Stefanie Seemann (Autor)
Gasgefüllte Mikropartikel - ein neues nichtvirales Gentransfersystem

Gasgefüllte Mikropartikel – ein neues nichtvirales Gentransfersystem

Stefanie Seemann

Cuvillier Verlag Göttingen

https://cuvillier.de/de/shop/publications/3668

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Gentherapie 1

1.2 Gentransfer 4

1.2.1 Virale Gentransfersysteme 5

1.2.2 Nichtvirale Gentransfersysteme 7

1.3 Systeme für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung 9

1.3.1 Ultraschallinduzierte Wirkstofffreisetzung 13

1.4 Ziel der Arbeit 15

2 Material und Methoden **17**

2.1 Material 17

2.1.1 Chemikalien 17

2.1.2 Kits 18

2.1.3 Lösungen und Puffer 18

2.1.4 Bakterienkulturmedium 20

2.1.5 Zellkulturmedien 20

2.1.6 Verbrauchsmaterial 21

2.1.7 Geräte 21

2.1.8 Plasmide, Bakterienstämme und Zellkulturen 22

2.1.9 Versuchstiere und Tiermodelle 22

2.2 Methoden 23

2.2.1 Sterilisation von Chemikalien, Lösungen und Geräten 23

2.2.2 Zell- und molekularbiologische Methoden 23

2.2.3 Herstellung von gasgefüllten Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid)-Mikropartikeln 32

2.2.4 Verkapselung von Plasmid-DNA in gasgefüllte PLGA-Mikropartikel 33

2.2.5 Extraktion von Plasmid-DNA aus PLGA-Mikropartikeln 34

2.2.6 Pharmazeutische Charakterisierung der PLGA-Mikropartikel 35

2.2.7 Akustische Charakterisierung von gasgefüllten PLGA-Mikropartikeln 37

2.2.8 Quantitative Bestimmung der verkapselten DNA 39

2.2.9 Freisetzungskinetik der verkapselten DNA *in vitro* 42

2.2.10 Transfektion von Zellkulturen mit DNA-haltigen PLGA-Mikropartikeln 43

2.2.11 Transfektionsversuche *in vivo* an einem Tiermodell 44

2.2.12 Histologische Methoden 47

3 Ergebnisse **49**

3.1 Charakterisierung von PLGA-Mikropartikeln 49

3.1.1 Verkleinerung der Ansatzgröße für die Verkapselung von Plasmid-DNA 49

3.1.2 Modifizierung der Standardpartikelformulierung 50

3.1.3 Morphologie der PLGA-Mikropartikel 50

3.1.4 Größenverteilung der PLGA-Mikropartikel 58

3.1.5 Dämpfungseigenschaften der PLGA-Mikropartikel 61

3.2 Verkapselung von DNA in PLGA-Mikropartikel 63

3.3 DNA-Verkapselungseffizienz von PLGA-Mikropartikeln 66

3.3.1 Bestimmung der Verkapselungseffizienz mit einem Fluoreszenzmarker 67

3.3.2 Bestimmung der Verkapselungseffizienz mit radioaktiv markierter DNA 69

3.4 *In vitro* Freisetzung von DNA aus PLGA-Mikropartikeln 71

3.5 *In vitro* Transfektion mit PLGA-Mikropartikeln 75

3.6 *In vivo* Transfektion mit PLGA-Mikropartikeln 78

3.6.1 Intraarterielle Substanzapplikation 78

3.6.2 Intravenöse Substanzapplikation 81

4 Diskussion **85**

4.1 Herstellung von gasgefüllten PLGA-Mikropartikeln 85

4.1.1 Alternative Herstellungsmethoden und Formulierungen 86

4.1.2 Verkleinerung des Standardansatzes 88

4.1.3 Herstellung von DNA-haltigen PLGA-Mikropartikeln 89

4.1.4 Dämpfungsverhalten von gasgefüllten PLGA-Mikropartikeln 89

4.1.5 Größenverteilung von gasgefüllten PLGA-Mikropartikeln 90

4.2 Verkapselung von Plasmid-DNA in PLGA-Mikropartikeln 91

4.2.1 Anforderungen an die DNA 91

4.2.2 Lokalisation der DNA 93

4.2.3 Verkapselungseffizienz der PLGA-Mikropartikel 96

4.2.4 *In vitro* Freisetzungskinetik der DNA 100

4.3 DNA-haltige PLGA-Mikropartikel als Gentransfersystem 102

4.3.1 *In vitro* Transfektion mit DNA-haltigen PLGA-Mikropartikeln 102

4.3.2 *In vivo* Transfektion mit DNA-haltigen PLGA-Mikropartikeln 104

4.4 Ausblick 105

5 Zusammenfassung 109