzellkulturen	27
3.3	In-vivo-Gentransfer in murine Angiosarkom-Tumore	29
3.3	Ex-vivo-Analyse des Gentransfers in murine Angiosarkom-Tumore	31
3.4	Dosis-Optimierungsstudie zum in-vivo-Gentransfer in die Skelettmuskulatur	32
4	Diskussion	36
4.1	In-vitro-Charakterisierung der kationischen und neutralen Microbubbles.....	37
4.2	In-vitro- und in-vivo-Gentransfer in murine SVR-Angiosarkom-Zellen.....	38
4.3	Systematischer Vergleich des Ultraschall-vermittelten Gentransfers.	40
4.4	Limitationen.....	44
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	53
8	Danksagungen	54

1 Einleitung

1.1 Gentherapie in der Onkologie

Krebserkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Nationen dar (4, 5). Für 2013 wird Schätzungen zufolge in den Ländern der Europäischen Union von 1,3 Millionen und in den USA von 577,000 krebbedingten Todesfällen ausgegangen (6, 7). In den letzten Jahrzehnten wurde ein deutlicher Fortschritt in der Früherkennung von Krebserkrankungen erreicht (8), wozu insbesondere die Etablierung von Screening-Programmen für verschiedene Krebsarten wie das Mamma-Karzinom, das Kolon-Karzinom oder das Zervix-Karzinom zählen (9-11). In Verbindung mit verbesserten Therapieoptionen zeigen sich somit über die letzten Jahre erhöhte Überlebensraten für onkologische Patienten, besonders in der Behandlung von frühen Krebsstadien (12, 13). Im Gegensatz hierzu sind allerdings die Überlebensraten für fortgeschrittene Krebserkrankungen insgesamt nur in geringer Weise angestiegen, sodass in der Onkologie weiterhin der Bedarf an neuen therapeutischen Optionen besteht (14).

Vor diesem Hintergrund wird die Gentherapie in der Onkologie nun schon seit drei Jahrzehnten als neuartiger therapeutischer Ansatz diskutiert, der eine Ergänzung zu den drei klassischen Säulen der Krebstherapie – der Strahlentherapie, Chirurgie und medikamentösen Tumortherapie – darstellen könnte (15). Mit über 1100 klinischen Studien (Stand: 2013) stellt die Behandlung von Krebserkrankungen bereits jetzt den größten Forschungsbereich innerhalb der Gentherapie dar (16), wobei zusätzlich zahlreiche neue therapeutische Gene gegen Krebserkrankungen in präklinischen Studien erprobt werden (17).

Gentherapie: Wirkprinzipien und Strategien.

Das Wirkprinzip der Gentherapie kann wie folgt beschrieben werden: Fremdes genetisches Material wird im Rahmen einer Transfektion in Körper- bzw. Tumorzellen eingebracht, um dort genetische Defekte zu kompensieren und somit die Zellfunktion zu normalisieren, wodurch maligne Erkrankungen potentiell geheilt werden können (18, 19). Wegweisend für die Gentherapie hat sich dabei der Umstand herausgestellt, dass die Forschung in den letzten Jahrzehnten einen erheblichen Informationsgewinn über die spezifischen molekularen und genetischen Ursachen von Krebserkrankungen erbracht hat (20). Diese Erkenntnisse, die bereits für die Entwicklung gezielter Antikörper-basierter Therapien maßgeblich gewesen sind (21), stellen auch die Grundlage mehrerer gentherapeutischer Ansätze dar.

Verschiedene Strategien sind in der Gentherapie in präklinischen Studien entwickelt worden, die speziell auf die genetischen Mechanismen der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen zielen (22, 23):

Bei der „Selbstmord-Gen“-Therapie (24, 25) und der onkolytischen Therapie (26) wird der fehlenden Proliferationshemmung und Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren der Krebszellen entgegengesteuert, indem Gene in die malignen Zellen eingeführt werden, die über apoptotische und nicht-apoptotische Mechanismen zur verstärkten Zelllyse führen (27, 28). Die antiangiogenetische Gentherapie zielt indes darauf, Gene in Tumore einzubringen, die proangiogenetische Signalwege gezielt inhibieren und somit diese essentielle Wachstumskomponente solider Tumore hemmen (29). Bei immunmodulatorischen Ansätzen der Gentherapie wird außerdem die lokale Immunantwort im Tumor durch den Transfer von Genen für proinflammatorische Zytokine verstärkt (30) oder rekombinante DNA-Vakzine gegen tumorassoziierte Antigene erstellt, um eine systemische Immunreaktion gegen die Krebserkrankung zu fördern (31, 32). Schließlich wurden Strategien entwickelt, um die Regulation des Zellzyklus in Tumorzellen zu normalisieren, indem Tumorsuppressor-Gene wie *p53* in Krebszellen von außen eingeführt wurden (33, 34) oder Onkogene wie *c-myc* durch die Administration kurzer inhibitorischer Gensegmente gezielt an der Expression gehindert wurden (35).

Vektorsysteme: Die größte Herausforderung der Gentherapie.

Obwohl in Zellkulturen eine deutliche Wirkung diverser therapeutischer Gene auf Krebszellen nachgewiesen wurde, bleibt die Entwicklung eines effektiven und sicheren Vektorsystems zum Gentransfer in lebende Organismen noch immer die größte Herausforderung für die klinische Umsetzung der Gentherapie (22).

Eine Vielzahl von Vektorsystemen befindet sich momentan in der präklinischen und klinischen Erforschung, die sich generell in virale und nicht-virale Vektoren einteilen lässt (36, 37).

Aufgrund der natürlichen Eigenschaft von Viren, genetisches Material effizient in Wirtszellen einzubringen, bevorzugt die Mehrzahl der Gentherapie-Studien virale Vektoren zum Gentransfer (38). Hierbei werden zumeist Vektoren verwendet, die auf Adenoviren oder Retroviren basieren, seltener auf Adeno-assoziierte Viren, Herpes simplex-Viren und das Pockenvirus (17, 22). Die Hauptunterschiede der einzelnen viralen Vektorsysteme liegen hierbei vor allem in Ihren Fähigkeiten zur Langzeit-Integration fremder Gene in das Genom der Zielzelle, der Transfektion nicht mehr teilungsfähiger Zellen, Ihrem Tropismus zu bestimmten Zellarten, sowie dem Ausmaß der Immunogenität (15, 22).

Obwohl virale Vektoren in präklinischen Studien einen höchst effektiven Gentransfer aufweisen konnten, gibt es bezüglich Ihrer Verwendung beim Menschen noch immer

bedeutende Sicherheitsbedenken (39): Viele virale Vektorsysteme besitzen, wie klinische Studien nachgewiesen haben, als Abkömmlinge pathogener Erreger noch immer das Potential, Vektor-induzierte Zytotoxizität hervorzurufen (40). Zusätzlich wurden schwere Fälle von systemischen Immunreaktionen nach viraler Gentherapie beschrieben, die in einem Fall sogar zum Tod des behandelten Patienten geführt hatten (41, 42). Ein weiteres Risiko stellt die Gefahr da, dass virale Vektoren durch die Integration der fremden DNA in das Genom der Zielzelle mutagen wirken und somit selbst maligne Erkrankungen hervorrufen können (39, 43).

Letztlich konnten virale Vektoren in ersten klinischen Studien jedoch auch hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirkung die hohen Erwartungen nicht erfüllen, die in sie gelegt worden waren (36): Obwohl in China bereits zwei kommerziell erhältliche virale Vektorsysteme für die Behandlung von Krebserkrankungen zugelassen sind, haben klinische Phase I-III-Studien aus den USA und Europa bisher keinen substantiellen Einfluss auf den Krankheitsverlauf durch virale Gentherapie in der Onkologie zeigen können (44, 45).

Vor dem Hintergrund dieser Einschränkungen der viralen Gentherapie wurden diverse nicht-virale Vektorsysteme entwickelt, die sich allgemein in chemische und physikalische Methoden einteilen lassen (46).

Chemische Verfahren verwenden zum Gentransfer kationische Substanzen, die Nukleinsäuren durch deren anionische Phosphat-Reste elektrostatisch binden können und durch die Bildung neutraler Komplexe die zelluläre Aufnahme von genetischem Material erheblich verstärken (47). Zu den verwendeten Substanzen zählen synthetische oder natürlich gewonnene kationische Lipide (48), kationische Polymere wie Polyethylenimin (49) oder Chitosan (50) sowie kationische Peptide wie Polylysin (51).

Physikalische Methoden zielen indes direkt darauf ab, eine transiente Perforation der Zellmembran zu bewirken, um über die neu geschaffenen Membranporen die Aufnahme von fremden Genen in die Zielzellen zu erleichtern (46). Verfahren wie die Jet-Injektion (52), der hydrodynamische Gentransfer (53) oder ballistische Verfahren wie die Bombardierung mit Schwermetall-Partikeln (54) funktionieren dabei im Wesentlichen über den Aufbau eines Druckgradienten über die Zellmembran. Im Gegensatz hierzu wird bei der Elektroporation die Bildung von Membranporen zur Beschleunigung des Gentransfers über die Applikation elektrischer Pulse ermöglicht (55).

Trotz deutlicher Fortschritte in der nicht-viralen Gentherapie weisen die meisten Vektorsysteme noch immer einen ungenügenden Gentransfer auf (47, 56), der deutlich unter der Leistung viraler Vektoren liegt (57). Weitere Limitationen nicht-viraler Vektorsysteme sind die überwiegend invasive Natur der physikalischen Verfahren sowie toxische und immunologische Reaktionen auf chemische Vektoren (46).

Vor diesem Hintergrund erscheint es offensichtlich, dass die größte Herausforderung für die klinische Umsetzung der Gentherapie nach wie vor die Entwicklung eines sicheren, effektiven und nicht-invasiven Vektorsystems darstellt (36, 37).

1.2 Ultraschall-vermittelter Gentransfer

Ultraschall ist als einfach verfügbares, sicheres und kostengünstiges Bildgebungsverfahren ein fester Bestandteil der klinischen Routinediagnostik (58). Neben der diagnostischen Verwendung ist in den letzten Jahren zunehmend das therapeutische Potential des Ultraschalls ins Interesse der Forschung gerückt (59, 60). Im Gegensatz zum diagnostischen Ultraschall, bei dem Frequenzen zwischen 1 und 20 MHz sowie geringe Intensitäten für die Bildgebung verwendet werden (61, 62), werden für therapeutische Verfahren zumeist niedrigere Frequenzen von 20 kHz bis 2.5 MHz (46, 60) bei höheren Ultraschall-Intensitäten (0.5 bis 3 W/cm²) angewandt (63-65). Zahlreiche Ultraschall-basierte therapeutische Verfahren sind entwickelt worden, die für verschiedene Zwecke wie z.B. zur Thrombolyse, zur lokalen Unterstützung medikamentöser Therapien oder zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke optimiert worden sind (66-68). Auch in der Gentherapie wird Ultraschall als vielversprechendes Verfahren erprobt, welches das Potential vorweisen könnte, die Beschränkungen anderer Vektorsysteme zu überwinden (69-72).

Sonoporation: Ultraschall-gestützte Zellmembranperforation.

Niedrigfrequenter Ultraschall besitzt die Eigenschaft, über die Bildung transienter Membranporen die Aufnahme von Makromolekülen – wie z.B. DNA oder pharmakologische Substanzen – in Zellen zu vereinfachen (73-75). Dieser Mechanismus, der Sonoporation genannt wird, ist in seiner Wirkweise im Einzelnen noch nicht vollständig verstanden. Jedoch gilt es in der Literatur als gesichert, dass dieser Vorgang überwiegend durch akustische Kavitation vermittelt wird (76-78), womit die durch periodische Druckwellen hervorgerufene Bildung und Implosion von Gaseinschlüssen in einer Flüssigkeit und der konsekutive Energietransfer in das Gewebe beschrieben wird (79). Kleine Gasbläschen, die in einer Flüssigkeit entweder bereits in geringem Umfang existieren oder durch Druckwellen neu entstehen, zeigen unter Ultraschall-Exposition eine periodische und regelmäßige Volumenschwankung, was als nicht-inerte oder stabile Kavitation bezeichnet wird (80, 81). Diese stabile Kavitation zeigt nur geringe Bioeffekte auf Gewebe, allerdings kann durch höhere Ultraschallenergien eine inerte Kavitation hervorgerufen werden, wobei es zu instabilen Oszillationen der Gasbläschen und schließlich zu deren Kollabieren kommt (76). Hierdurch wird die akustische Energie des Ultraschalls auf ein sehr geringes Volumen konzentriert (82) und es entstehen sekundäre Bioeffekte, die zur Sonoporation und somit zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität führen. Hierzu zählen Hochgeschwindigkeits-

Mikrojets (83), Schockwellen (84, 85) und weitere Strömungsveränderungen (z.B. „Microstreaming“) (66) sowie die intrazelluläre Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoff-Spezies (86-88) (s. **Abbildung 1**).

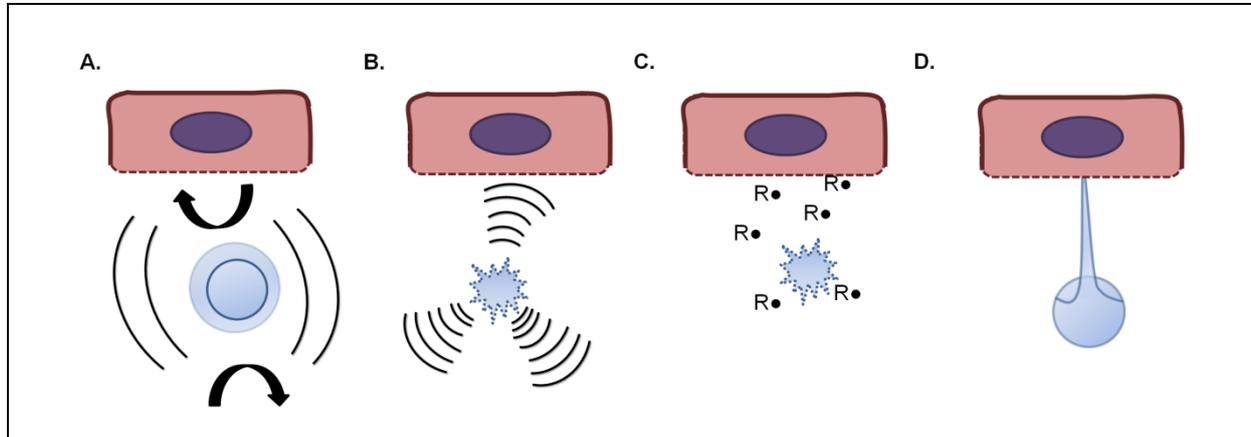


Abbildung 1. Potentielle Mechanismen der Sonoporation. Verschiedene Mechanismen sind beschrieben worden, die der Ultraschall-induzierten Zellmembranperforation zugrunde liegen. Hierzu zählen die Induktion von Mikroströmungen (Microstreams) durch oszillierende Gasbläschen (A), die Emission von Schockwellen (B) und die Bildung freier Radikale (C) durch kollabierende Gasbläschen. Außerdem kann das asymmetrische Kollabieren von Gasbläschen an Zelloberflächen zu Mikrojets führen, die die Zellmembran perforieren (D). Modifiziert nach Panje et al. (1).

Der Vorgang der Sonoporation kann dabei durch die Anwesenheit von künstlichen Gasbläschen – wie etwa Microbubble-basierte Ultraschallkontrastmittel – um mehrere Potenzen verstärkt werden (59, 89). Microbubbles dienen dabei als Kavitationskerne, die die Energieschwelle für das Auftreten von inerter Kavitation senken und somit die Sonoporation von Zellen begünstigen (76). Hierbei ist es für die erfolgreiche Sonoporation von entscheidender Bedeutung, dass sich die kollabierenden Microbubbles nur wenige Mikrometer von den Zielzellen entfernt befinden (90).

Abgesehen von der Sonoporation werden in der Forschung aktuell noch weitere Ultraschall-vermittelte Mechanismen diskutiert, von denen angenommen wird, dass sie den Gentransfer in die Zielzellen fördern: Hierzu zählen die Induktion der Genaufnahme durch Endozytose (91, 92), die Erhöhung der Endothelpermeabilität durch Erzeugung umschriebener Rupturen der Kapillargefäße (93, 94) sowie die Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen (95, 96). Mehrere Studien beschreiben als Folge dessen eine Extravasation systemisch verabreichter Genvektoren über die Endothelbarriere ins Interstitium sowie die Transfektion perivaskulärer Zellen (3, 69, 97-99). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit Microbubbles auch den intrazellulären Gentransport in den Zellkern begünstigt (63). Abhängig von der Art des verwendeten genetischen Materials und anderen Faktoren wie z.B. der Wahl des Promotors kann nach Ultraschall-vermitteltem in-vivo-

Gentransfer eine Genexpression bis zu mehrere Monate lang in den Zielzellen nachgewiesen werden (100).

Microbubbles: Kontrastmittel und Mediatoren der Sonoporation.

Microbubbles werden als Ultraschallkontrastmittel z.B. in der Echokardiographie (101, 102) sowie in der nicht-invasiven Abklärung fokaler Leber- und Nierenläsionen (103, 104) bereits routinemäßig in der Klinik verwendet. Sie besitzen einen mittleren Durchmesser von 1 bis 8 μm und bestehen aus einem Gaskern (meist Perfluorverbindungen), der durch eine Hülle aus Lipiden oder Proteinen stabilisiert wird (105). Microbubbles stellen ein intravasculäres Kontrastmittel dar, das nach intravenöser Injektion ein ähnliches Fließverhalten in der Mikrozirkulation wie Erythrozyten aufweist und sich somit auch zur Quantifikation des kapillären Blutflusses eignet (58, 106). Studien zur in-vivo-Biodistribution haben nachgewiesen, dass Microbubbles innerhalb weniger Minuten aus dem vaskulären Kompartiment eliminiert und hauptsächlich durch das retikuloendotheliale System in der Leber und in der Milz abgebaut werden (107-109). Die Halbwertszeit der Microbubbles kann durch eine Umhüllung der Oberfläche mit Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG) deutlich verlängert werden, da hierdurch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit Serumproteinen, die Aggregation von Microbubbles und die Aufnahme durch retikuloendotheliale Zellen verringert werden (110).

Mehrere Microbubble-basierte Kontrastmittel sind mittlerweile kommerziell erhältlich und weltweit in über 60 Ländern zugelassen, darunter auch von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) und der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) (111, 112).

Ablauf des Gentransfers mittels Ultraschall.

Für den Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer mit Microbubbles werden folgende Schritte durchlaufen (s. **Abbildung 2**): Zunächst werden Microbubbles und das genetische Material entweder systemisch oder direkt in das Zielorgan, z.B. in einen Tumor, injiziert (98, 113). Hierauf erfolgt die lokale Ultraschall-Exposition an einer bestimmten Körperregion, wodurch auch bei systemischer Injektion der Gentransfer auf die Zielregion beschränkt bleibt (97). Die Microbubbles werden im Ultraschallfeld zerstört und verstärken dabei die Sonoporation und somit die intrazelluläre Aufnahme des genetischen Materials (69, 71). Die Effektivität des Gentransfers kann hierauf entweder direkt durch direkte Bestimmung der Genexpression in den Zielzellen oder indirekt durch Reporterogenbildung (s.u.) oder durch den therapeutischen Effekt bestimmt werden (114).

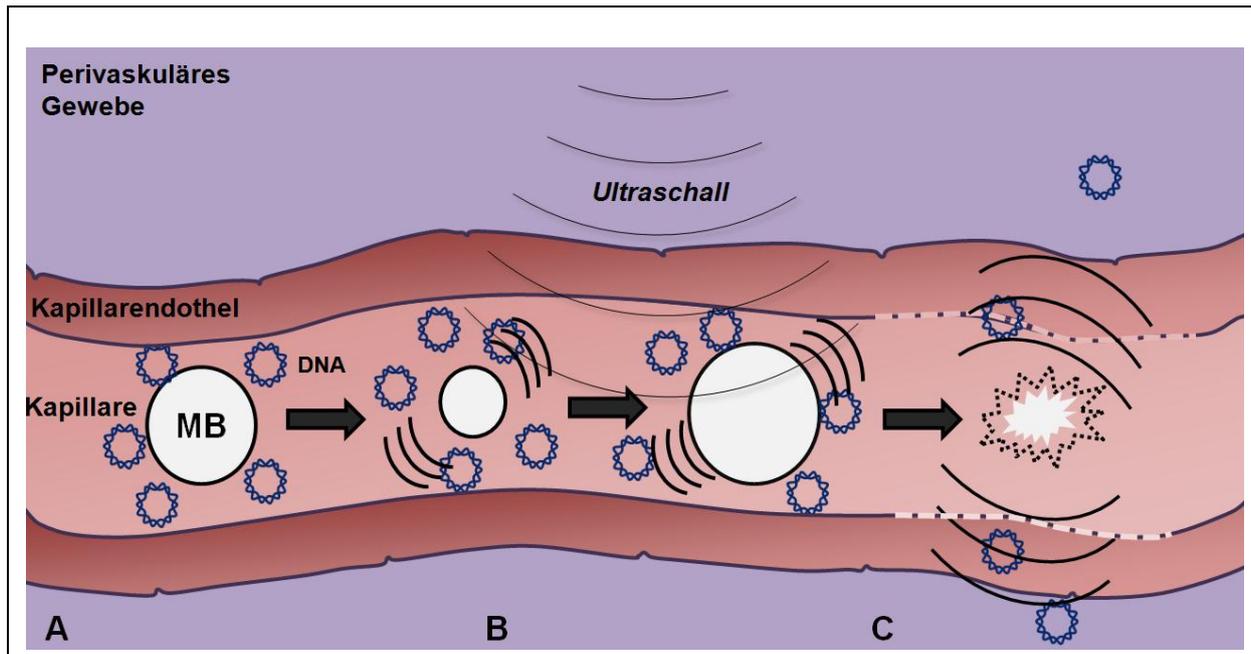


Abbildung 2. Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit Microbubbles nach systemischer Injektion von Microbubbles und DNA. (A) Systemisch injizierte Microbubbles (MB) und genetisches Material (DNA) zirkulieren im Kreislauf. (B) Microbubbles oszillieren bei Ultraschallexposition, bis sie schließlich kollabieren. (C) Das Kollabieren der Microbubbles bewirkt einen Energietransfer auf das Gewebe, wodurch es zur Membranperforation von umgebenden Zellen kommt. Genetisches Material kann in Folge dessen vereinfacht in Endothelzellen und perivaskuläre Stromazellen eindringen. Modifiziert nach Panje et al. (1).

Die Mehrheit der experimentellen Studien zu Ultraschall-vermitteltem Gentransfer verwendet klinisch zugelassene Microbubbles als Kavitationskerne zur Verstärkung der Sonoporation, ohne dass es zu weiterer Interaktion zwischen dem genetischen Material und den zumeist ungeladenen oder anionischen Microbubbles kommt (69, 105). Vorteile dieser Microbubble-Arten sind die einfache Verfügbarkeit sowie das Potential zur schnelleren klinischen Umsetzung durch die bereits vorhandene Zulassung für medizinische Zwecke. Erste präklinische Studien zeigten jedoch die Notwendigkeit relativ hoher Dosen an Microbubbles und genetischem Material für einen erfolgreichen Gentransfer, was unter anderem auf den raschen enzymatischen Abbau der applizierten DNA oder RNA durch Endonukleasen zurückgeführt werden kann (115, 116).

