

## Wissenschaftlicher Bericht - FZKA 6505 Zusammenfassung

Die Lipofektion, der durch Lipide vermittelte Übertrag genetischen Materials in Zellen (Transfektion), ist eine viel versprechende Technik für die somatische Gentherapie. Allerdings wurde bis heute noch kein ideales Transfektionslipid gefunden. Eine systematische Suche, ein *Screening*, nach neuen, effektiven und nicht toxischen Transfektionslipiden könnte dazu beitragen, ideale Lipide zu identifizieren und die Lipofektion noch weiter zu verbessern.

Um eine Vielzahl kationischer Lipide und Lipidmischungen hinsichtlich ihres Transfektionsverhaltens untersuchen und vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur automatisierten Lipofektion im Mikrotiter-Plattenformat entwickelt. Hierzu wurden die einzelnen Bereiche eines Lipofektionsexperiments – Herstellung von Liposomen, Bildung von Lipid/DNA-Komplexen, Transfektion sowie Assays zur Bestimmung der Transfektionseffizienz – speziell für das 96-Well-Format entwickelt. Jeder Teilschritt wurde separat optimiert und konnte anschließend erfolgreich auf einen zur Verfügung stehenden Pipettierroboter übertragen werden.

Mit Hilfe des automatisierten Lipofektionsverfahrens wurde das Transfektionsverhalten von 36 kationischen Lipid(mischung)en in einem Screening in 6 für gentherapeutische Fragestellungen interessanten Zelllinien verglichen. Für jede Zelllinie konnte je eine *Hitliste* der effizientesten Lipide bzw. -mischungen sowie der am wenigsten toxischen, effizienten Lipide erstellt werden. Das hier entwickelte Testverfahren erlaubte selbst für schwer transfizierbare Zellen, wie z. B. HUVEC, die Identifikation geeigneter Transfektionslipide. Aus der großen Menge an Daten wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Lipiden und ihrem Transfektionsverhalten (bzgl. Transfektionseffizienz, Zytotoxizität, Einfluss von Helferlipiden) abgeleitet. Zwischen den einzelnen Zellsystemen zeigten sich zelltypspezifische Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Lipide. Diese deuten auf unterschiedliche Lipoplexenaufnahmemechanismen hin.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Kinetik und der Mechanismus der Lipoplexaufnahme exemplarisch an COS-7-Zellen untersucht. Die Aufnahme von DOTAP/pCMXluc-Lipoplexen verläuft nach einer langsamen, linearen Kinetik. Nur ein Teil der auf den Zellen anhaftenden Lipoplexe wird tatsächlich von diesen internalisiert. Durch Einsatz spezifischer Endozytoseinhibitoren konnte gezeigt werden, dass COS-7-Zellen Lipid/DNA-Komplexe hauptsächlich über einen ATP-abhängigen Endozytosemechanismus aufnehmen.

Das in dieser Arbeit entwickelte, automatisiert durchführbare Lipofektionsverfahren liefert die Voraussetzung für weitere Screeningexperimente. Aufgrund seiner Sensitivität können auch schwer zu transfizierende Zellen eingesetzt werden. Auf der Basis dieser Untersuchungen können weiterführende Studien in anderen Zellsystemen durchgeführt werden. Dadurch sollte es möglich sein, die zellulären Mechanismen noch besser zu verstehen und zur Optimierung der Lipofektion einzusetzen.

**Development of an automated screening method for identification of new transfection lipids and investigation on the mechanism of lipofection**

Lipofection, i. e. the transfer of genetic material into cells (transfection) mediated by lipids, represents a promising method for somatic gene therapy. Until now, no ideal transfection lipid has been described. A systematical screening for finding new, effective, and non-toxic lipids may thus serve to identify ideal transfection lipids and, hence, to optimize lipofection.

For investigation and comparison of the transfection properties of a large number of cationic lipids (including combinations of lipids), an automated method for lipofection in microtiter plates has been developed. Accordingly, all parts of a lipofection experiment – preparation of liposomes, formation of DNA/lipid-complexes, cell transfection, as well as determination of lipofection efficiency – were specifically adapted to 96-well microtiter plates. All steps were optimized separately and then successfully transferred to a pipetting robot.

By means of the automated lipofection method, the transfection behaviour of 36 cationic lipids and lipid combinations could be studied in a screening with six cell lines, resulting in *hit lists* of the most efficient lipids as well as of the least toxic, efficient lipids in each cell line. The automated lipofection method thus allowed identification of favorable, effective lipids even in cell lines like HUVEC which are difficult to transfect. The huge amount of screening data served to derive structure-activity relationships between the lipids and their transfection behaviour (concerning transfection efficiency, cytotoxicity, influence of helper lipids). Cell type-specific differences were observed between the different cell lines probably indicating differences in lipoplex uptake.

To confirm this hypothesis, the kinetics as well as the mechanism of lipoplex uptake into COS-7 cells (as an exemplary cell line) were studied. DOTAP/pCMXluc-lipoplexes were shown to be internalized slowly (by first order kinetics). The cells internalized only a part of the lipoplexes adhering to the cell surface. Using specific inhibitors of endocytosis, COS-7 cells were shown to endocytose DNA/lipid-complexes predominantly by an ATP-dependent mechanism.

The automated lipofection method my thesis describes represents a solid basis for further screening experiments. Due to its high sensitivity, it even allows the use of cells which are difficult to transfect. Based on these results, future studies using other cell systems ought to further clarify the cellular mechanisms of lipofection to be used for further cell-specific optimization of the lipofection method.