Microbubbles als Gentransporter.

Um diese Limitationen konventioneller Microbubbles zu überwinden, befassen sich jüngere Studien mit der Entwicklung kationischer Microbubbles, die nicht allein zur Sonoporation der Zielzellen führen, sondern auch als Gentransporter agieren und genetisches Material komplexieren können (97, 117, 118). Durch die Verwendung kationischer Peptide oder Lipide in der Microbubble-Synthese werden anionische Nukleinsäuren über elektrostatische

Wechselwirkungen an der Oberfläche der Microbubbles (97) oder in deren Kern (119, 120) gebunden. Kationische Microbubbles können mit verschiedenem genetischen Material durch Koinkubation beliebig beladen werden, wobei Plasmid-DNA (121) genauso wie Oligonukleotide (118) verwendet werden können.

Durch die elektrostatische Bindung des genetischen Materials soll erreicht werden, dass die Microbubbles ihre Ladung vor enzymatischem Abbau schützen und erst durch ihre Ultraschall-vermittelte Zerstörung im gewünschten Gewebe gezielt wieder freisetzen, wodurch insgesamt eine Verstärkung des Gentransfers erwartet wird (s. **Abbildung 3**) (69, 99, 115).

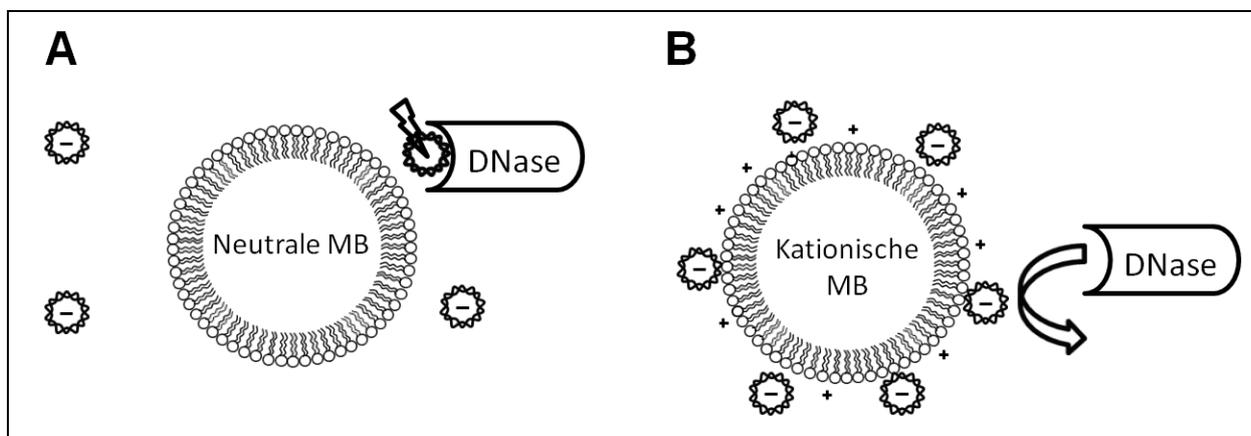


Abbildung 3. Microbubbles als Gentransporter. Konventionelle neutrale Microbubble-Typen verstärken die Ultraschall-vermittelte Sonoporation von Zellen, zeigen aber keine Interaktion mit DNA und anderem genetischem Material. Therapeutische Gene sind somit nach systemischer Injektion der enzymatischen Degradation durch DNasen ausgesetzt (A). Neuere Microbubble-Typen sind in der Lage, durch ihre positive Oberflächenladung genetisches Material auf ihrer Hülle zu binden und somit vor Degradation zu schützen (B). Modifiziert nach Panje et al. (1).

Obwohl die theoretischen Vorteile kationischer Microbubbles zur Verstärkung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers naheliegend sind, ist zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit diese erhöhte Transfektion allerdings noch in keiner direkten Vergleichsstudie zwischen konventionellen und kationischen Microbubbles gesichert nachgewiesen worden.

1.3 Reporter-gen-Bildgebung und Biolumineszenz

Die Reporter-gen-Bildgebung stellt eine elegante Methode dar, den Gentransfer in Zellkulturen oder in lebende Organismen zu quantifizieren und somit eine Basis für Optimierungsstudien zu schaffen, bevor therapeutische Gene verwendet werden (122, 123). Außerdem besteht die Möglichkeit, die Genexpression über einen bestimmten Zeitraum nicht-invasiv zu untersuchen, ohne dass die Entnahme von Gewebeproben oder die Extraktion von Zellproteinen hierfür notwendig wären (124). Ein Reporter-gen kodiert gewöhnlicherweise für ein nicht-therapeutisches Protein, dessen Expression durch verschiedene Bildgebungsmethoden beobachtet werden kann und in transfizierten Zellen verglichen zum umliegenden Gewebe einen messbaren Signalanstieg hervorruft (125). Am häufigsten kommen hierbei optische Bildgebungsverfahren wie die Biolumineszenz und die Fluoreszenz zur Anwendung (126).

In der Biolumineszenzbildgebung werden Gene für bestimmte Enzyme wie die Luziferase in Zellen eingebracht, die nach ihrer Expression als interne biologische Lichtquelle dienen (127). Nach Gabe eines spezifischen Enzymsubstrats, hier D-Luciferin, katalysieren die Enzyme energieabhängige Reaktionen unter Emission von Photonen in einer bestimmten Wellenlänge, die mit speziellen CCD-Sensoren (*charge coupled device*) quantifiziert werden können (128).

Im Gegensatz hierzu kodieren Fluoreszenz-Reporter-gene für Proteine wie z.B. das *green fluorescent protein* (GFP), die nach Exzitation durch eine äußere Lichtquelle selbst Photonen in einer größeren Wellenlänge emittieren (129).

Eines der ältesten Reporter-gene stellt das bakterielle Gen LacZ aus *Escherichia coli* dar, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert welches die Hydrolyse von β -Galaktosiden in Monosaccharide katalysiert (130). Für den qualitativen Nachweis der Expression der β -Galaktosidase wird das artifizielle β -Galaktosid X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure) verwendet, das enzymatisch katalysiert in 5-Brom-4-chlor-indoxyl und den tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo gespalten wird, welcher nach erfolgreicher Transfektion in Gewebeschnitten nachgewiesen werden kann (131).

Mehrere Studien haben bereits durch Reporter-gen-Bildgebung nachgewiesen, dass durch Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit Microbubbles eine erfolgreiche Transfektion von Zellkulturen und verschiedenen Zielorganen im lebenden Organismus erreicht werden kann (97, 132-135). Insbesondere ist diese Technik verwendet worden, um die Auswirkung verschiedener experimenteller Einflussgrößen wie Microbubble-Typen und -Dosierung, Gendosis und Ultraschall-Parameter auf den Gentransfer im Rahmen von Optimierungsstudien zu quantifizieren (100, 136-139).

1.4 Hypothesen und Fragestellung

Basierend auf den zuvor beschriebenen Annahmen stellten wir die Hypothese auf, dass die Verwendung von kationischen Microbubbles, die als Gentransporter agieren und DNA auf ihrer Oberfläche binden können, im Vergleich zu neutralen Microbubbles ohne Interaktion mit der DNA zu einer Steigerung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers führen kann.

Obwohl die theoretischen Vorteile kationischer Microbubbles naheliegend sind und von mehreren Autoren angenommen werden (69, 105, 115), ist zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit diese Steigerung des Gentransfers in keiner direkten Vergleichsstudie zwischen konventionellen und kationischen Microbubbles gesichert nachgewiesen worden.

Das Ziel dieser Studie war es folglich zunächst, kationische Microbubbles und neutrale Kontroll-Microbubbles auf ihre Eigenschaft zu überprüfen, DNA zu binden und vor enzymatischem Abbau zu schützen.

Hierauf folgend wurde der Ultraschall-vermittelte Gentransfer mit beiden Microbubble-Typen in der Zellkultur und im in-vivo-Tumormodell miteinander verglichen, um zu bestätigen, dass die Eigenschaften kationischer Microbubbles tatsächlich in einer Steigerung des Gentransfers resultieren.

Schließlich wurde in einer in-vivo-Optimierungsstudie untersucht, welchen Einfluss verschiedene Microbubble- und DNA-Dosierungen auf den Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles besitzen. Hierbei wurde insbesondere analysiert, inwiefern kationische Microbubbles bei den verschiedenen untersuchten Dosierungen jeweils eine relative Steigerung des Gentransfers bewirken können.

2 Material und Methoden

2.1 Reportergergen-Plasmide

Verwendete Reportergergen-Plasmide.

Für die folgenden in-vitro- und in-vivo-Versuche wurden folgende kommerziell erhältliche Biolumineszenz-Reportergergene und Plasmid-Vektoren verwendet:

- a) Für die initialen in-vitro-Studien und für die in-vivo-Studie im Tumormodell wurde das Reportergergen *Click beetle Luciferase* (Cbluc) im pcDNA 3.1-Plasmidvektor mit Puromycin-Resistenz und unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promoters verwendet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- b) Für die folgende Optimisierungsstudie wurde das kodon-optimierte Reportergergen *Firefly luciferase 2* (Fluc2) im pGL4-Plasmidvektor mit Neomycin-Resistenz und unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promoters verwendet (pGL4.51-Vektor; Promega, Madison, WI, USA). Das ursprünglich vom Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) stammende Luziferase-Gen wurde hierbei durch Basenaustausch an den genetischen Code von Säugerzellen angepasst, um eine maximale Expression in den verwendeten Zellreihen und Versuchstieren zu gewährleisten.
- c) Für die ex-vivo-Analyse der lokalen Ausdehnung der Transfektion wurde zusätzlich das Reportergergen β -Galaktosidase (β -gal) im pcDNA 3.1-Plasmidvektor mit Puromycin-Resistenz und unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promoters verwendet (Invitrogen).

Plasmidamplifikation durch Transformation und Kultur kompetenter E. coli-Bakterien.

Die Amplifikation der verwendeten Plasmide erfolgte in kompetenten *E. coli*-DH5 α -Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) den Herstellerangaben entsprechend (140).

Bei -80° C gelagerte DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 50 μ l in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nicht benötigte Zellen wurden im Trockeneis-Ethanol-Bad erneut eingefroren und bei -80° C konserviert.

10 ng der jeweiligen Plasmid-DNA (Cbluc, β -gal bzw. Fluc2) wurden den Reaktionsgefäßen hinzugegeben, bevor sie für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die Plasmid-Zell-Lösungen für 20 sec einem Hitzeschock bei 42° C im Wasserbad ausgesetzt. Nach 2 min Abkühlung auf Eis wurde den Proben jeweils 950 μ l vorgewärmtes autoklaviertes LB-Medium (LB Broth 25g/l; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) hinzugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 37° C für eine Stunde auf einem Schüttler bei 225 rpm.

200 μ l der Proben wurden jeweils auf eine vorgewärmte selektive Agarplatte (50 μ g/ml Puromycin bei CBluc und β -gal bzw. Neomycin bei Fluc2) transferiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Am Folgetag erfolgte die Kultur der kompetenten Bakterien und die Plasmidextraktion mittels des Endotoxin Free Maxiprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) den Herstellerangaben entsprechend (141), um eine mögliche Verunreinigung der Plasmid-DNA mit bakteriellen Endotoxinen und eine daraus folgende systemische Reaktion nach Injektion in den Versuchstieren zu vermeiden.

Eine einzelne Bakterienkolonie der Agarplatten wurde in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml des selektiven Antibiotikums für 8 Stunden auf einem Schüttler (300 rpm) bei 37° C inkubiert.

200 µl der Startkultur wurden darauf folgend in 250 ml selektives LB-Medium transferiert und für weitere 16 Stunden inkubiert. Durch Zentrifugation (JA10 Zentrifuge; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) der Kulturen bei 6000 g für 4 min bei 4° C und Verwerfen des Überstandes wurden die Bakterien vom Nährmedium getrennt und anschließend in 10 ml RNase-haltigen P1-Puffer resuspendiert.

Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und wurde durch anschließende Gabe von 10 ml des P3-Puffers gestoppt.

Die Lösung wurde anschließend im QIAfilter-Modul filtriert und ca. 25 ml des Filtrates wurden mit 2,5 ml ER (*endotoxin removal*)-Puffer nach gründlichem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert. In der Lösung enthaltene bakterielle Endotoxine wurden im QIAGEN-tip-Filtersystem mit zweifacher Gabe von 30ml QC-Puffer ausgewaschen.

Die Plasmid-DNA wurde durch 15 ml QN-Puffer aus dem Filtersystem herausgewaschen und nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol zur Präzipitation durch Zentrifugation (15000 g für 30 min bei 4°C) aus der Lösung getrennt.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNA mit 5 ml endotoxinfreier 70%iger Ethanollösung gewaschen und erneut für 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Die zentrifugierte Plasmid-DNA wurde für 10 min luftgetrocknet und schließlich in TE-Puffer resuspendiert.

Die DNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessungen (260 nm) mittels Spektrophotometrie (Agilent, Santa Clara, CA, USA) bestimmt.

Die Integrität der amplifizierten Plasmide wurde mittels Gel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.8) im Vergleich mit den vom Hersteller direkt bezogenen Plasmiden bestätigt.

2.2 Microbubbles

Kationische Microbubbles (BG6775; Bracco, Genf, Schweiz) wurden unter Verwendung von Perfluorobutan sowie folgenden Lipiden und Phospholipiden hergestellt: 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DSPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(polyethylenglykol)-5000] (DPPE-PEG₅₀₀₀, Avanti Polar Lipids), Palmitinsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) und zusätzlich 20 mol% 1,2-Distearoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DSTAP; Avanti Polar Lipids) zum Einbringen der

positiven Ladung in die Microbubbles-Hülle. Neutrale Kontroll-Microbubbles (BG6895; Bracco, Genf, Schweiz) wurden bis auf das Weglassen von positiv geladenen Phospholipid DSTAP in identischer Weise hergestellt (s. **Abbildung 4**).

Beide Arten von Microbubbles wurden nach Lyophilisation bei 4°C in versiegelten Ampullen gelagert, die mit Perfluorobutan und Stickstoff gefüllt waren, und in dieser Form unserem Labor zur Verfügung gestellt. Microbubbles-Lyophilisate wurden direkt vor den jeweiligen Experimenten in steriler 0.9% Kochsalzlösung (154mM NaCl) resuspendiert. Microbubbles und DNA wurden vor allen Experimenten für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um ladungsabhängige Bindungen zu ermöglichen.

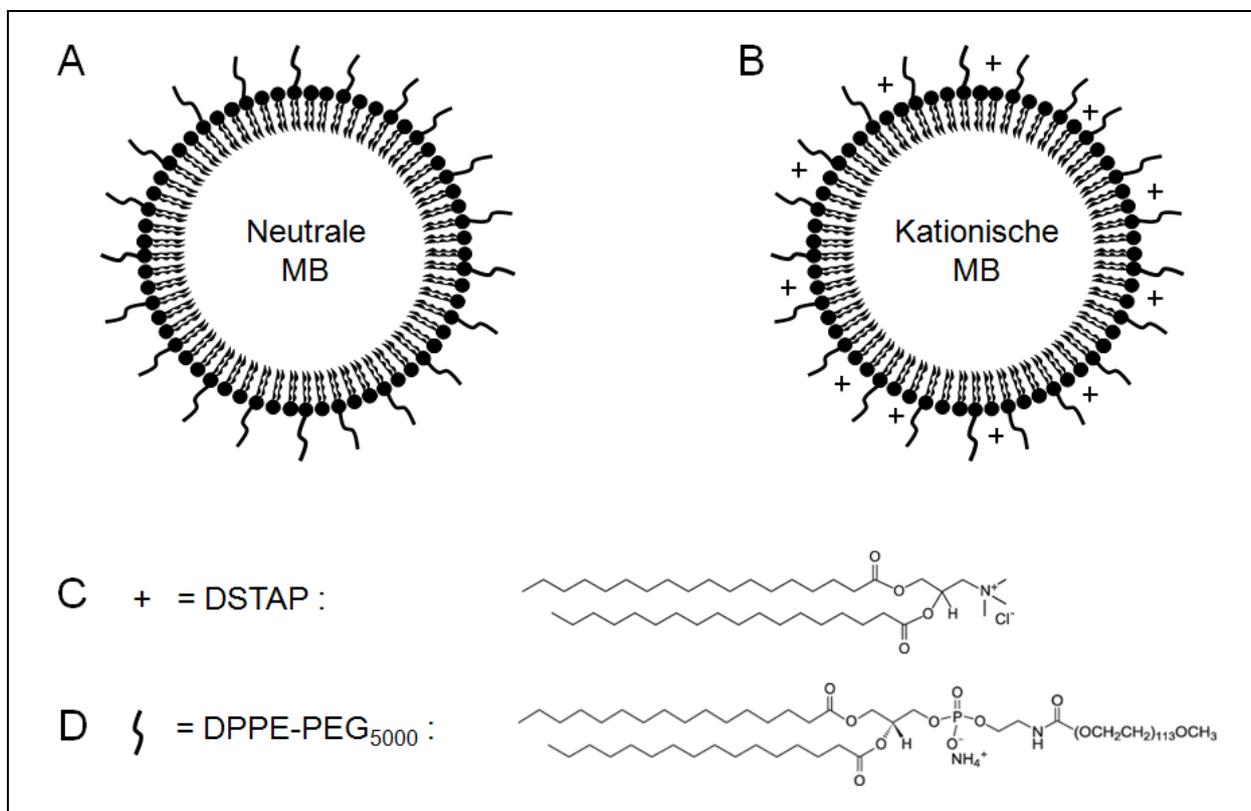


Abbildung 4. Schematische Darstellung der verwendeten neutralen (A) und kationischen (B) Microbubbles. Die Hülle beider Microbubble-Typen setzt sich aus den gleichen Phospholipiden zusammen, wobei bei den kationischen Microbubbles die positive Oberflächenladung durch Zugabe von DSTAP (C) erreicht wurde. Beide Microbubble-Arten wurden mit Polyethylenglycol (PEG₅₀₀₀) ummantelt, um die Stabilität der Microbubbles zu erhöhen (D). Modifiziert nach Wang et al. (3).

2.3 Zell-Linie für in-vitro-Experimente und Tumorimplantation

Murine Angiosarkom-Endothelzellen (SVR) wurden von der *American Tissue Type Collection* (Manassas, VA, USA) erworben und in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unter Zugabe von 10% fetalem Kalbsserum, L-Glutamin (Invitrogen) und jeweils 100 U/ml Penicillin sowie Streptomycin (Invitrogen) kultiviert.

Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heratherm; Thermo Scientific, Barrington, IL, USA) bei 37°C Feuchtluft und 5% CO₂-Atmosphäre bis 70-80% Konfluenz wachsen gelassen. Die Lösung der Zellen von den Kulturbedältern erfolgte nach mehrmaliger Spülung mit Phosphat-gepufferter 0,9% NaCl-Lösung (PBS; Invitrogen) durch Inkubation mit Trypsin für 5 min bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend in 15 ml Nährmedium verdünnt und durch Zentrifugation (5 min bei 400g, danach 3 min bei 800 g; Centrifuge 5417R; Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) separiert. Nach Resuspension in PBS erfolgte die Quantifikation im Hämozytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) in 1:10 Verdünnung von 10 µl Zellsuspension mit 45 µl PBS und 45 µl Trypanblau (Invitrogen). Die Zellen wurden anschließend in der vorgesehenen Anzahl für die in-vitro-Experimente sowie für die subkutane Tumorimplantation verwendet.

2.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche, sechs bis acht Wochen alte thymusaplastische Nacktmäuse (Crl:NU(NCr)-*Foxn1^{nu}*) von der Firma Charles River (Wilmington, MA, USA) direkt bezogen. Die Mäuse wurden in Gruppen zu maximal fünf Tieren in Käfigen in einem klimatisierten Raum bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Wasser und Trockenfutter (Pharmserv, Framingham, MA, USA) standen hierbei jederzeit frei zur Verfügung. Alle Tierexperimente wurden vom *Administrative Panel on Laboratory Animal Care* der Stanford University genehmigt (s. Anhang). Die Anleitung zur Arbeit mit den Versuchstieren erfolgte durch den Kurs *Small Animal Care* des *Veterinary Service Center* der Stanford University sowie durch den Betreuer.

2.5 Charakterisierung der Microbubbles nach Größenverteilung und Ladung

Kationische und neutrale Microbubbles wurden jeweils vom Hersteller auf die Größenverteilung mit einem Coulter-Zähler (Multisizer 3; Beckman Coulter, Nyon, Schweiz) untersucht. Die Größe der Microbubbles wurde als mittlerer Durchmesser (D_n) sowie als volumenbasierter mittlerer Durchmesser (D_v) errechnet.

Die Ladung der Microbubbles wurde als Zeta-Potential gemessen. Hierfür wurden die Microbubbles jeweils in 1 mM NaCl (pH 7,4) resuspendiert und die Ladung mittels Laser-Doppler-Elektrophorese (ZetaSizer 3000; Malvern Instruments, Malvern, England) bestimmt.

2.6 Nachweis der nicht-kovalenten DNA-Bindung auf Microbubble-Oberflächen

Durch den folgenden Versuch sollte in vitro der Nachweis für die Bindung von DNA an der Oberfläche der kationischen Microbubbles erbracht und der angenommene Unterschied zu den neutralen Kontroll-Microbubbles aufgezeigt werden.

pDNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben markiert: 1 mM YOYO-1 wurde in Tris-Azetat-Puffer (40mM Tris-Azetat, 2 mM EDTA, pH 8.0) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Zur Markierung von 1 µg DNA wurden 30 µl der verdünnten YOYO-1-Lösung (Invitrogen) und eine Inkubationszeit von 30 min in einem lichtdichten Reaktionsgefäß verwendet. 5 µg fluoreszenzmarkierter pDNA wurden mit 5×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles in 0.9% NaCl-Lösung in einem Gesamtvolumen von 400 µg für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt und auf ungeladene Objektträger (Invitrogen) aufgetragen. Digitale Fluoreszenz- und Hellfeld-Bilder wurden mit einem mit einem fokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) aufgenommen. Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde ein Argon-Laser (488 nm) verwendet. Alle Versuche erfolgten in dreifacher Ausführung.

2.7 Quantifikation der durch Microbubbles gebundenen DNA-Menge

Nach der Demonstration der gebundenen DNA auf der Microbubbles-Oberfläche mittels Fluoreszenzmikroskopie stellte der nächste Versuch eine Möglichkeit dar, die durch die Microbubbles gebundene DNA-Menge zu quantifizieren (s. **Abbildung 5**).

Die Bestimmung der gebundenen DNA-Menge erfolgte indirekt durch die Messung der ungebundenen Fraktion. Hierfür wurde sich die Eigenschaft der Microbubbles zunutze gemacht, durch ihren Gaskern in wässrigen Lösungen aufzusteigen und nach einiger Zeit eine Schicht oberhalb der Lösung zu bilden. Durch vorsichtige Zentrifugation kann dieser Vorgang beschleunigt werden, ohne die Integrität der Microbubbles signifikant zu beeinflussen (97). Die durch Microbubbles gebundene DNA wird somit der Lösung entzogen, was sich in einem Abfall der Konzentration im Unterstand zeigt.

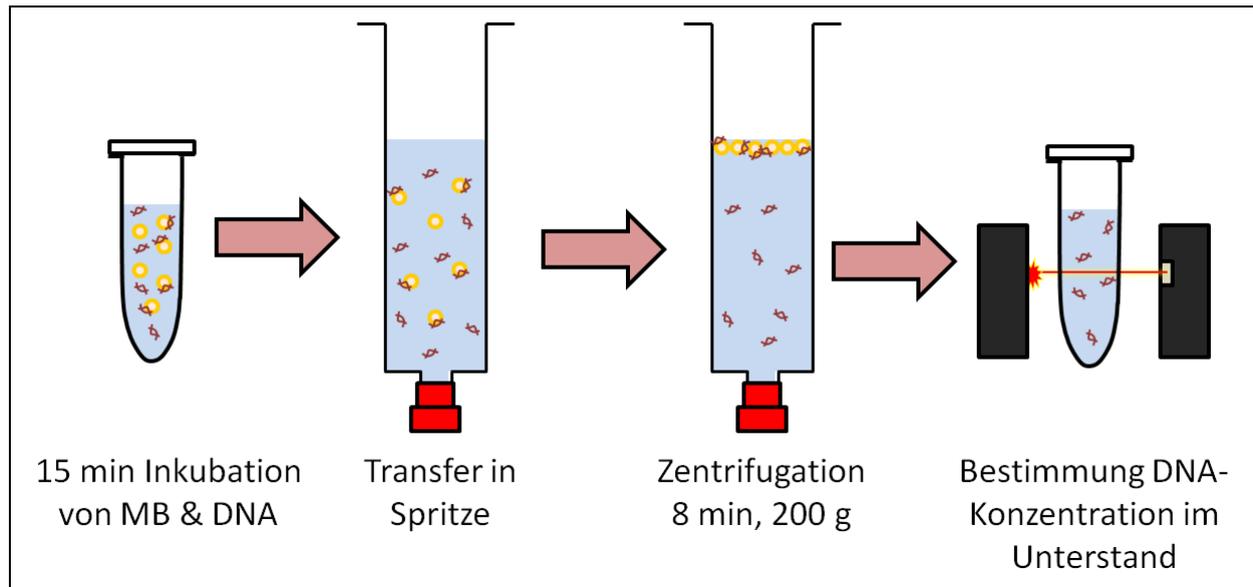


Abbildung 5. Schematischer Ablauf der indirekten Quantifikation der an kationischen Microbubbles gebundenen DNA. Durch vorsichtige Zentrifugation wird die Eigenschaft der Microbubbles (MB) verstärkt, durch ihren Gaskern zu flotieren, sodass sich oberhalb der Lösung eine Schicht aus Microbubbles und gebundener DNA bildet. Nach Zentrifugation zeigt sich spektrophotometrisch im Unterstand eine verringerte Konzentration der freien DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe als indirekter Nachweis der DNA-Bindfähigkeit der Microbubbles.

Kationische und neutrale Microbubbles wurden in 0.9% gepufferter NaCl-Lösung resuspendiert, um eine Konzentration von $1,4 \times 10^9$ Microbubbles / ml zu erhalten. Das Plasmid pCMV-Fluc2 wurde durch Photospektrometrie bei 260 nm quantifiziert.

Jeweils 5×10^8 kationische oder neutrale Microbubbles wurden für 15 Minuten mit unterschiedlichen Mengen des Plasmids (5, 10, 20, 40, 60 und 80 μg) in einem Volumen von 1.6ml 0.9% NaCl bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Flotation der gasgefüllten Microbubbles zu verhindern, wurden die Proben während der Inkubation auf einer Labor-Schaukel (Frequenz 30/min; PMR-30; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) gelagert.

Nach der Inkubation wurde das gesamte Volumen jeder Probe in eine verschlossene 3-ml-Polycarbon-Spritze transferiert und anschließend für 8 min bei 200 g in einer Schwenkbecherzentrifuge (Legend Mach 1.6R; Sorvall, Waltham, MA, USA) zentrifugiert, um die gasgefüllten Microbubbles von der restlichen Lösung mit der ungebundenen DNA zu trennen.

Eine kleine Menge des Unterstandes (200 μl) wurde aus der Spritze abgelassen, ohne die Microbubbles-Schicht zu beeinflussen. Die Probe wurde daraufhin in einen Zentrifugalfilter (0.45 μm , Millipore, Billerica, MA, USA) transferiert, um die Lösung von verbliebenen Microbubbles-Debris zu reinigen und somit eine erhöhte Hintergrund-Absorption bei der photometrischen DNA-Quantifikation zu vermeiden. Durch Pilotstudien wurden zuvor die

Herstellerangaben bestätigt, dass die Zentrifugalfilter durchlässig für DNA, aber nicht für Microbubbles seien.

Nach Zentrifugation der Filter mit maximaler Geschwindigkeit (14000 g) für 5 min wurde die DNA-Konzentration im Filtrat photometrisch im Vergleich zu einer Standardkurve bestimmt. Die Menge an ungebundener DNA in der Probe wurde aus dem Produkt von DNA-Konzentration im Unterstand und dessen Volumen errechnet. Die von Microbubbles gebundene DNA wurde als Differenz der Mengen von Gesamt-DNA in der Probe und ungebundener DNA berechnet.

Die Experimente erfolgten in dreifacher Ausführung.

2.8 Nachweis des Schutzes vor Degradation durch DNA-Bindung

Um die protektiven Eigenschaften von kationischen gegenüber neutralen Microbubbles bei der DNA-Degradation durch Endonukleasen darzustellen, wurde DNA zu beiden Arten der Microbubbles gegeben und anschließend mit DNase I inkubiert, wonach das Ausmaß der Degradation durch Gelelektrophorese analysiert wurde.

10 µg DNA wurden mit 1×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles in 100 µl 1 mM NaCl-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung von DNA-Microbubble-Komplexe zu ermöglichen. Die Proben wurden im Folgenden auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt und mit 0,02 units der DNase I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) für 15 min bei 37° C inkubiert (115). Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit durch die Zugabe von 20 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Endkonzentration 5 mmol/L; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) beendet, wodurch die DNase I-Aktivität inhibiert wurde. Anschließend wurden die Proben mit 1mM NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 400 µl verdünnt. Die an Microbubbles gebundene DNA wurde von der ungebundenen pDNA durch Zentrifugation für 30 min bei 200 g unter Verwendung eines Zentrifugationsfilters mit einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore) getrennt. Das Filtrat wurde direkt zur photometrischen Quantifizierung der ungebundenen DNA (siehe oben) verwendet.

Die oberhalb des Filters an den Microbubbles gebundene DNA wurde im folgenden Schritt mit 200 µl einer 5 M NaCl-Lösung inkubiert und bei 2000 g für 10 min erneut zentrifugiert. Hierdurch wurde die ladungsabhängige Interaktion der DNA und Microbubbles aufgehoben und die vormals gebundene DNA von den Microbubbles separiert. Die Extraktion der DNA aus der hochmolaren NaCl-Lösung erfolgte mittels Purifikationssäulen (QIAquick; Qiagen, Valencia, CA, USA) entsprechend den Herstellerangaben, um anschließend eine photometrische Quantifizierung zu ermöglichen (siehe oben).

Das Ausmaß der DNA-Degradation in den einzelnen Versuchsgruppen wurde im Folgenden durch Gelelektrophorese ermittelt. 0,8% Agarose-Gel (Seakem Agarose; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) wurde mit einer 1:50-Verdünnung des TAE-Puffers (2 M Tris-Azetat, 50

mM EDTA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unter Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Bio-Rad, Hercules, CA) anfertigt und je Versuchsgruppe mit 1 µg DNA und 2 µl *Bluejuice gel loading buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) beladen. Die DNA-Gel-Elektrophorese (Elektrophorese-Kammer: Wide Mini-Sub (R) Cell-GTI; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) erfolgte für 45 min bei 100 V. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden anschließend unter UV-Licht digital fotografiert (2UV Transilluminator; UVP, Upland, CA, USA).

Als Kontrollgruppen ohne Zusatz von Microbubbles dienten a) DNA ohne DNase I; b) DNA und DNase I; c) DNA, DNase I und sofortige Inhibition durch EDTA. Alle Kontrollgruppen durchliefen die gleichen Schritte wie die Versuchsgruppen, wobei das fehlende Volumen der Microbubbles durch 1mM NaCl-Lösung ausgeglichen wurde.

Der gesamte Versuch wurde jeweils dreifach für beide verwendete Plasmide wiederholt.

2.9 Ultraschall-vermittelter in-vitro-Gentransfer in Zellkulturen

Versuchsdurchführung.

Die relative Verstärkung von Ultraschall-vermitteltem Gentransfer durch kationische Microbubbles im Vergleich zu neutralen Kontroll-Microbubbles wurde zunächst in der Zellkultur ermittelt. Da Microbubbles aufgrund ihres Gaskernes in Flüssigkeiten allmählich aufsteigen, wurde der Kontakt zwischen Zellen und Microbubbles maximiert, indem die Zielzellen *oberhalb* der Microbubbles-DNA-Lösung platziert wurden (s. **Abbildung 6**).

SVR-Zellen wurden mit einem Hämozytometer quantifiziert (siehe oben). Jeweils 1×10^5 Zellen wurden auf sterile Glasplatten (2.5 cm Durchmesser; VWR Scientific, West Chester, PA, USA) gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Transfektion fand am Folgetag statt, wobei die Glasplatten mit den SVR-Zellen auf Mikroplatten (6 Vertiefungen; BD Biosciences, Bedford, MA, USA) transferiert wurden. Die Glasplatten wurden durch einen ringförmigen Einsatz in den Vertiefungen auf einer konstanten Höhe fixiert, sodass die zellbewachsene Seite nach unten zur Lösung zeigte.

Die SVR-Zellen wurden auf diese Weise einer Lösung aus 4 µg DNA sowie 5×10^7 kationischen Microbubbles, neutralen Kontroll-Microbubbles oder keinen Microbubbles in 6 ml Opti-MEM-Medium (Invitrogen) ausgesetzt. Um ein Aufsteigen der Microbubbles in Richtung der Zellen zu ermöglichen, wurde 5 min vor Beginn der Ultraschall-Exposition gewartet. 4ml zusätzliches Medium wurde oberhalb der Glasplatte hinzugegeben und die Zellen für 1 min dem therapeutischen Ultraschall (1MHz, 1 W/cm², 20% DC; Sonitron 2000; Rich-Mar, Chattanooga, TN, USA) mittels eines in das Medium eingetauchten runden Ultraschall-Kopfes (20 mm Durchmesser) ausgesetzt.

In einer weiteren Kontrollgruppe wurden die Zellen wie oben beschrieben der Microbubble-DNA-Lösung ausgesetzt, allerdings nicht dem Ultraschall.

Um die Bildung von stehenden Wellen zu minimieren, wurde der Versuch in einem 37° C warmen, entgasten Wasser-Bad durchgeführt, an dessen Boden Ultraschall-absorbierendes Gummi (100) angebracht wurde.

Nach der Transfektion wurden die Glasplatten mit der zellbewachsenen Seite nach oben gedreht. Nach einer Stunde wurde 1 ml (= 10 vol%) fetales Kälberserum (Invitrogen) als Nährlösung hinzugefügt, und die Zellen wurden wie oben beschrieben für 24 Stunden weiter inkubiert.

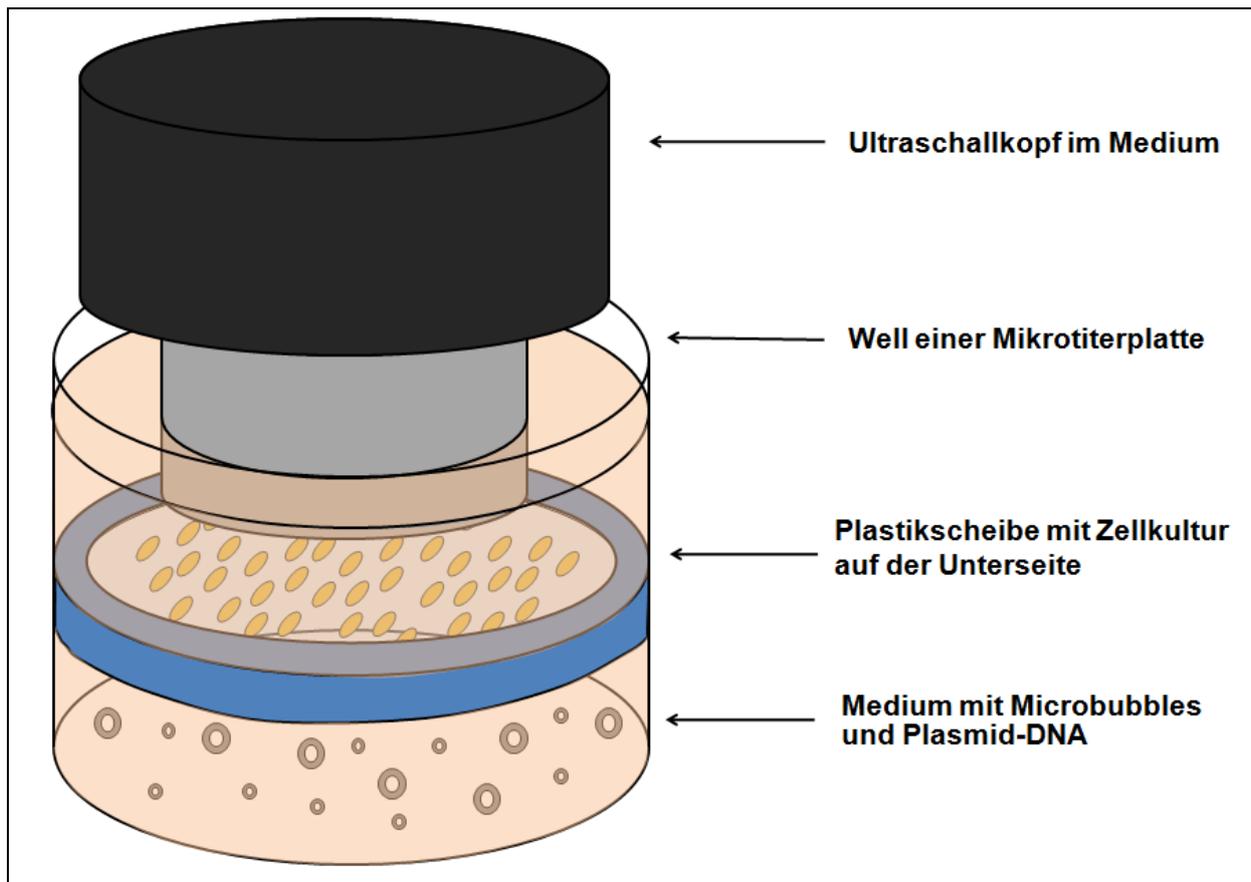


Abbildung 6. Experimenteller Aufbau für den Ultraschall-vermittelten Gentransfer in Zellkulturen. SVR-Endothelzellen wurden auf Plastikscheiben kultiviert, die für die Transfektion umgedreht wurden, damit die Zellen oberhalb der Microbubble-Plasmid-DNA-Lösung angebracht werden konnten. Durch ihren Gaskern bedingt stiegen Microbubbles auf, sodass Sie sich in der unmittelbaren Nähe der Zellen anreicherten. Ultraschall wurde von der oberen Well-Öffnung aus appliziert. Modifiziert nach Panje et al. (2).

Quantifizierung der Transfektion durch den normalisierten Luziferase-Assay.

Der Ultraschall-vermittelte Gentransfer in Zellkulturen wurde quantifiziert, indem die Aktivität des Reportergens Luziferase in der Zellkultur 24 Stunden nach der Transfektion im Verhältnis zur Zellproteinmenge bestimmt wurde. Hierfür wurde das *Luciferase Assay Kit* (Promega, Madison, IL, USA) entsprechend den Herstellerangaben verwendet:

Die behandelten SVR-Zellen wurden mit Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung zweimal gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 200 µl 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega) für 30 min lysiert, wobei die Proben auf Eis gelegt und auf einer Labor-Schaukel positioniert wurden. Die Proben wurden in Reaktionsgefäße transferiert und bei 20000 g für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5417R; Eppendorf), um den Zell-Debris abzusondern. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übernommen und für den Luziferase-Assay verwendet: 20 µl der Proben wurden mit 100 µl *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II; Promega) gemischt, das das Substrat der Luziferase enthält. Die Biolumineszenz der Proben wurde unmittelbar nach dem Mischen mit einem Luminometer (20/20n; Turner Biosystems, Madison, WI, USA) mit 10 sec Aufnahmezeit gemessen.

Um eine Verfälschung der Biolumineszenz-Werte durch Abweichungen in der Zellzahl zu vermeiden, wurden die erhaltenen Biolumineszenz-Signale in Hinblick auf die Gesamtproteinmenge je Probe normalisiert. Diese wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt: Proteine reduzieren konzentrationsabhängig Cu^{2+} zu Cu^{1+} , was durch Zugabe von Bicinchoninsäure photometrisch durch eine Zunahme der optischen Dichte bei 562 nm gemessen werden kann (142). Das Protein Assay-Kit war auf die Verwendung von alkalischen Proben optimiert, die durch die Benutzung des *Passive Lysis Buffer* zur Zell-Lyse gegeben waren. Von den Proben wurden jeweils 9 µl der Proben mit 4 µl der *Compatibility Reagent Solution* (Pierce) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 260 µl *Working Reagent* (Pierce) hinzugefügt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Hierauf erfolgte die photometrische Messung bei 562 nm (Safire 2 Microplate Reader; Tecan, San Jose, CA, USA). Durch einen Leerwert und dreifache Standard-Verdünnungsreihen einer Rinderalbumin-Stammlösung (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/ml; Invitrogen) wurde eine Eichkurve erstellt und darauf basierend der Gesamtproteingehalt der jeweils untersuchten Probe errechnet.

Die Reporter-gen-Aktivität jeder Probe wurde in RLU (*relative luciferase units*) per µg Protein angegeben.

Alle Experimente wurden jeweils in dreifacher Ausführung mit den Reporter genen *Click beetle luciferase* sowie *Firefly luciferase 2* durchgeführt.

2.10 Ultraschall-vermittelter in-vivo-Gentransfer mit Microbubbles

Versuchsaufbau für die in-vivo-Transfektion.

Abbildung 7 verdeutlicht schematisch den experimentellen Aufbau, der für alle in-vivo-Transfektionen gleichermaßen verwendet wurde. Zur Narkose der Versuchstiere wurde 2% Isofluran in Sauerstoff mit einer Flussrate von 2 L / min verwendet. Nach Eintritt der Narkose wurden die Mäuse auf eine auf 37° C geheizte Plattform transferiert, auf der durch ein Mundstück die Gasnarkose während des Experimentes aufrecht erhalten wurde. In Analogie zu den in-vitro-Experimenten wurde unterhalb des behandelten Hinterbeines eine Ultraschall-absorbierende Gummiplatte platziert.

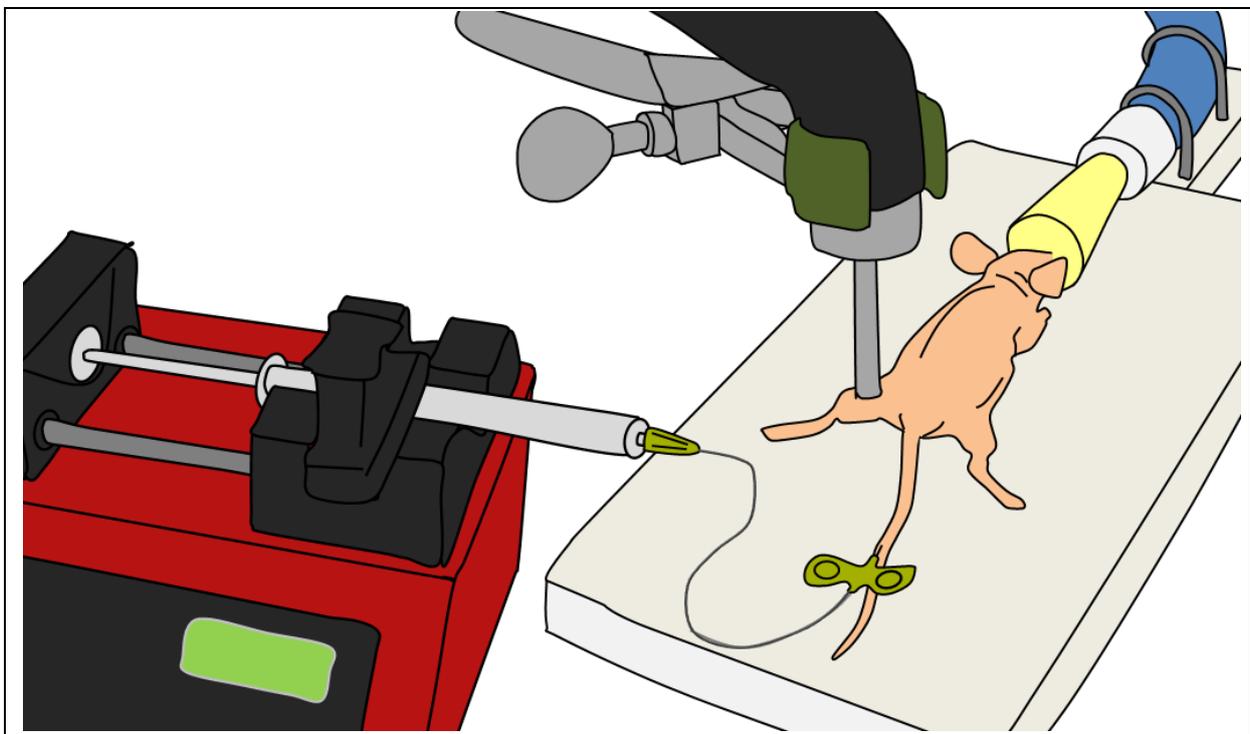


Abbildung 7. Experimenteller Aufbau für den Ultraschall-vermittelten Gentransfer in vivo. Eine Lösung aus Plasmid-DNA und kationischen bzw. neutralen Microbubbles oder nur Plasmid-DNA wurde über einen Katheter in die Schwanzvene der narkotisierten Mäuse injiziert. Die Injektion erfolgte maschinell kontrolliert mit einer konstanten Flussrate. Ultraschall wurde direkt auf das Hinterbein der Versuchstiere appliziert. Modifiziert nach Panje et al. (2).

Kationische oder neutrale Microbubbles wurden in 0,9% steriler Kochsalzlösung resuspendiert und für 15 min mit der Reporter-gen-Plasmid-DNA in verschiedenen Konzentrationen bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 400 µl).

Um eine gleichmäßige, konstante Infusion des Microbubble-DNA-Gemisches zu ermöglichen, wurde die Lösung mittels einer Infusionspumpe mit einer Flussrate von 100 µl/min über einen 27 g Katheter in die Schwanzvene injiziert. Ein runder 6 mm-Schallkopf

des therapeutischen Ultraschall-Gerätes (Sonitron 2000) wurde zentral auf das ausgestreckte Hinterbein der Versuchstiere positioniert, wobei ein auf 37° C vorgewärmtes Ultraschall-Kontaktgel verwendet wurde. Die Ultraschallbehandlung wurde anschließend für 5 min mit folgenden Parametern durchgeführt: 1 MHz Frequenz, 2 W/cm² Intensität und 50% Tastverhältnis (duty cycle). Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Mäuse zurück in den Käfig transferiert und bis zum Aufwachen aus der Narkose überwacht.

Messung der Genexpression durch in-vivo-Reporter-Gen-Bildgebung.

Die Versuchstiere wurden wie oben beschrieben erneut narkotisiert. D-Luciferin, das Substrat der Luziferase, wurde in einer Menge von 150 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden daraufhin umgehend in das IVIS 200-System (Xenogen) transferiert. Das Biolumineszenzsignal wurde in sequentiellen Aufnahmen, abwechselnd in dorsaler und ventraler Lage der Versuchstiere, vom Zeitpunkt der Injektion an gemessen, bis das maximale Signal erreicht wurde.

Die Biolumineszenzsignale wurden mit dem Softwareprogramm Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) analysiert.

Ultraschall-vermittelter in-vivo-Gentransfer des Click beetle luciferase-Reportergens in murine Angiosarkom-Tumore mittels kationischer und neutraler Microbubbles.

Vor der Transfektion erfolgte die subkutane Implantation von SVR-Angiosarkom-Tumoren in die Hinterbeine der Versuchstiere: SVR-Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und durch Trypsinierung gesammelt, gewaschen und in PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die SVR-Zellen im Hämocytometer quantifiziert und 1,5 x 10⁶ SVR-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit Matrigel-Proteinmatrix (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) gemischt und subkutan in die Hinterbeine der narkotisierten Versuchstiere injiziert. Die Tumore wurden bis zu einem maximalen Durchmesser von 5 mm wachsen gelassen, bevor die Versuchstiere zur in-vivo-Transfektion verwendet wurden.

Der Ultraschall-vermittelte Gentransfer erfolgte wie oben beschrieben unter der Verwendung von 200 µg Click beetle luciferase-Reportergenplasmid sowie 1 x 10⁹ kationische oder neutrale Microbubbles (jeweils n=7). Als Kontrollgruppen diente die Infusion von kationischen Microbubbles und Plasmid-DNA ohne Ultraschallexposition sowie die alleinige Infusion von Plasmid-DNA ohne Microbubbles mit anschließender Ultraschallexposition (jeweils n=5).

Die Messung der Genexpression durch in-vivo-Reporter-Gen-Bildgebung erfolgte 12, 24, 36 sowie 48 Stunden nach Transfektion.

Ex vivo-Analyse des Gentransfers durch Bestimmung der Reporter-gen-Aktivität im Zell-Lysat und durch Bestimmung der räumlichen Verteilung des β -Galaktosidase-Reportergens.

Die Versuchstiere mit SVR-Tumoren wurden nach der letzten Biolumineszenz-Messung 48 Stunden nach Transfektion euthanasiert. Die Tumore wurden umgehend entnommen und schockgefroren. Zusätzlich wurden die Leber und die Milz der Versuchstiere entnommen, die in vorherigen Studien als Hauptorgane für den Abbau von Microbubbles und DNA identifiziert worden waren (107, 109).

Die entnommenen Gewebeproben wurden durch T-PER-Puffer (Pierce, Rockford, IL, USA) sowie Ultraschallexposition bei 20 KHz (Sonicator 3000; Misonix, Farmingdale, NY, USA) homogenisiert und lysiert. Durch Zentrifugation (Legend Mach 1.6R; 10000 g für 3 min) erfolgte eine Abtrennung des Zell-Detritus. Im Überstand wurde im Folgenden die Expression des *Click beetle luciferase*-Reportergens durch das oben bereits beschriebene *Luciferase Assay Kit* quantifiziert und verglichen. Hierbei wurde wie zuvor die Reporter-gen-Expression in Hinblick auf die Gesamtproteinmenge je Probe normalisiert.

Für die Bestimmung der räumlichen Verteilung des Gentransfers nach intravenöser Injektion von Microbubbles und DNA sowie lokaler Ultraschall-Exposition wurde eine weitere Gruppe Tumor-tragender Mäuse (n=4) in der oben beschriebenen Weise transfiziert, wobei als Reporter-gen β -Galactosidase (β -gal) verwendet wurde. Die Versuchstiere wurden gleichfalls 48 Stunden nach der Transfektion euthanasiert, die Tumore en bloc entnommen und in *Optimal cutting temperature compound* (OCT; Tissue Tek, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) bei -20°C Grad eingefroren. Zwei aneinanderliegende Gewebeschnitte (5 μ m) wurden von jedem Tumor angefertigt, umgehend in 4% Formalin fixiert und anschließend in Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS) gewaschen. Für den Nachweis der β -Galaktosidase-Expression wurden die Gewebeschnitte – entsprechend den Herstellerangaben (143) – mit neu angesetztem β -Galaktosidase-Substrat (0,1% X-gal, 4 mmol/l MgCl₂, 1,5 mg/ml Kaliumferricyanid und 2,5 mg/ml Kaliumferrocyanid in Phosphat-gepufferter 0,9-prozentiger NaCl-Lösung) für einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die histologische Färbung (Hämatoxylin-Eosin, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa, USA) erfolgte am zweiten, angrenzenden Gewebeschnitt des jeweiligen Tumors entsprechend den Herstellerangaben. Nachdem die histologischen Schnitte mit Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung gespült wurden, erfolgten digitale Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung mit dem *Nanozoomer slide scanner* (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA) mit anschließender virtueller Mikroskopie unter Verwendung der *NDP.view*-Software (Hamamatsu).

Als Negativkontrolle dienten die entnommenen Tumore von nicht transfizierten Mäusen (n=4), die zum gleichen Zeitpunkt entnommen worden waren und von denen in identischer Weise histologische Schnitte angefertigt wurden.

Ultraschall-vermittelter in vivo-Gentransfer des Firefly Luciferase 2-Reportergens in die Skelettmuskulatur mittels kationischer und neutraler Microbubbles.

Die folgende Studie diente dazu, die Steigerung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit kationischen Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles in verschiedenen Microbubble- und DNA-Dosierungen sowie gegenüber Kontrollgruppen ohne Ultraschallexposition bzw. ohne Microbubbles zu ermitteln (jeweils n=6).

Als Reportergen wurde die *Firefly Luciferase 2* verwendet. Als Zielorgan diente die Skelettmuskulatur der Hinterbeine der Versuchstiere.

Bei konstant gehaltener Microbubble-Dosierung von 1×10^8 Microbubbles wurden zunächst der absolute und relative Gentransfer von kationischen Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles bei verschiedenen Plasmid-DNA-Dosierungen (10, 17,5, 25, 37,5 und 50 μg) ermittelt.

In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte der Ultraschall-vermittelte Gentransfer mit einer konstanten Plasmid-DNA-Dosis von 50 μg und verschiedenen Dosierungen der kationischen und neutralen Microbubbles (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8).

Die Messung der Genexpression durch in-vivo-Reportergen-Bildgebung begann 24 Stunden nach der Transfektion und wurde für insgesamt 7 Tage alle 24 Stunden fortgeführt.

Statistische Analyse.

Für DNA-Bindungs Kapazität bzw. für die in-vitro-Gentransfer-Experimente wurde der Wilcoxon-Rangsummentest zum Vergleich der Plateauwerte beider Kurven bzw. der Transfektionseffizienz der einzelnen Gruppen verwendet. Für die statistische Auswertung der in-vivo-Gentransfer-Experimente wurde ein nach Experimentendatum stratifizierter Wilcoxon-Rangsummentest ausgewählt, um den *batch effect* auszugleichen. Der relative Vorteil der Transfektion mit kationischen gegenüber neutralen Microbubbles wurde als Quotient der in-vivo-Biolumineszenz-Signale beider Gruppen für jede DNA- und Microbubble-Konzentration separat angegeben. Der Trend des Anstiegs des Biolumineszenzsignals mit der Zeit wurde mit einer einfachen linearen Regressionsanalyse überprüft. Alle statistischen Analysen wurden mittels der Statistiksoftware R.2.6.1) durchgeführt. P-Werte von 0.05 oder weniger wurden hierbei als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Charakterisierung der kationischen und neutralen Microbubbles

Die vom Hersteller durchgeführte Charakterisierung kationischer und neutraler Kontroll-Microbubbles nach Größenverteilung und Ladung mittels Coulter-Zähler und Laser-Doppler-Elektrophorese ergab ein Zeta-Potential für kationische Microbubbles von $+15,8 \pm 2,0$ mV verglichen mit $-0,3 \pm 0,3$ mV für die Kontroll-Microbubbles, während der Durchmesser der kationischen ($D_n 1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $D_v 3,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$) und neutralen ($D_n 1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $D_v 3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$) Microbubbles keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwies.

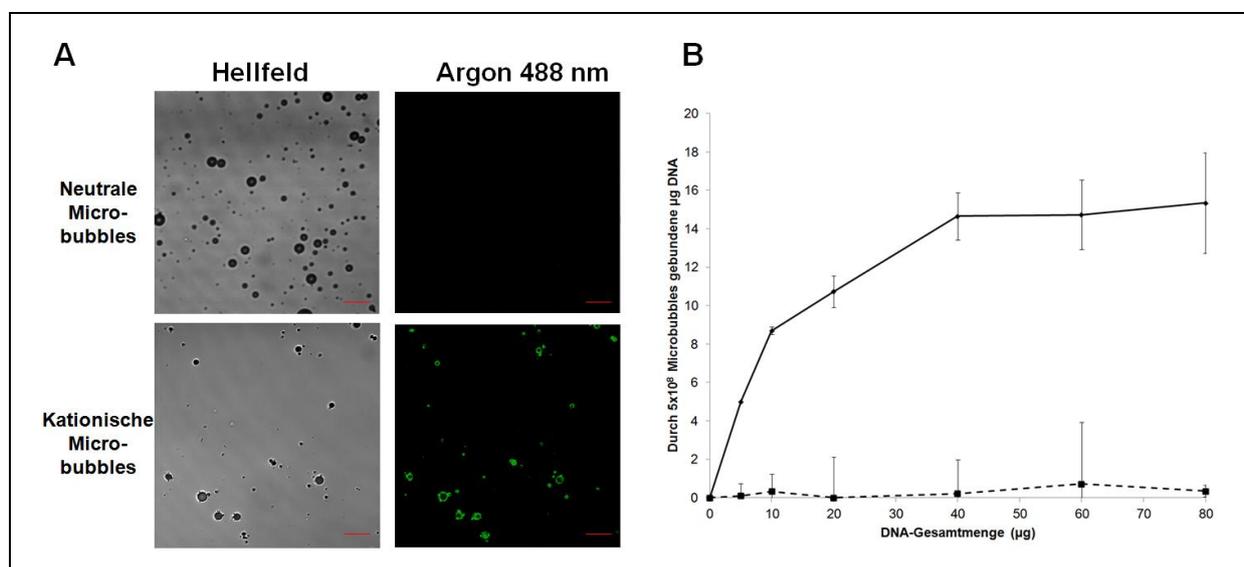


Abbildung 8. Interaktionen der Plasmid-DNA mit kationischen und neutralen Microbubbles. (A) Konfokalmikroskopie und korrespondierende Hellfeld-Aufnahmen (Vergrößerung 1:1000, Skala = $10 \mu\text{m}$) zeigen YOYO-1-fluoreszenzmarkierte Plasmid-DNA an der Oberfläche von kationischen Microbubbles, allerdings nicht von neutralen Kontroll-Microbubbles. (B) Die quantitative Bestimmung der Bindungskapazität der kationischen Microbubbles ergab $14,9 \pm 1,7 \mu\text{g}$ für 5×10^8 kationische Microbubbles (mittlere Bindungskapazität in der Plateauphase). Neutrale Kontroll-Microbubbles zeigten nur ein schwaches Hintergrundsignal ($n=3$ pro Gruppe). Fehlerbalken = Standardabweichung. Modifiziert nach Wang et al. (3).

Die separate Untersuchung kationischer und neutraler Microbubbles nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierter DNA durch konfokale Mikroskopie erbrachte den visuellen Nachweis der ladungsbedingten Bindung der DNA an der Oberfläche kationischer Microbubbles, während kein Nachweis einer Bindung bei neutralen Microbubbles möglich war (s. **Abbildung 8a**).

Die quantitative Bestimmung der DNA-Bindungskapazität der Microbubbles zeigte eine Sättigungskurve für kationische Microbubbles (s. **Abbildung 8b**) mit einer mittleren Bindungskapazität in der Plateauphase von $14,9 \pm 1,7 \mu\text{g}$ für 5×10^8 Microbubbles (entsprechend $0,03 \text{ pg}$ pro kationischer Microbubble). Im Gegensatz hierzu konnte kein deutlicher Nachweis einer DNA-Bindungsfähigkeit für die gleiche Anzahl neutraler *Microbubbles* bei allen untersuchten Mengen an pDNA erfolgen ($0,27 \pm 1,5 \mu\text{g}$; $P < 0,001$).

Die Exposition von $10 \mu\text{g}$ DNA gegenüber DNase I nach Inkubation mit 1×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles zeigte eine partielle Protektion der an der Oberfläche der kationischen Microbubbles gebundenen DNA gegen enzymatische Degradation (s. **Abbildung 9**, Bande 4). Die Proben mit DNA und neutralen Microbubbles sowie die Proben mit pDNA ohne Microbubbles wiesen hingegen eine vollständige DNA-Degradation auf, was an den verwischten Banden zu erkennen ist (s. **Abbildung 9**, Banden 3 und 5).

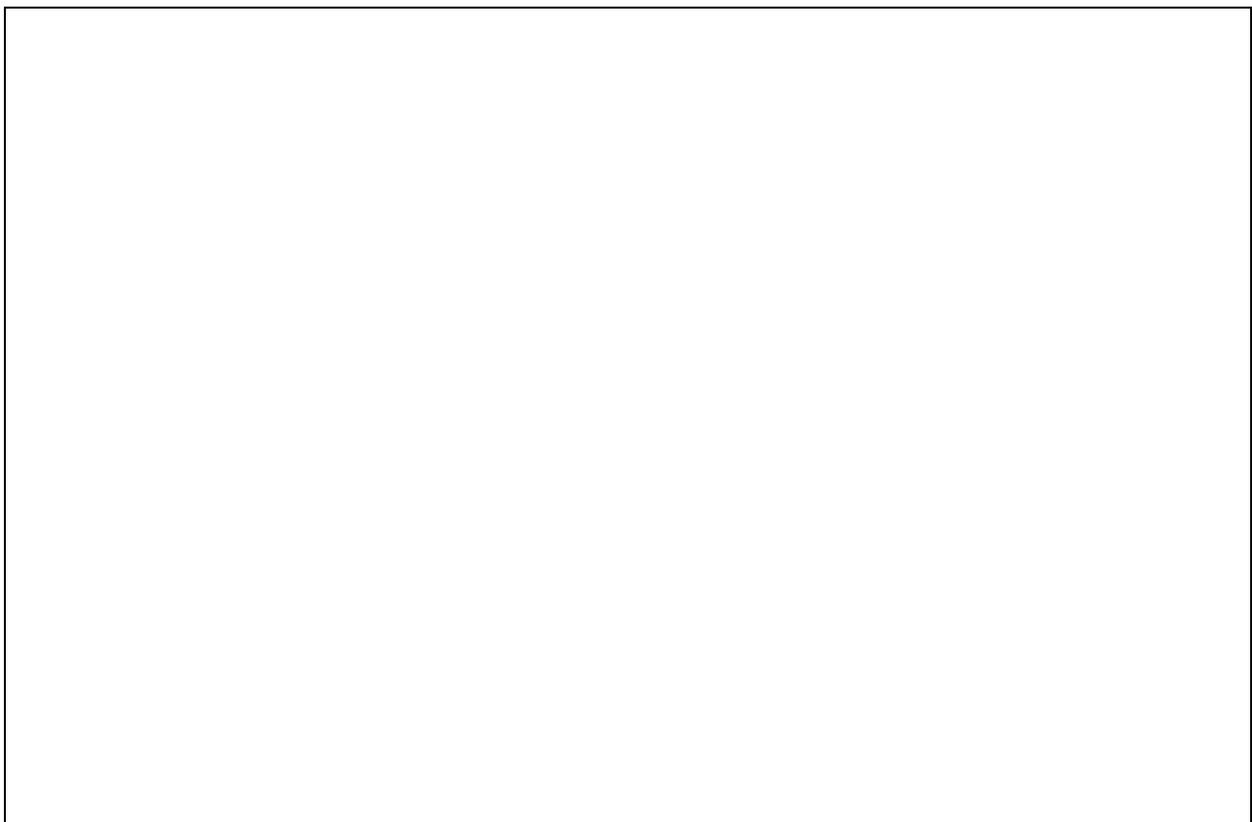


Abbildung 9. Protektion der Plasmid-DNA durch Bindung an kationische Microbubbles. Kationische und neutrale Microbubbles sowie Kontrollproben wurden zusammen mit Plasmid-DNA gemischt und mit DNase exponiert. Mittels Gelelektrophorese wurde für kationische Microbubbles eine partielle Protektion der Plasmid-DNA vor enzymatischer Degradation nachgewiesen (Bande 4). Plasmid-DNA in den Proben mit neutralen Microbubbles (Bande 5) wurden genauso vollständig abgebaut wie Plasmid-DNA, die ohne Microbubbles mit DNase inkubiert wurde (Bande 3). Modifiziert nach Wang et al. (3).

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse der in-vitro-Charakterisierung der kationischen und neutralen *Microbubbles* zusammen.

TABELLE 1. Vergleich der in-vitro-Charakterisierung kationischer und neutraler *Microbubbles*

	Dn (μm)	Dv (μm)	Zeta-Potential (mV)	DNA-Bindungs- Kapazität per 5×10^8	Protektion gegenüber DNase I
Kationische Microbubbles (BG 6775)	$1,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,5$	$+15,8 \pm 2,0$	$14,9 \pm 1,7 \mu\text{g}$	partiell
Neutrale Microbubbles (BG 6895)	$1,4 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,5$	$-0,3 \pm 0,3$	$0,27 \pm 1,5 \mu\text{g}$	nein
Statistische Signifikanz	n.s.	n.s.	$P < 0,05$	$P < 0,001$	n.a.

Dn = mittlerer Durchmesser; Dv = volumenbasierter mittlerer Durchmesser; n.s. = nicht signifikant; n.a. = nicht anwendbar

3.2 In-vitro-Gentransfer in murine Endothelzellkulturen

Der in-vitro-Gentransfer in SVR-Endothelzellen mit Ultraschall und kationischen und neutralen *Microbubbles* erfolgte zunächst unter Verwendung des Reportergens *Click beetle luciferase*, in einer darauf folgenden Versuchsreihe mit dem Kodon-optimierten Reportergen *Firefly luciferase 2*.

Der Gentransfer mit Ultraschall und *Click beetle luciferase* zeigte unter Verwendung kationischer *Microbubbles* in den transfizierten Gefäßendothelzellen 24 Stunden später als indirekten Nachweis für erfolgreichen Gentransfer und Genexpression ein mittleres Biolumineszenz-Signal von $219,0 \pm 92,5$ RLU/ μg Zellprotein, das 20-fach höher als das Ergebnis mit neutralen *Microbubbles* von $10,9 \pm 2,7$ RLU/ μg Zellprotein war ($P = 0,001$). Der Gentransfer mit kationischen *Microbubbles* lieferte ferner signifikant höhere Biolumineszenz-Signale als in den Kontrollgruppen unter alleiniger Verwendung von Ultraschall und Reportergen-DNA ($5,2 \pm 1,2$ RLU/ μg Zellprotein, $P = 0,0005$) sowie von *Microbubbles* und Reportergen-DNA ($3,5 \pm 1,9$ RLU/ μg protein, $P = 0,008$) (s. **Abbildung 10**).

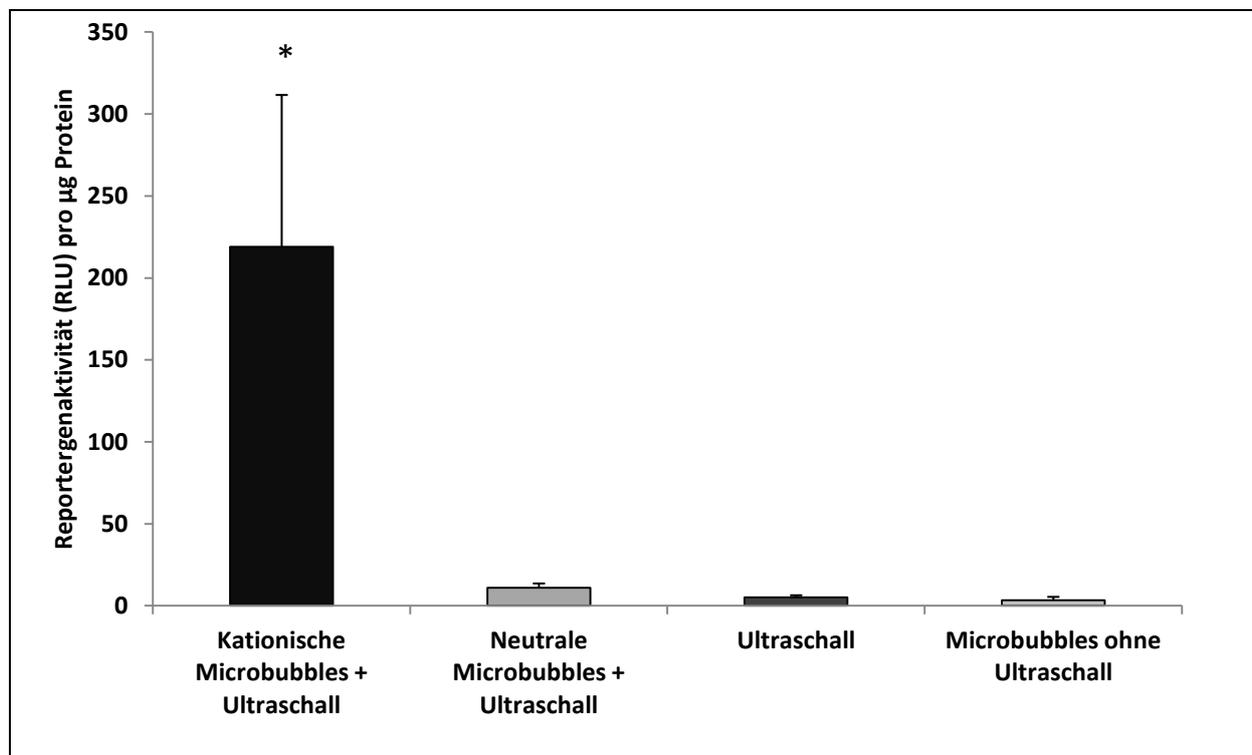


Abbildung 10. Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles in Zellkulturen. SVR-Zellen wurden mit 4 µg *Click beetle luciferase* Reporter-Gen-Plasmid unter Verwendung von Ultraschall und 5×10^7 kationischen oder neutralen Microbubbles, Ultraschall allein oder kationische Microbubbles ohne Ultraschall transfiziert. Biolumineszenzmessungen zeigten eine deutlich erhöhte Genexpression 24 h nach Transfektion für kationische Microbubbles und Ultraschall gegenüber neutralen Microbubbles (20-fach) und keinen Microbubbles (42-fach). Kationische Microbubbles ohne Ultraschall ergaben kein signifikantes Reporter-Gen-Signal. Ultraschall-Parameter: 1 Mhz, 1 W/cm², 20% *duty cycle*. Fehlerbalken = Standardabweichung. * $P < 0,007$ verglichen zu den Gruppen mit neutralen Microbubbles, keinen Microbubbles und keinem Ultraschall. Modifiziert nach Wang et al. (3).

In der folgenden Versuchsreihe lieferte der in-vitro-Gentransfer mit Ultraschall und dem Kodon-optimierten Reporter-Gen *Firefly luciferase 2* unter identischen experimentellen Bedingungen für kationische Microbubbles gleichermaßen ein 14,5-fach höheres ($P < 0.001$) Biolumineszenz-Signal von 19799 ± 4401 RLU/µg Zellprotein verglichen zu neutralen Microbubbles (1361 ± 680 RLU/µg protein). Der Gentransfer mit Ultraschall und kationischen Microbubbles zeigte gleichfalls signifikant höhere Biolumineszenz-Signale als mit Ultraschall allein (91 ± 109 RLU/µg Zellprotein; $P < 0,001$) oder Microbubbles allein (5 ± 2 RLU/µg Zellprotein; $P < 0,001$).

3.3 In-vivo-Gentransfer in murine Angiosarkom-Tumore

Der Ultraschall-vermittelte in-vivo-Gentransfer des Reportergens *Click beetle luciferase* wurde durch Messung des Biolumineszenz-Signals über dem tumortragenden Hinterbein der Versuchstiere nach 12, 24, 36 und 48 Stunden quantifiziert (s. **Abbildung 11**). Die Biolumineszenz-Bildgebung zeigte bereits 12 Stunden nach dem Gentransfer ein auf das Ultraschall-exponierte Gebiet begrenztes Signal als Zeichen für erfolgreichen Gentransfer und Genexpression. Kein in-vivo-Biolumineszenz-Signal zeigte sich über den Organen, in denen bekanntermaßen Microbubbles systemisch eliminiert werden, wozu insbesondere die Leber und die Milz zählen (107).

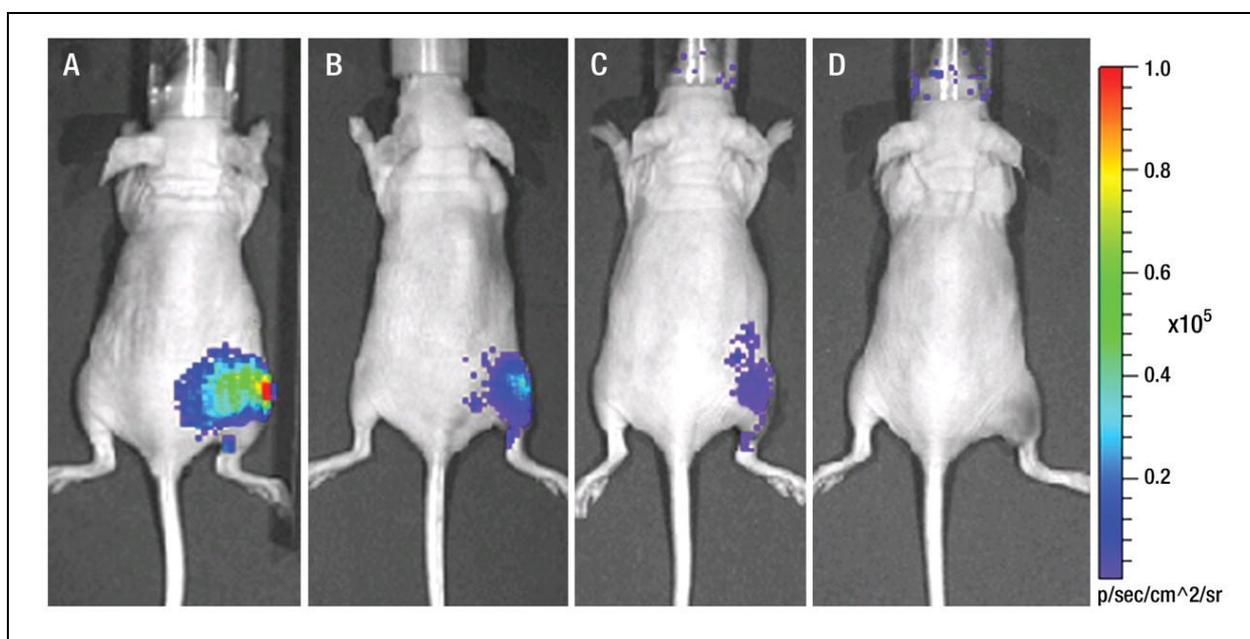


Abbildung 11. Reporterbildung nach in-vivo-Gentransfer. Repräsentative Aufnahmen der in vivo-Biolumineszenz 36 Stunden nach erfolgtem Ultraschall-vermitteltem Gentransfer in die tumortragenden Hinterbeine der Versuchstiere mittels systemischer Injektion des *Click beetle luciferase*-Reportergen-Plasmids sowie kationischer Microbubbles (A), neutraler Microbubbles (B) oder ohne Microbubbles (C). In der vierten Gruppe (D) erhielten die Mäuse eine Injektion von kationischen Microbubbles und Plasmid-DNA, ohne dass Ultraschall appliziert wurde. Die höchsten Biolumineszenzsignale wurden bei den Mäusen beobachtet, bei denen der Gentransfer mit Ultraschall und kationischen Microbubbles erfolgte (A). Biolumineszenzsignale sind angegeben in Photonen (p)/sec/cm²/Steradian (sr). Modifiziert nach Wang et al. (3).

Im direkten Vergleich erzeugte Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit kationischen Microbubbles zu allen Messzeiten ein 2,4- bis 3,5-fach höheres mittleres in-vivo-Biolumineszenzsignal ($[5,9 \pm 2,2]$ bis $[9,3 \pm 5,2] \times 10^4$ Photonen/sec/cm²/sr) im Vergleich zum Gentransfer mit neutralen Microbubbles ($[2,4 \pm 0,8]$ bis $[2,9 \pm 1,1] \times 10^4$ Photonen/sec/cm²/sr, $P < 0.0001$) und zum Gentransfer ohne Microbubbles ($[0.3 \pm 0.2]$ bis

$[1,0 \pm 1,3] \times 10^4$ Photonen/sec/cm²/sr, $P < 0,0001$) (s. **Abbildung 12**). Die negative Kontrollgruppe mit alleiniger Infusion von Reporter-gen-DNA und kationischen Microbubbles ohne Ultraschall-Exposition zeigt ein kaum messbares Biolumineszenz-Signal ($[0,1 \pm 0,1] \times 10^4$ Photonen/sec/cm²/sr).

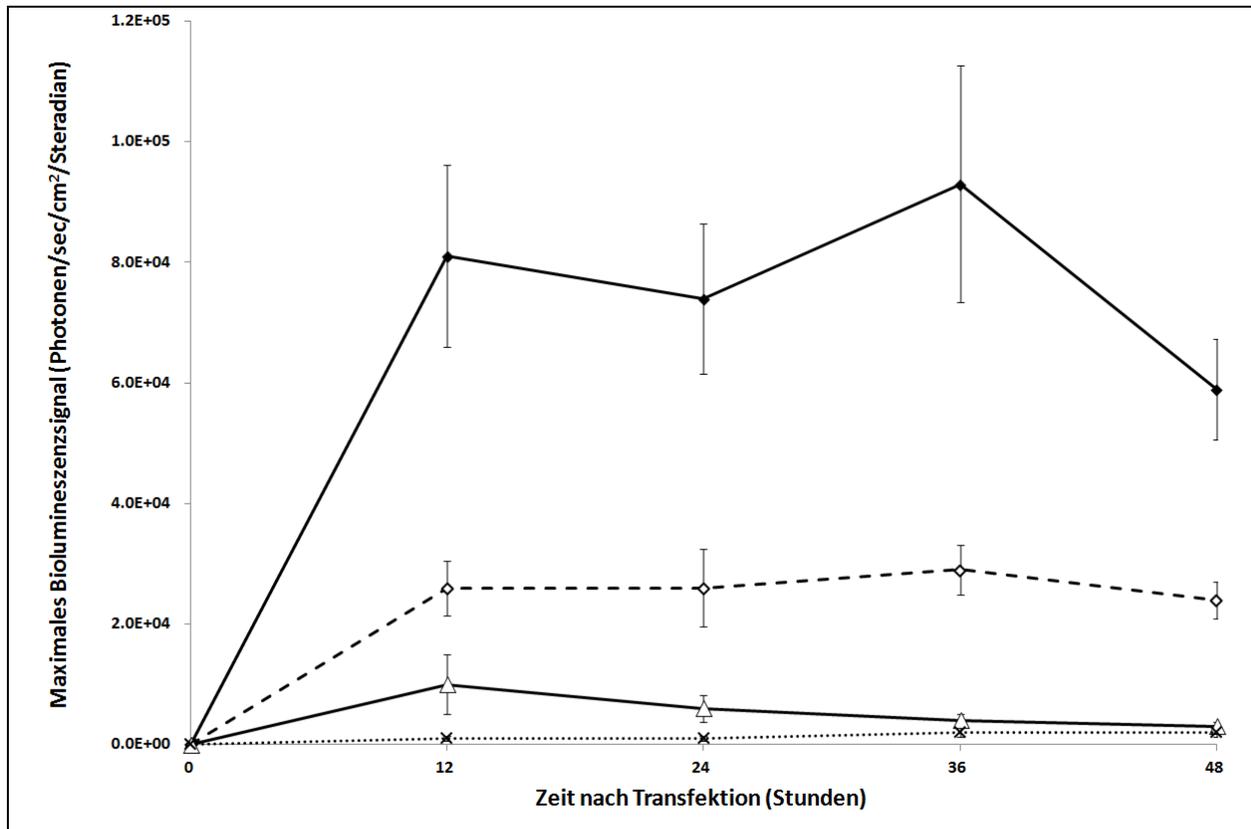


Abbildung 12. Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles in subkutane Angiosarkom-Tumore im Mausmodell. Die Kurven geben die Mittelwerte der seriellen Messungen der Click beetle luciferase-Reporter-genexpression als Biolumineszenzsignal wieder, die 12, 24, 36 und 48 Stunden nach dem Gentransfer erfolgten. Mäuse, die mit Ultraschall und kationischen Microbubbles transfiziert wurden (schwarze Karos), zeigten ein signifikant höheres Signal als die Mäuse, bei denen der Gentransfer mit neutralen Microbubbles und Ultraschall (leere Karos) oder nur mit Ultraschall (leere Dreiecke) erfolgte (jeweils n=7 pro Gruppe). Mäuse aus der Negativ-Kontrollgruppe (Kreuze, n=5) erhielten eine Injektion kationischer Microbubbles und Plasmid-DNA ohne folgende Ultraschallexposition und zeigten nur minimale Biolumineszenzsignale. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. * $P < 0,001$ für alle paarweisen Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen. Modifiziert nach Wang et al. (3).

3.3 Ex-vivo-Analyse des Gentransfers in murine Angiosarkom-Tumore

Die Quantifikation des Gentransfers durch in-vivo-Biolumineszenz-Bildgebung wurde durch die ex-vivo-Untersuchung der nach 48 Stunden entnommenen Tumoren auf Aktivität des Reportergens *Click beetle luciferase* bestätigt (s. **Abbildung 13**). Das mittlere Biolumineszenz-Signal im Zell-Lysat der mit kationischen Microbubbles transfizierten Tumore war mit $12,2 \pm 2,8$ RLU/ μ g Zellprotein signifikant größer ($P = 0,0038$) als das Signal der mit neutralen Microbubbles transfizierten Tumore ($7,01 \pm 2,3$ RLU/ μ g Zellprotein). Die Zell-Lysate der entnommenen Tumore, an denen der Gentransfer nur mit Ultraschall und ohne Microbubbles erfolgte, zeigten signifikant niedrigere Werte für die Reporterogenaktivität ($0,68 \pm 4,6$ RLU/ μ g Zellprotein) verglichen zum Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen oder neutralen Microbubbles ($P < 0,001$).

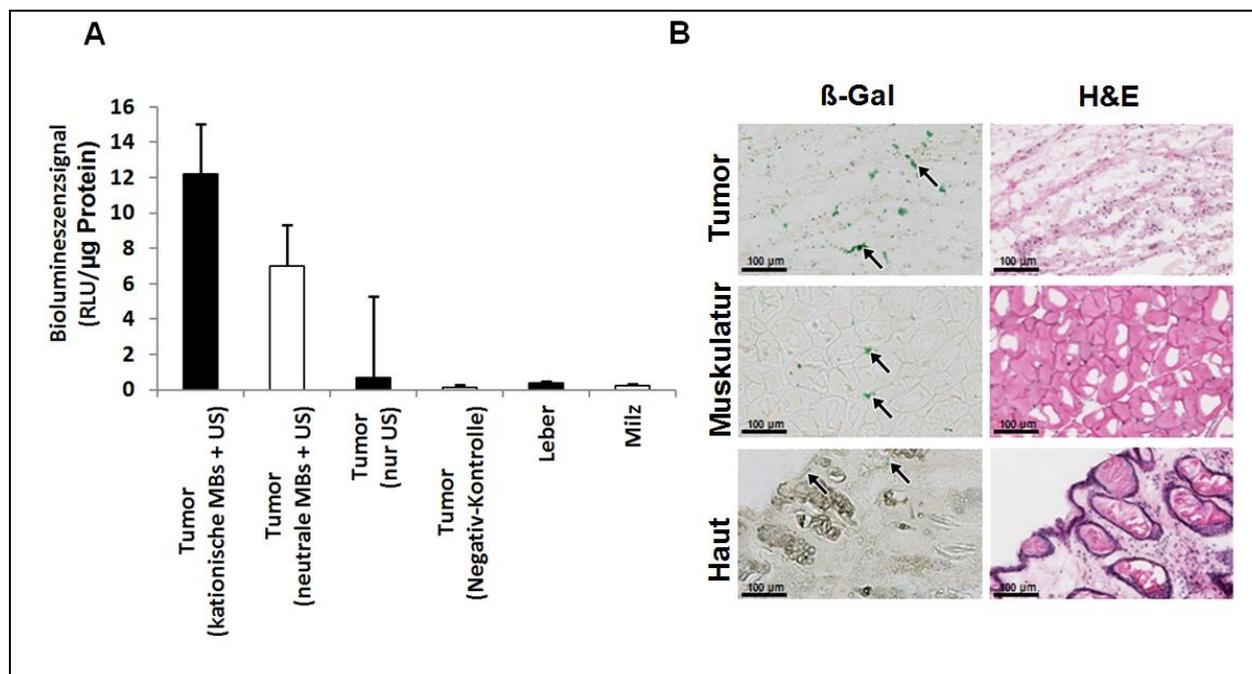


Abbildung 13. Ex-vivo-Analyse des Ultraschall-vermittelten Gentransfers im Tumormodell. Die Quantifikation der *Click beetle luciferase*-Reporterexpression in entnommenen Tumoren 48 h nach erfolgtem Gentransfer korreliert mit den Ergebnissen der in-vivo-Messungen (A): Ultraschall und kationische Microbubbles erzeugen einen höheren Gentransfer als Ultraschall mit neutralen Microbubbles oder Ultraschall allein. Leber und Milz zeigen nur eine vernachlässigbare Reporterexpression. RLU = Relative luciferase units. Die räumliche Verteilung der Genexpression 48 h nach erfolgter Transfektion (B) weist das β -Gal-Reportergen im Tumor nach, allerdings auch in der umliegenden Haut und Skelettmuskulatur. MBs = Microbubbles, H&E = Hematoxylin-Eosin-Färbung, β -Gal = β -Galaktosidase-Reportergen. RLU = Relative luciferase units.

Die Tumore der Versuchstiere, die eine alleinige Infusion von DNA und kationischen Microbubbles erhalten hatten, zeigten auch im ex-vivo-Versuch nur eine vernachlässigbar geringe Reporter-Gen-Aktivität ($0,14 \pm 0,12$ RLU/ μ g Zellprotein). Geringe Biolumineszenz-Signale wurden ebenfalls in den Zell-Lysaten der entnommenen Leber ($0,38 \pm 0,11$ RLU/ μ g Zellprotein) und Milz ($0,21 \pm 0,11$ RLU/ μ g Zellprotein) der Versuchstiere gemessen, die zuvor einem Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen Microbubbles ausgesetzt waren. Insgesamt korrelierte die ex-vivo-Biolumineszenz-Messung gut mit der vor der Tumorentnahme erfolgten in-vivo-Biolumineszenz-Bildgebung 48 Stunden nach Gentransfer ($\rho = 0,88$; $P < 0,0001$).

3.4 Dosis-Optimierungsstudie zum in-vivo-Gentransfer in die Skelettmuskulatur

Vergleich des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit kationischen und neutralen Microbubbles zu Kontrollgruppen ohne Ultraschallexposition und ohne Microbubbles. Nach Bestätigung der Überlegenheit der kationischen Microbubbles im Ultraschall-vermittelten Gentransfer im SVR-Zellkultur-Modell erfolgte die zweite in-vivo-Studie zur genaueren Analyse des Einflusses der Dosierungsverhältnisse von Reporter-Gen und Microbubbles auf das Transfektionsergebnis mittels des kodonoptimierten Reporter-Gen *Firefly luciferase 2* und der Skelettmuskulatur des Hinterbeines als Zielorgan.

Nach Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit 50μ g der *Firefly luciferase 2*-DNA und 1×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles zeigte die in-vivo-Biolumineszenz-Bildgebung der Reporter-Gen-Aktivität über dem Zielorgan einen mit der Zeit zunehmenden Signalanstieg ($P < 0,01$). Das individuelle Signalmaximum der Versuchstiere wurde zwischen 96 und 144 Stunden nach erfolgtem Gentransfer beobachtet (s. **Abbildung 14**).

Im Gegensatz hierzu zeigte die longitudinale Signalmessung in den Gruppen, in denen der Gentransfer entweder nur mit Ultraschall oder nur mit Microbubbles erfolgte, durchgehend niedrige Werte ohne signifikanten Signalanstieg ($P = 0,47$ bzw. $P = 0,75$).

Die maximale in-vivo-Reporter-Gen-Aktivität war nach Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit kationischen Microbubbles $1,5 \pm 0,7 \times 10^7$ Photonen/sec/cm²/sr) signifikant höher ($P = 0,005$) als mit neutralen Microbubbles ($1,1 \pm 0,4 \times 10^7$ Photonen/sec/cm²/sr). Gegenüber dem Ultraschall-vermittelten Gentransfer ohne Microbubbles ($3,1 \pm 1,1 \times 10^3$ Photonen/sec/cm²/sr) konnte somit auch in diesem Modell eine deutlich signifikante Erhöhung des Biolumineszenz-Signals durch die Verwendung von kationischen (4969-fach, $P < 0,001$) und neutralen Microbubbles (3654-fach, $P < 0,001$) erreicht werden.

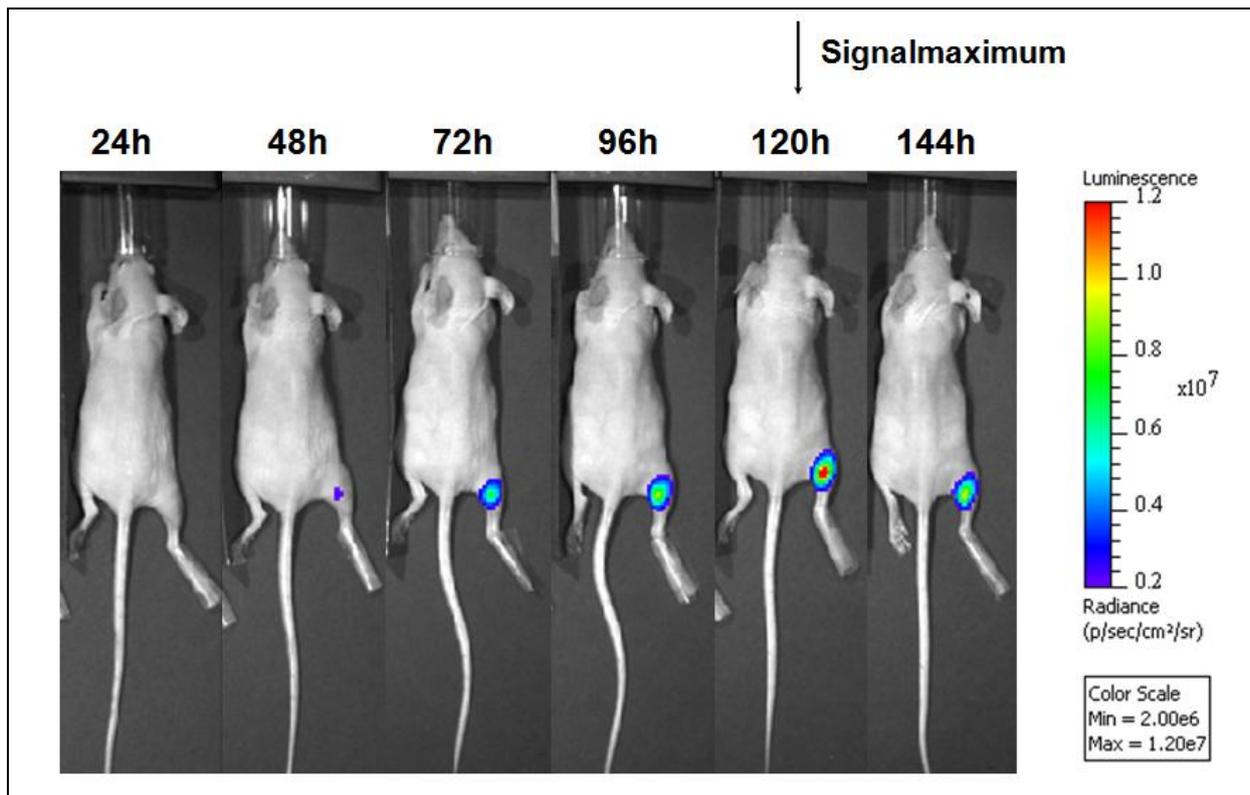


Abbildung 14. Serielle in-vivo-Biolumineszenzbildgebung zur Quantifikation der Reporterexpression nach erfolgreichem Gentransfer. Die Bilder zeigen den Verlauf der Genexpression in einer repräsentativen Maus, deren Hinterbein-Skelettmuskulatur mit 1×10^8 Microbubbles und $50 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA transfiziert worden war. Die in-vivo-Biolumineszenzbildgebung fand alle 24 h bis 144 h nach erfolgreichem Gentransfer statt. In diesem Versuchstier wurde das maximale Biolumineszenzsignal (Photonen/sec/cm²/Steradian) nach 120 h nachgewiesen. Modifiziert nach Panje et al. (2).

Im Gegensatz zur vorherigen Studie zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied ($P = 0,31$) zwischen der Gruppe mit Ultraschall-vermitteltem Gentransfer ohne Microbubbles und der alleinigen Infusion der pDNA und kationischen Microbubbles ohne Ultraschall-Exposition ($1,0 \pm 1,6 \times 10^4$ Photonen/sec/cm²/sr).

Effekt der DNA-Dosierung auf Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit Microbubbles.

Die mittleren in-vivo-Biolumineszenz-Signale über dem Zielorgan nach Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit 1×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles und verschiedener DNA-Dosierungen werden in **Abbildung 15** veranschaulicht. Die maximale Reporterexpression wurde bei der höchsten verwendeten Dosierung von $50 \mu\text{g}$ sowohl für kationische ($1,5 \pm 0,7 \times 10^7$ Photonen/sec/cm²/sr, $P = 0,04$ im Vergleich zu $37,5 \mu\text{g}$) als auch für neutrale Microbubbles ($1,1 \pm 0,4 \times 10^7$ Photonen/sec/cm²/sr, $P = 0,047$ im Vergleich zu $37,5 \mu\text{g}$) beobachtet. Die Reporterexpressionen waren signifikant höher nach Gentransfer mit kationischen Microbubbles verglichen mit neutralen Microbubbles für die DNA-Dosierungen von 10 , 25 , $37,5$ und $50 \mu\text{g}$ ($P < 0,05$). Für die DNA-Dosierung von $17,5 \mu\text{g}$ zeigte der Gentransfer mit kationischen Microbubbles ($2,6 \pm 2,9 \times 10^6$ Photonen/sec/cm²/sr)

allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,14$) zum Gentransfer mit neutralen Microbubbles ($1.4 \pm 1.3 \times 10^6$ Photonen/sec/cm²/sr).

Der Vergleich der Reporter-Gen-Aktivität nach Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit kationischen gegenüber neutralen Microbubbles korrelierte invers mit der DNA-Dosierung ($\rho = -0,90$; $P = 0,02$): Bei der geringsten DNA-Dosierung von 10 μg zeigte sich ein deutlicher Vorteil für kationische Microbubbles (Faktor 7,5), der bei der höchsten untersuchten DNA-Dosierung von 50 μg auf den Faktor 1,4 abnahm.

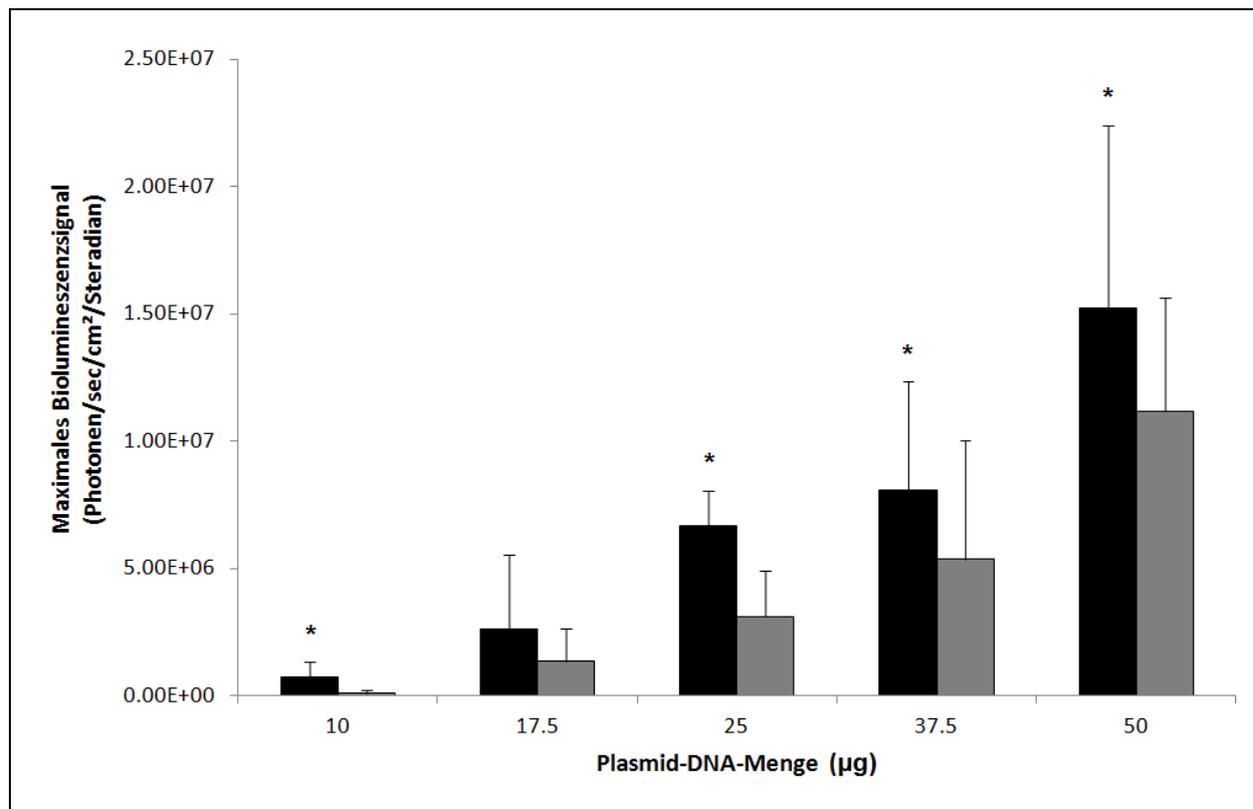


Abbildung 15. Einfluss der Plasmid-DNA-Dosierung auf den Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles. Der Gentransfer mit 1×10^8 Microbubbles steigerte sich mit zunehmender DNA-Dosierung und erreichte ein Maximum bei der höchsten untersuchten Dosierung (50 μg). Die relative Steigerung des Gentransfers mit kationischen Microbubbles (schwarze Balken) gegenüber neutralen Microbubbles (graue Balken) war am deutlichsten bei der geringsten DNA-Dosierung (10 μg) und nahm mit zunehmender Dosierung ab. * = $P < 0,05$ beim Vergleich von kationischen und neutralen Microbubbles. Fehlerbalken = Standardabweichung. Modifiziert nach Panje et al. (2).

Effekt der Microbubbles-Dosierung auf den Ultraschall-vermittelten Gentransfer.

Die mittleren in-vivo-Biolumineszenz-Signale über dem Zielorgan nach Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit 50 μg *Firefly luciferase 2*-DNA und verschiedenen Dosierungen der kationischen oder neutralen Microbubbles werden in **Abbildung 16** veranschaulicht. Insgesamt zeigte sich eine Zunahme des mittleren Biolumineszenz-Signals mit Erhöhung der

Microbubbles-Dosierung und einem maximalen mittleren Biolumineszenz-Signal bei 1×10^8 Microbubbles. Kein signifikanter Unterschied im Biolumineszenz-Signal konnte allerdings bei Erhöhung der Dosis von 1×10^8 auf 5×10^8 kationische ($P = 0,97$) oder neutrale Microbubbles ($P = 0,81$) gefunden werden.

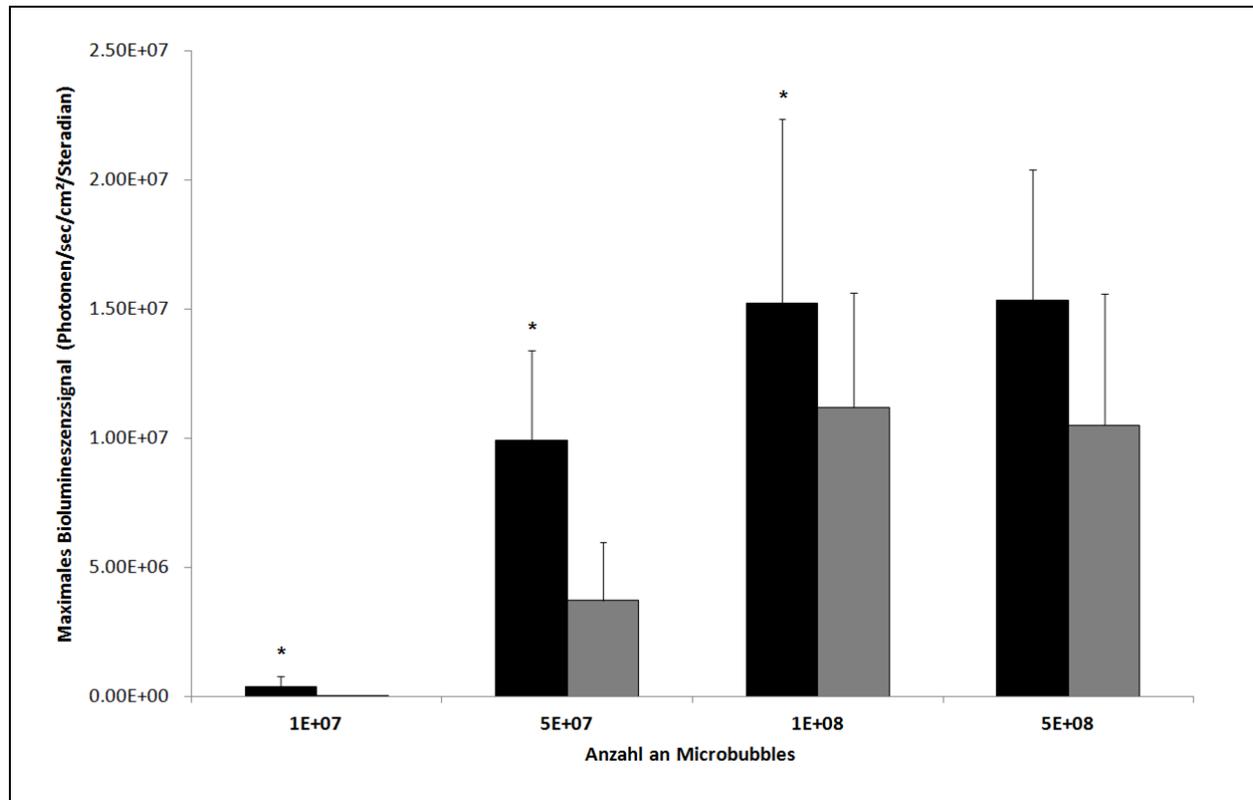


Abbildung 16. Einfluss der Microbubble-Dosierung auf den Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles. Der in-vivo-Gentransfer stieg mit zunehmender Dosis an kationischen und neutralen Microbubbles gleichermaßen an und erreichte ein Plateau bei 1×10^8 Microbubbles ohne signifikanten Anstieg des Gentransfers bei Erhöhung der Dosis auf 5×10^8 Microbubbles. Eine signifikante Steigerung des Gentransfers mit kationischen Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles zeigte sich in allen Gruppen abgesehen von der höchsten untersuchten Microbubble-Dosierung (5×10^8 Microbubbles). * = $P < 0,05$ beim Vergleich von kationischen und neutralen Microbubbles. Fehlerbalken = Standardabweichung. Modifiziert nach Panje et al. (2).

Der direkte Vergleich des Gentransfers mit kationischen und neutralen Microbubbles zeigte signifikant höhere Reporter-Gen-Aktivitäten bei der Verwendung kationischer Microbubbles für die Dosierungen von 1×10^7 , 5×10^7 , und 1×10^8 Microbubbles ($P < 0,05$), nicht aber für die höchste Microbubbles-Dosierung von 5×10^8 ($P = 0,35$). Der relative Unterschied des Gentransfers mit kationischen gegenüber neutralen Microbubbles war am deutlichsten bei der geringsten Dosierung von 1×10^7 (Faktor 27), durch Dosiserhöhung der Microbubbles aber zunehmend verringert bis auf Faktor 1,4 bei 1×10^8 Microbubbles.

4 Diskussion

Die klinische Umsetzung der Gentherapie ist in den letzten beiden Jahrzehnten im Wesentlichen aufgrund des Mangels an einer sicheren, effektiven und nicht-invasiven Methode aufgehalten worden, die genetisches Material selektiv in die erkrankten Zellen einbringen kann (44). Während virale Vektorsysteme aufgrund von beobachteten schweren Nebenwirkungen deutliche Sicherheitsbedenken aufgeworfen haben, zeigt sich bei nicht-viralen Vektoren zumeist eine relativ geringe Effektivität des Gentransfers (15, 46).

Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit Microbubbles stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um den bestehenden Mangel eines sicheren und wirksamen Vektorsystems zu überwinden, wobei ein großer Vorteil der Methode der bereits bestehende risikoarme Einsatz von Ultraschall und Microbubbles in der klinischen Bildgebung darstellt. Zusätzlich kann der Gentransfer durch gezielte Ultraschallexposition selektiv auf eine bestimmte Region beschränkt werden (59), und die Technik bietet potentiell die Möglichkeit eines zeitgleichen Therapiemonitorings durch kontrastverstärkten Ultraschall (99).

Vor dem Hintergrund jahrzehntelanger Forschung an kationischen nicht-viralen Vektoren, die DNA komplexieren können (144), wurden in den letzten Jahren Microbubbles entwickelt, die neben ihren verstärkenden Effekt auf die Sonoporation von Zellen zusätzlich eine positiv geladene Hülle besitzen, auf der DNA gebunden werden kann (117).

Die Grundlage dieser Studie stellte die Hypothese dar, dass kationische Microbubbles als Gentransporter die Fähigkeit besitzen, genetisches Material zu binden, vor enzymatischer Degradation zu schützen und somit über eine Erhöhung der lokalen Gen-Konzentration am Zielort den Ultraschall-vermittelten Gentransfer zu steigern. Obwohl bereits von mehreren Autoren angenommen (69, 105, 115), wurde diese Eigenschaft kationischer Microbubbles allerdings noch nicht in einer in-vivo-Transfektionsstudie nachgewiesen.

Um unsere Hypothese zu testen, wurden kationische Microbubbles sowie neutrale Kontroll-Microbubbles gleicher Zubereitung und Größe auf Ihre Fähigkeit überprüft, DNA zu binden sowie den Ultraschall-vermittelten Gentransfer in der Zellkultur und in einem in-vivo-Tumormodell zu verstärken. In einer zweiten in-vivo-Studie im Mausmodell wurde – vor dem Hintergrund widersprüchlicher Angaben in der kürzlich publizierten Literatur – der Vorteil kationischer Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles unter Verwendung mehrerer verschiedener DNA- und Microbubble-Konzentrationen systematisch analysiert.

4.1 In-vitro-Charakterisierung der kationischen und neutralen Microbubbles.

Kationische Microbubbles binden DNA und schützen sie vor dem Abbau durch Endonukleasen.

Kationische und neutrale Kontroll-Microbubbles gleicher Größe wurden – bis auf die Zugabe positiv geladener Phospholipide in die Hülle der kationischen Microbubbles – in identischer Weise hergestellt. Durch konfokale und Fluoreszenz-Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die fluoreszenzmarkierte Plasmid-DNA auf der Oberfläche kationischer Microbubbles, aber nicht neutraler Microbubbles gebunden wird. Mit einem Zeta-Potential von +15,8 mV konnte mittels Sättigungskurve eine maximale Bindungskapazität der kationischen Microbubbles von 0,03 pg DNA/Microbubble nachgewiesen werden, was in der gleichen Größenordnung wie die zuvor mit 0,04 pg DNA/Microbubble beschriebene Kapazität eines vergleichbaren kationischen Microbubble-Typs liegt (97). Der Ansatz, genetisches Material über elektrostatische Wechselwirkungen auf der Microbubble-Oberfläche zu binden, hat deutliche Vorteile in der Flexibilität und im Aufwand der Herstellung verglichen mit anderen Methoden wie die kovalente Bindung von Plasmid-DNA oder die Inkorporation von DNA in die Microbubble-Hülle während der Microbubble-Synthese (133, 145). DNA-Plasmide mit verschiedenen therapeutischen oder Reporter-Genen (97) oder auch andere Nukleinsäuren-basierte Therapeutika wie z.B. siRNA (small interfering RNA) oder Oligonukleotide (118) können durch simple Koinkubation spontan mit den kationischen Microbubbles verbunden werden.

Eine deutliche Limitation dieser Methode stellt allerdings die begrenzte Oberfläche der Microbubbles dar, wodurch die maximale Bindungskapazität und somit die Funktion der Microbubbles als Gentransporter zur Erhöhung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers eingeschränkt wird (69). In der Forschung werden daher neue Modelle erprobt, wie die Kapazität der Microbubbles zusätzlich erhöht werden kann (**Abbildung 17**): Bisher publizierte Lösungsansätze stellen die DNA-Beladung in mehreren Schichten (117) sowie die Beladung der Microbubbles mit Komplexen aus Liposomen und genetischem Material dar (146).

Der Expositionsversuch mit DNase ergab, dass die Konjugation der Plasmid-DNA und der kationischen Microbubbles zu einer partiellen Protektion der DNA vor enzymatischer Degradation führte. Dieses Ergebnis bestätigt bisher publizierte Studien und veranschaulicht, dass der Schutz der gebundenen Plasmid-DNA unter Verwendung kationischer Microbubbles ein plausibler Mechanismus ist, um die DNA-Konzentration am Zielort zu erhöhen und somit den Gentransfer zu steigern (115, 147).

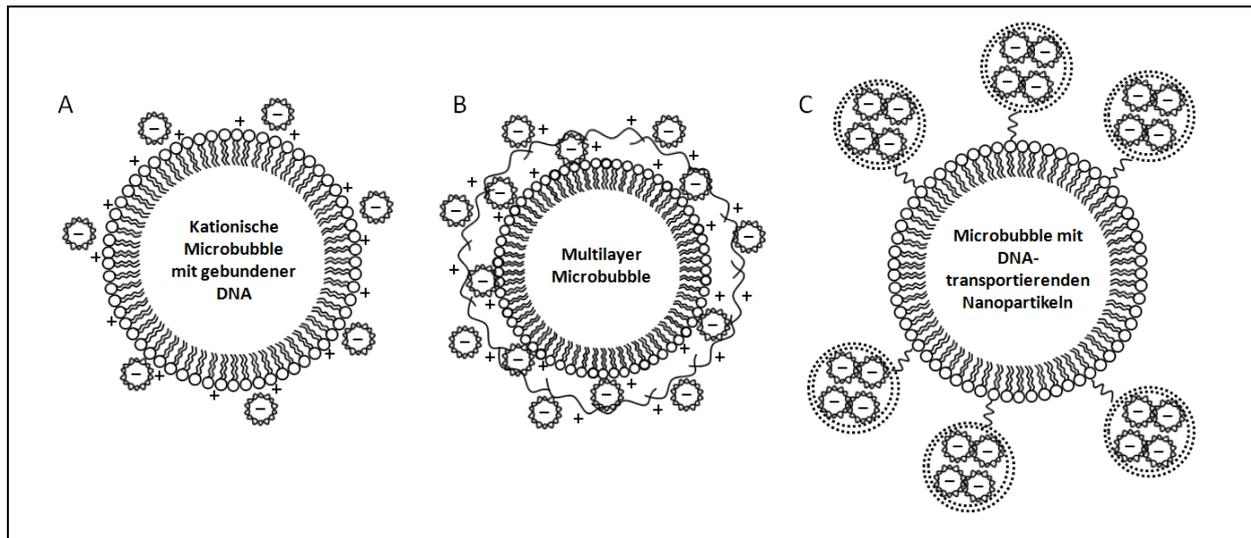


Abbildung 17. Strategien in der Microbubble-Entwicklung zur Erhöhung der DNA-Bindungs Kapazität. Kationische Microbubbles – wie in der vorliegenden Studie verwendet – können DNA über elektrostatische Wechselwirkungen auf ihrer Oberfläche binden (A). Um die Bindungskapazität zu vergrößern, können Microbubbles in mehreren Schichten mit DNA beladen werden (B). Alternativ können mit DNA komplexierte Nanopartikel an der Microbubble-Oberfläche gebunden werden (C). Modifiziert nach Panje et al. (1).

4.2 In-vitro- und in-vivo-Gentransfer in murine SVR-Angiosarkom-Zellen

Kationische Microbubbles steigern den Ultraschall-vermittelten Gentransfer gegenüber neutralen Microbubbles in Zellkulturen und in solide Tumore.

Der direkte Vergleich des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit kationischen Microbubbles verglichen zu neutralen Microbubbles zeigte eine signifikant gesteigerte Transfektion durch die Verwendung von DNA-bindenden kationischen Microbubbles in Zellkulturexperimenten (20-fach) sowie in subkutanen Tumoren im Tiermodell (2.4 bis 3.2-fach). Die vorliegende Arbeit stellt die erste Studie dar, die in einem direkten Vergleich einen erhöhten Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen gegenüber neutralen Microbubbles in einem in-vivo-Tumormodell nach intravenöser Administration nachweisen konnte. Unsere Ergebnisse ergänzen dabei die Resultate einer kürzlich publizierten Pilotstudie mit drei Mäusen pro Gruppe (148), die keinen signifikanten Unterschied im Ultraschall-vermittelten Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles eines anderen Herstellers zeigen konnten. Allerdings muss hierbei hervorgehoben werden, dass in der genannten in-vivo-Studie eine intramuskuläre Injektion der Microbubble-DNA-Komplexe durchgeführt wurde, wobei die Vorteile kationischer Microbubbles – besonders in Hinblick auf den Schutz der DNA vor enzymatischer Degradierung durch Serum-Endonukleasen im Blutkreislauf – wahrscheinlich nicht zur vollen Geltung kommen können.

Im Vergleich mit den in-vivo-Experimenten zeigten sich beim Gentransfer in der Zellkultur eine wesentlich deutlichere Überlegenheit der kationischen Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der spezielle Aufbau des Versuches: Da die Zellkulturen vor dem Gentransfer oberhalb der Lösung mit DNA und Microbubbles gelagert wurden, könnten die Komplexe aus kationischen Microbubbles und DNA durch den Gaskern der Microbubbles zusammen aufsteigen und somit die DNA-Konzentration an der Oberfläche der Endothelzellen deutlich erhöhen. Im Gegensatz hierzu ist anzunehmen, dass neutrale Microbubbles zwar gleichfalls aufsteigen, die ungebundenen Plasmide in diesen Versuchen sich allerdings über das gesamte Volumen des Mediums verteilen, wodurch sich eine deutlich geringere DNA-Konzentration an den Zelloberflächen ergibt, während beim in-vivo-Versuch im Kapillarbett die Distanz der Microbubbles zur Oberfläche der Zielzellen in jedem Fall nur wenige Mikrometer beträgt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass kationische Microbubbles in vivo nach systemischer Administration durch hämodynamische Kräfte oder auch durch Wechselwirkungen mit Serumproteinen ein anderes Bindungsverhalten als in vitro aufweisen, welches sich auf die Effektivität des Gentransfers auswirken könnte.

Ex-vivo-Lokalisierung der Transfektion im Tumor und umliegenden Gewebe.

Die räumliche Verteilung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers im Tumor und umliegenden Gewebe wurde durch eine ex-vivo-Analyse der β -Galaktosidase-Reporterexpression ermittelt. In den tumortragenden Hinterbeinen, in denen die Transfektion erfolgte, wurde die Genexpression nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in der anliegenden Muskulatur und in der Haut nachgewiesen, die ebenfalls dem Ultraschall ausgesetzt waren. Die Ergebnisse der ex-vivo-Bestimmung der Luziferase-Aktivität bestätigten außerdem unsere vorherigen Resultate der in-vivo-Biolumineszenzbildgebung, bei der ein höherer Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit kationischen Microbubbles verglichen zu neutralen Microbubbles nachgewiesen wurde, aber auch keine messbare Reporterexpression in Organregionen außerhalb der Ultraschallexposition wie etwa in der Leber oder in der Milz. Zusammengenommen folgt aus diesen Resultaten, dass selbst in den Organen, die in erster Linie für die systemische Elimination der Microbubbles und der DNA verantwortlich sind, im Gegensatz zu der dem Ultraschall ausgesetzten Region keine unspezifische Transfektion stattfindet. Ferner bestätigen unsere Ergebnisse die Aussagen vorheriger Studien (99, 149), dass Ultraschall-vermittelter Gentransfer zwar auf zellulärer Ebene nicht spezifisch ist, allerdings durch die gezielte Platzierung des Ultraschallkopfes auf umschriebene Körperregionen begrenzt werden kann.

Fortschritte in der Entwicklung des therapeutischen Ultraschalls könnten in Zukunft eine noch fokussiertere Applikation des Ultraschalls ermöglichen, wodurch die Spezifität des Gentransfers erhöht werden könnte.

4.3 Systematischer Vergleich des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit verschiedenen DNA- und Microbubble-Dosierungen in die Skelettmuskulatur.

Notwendigkeit der Studie und Wahl des Tiermodells.

Unsere initiale Studie zum Ultraschall-vermittelten Gentransfer in einem subkutanen Angiosarkom-Tumormodell hatte nachweisen können, dass kationische Microbubbles verglichen zu neutralen Kontroll-Microbubbles die Effektivität der Transfektion substantiell steigern können (3). Obwohl die Vorteile kationischer Microbubbles als Gentransporter von vielen Autoren propagiert werden (69, 71, 105, 150), wurden bisher wenige direkte Vergleichsstudien publiziert, die sich zudem weitgehend auf den Gentransfer in Zellkulturen beschränkten und dabei kontroverse Ergebnisse zeigten: Tlaxca et al. (121) konnten keinen signifikanten Unterschied für den Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles nachweisen, während Nomikou et al. (148) einen Vorteil für kationische Microbubbles beschrieben (allerdings ohne Angabe von Signifikanzwerten). In einer weiteren, oben bereits erwähnten in-vivo-Transfektionsstudie der gleichen Autoren zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied im Gentransfer mit kationischen verglichen zu neutralen Microbubbles bei direkter intramuskulärer Injektion (148). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse und basierend auf der Annahme, dass der Ultraschall-vermittelte Gentransfer mit Microbubbles von multiplen Faktoren abhängig ist, stellten wir die Hypothese auf, dass ein Vorteil in der Transfektion mit kationischen gegenüber neutralen Microbubbles nicht allgemein vorliegt, sondern erst unter bestimmten Voraussetzungen zum Vorschein tritt. Wir untersuchten in dieser Studie daher die Auswirkung verschiedener Microbubble- und DNA-Dosierungen auf die absolute Effektivität des Ultraschall-vermittelten Gentransfers sowie auf den relativen Unterschied im Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles.

Um diese systematische Analyse durchzuführen, verwendeten wir die Skelettmuskulatur in Mäusen als Zielorgan, da es sich hierbei um ein gut durchblutetes und dem Ultraschall zugängliches Organ handelt, das bereits in mehreren Publikationen zum Ultraschall-vermittelten Gentransfer für Vergleichsstudien verwendet worden ist (97, 100, 111, 151, 152). Außerdem liegt die Reproduzierbarkeit bei diesem Modell höher als bei Tumor-Modellen, bei denen das Wachstum und die Vaskularisierung des Tumors der einzelnen Versuchstiere deutlichen Schwankungen unterworfen sein kann (153), was insbesondere für die durchgeführte serielle in-vivo-Messung der Reporter-Gen-Aktivität über einen längeren Zeitraum von Bedeutung sein kann.

Kationische und neutrale Microbubbles steigern den Ultraschall-vermittelten Gentransfer im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

In den durchgeführten Versuchen wurden jeweils nur die DNA- oder Microbubble-Dosierung verändert, während alle anderen Parameter für den Gentransfer konstant gehalten wurden.

Hierbei muss herausgehoben werden, dass in den von uns durchgeführten Experimenten Microbubbles und DNA intravenös verabreicht wurden, womit eine invasive direkte intramuskuläre Injektion vermieden werden konnte, die zudem schon durch den bei der Injektion hervorgerufenen erhöhten Gewebedruck einen Gentransfer bewirken kann (46).

Nach erfolgtem Ultraschall-vermitteltem Gentransfer mit 50 µg des *Firefly luciferase 2*-Plasmids sowie 1×10^8 kationischen oder neutralen Microbubbles im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne Ultraschallexposition bzw. ohne Microbubble-Zugabe erfolgte die serielle Quantifikation der Reporter-Gen-Expression durch in-vivo-Biolumineszenzbildgebung. Im Gegensatz zu den Zellkultur-Experimenten zeigte sich keine nachweisbare Luziferase-Aktivität in der Kontrollgruppe, in der der Ultraschall-vermittelte Gentransfer ohne Zugabe von Microbubbles durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse veranschaulichen die bisherigen Beobachtungen, dass beim in-vitro- und in-vivo-Gentransfer deutlich unterschiedliche Bedingungen vorliegen (59), und erlauben die Schlussfolgerung, dass Microbubbles für Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer unter den verwendeten experimentellen Konditionen essenziell sind.

Einfluss der Microbubble- und DNA-Dosierung auf die absolute Effektivität des Ultraschall-vermittelten Gentransfers.

Die Ergebnisse der in-vivo-Transfektionsexperimente zeigten einen dosisabhängigen Anstieg des Gentransfers bei einer Erhöhung der DNA- und Microbubble-Dosierung. Der maximale Gentransfer wurde bei der höchsten untersuchten Plasmid-DNA-Dosierung von 50 µg und den beiden höchsten Microbubble-Dosierungen von 1×10^8 und 5×10^8 Microbubbles vorgefunden.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten zuvor publizierter Studien zum Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer in die Herzmuskulatur, welche sowohl eine Steigerung des Gentransfers durch Erhöhung der Microbubble-Dosierung (136) als auch durch höhere DNA-Dosen (132) nachweisen konnten. Die Korrelation zwischen erhöhter DNA-Dosis und gesteigerter Transfektion ist naheliegend, da die Transfektion maßgeblich vom Ausmaß des intrazellulären Transfers der DNA abhängig ist. Luo et al. (154) konnten nachweisen, dass die Erhöhung der lokalen DNA-Konzentration an der Zelloberfläche den Gentransfer substantiell steigern kann.

In ähnlicher Weise ist davon auszugehen, dass eine höhere Konzentration an Microbubbles in der unmittelbaren Nähe der Zielzellen den Ultraschall-vermittelten Gentransfer steigert, da hierdurch die Anzahl der potentiellen Kavitationskerne erhöht wird, die die Sonoporation der Zellmembranen und folglich die intrazelluläre Aufnahme von genetischem Material fördert (136).

Allerdings wurde unter Beibehaltung einer konstanten DNA-Dosis von 50 µg bei einer steigenden Microbubble-Dosierung bereits bei 1×10^8 kationischen sowie neutralen Microbubbles eine Sättigung des zu erreichenden Gentransfers erreicht, ohne dass dieser durch die Erhöhung der Microbubble-Dosierung auf 5×10^8 Microbubbles signifikant gesteigert werden konnte.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten anderer Autoren, die nach systemischer Injektion eine Sättigung des Gentransfers bei einer vergleichbaren Dosis von 3.6×10^8 Microbubbles ohne weiteren Anstieg bei 6×10^8 Microbubbles berichtet haben (136). Weitere Studien fanden ebenfalls ein Erreichen des maximalen Gentransfers bei Microbubble-Dosierungen vor, die kleiner als die größte untersuchte Dosis waren (65, 132, 139). Es ist daher vermutet worden, dass eine Erhöhung der Microbubble-Dosierung ohne gleichzeitige Erhöhung der DNA-Menge ab einer bestimmten DNA-Dosierung den Gentransfer nicht weiter steigern kann (136).

Andere Autoren nehmen hingegen an, dass eine starke Erhöhung der Microbubble-Konzentration einen weiteren Anstieg des Gentransfers dadurch verhindert, dass die verstärkte Sonoporation zu irreversiblen Mikroperforationen der Membranen und bleibenden Zellschaden führt (121, 155, 156). Diese Annahmen decken sich mit Zellkultur-Experimenten, in denen für höheren Microbubble-Dosierungen eine geringere Überlebensrate der Zellen nach Ultraschall- und Microbubble-Exposition berichtet worden ist (78, 157).

Obwohl sich mit den in unserer Studie verwendeten DNA-Dosierungen keine Sättigungskurve mit Plateaubildung zeigte, haben andere Autoren für den Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer eine solche Sättigungskinetik beschrieben (132). Zukünftige Studien sollten daher auch Versuche mit höheren DNA-Dosen einschließen. In Studien zum Ultraschall-vermittelten Gentransfer im Mausmodell wurden bisher die intravenöse Gabe von bis zu 200 µg berichtet (136).

Einfluss der Plasmid-DNA- und Microbubble-Dosierung auf die relative Steigerung des Gentransfers durch kationische Microbubbles.

In unserer Studie wurde gleichfalls die relative Steigerung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit kationischen Microbubbles verglichen zu neutralen Microbubbles bei den verschiedenen verwendeten DNA- und Microbubble-Dosierungen analysiert.

Bei den verschiedenen untersuchten DNA-Dosierungen konnte eine signifikant höhere Transfektion beim Gentransfer mit kationischen Microbubbles für alle Dosierungen (10, 25, 37,5 und 50 µg) außer für 17,5 µg beobachtet werden. Zwar war bei dieser pDNA-Dosierung eine 1,9-fach erhöhte Transfektion mit kationischen verglichen zu neutralen Microbubbles zu beobachten, allerdings war diese – am ehesten durch eine hohe Variabilität innerhalb der Gruppe und folglich hoher Standardabweichung – statistisch nicht signifikant. Insgesamt

zeigte der Effektivitätsvorteil der kationischen Microbubbles gegenüber den neutralen Microbubbles beim Ultraschall-vermittelten Gentransfer eine inverse Korrelation zur DNA-Dosierung, das heißt, die relative Steigerung des Gentransfers war am deutlichsten bei der niedrigsten DNA-Menge von 10 µg (Faktor 7,5) und am geringsten bei der höchsten eingesetzten Dosis von 50 µg (Faktor 1,4).

Bei den vier untersuchten Microbubble-Dosierungen zeigte sich eine gesteigerte Transfektion durch kationische Microbubbles verglichen zu neutralen Microbubbles für 1×10^7 , 5×10^7 , und 1×10^8 Microbubbles, allerdings nicht für 5×10^8 Microbubbles. Dieser Effekt kann allerdings nicht allein durch eine höhere Variabilität begründet werden. In Analogie zum Vergleich aufsteigender DNA-Dosierungen zeigte sich die höchste relative Steigerung des Gentransfers mit kationischen Microbubbles gegenüber neutralen Microbubbles bei der geringsten Dosierung (27-fach bei 1×10^7 Microbubbles), wohingegen höhere Microbubble-Dosierungen nur eine moderate Steigerungsrate aufwiesen (1,4-fach bzw. 1,5-fach bei 1×10^8 und 5×10^8 Microbubbles).

Unsere Hypothese war in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (69, 115, 117, 121), dass kationische Microbubbles durch ihre Fähigkeit, DNA elektrostatisch zu binden, den Gentransfer steigern können, da sie dadurch die DNA vor enzymatischem Abbau schützen und erst wieder Ultraschall-vermittelt in der unmittelbaren Nähe der Zielzellen freisetzen. Da die Sonoporation der Zielzelle im direkten Umfeld der Microbubbles stattfindet (78), wird angenommen, dass durch die Ansammlung von DNA auf der Oberfläche kationischer Microbubbles somit eine größere Menge an genetischem Material zum intrazellulären Transfer durch die neu geschaffenen kurzlebigen Membranporen zur Verfügung steht, als wenn die DNA frei im Kreislauf zirkulieren würde (69).

In Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse ist die Interpretation naheliegend, dass unsere Hypothese zumindest bei den geringeren untersuchten Microbubble- und DNA-Dosierungen bestätigt werden kann. Höhere systemische DNA- und Microbubble-Dosierungen scheinen allerdings eine ausreichend hohe Konzentration an Microbubbles und DNA in der unmittelbaren Nähe der Zielzellen für einen effektiven Gentransfer zu bewirken, ohne dass dabei die oben beschriebene Fähigkeit der kationischen Microbubbles zum Gentransport noch bedeutsam ins Gewicht fällt. Ferner kann man annehmen, dass höhere DNA-Gesamtdosen nur zu einem geringen prozentuellen Anteil enzymatisch abgebaut werden können, sodass ein Schutz durch Bindung an kationische Microbubbles keine signifikante Steigerung an verfügbarer intakter DNA für den Gentransfer bewirkt.

Schlussfolgerungen.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass kationische Microbubbles den Ultraschall-vermittelten Gentransfer gegenüber neutralen Microbubbles am deutlichsten steigern, wenn geringe Microbubble- oder DNA-Dosierungen verwendet werden. Hieraus

lässt sich umgekehrt schließen, dass die Vorteile der kationischen Microbubbles bei systemischer Gabe höherer DNA- und Microbubble-Konzentrationen aufgehoben werden. Unsere Dosis-Optimierungsstudie liefert somit entscheidende Einblicke, wie die erhöhte Effektivität der kationischen Microbubbles für den Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer am besten genutzt werden kann: Obwohl ein effektiver Gentransfer mit hohen Dosen von neutralen Microbubbles genauso wie mit kationischen Microbubbles erzielt wurde, wird eine klinische Umsetzung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit großer Wahrscheinlichkeit eine Dosislimitierung aus Sicherheitsgründen erfordern. Kationische Microbubbles könnten somit eine bedeutende Rolle spielen, einen effektiven Gentransfer mit geringeren Dosen zu erzielen. Gerade vor dem Hintergrund, dass die Translation der Methode zur Behandlung von Patienten im Gegensatz zum Tiermodell deutliche höhere Gesamtdosen benötigen wird, könnten kationische Microbubbles auch dazu beitragen, durch die Ermöglichung einer Dosisreduktion die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens zu steigern.

4.4 Limitationen

Wenngleich unsere Studie wichtige Erkenntnisse zum Einfluss kationischer Microbubbles auf den Ultraschall-vermittelten Gentransfer liefern kann, sollten folgende Limitationen erwähnt werden, die die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken können:

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit Microbubbles im Tiermodell. Die Studien zum in-vitro-Gentransfer erfolgten – basierend auf bisher publizierten Experimenten und eigenen Pilotstudien – unter Verwendung eines festen experimentellen Aufbaus. Angesichts der Tatsache, dass Erkenntnisse aus dem in-vitro-Gentransfer nicht unmittelbar auf Versuche im Tiermodell übertragen werden können (59), wurde auf eine in-vitro-Optimierungsstudie verzichtet.

Obwohl in der Studie im subkutanen Tumormodell die Verteilung der Mäuse auf die einzelnen Gruppen randomisiert wurde, muss von Unterschieden in der Perfusion und im Wachstum der Tumore ausgegangen werden (153), was zu Schwankungen in der Effektivität des Gentransfers innerhalb einer Behandlungsmodalität führen kann. In zukünftigen Studien könnte die Quantifikation des Gentransfers durch Ultraschall-gestützte Tumorausmessung und dreidimensionale Perfusionsbildgebung normalisiert werden, um potentielle Störgrößen zu eliminieren.

Eine weitere Limitation des Tumormodells stellt der begrenzte Zeitraum der Biolumineszenzbildgebung zur seriellen Quantifikation der Genexpression nach erfolgter Transfektion dar. Aufgrund des aggressiven Wachstums der Tumore war es nicht möglich, die Reporter-gen-Expression länger als 48 Stunden zu verfolgen, da die Versuchstiere gemäß der Richtlinien der *Administrative Panel on Laboratory Animal Care* der Stanford

University bei Tumoren über 1,75 cm Größe und bei exulzerierten Tumoren euthanasiert werden mussten (158). Außerdem wurde in dieser Studie nicht untersucht, ob die Steigerung des Gentransfers durch kationische Microbubbles unter anderen experimentellen Bedingungen – wie etwa Ultraschall-Parameter, Microbubble- und DNA-Dosierungen sowie anderen Zielorganen – weiterhin bestehen bleiben würde.

Die zweite Studie im Tiermodell zielte daher darauf, den Einfluss kationischer Microbubbles auf den Gentransfer unter Verwendung verschiedener DNA- und Microbubble-Dosierungen und der Skelettmuskulatur als stabiles Zielgewebe über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dennoch bleibt die nachgewiesene Effektivitätssteigerung durch kationische Microbubbles auf die verwendeten Microbubble-Typen und den speziellen Protokollen beim Gentransfer beschränkt. Weitere Studien müssen bestätigen, ob die gewonnenen Erkenntnisse auch auf kationische Microbubbles anderer Hersteller und auf andere Zielorgane zu generalisieren sind.

Schließlich wurde der Gentransfer mit kationischen und neutralen Microbubbles nicht speziell auf mögliche toxische Nebenwirkungen untersucht. Obwohl Microbubbles und Ultraschall in der Klinik bereits als sicheres diagnostisches Verfahren verwendet werden, erfordern die beim Gentransfer benötigten höheren Dosen eine genauere Evaluation. Hierbei sollte in zukünftigen Studien auch untersucht werden, ob kationische und neutrale Microbubbles Unterschiede in der Toxizität aufweisen.

5 Zusammenfassung

Die Gentherapie wird bereits seit über zwei Jahrzehnten als Behandlungsoption mit potentiell kurativem Ansatz für Krebserkrankungen in präklinischen und klinischen Studien erforscht. Es wurden zahlreiche therapeutische Verfahren entwickelt, die durch das Einbringen von genetischem Material in Tumorzellen deren Funktion normalisieren oder die Zellen gezielt in den Zelltod führen. Als bedeutendste Hürde für die Einführung der Methode als klinische Standardtherapie hat sich allerdings das Fehlen eines effektiven, spezifischen und sicheren Vektorsystems herausgestellt, um die therapeutischen Gene in vivo in die Zielzellen zu transportieren.

Ultraschall-vermittelter Gentransfer mit Microbubbles stellt ein vielversprechendes experimentelles Verfahren zur Gentherapie dar, das im Gegensatz zu viralen Vektoren über ein hervorragendes Sicherheitsprofil verfügt und dessen Wirkung durch lokal begrenzte Ultraschall-Applikation wirkungsvoll gesteuert werden kann.

Ultraschall-vermittelter Gentransfer basiert auf der vorübergehenden Perforation von Zellmembranen (Sonoporation), ein Effekt, der in Gegenwart von Microbubble-Kontrastmittel deutlich verstärkt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde in vitro sowie im Mausmodell die Effektivität des Ultraschall-vermittelten Gentransfers mit ungeladenen Standard-Microbubbles gegenüber neuartigen kationischen Microbubbles verglichen. In in-vitro-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass kationische Microbubbles genetisches Material auf Ihrer Oberfläche binden und gegen enzymatische Degradation schützen können sowie den Gentransfer in vitro um den Faktor 20 steigern.

Im in-vivo-Tumormodell zeigte sich ein signifikant höherer Gentransfer mit kationischen Microbubbles verglichen zu Standard-Microbubbles im umschriebenen Gebiet der Ultraschall-Exposition. Die folgende in-vivo-Dosisoptimierungsstudie ergab, dass sich die Steigerung des Ultraschall-vermittelten Gentransfers durch kationische Microbubbles verglichen mit Standard-Microbubbles besonders bei geringen Dosierungen von Microbubbles und DNA zeigte (bis um den Faktor 27), während dieser Effekt bei höheren Dosen neutralisiert wurde und der Unterschied nicht mehr signifikant war.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass kationische Microbubbles eine wirkungsvolle Methode darstellen, um bei geringeren Dosierungen den Ultraschall-vermittelten in-vivo-Gentransfer signifikant zu steigern. Basierend auf diesen Resultaten ist es wahrscheinlich, dass in zukünftigen Studien ein effektiver Gentransfer und therapeutischer Effekt mit kationischen Microbubbles auch mit niedrigen Dosierungen erreicht werden kann, wodurch die Wirtschaftlichkeit dieser Methode erhöht wird und potentielle Nebenwirkungen verringert werden könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Panje CM, Wang DS, Willmann JK. Ultrasound and Microbubble-Mediated Gene Delivery in Cancer: Progress and Perspectives. *Invest Radiol* 2013; (Im Druck).
2. Panje CM, Wang DS, Pysz MA, et al. Ultrasound-mediated gene delivery with cationic versus neutral microbubbles: effect of DNA and microbubble dose on in vivo transfection efficiency. *Theranostics* 2012; 2:1078-1091.
3. Wang DS, Panje C, Pysz MA, et al. Cationic versus neutral microbubbles for ultrasound-mediated gene delivery in cancer. *Radiology* 2012; 264:721-732.
4. Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep* 2009; 57:1-134.
5. Albrecht T, McKee M, Alexe DM, Coleman MP, Martin-Moreno JM. Making progress against cancer in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2008; 44:1451-1456.
6. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* 2012; 23:1044-1052.
7. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63:11-30.
8. Welch HG, Schwartz LM, Woloshin S. Are increasing 5-year survival rates evidence of success against cancer? *JAMA* 2000; 283:2975-2978.
9. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1784-1792.
10. Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Trends in colorectal cancer incidence rates in the United States by tumor location and stage, 1992-2008. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21:411-416.
11. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis* 2012; 16:175-204.
12. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:220-241.
13. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:243-252.
14. Hayat MJ, Howlander N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12:20-37.
15. Flotte TR. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol* 2007; 213:301-305.
16. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide: Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials. <http://www.abedia.com/wiley/indications.php> (Tag des Zugriffs: 01.06.2013).
17. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* 2007; 9:833-842.
18. Scollay R. Gene therapy: a brief overview of the past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953:26-30.
19. Greenberg AJ, McCormick J, Tapia CJ, Windebank AJ. Translating gene transfer: a stalled effort. *Clin Transl Sci* 2011; 4:279-281.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
21. Dienstmann R, Markman B, Tabernero J. Application of monoclonal antibodies as cancer therapy in solid tumors. *Curr Clin Pharmacol* 2012; 7:137-145.
22. Cao S, Cripps A, Wei MQ. New strategies for cancer gene therapy: progress and opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37:108-114.
23. Penuelas I, Haberkorn U, Yaghoubi S, Gambhir SS. Gene therapy imaging in patients for oncological applications. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32 Suppl 2:S384-403.
24. Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003; 3:13-26.
25. Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2007; 28:4-41.
26. Thomas SM, Grandis JR. The current state of head and neck cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 2009; 20:1565-1575.
27. El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 2004; 498:1-8.

28. Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61:554-571.
29. Samaranyake H, Maatta AM, Pikkarainen J, Yla-Herttuala S. Future prospects and challenges of antiangiogenic cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 2010; 21:381-396.
30. Mahvi DM, Henry MB, Albertini MR, et al. Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA--results of a phase I/IB clinical trial. *Cancer Gene Ther* 2007; 14:717-723.
31. Signori E, Iurescia S, Massi E, et al. DNA vaccination strategies for anti-tumour effective gene therapy protocols. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59:1583-1591.
32. Loisel-Meyer S, Foley R, Medin JA. Immuno-gene therapy approaches for cancer: from in vitro studies to clinical trials. *Front Biosci* 2008; 13:3202-3214.
33. Gabilovich DI. INGN 201 (Advexin): adenoviral p53 gene therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:823-832.
34. Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:55-61.
35. Ponzilli R, Katz S, Baryte-Lovejoy D, Penn LZ. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. *Eur J Cancer* 2005; 41:2485-2501.
36. Shillitoe EJ. Gene therapy: the end of the rainbow? *Head Neck Oncol* 2009; 1:7.
37. Tong AW, Jay CM, Senzer N, Maples PB, Nemunaitis J. Systemic therapeutic gene delivery for cancer: crafting Paris' arrow. *Curr Gene Ther* 2009; 9:45-60.
38. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 2011; 12:316-328.
39. Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 2006; 4:218-227.
40. Brenner MK, Okur FV. Overview of gene therapy clinical progress including cancer treatment with gene-modified T cells. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:675-681.
41. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999; 401:517-518.
42. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80:148-158.
43. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302:415-419.
44. Deneffe PP. Introduction to gene therapy: a clinical aftermath. *Methods Mol Biol* 2011; 737:27-44.
45. Aiuti A, Bachoud-Levi AC, Blesch A, et al. Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther* 2007; 14:1555-1563.
46. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* 2009; 11:671-681.
47. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008; 29:3477-3496.
48. Liu D, Ren T, Gao X. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 2003; 10:1307-1315.
49. Gautam A, Waldrep JC, Kleinerman ES, et al. Aerosol gene therapy for metastatic lung cancer using PEI-p53 complexes. *Methods Mol Med* 2003; 75:607-618.
50. Dass CR, Choong PF. The use of chitosan formulations in cancer therapy. *J Microencapsul* 2008; 25:275-279.
51. Guo J, Cheng WP, Gu J, et al. Systemic delivery of therapeutic small interfering RNA using a pH-triggered amphiphilic poly-L-lysine nanocarrier to suppress prostate cancer growth in mice. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45:521-532.
52. Walther W, Siegel R, Kobelt D, et al. Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7545-7553.
53. Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 2007; 15:2063-2069.
54. Goudy KS, Wang B, Tisch R. Gene gun-mediated DNA vaccination enhances antigen-specific immunotherapy at a late preclinical stage of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Clin Immunol* 2008; 129:49-57.
55. Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004; 11 Suppl 1:S33-42.
56. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* 2006; 13:1313-1319.
57. Varga CM, Tedford NC, Thomas M, Klibanov AM, Griffith LG, Lauffenburger DA. Quantitative comparison of polyethylenimine formulations and adenoviral vectors in terms of intracellular gene delivery processes. *Gene Ther* 2005; 12:1023-1032.

58. Lindner JR. Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:527-532.
59. Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther* 2007; 14:465-475.
60. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:255-260.
61. Machet L, Belot V, Naouri M, et al. Preoperative measurement of thickness of cutaneous melanoma using high-resolution 20 MHz ultrasound imaging: A monocenter prospective study and systematic review of the literature. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35:1411-1420.
62. Rasulo FA, De Peri E, Lavinio A. Transcranial Doppler ultrasonography in intensive care. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2008; 42:167-173.
63. Duvshani-Eshet M, Machluf M. Therapeutic ultrasound optimization for gene delivery: a key factor achieving nuclear DNA localization. *J Control Release* 2005; 108:513-528.
64. Tachibana K, Feril LB, Jr., Ikeda-Dantsuji Y. Sonodynamic therapy. *Ultrasonics* 2008; 48:253-259.
65. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 2002; 105:1233-1239.
66. Collis J, Manasseh R, Liovic P, et al. Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles. *Ultrasonics* 2010; 50:273-279.
67. Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IR. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med* 2012; 31:623-634.
68. Deckers R, Moonen CT. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery. *J Control Release* 2010; 148:25-33.
69. Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1153-1166.
70. Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in-vivo characterization. *J Control Release* 2010; 148:368-372.
71. Ferrara KW, Borden MA, Zhang H. Lipid-shelled vehicles: engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery. *Acc Chem Res* 2009; 42:881-892.
72. Park K. Microbubble ultrasound-guided targeted delivery to tumors. *J Control Release* 2012; 157:167.
73. Manome Y, Nakamura M, Ohno T, Furuhashi H. Ultrasound facilitates transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2000; 11:1521-1528.
74. Marmottant P, Hilgenfeldt S. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature* 2003; 423:153-156.
75. Geers B, Lentacker I, Alonso A, et al. Elucidating the Mechanisms Behind Sonoporation with Adeno-Associated Virus-Loaded Microbubbles. *Mol Pharm* 2011; 8:2244-2251.
76. Kimmel E. Cavitation bioeffects. *Crit Rev Biomed Eng* 2006; 34:105-161.
77. Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1103-1116.
78. Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet* 2002; 27:115-134.
79. Pitt WG, Hussein GA, Staples BJ. Ultrasonic drug delivery--a general review. *Expert Opin Drug Deliv* 2004; 1:37-56.
80. Datta S, Coussios CC, McAdory LE, et al. Correlation of cavitation with ultrasound enhancement of thrombolysis. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32:1257-1267.
81. Tung YS, Vlachos F, Choi JJ, Deffieux T, Selert K, Konofagou EE. In vivo transcranial cavitation threshold detection during ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice. *Phys Med Biol* 2010; 55:6141-6155.
82. Greenleaf WJ, Bolander ME, Sarkar G, Goldring MB, Greenleaf JF. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24:587-595.
83. Brujan EA, Ikeda T, Matsumoto Y. Jet formation and shock wave emission during collapse of ultrasound-induced cavitation bubbles and their role in the therapeutic applications of high-intensity focused ultrasound. *Phys Med Biol* 2005; 50:4797-4809.
84. Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J* 2003; 84:3087-3101.
85. Wu J, Ross JP, Chiu JF. Reparable sonoporation generated by microstreaming. *J Acoust Soc Am* 2002; 111:1460-1464.

86. Wei W, Zheng-zhong B, Yong-jie W, Qing-wu Z, Ya-lin M. Bioeffects of low-frequency ultrasonic gene delivery and safety on cell membrane permeability control. *J Ultrasound Med* 2004; 23:1569-1582.
87. Juffermans LJ, Dijkmans PA, Musters RJ, Visser CA, Kamp O. Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H1595-1601.
88. Lawrie A, Brisken AF, Francis SE, et al. Ultrasound-enhanced transgene expression in vascular cells is not dependent upon cavitation-induced free radicals. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29:1453-1461.
89. Miller DL, Thomas RM. Ultrasound contrast agents nucleate inertial cavitation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1995; 21:1059-1065.
90. Zhou Y, Yang K, Cui J, Ye JY, Deng CX. Controlled permeation of cell membrane by single bubble acoustic cavitation. *J Control Release* 2011; 157:103-111.
91. Hauser J, Ellisman M, Steinau HU, Stefan E, Dudda M, Hauser M. Ultrasound enhanced endocytotic activity of human fibroblasts. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35:2084-2092.
92. Meijering BD, Juffermans LJ, van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res* 2009; 104:679-687.
93. Miller DL, Qudus J. Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:661-667.
94. Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 1998; 98:1264-1267.
95. Caskey CF, Stieger SM, Qin S, Dayton PA, Ferrara KW. Direct observations of ultrasound microbubble contrast agent interaction with the microvessel wall. *J Acoust Soc Am* 2007; 122:1191-1200.
96. Kooiman K, Emmer M, Foppen-Harteveld M, van Wamel A, de Jong N. Increasing the endothelial layer permeability through ultrasound-activated microbubbles. *IEEE Trans Biomed Eng* 2010; 57:29-32.
97. Christiansen JP, French BA, Klibanov AL, Kaul S, Lindner JR. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29:1759-1767.
98. Nie F, Xu HX, Lu MD, Wang Y, Tang Q. Anti-angiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma mediated by microbubble-enhanced ultrasound exposure: an in vivo experimental study. *J Drug Target* 2008; 16:389-395.
99. Carson AR, McTiernan CF, Lavery L, et al. Gene therapy of carcinoma using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37:393-402.
100. Li YS, Davidson E, Reid CN, McHale AP. Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer Lett* 2009; 273:62-69.
101. Bhatia VK, Senior R. Contrast echocardiography: evidence for clinical use. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:409-416.
102. Quaia E. Microbubble ultrasound contrast agents: an update. *Eur Radiol* 2007; 17:1995-2008.
103. Piscaglia F, Lencioni R, Sagrini E, et al. Characterization of focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36:531-550.
104. Cosgrove D, Blomley M. Liver tumors: evaluation with contrast-enhanced ultrasound. *Abdom Imaging* 2004; 29:446-454.
105. Tinkov S, Bekeredjian R, Winter G, Coester C. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *J Pharm Sci* 2008.
106. Pysz MA, Foygel K, Panje CM, Needles A, Tian L, Willmann JK. Assessment and monitoring tumor vascularity with contrast-enhanced ultrasound maximum intensity persistence imaging. *Invest Radiol* 2011; 46:187-195.
107. Willmann JK, Cheng Z, Davis C, et al. Targeted microbubbles for imaging tumor angiogenesis: assessment of whole-body biodistribution with dynamic micro-PET in mice. *Radiology* 2008; 249:212-219.
108. Tartis MS, Kruse DE, Zheng H, et al. Dynamic microPET imaging of ultrasound contrast agents and lipid delivery. *J Control Release* 2008; 131:160-166.
109. Perkins AC, Frier M, Hindle AJ, et al. Human biodistribution of an ultrasound contrast agent (Quantison) by radiolabelling and gamma scintigraphy. *Br J Radiol* 1997; 70:603-611.
110. Talu E, Lozano MM, Powell RL, Dayton PA, Longo ML. Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device. *Langmuir* 2006; 22:9487-9490.

111. Wang X, Liang HD, Dong B, Lu QL, Blomley MJ. Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology* 2005; 237:224-229.
112. Stewart VR, Sidhu PS. New directions in ultrasound: microbubble contrast. *Br J Radiol* 2006; 79:188-194.
113. Aoi A, Watanabe Y, Mori S, Takahashi M, Vassaux G, Kodama T. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2008; 34:425-434.
114. Zolocheska O, Figueiredo ML. Advances in sonoporation strategies for cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4:988-1006.
115. Lentacker I, De Geest BG, Vandenbroucke RE, et al. Ultrasound-responsive polymer-coated microbubbles that bind and protect DNA. *Langmuir* 2006; 22:7273-7278.
116. Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL, Gallo RC. Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther* 1997; 4:226-237.
117. Borden MA, Caskey CF, Little E, Gillies RJ, Ferrara KW. DNA and polylysine adsorption and multilayer construction onto cationic lipid-coated microbubbles. *Langmuir* 2007; 23:9401-9408.
118. Haag P, Frauscher F, Gradl J, et al. Microbubble-enhanced ultrasound to deliver an antisense oligodeoxynucleotide targeting the human androgen receptor into prostate tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102:103-113.
119. Frenkel V. Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1193-1208.
120. Hauff P, Seemann S, Reszka R, et al. Evaluation of gas-filled microparticles and sonoporation as gene delivery system: feasibility study in rodent tumor models. *Radiology* 2005; 236:572-578.
121. Tlaxca JL, Anderson CR, Klibanov AL, et al. Analysis of in vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36:1907-1918.
122. McCaffrey A, Kay MA, Contag CH. Advancing molecular therapies through in vivo bioluminescent imaging. *Mol Imaging* 2003; 2:75-86.
123. Iyer M, Sato M, Johnson M, Gambhir SS, Wu L. Applications of molecular imaging in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2005; 5:607-618.
124. Waerzeggers Y, Monfared P, Viel T, Winkeler A, Voges J, Jacobs AH. Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. *Methods* 2009; 48:146-160.
125. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:591-607.
126. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003; 17:545-580.
127. Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* 1996; 173:5-11.
128. Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002; 4:235-260.
129. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; 8:1-33.
130. Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, et al. Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides. *J Med Chem* 1964; 7:574-575.
131. Burn SF. Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining. *Methods Mol Biol* 2012; 886:241-250.
132. Chen S, Shohet RV, Bekeredjian R, Frenkel P, Grayburn PA. Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:301-308.
133. Chen S, Ding JH, Bekeredjian R, et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8469-8474.
134. Duvshani-Eshet M, Machluf M. Efficient transfection of tumors facilitated by long-term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting. *Cancer Gene Ther* 2007; 14:306-315.
135. Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release* 2008; 125:137-144.
136. Alter J, Sennoga CA, Lopes DM, Eckersley RJ, Wells DJ. Microbubble stability is a major determinant of the efficiency of ultrasound and microbubble mediated in vivo gene transfer. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35:976-984.

137. Watanabe A, Otake R, Nozaki T, et al. Effects of microbubbles on ultrasound-mediated gene transfer in human prostate cancer PC3 cells: comparison among Levovist, YM454, and MRX-815H. *Cancer Lett* 2008; 265:107-112.
138. Passineau MJ, Zourelis L, Machen L, Edwards PC, Benza RL. Ultrasound-assisted non-viral gene transfer to the salivary glands. *Gene Ther* 2010; 17:1318-1324.
139. Sakai T, Kawaguchi M, Kosuge Y. siRNA-mediated gene silencing in the salivary gland using in vivo microbubble-enhanced sonoporation. *Oral Dis* 2009; 15:505-511.
140. Invitrogen: MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells. .
<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18258012.pdf> (Tag des Zugriffs: 01.06.2013).
141. Qiagen: EndoFree Plasmid Maxi Kit. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Plasmid-DNA/EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit#resources> (Tag des Zugriffs: 01.06.2013).
142. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
143. Sigma-Aldrich: β-Galactosidase Reporter Gene Staining Kit.
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/galsbul.Par.0001.File.tmp/galsbul.pdf> (Tag des Zugriffs: 14.06.2013).
144. Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 2006; 116:255-264.
145. Frenkel PA, Chen S, Thai T, Shohet RV, Grayburn PA. DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28:817-822.
146. Vandembroucke RE, Lentacker I, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Ultrasound assisted siRNA delivery using PEG-siPlex loaded microbubbles. *J Control Release* 2008; 126:265-273.
147. Liu F, Shollenberger LM, Conwell CC, Yuan X, Huang L. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J Gene Med* 2007; 9:613-619.
148. Nomikou N, Tiwari P, Trehan T, Gulati K, McHale AP. Studies on neutral, cationic and biotinylated cationic microbubbles in enhancing ultrasound-mediated gene delivery in vitro and in vivo. *Acta Biomater* 2011; 8:1273-1280.
149. Koike H, Tomita N, Azuma H, et al. An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. *J Gene Med* 2005; 7:108-116.
150. Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. *J Control Release* 2006; 114:89-99.
151. Liang HD, Lu QL, Xue SA, et al. Optimisation of ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in skeletal muscle cells. *Ultrasound Med Biol* 2004; 30:1523-1529.
152. Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther* 2003; 10:396-405.
153. Willmann JK, Paulmurugan R, Chen K, et al. US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice. *Radiology* 2008; 246:508-518.
154. Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 2000; 18:893-895.
155. Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23:953-959.
156. Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, Apkarian RP, Zarnitsyn V, Prausnitz MR. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32:915-924.
157. Otani K, Yamahara K, Ohnishi S, Obata H, Kitamura S, Nagaya N. Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. *J Control Release* 2009; 133:146-153.
158. Stanford University Administrative Panel of Laboratory Animal Care: .
https://labanimals.stanford.edu/docs/guidelines-pdfs/Guidelines_Maintenance_Tumors_Hybridomas_Rodents.pdf (Tag des Zugriffs: 16.06.2013).

7 Anhang



Stanford University
Stanford, California 94305-5401

Michael E. Moseley, Ph.D

(650) 723-4550

IACUC Chair

(650) 725-8013 FAX

VERIFICATION OF

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) APPROVAL

Date: May 29, 2009

To: Juergen Karl Willmann, Radiology - Diagnostic Radiology
 David Stephen Wang, Nirupama Suresh Deshpande, Marybeth Anne Pysz

Protocol Title: "Ultrasound and microbubble enhanced therapeutic delivery and local effects of radiotherapy, genes therapy, drugs, and stem cells"

Funding: Department Name: Radiology, PTA: 1062330-100-DAADL

Assurance Number: A3213-01

Approval Period: 05/28/2009 THROUGH 05/27/2010

Review Type: NEW

Protocol ID: 21637

The IACUC approved this protocol transaction on 05/28/2009. Prior to initiation of animal studies, if this study involves biohazardous or radioactive agents, you must obtain Biosafety Panel or Radiological Safety Panel approval.

The expiration date of this approval is 05/27/2010 at Midnight. If this project is to continue past that date, you must submit an updated protocol (renewal) in advance for IACUC re-approval. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IACUC. No changes may be initiated without prior approval by the IACUC, except where deemed necessary by veterinary staff. (Any such exceptions must be reported to the IACUC within 10 working days). The PD must notify the IACUC promptly of any complications that occur (see <http://labanimals.stanford.edu/protocols/index.html> for information on reporting complications).

All continuing protocols (renewals) must be reviewed and re-approved before the expiration date. It is your responsibility to resubmit the protocol to the IACUC for annual renewal.

Please remember that protocol records related to this study must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. (See Policy on Retention of and Access to Research Data, Research Policy Handbook, <http://stanford.edu/dept/DoR/rph/2-10.html>.)

Michael E. Moseley, Ph.D.

Michael E. Moseley, Ph.D, IACUC Chair.

8 Danksagungen

Bei meinem Betreuer an der Stanford University, Herrn Professor Dr. med. Jürgen Willmann, möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Arbeit am vorliegenden Forschungsprojekt ermöglicht hat und dass ich von ihm von der Planung bis zur Publikation maßgeblich unterstützt worden bin.

Der gleiche Dank gilt den damaligen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Marybeth Pysz und Dr. David Wang, von denen ich während des Forschungsjahres an der Stanford University freundlich aufgenommen worden bin und die mich in die experimentelle Forschung eingearbeitet haben.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich mich für die großzügige finanzielle und ideelle Unterstützung meines Auslandsjahres bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich während der Zeit im Ausland aus der Ferne begleitet haben und während des gesamten Studiums für mich da gewesen sind.

Schließlich danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Jürgen Dunst, für die Betreuung meiner Promotion in Lübeck sowie dafür, dass er in mir die Begeisterung für die radiologischen Fächer und die Onkologie geweckt hat.

9 Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

Panje CM, Wang DS, Willmann JK: *Ultrasound and Microbubble-Mediated Gene Delivery in Cancer: Progress and Perspectives*. Investigative Radiology. 2013; 48 (11): 755-769.

Panje CM, Wang DS, Pysz, MA, Paulmurugan R, Ren Y, Tranquart F, Tian L, Willmann JK: *Ultrasound-Mediated Gene Delivery with Cationic Versus Neutral Microbubbles: Effect of DNA and Microbubble Dose on In Vivo Transfection Efficiency*. Theranostics. 2012; 2(11): 1078-1091.

Wang DS, **Panje C**, Pysz MA, Paulmurugan R, Rosenberg J, Gambhir SS, Schneider M, Willmann JK: *Cationic versus Neutral Microbubbles for Ultrasound-mediated Gene Delivery in Cancer*. Radiology. 2012 Sep;264(3):721-32.

Pysz MA, Foygel K, **Panje CM**, Needles A, Tian L, Willmann JK: *Assessment and monitoring tumor vascularity with contrast-enhanced ultrasound maximum intensity persistence imaging*. Invest Radiol. 2011 Mar;46(3):187-95.

Vorträge und Poster

Panje C, Papachristofilou A, Zilli T, Dal Pra A, Herrera F, Najafi Y, Zwahlen D, Plasswilm D, Putora PM: *Primary Radiotherapy for Prostate cancer: Patterns of Practice in Switzerland*. 18. Jahresversammlung der SASRO (Scientific Association of Swiss Radiation Oncology). 27. – 29. März 2014. Lugano, Schweiz.

Panje CM, Weder P, Henke G, Plasswilm L. *Adjuvant Radiotherapy for Breast Cancer is Safely Feasible in a Patient Affected by Darier's Disease*. 18. Jahresversammlung der SASRO (Scientific Association of Swiss Radiation Oncology). 27. – 29. März 2014. Lugano, Schweiz.

Putora PM, **Panje C**, Hundsberger T, Van Leyen K, Ess S, Plasswilm L, Früh M. *Favorable Survival of Women with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) after Resection of Brain Metastases (BM) and Whole Brain Radiotherapy (WBRT)*. IALSC 15th World Conference on Lung Cancer. 27.-31. Oktober 2013. Sydney, Australien.

Panje C, Pysz MA, Wang DS, Ren Y, Schneider M, Willmann JK: *Influence of Microbubble and DNA Doses on in Vivo Ultrasound-mediated Gene Delivery with Cationic vs Neutral Microbubbles*. 96th Scientific Assembly and Annual Meeting of the Radiological Society of North America, 28. November - 3. Dezember 2010. Chicago, Illinois, USA.

Panje C, Pysz MA, Wang DS, Ren Y, Schneider M, Willmann JK: *In Vivo Ultrasound-mediated Gene Delivery with Cationic and Neutral Microbubbles: Effect of Varying Microbubble and DNA Doses*. World Molecular Imaging Congress 2010, 8 – 11. September 2010. Kyoto, Japan.

Pysz MA, **Panje CM**, Gambhir S, Schneider M, Willmann JK: *Pre-clinical Evaluation of Novel Clinically-Translatable KDR-Targeted Microbubbles for Molecular Ultrasound Imaging of Angiogenesis in Cancer*. World Molecular Imaging Congress 2009, 23. – 26. September 2009. Montreal, Kanada.

Pysz MA, **Panje CM**, Wang DS, Deshpande NS, Willmann JK: *Maximum Intensity Persistence Analysis is a Sensitive and Reliable Tool to Quantitate Tumor Angiogenesis with Ultrasound Imaging*. World Molecular Imaging Congress 2009, 23. – 26. September 2009. Montreal, Kanada.

Wang DS, Pysz MA, Paulmurugan R, **Panje CM**, Gambhir S, Schneider M, Willmann JK: *Enhanced Ultrasound-Mediated Gene Delivery with Cationic Microbubbles in a Mouse Model of Tumor Angiogenesis*. World Molecular Imaging Congress 2009, 23. – 26. September 2009. Montreal, Kanada.