

# Herstellung, zelluläre Prozessierung und Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme



INAUGURALDISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE  
DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE, PHARMAZIE UND GEOWISSENSCHAFTEN  
DER ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG IM BREISGAU

vorgelegt von  
Sebastian Schneider  
aus Koblenz

2010



Die praktischen Arbeiten zur Erstellung dieser Dissertationsschrift wurden im Zeitraum von Juli 2006 bis Januar 2010 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Dekan:	Prof. Dr. Harald Hillebrecht
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Referentin:	Prof. Dr. Regine Süss
Korreferent:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Drittprüfer:	Prof. Dr. Dieter Meyer
Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	6. Mai 2010



## **Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

### **Publikationen:**

Schneider S, Süss R; *Spectral Bio-Imaging and Confocal Imaging of the Intracellular Distribution of Lipoplexes*; in Liposomes; Volkmar Weissig (ed.); Humana Press; Totowa, N.J. (2010).

Manuskript im Druck

Hantel C, Lewrick F, Schneider S, Zwermann O, Perren A, Reinicke M, Süss R, Beuschlein F; *Anti insulin-like growth factor 1 receptor targeted immunoliposomes: a formulation combining two anticancer treatments with enhanced therapeutic efficiency*; J Clin Endocrinol Metab; (2010).

Manuskript im Druck

Schneider S, Lenz D, Holzer M, Palme K, Süss R; *Intracellular FRET analysis of lipid/DNA complexes using flow cytometry and fluorescence imaging techniques*.

Manuskript zur Publikation eingereicht

Schneider S, Steinbach A, Süss R; *Uptake, cellular processing and intracellular dissociation of lipid/DNA complexes in different cellular models*.

Manuskript fertig gestellt

## Posterpräsentationen:

Schneider S, Peschka-Süss R

*Fluorescence studies on the cellular processing of lipoplexes.*

DPhG-Jahrestagung, Erlangen, 2007.

Schneider S, Peschka-Süss R

*Intracellular trafficking of lipid/DNA complexes in MDCK cells.*

Controlled Release Society German Chapter, Annual Meeting, Braunschweig, 2008.

Schneider S, Peschka-Süss R

*Investigating uptake and cellular processing of lipoplexes in MDCK cells.*

6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, 2008.

Schneider S, Peschka-Süss R

*Highlighting gene therapy systems: endocytosis of lipid/DNA complexes.*

Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Universität Freiburg, Freiburg, 2008.

Schneider S, Steinbach A, Peschka-Süss R

*Processing of lipid/DNA complexes in different cellular models.*

Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Universität Freiburg, Freiburg, 2009.

## **Vorträge:**

Schneider S, Peschka-Süss R

*Liposomes and Lipoplexes: Studies on cellular processing using Spectral Bioimaging.*  
18<sup>th</sup> Mountain/Sea Liposome Workshop, Ameland, 2006.

Lenz D, Schneider S, Peschka-Süss R, Palme K

*Analysis of cytotoxicity of Si nano beads.*

Bonsai (Bio-imaging with Smart Functional Nanoparticles) meeting, Mailand, 2008.

Schneider S, Melzig M F, Peschka-Süss R

*Endocytosis of lipid/DNA complexes: uptake and cellular processing in MDCK cells.*  
19<sup>th</sup> Mountain/Sea Liposome workshop, Oberjoch/Allgäu, 2008.

Schneider S, Peschka-Süss R

*Nicht-virale Gentherapie: zelluläre Barrieren bei der Endozytose von Lipid/DNA Komplexen*

Symposium des Fördervereins für Arzneimittelforschung (FAF), Freiburg, 2008.

Schneider S, Süss R

*Lipid/DNA complexes - from complexation to decomplexation.*

8. Pharmazie-Workshop, Oberjoch/Allgäu, 2009.

Schneider S, Süss R

*Lipid-mediated gene transfer: from complexation to decomplexation.*

DPhG Doktorandentagung, Pichlarn-Aigen, 2009.



## Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Regine Süss für die wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung und das Vertrauen in meine Arbeit. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rolf Schubert danke ich gleichermaßen für die wissenschaftliche Betreuung, Unterstützung und die Möglichkeit, meine Promotion in einem lebendigen Arbeitskreis entfalten zu können.

Mein Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich:

Meinen Kooperationspartnern:

Herrn Prof. Dr. Dieter Meyer für die interessante Kooperation rund um den NR1-Rezeptor und die Bereitschaft, das Amt des Dritprüfers zu übernehmen.

Herrn Dr. Dominik Lenz für den CellProfiler und die einzigartige Zusammenarbeit am FRET-Projekt. Herrn Prof. Dr. Klaus Palme für die Korrekturen und Hilfestellungen bei der Veröffentlichung dieses Projekts.

Frau Dr. Felicitas Lewrick für viele hilfreiche Diskussionen, Ratschläge und die erfolgreiche Kooperation zur intrazellulären Prozessierung von DXR Liposomen.

Herrn Dr. Martin Holzer für seine „stets offene Tür“ - nicht nur bei der Synthese des Cy5-DOPE.

Herrn Dr. Holger Weiß für die Durchführung der Gelelektrophorese-Versuche.

Frau Dr. Vanessa Bunjes für die Einführung in das Lektin-*targeting*.

Herrn Alexander Burghardt für seine große Unterstützung bei der Durchführung der HPTLC-Experimente.

Herrn Dr. Roland Nitschke und dem Life Imaging Center für die Betreuung und Nutzung der konfokalen Mikroskope.

Frau Sabine Barnert für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Ina Stumpf für ihr großes Engagement bei der Charakterisierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme.

Frau Anna Gronert, Frau Yanitsa Atanasova und Frau Judith Jakoby für die wertvolle Mitarbeit im Rahmen eines Praktikums.

Meinen Freunden und Kollegen:

...am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für das „Wohlfühl“-Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank an Frau Nuria Beltran-Sanchez für ihre Unterstützung bei allen bürokratischen Fragen und Problemen.

Danke an Herrn Wolf Michaelis und Herrn Dr. Herbert Bochow für die angenehme Zusammenarbeit.

Für viele heitere Momente bei der gemeinsamen Betreuung von Studentenpraktikas danke ich Alice Theobald, Christian Zimmer und Michael Drechsler.

...in meiner Arbeitsgruppe für alle alltäglichen Kleinigkeiten.

Einen besonders herzlichen Dank an meine Vorgänger: Stefanie Häfele und Uli Huth.

Ich danke Stefanie Striepe, Felicitas Lewrick und Joanna Adrian für die unermüdlichen Korrekturen verschiedener Manuskripte.

Unvergessen bleiben meine Bürokollegen: Christian Schiffer danke ich für das gemeinsame, freundschaftliche Durchleben vieler Höhen und Tiefen. Annette Steinbach für die großartige Belegung eines verlassenen Büros und ihr großes Engagement bei der Fortführung und Korrektur dieser Arbeit.

... außerhalb der technologischen Wissenschaft:

Allen Sonnenstraßen-Mitbewohnern. Besonders Claude Becker, Francesco Pinosa, Karsten Voigt und Dominik Lenz für das Feierabendbier -und dau bis Kowelenz.

Allen Kongress-Freundschaften von Barcelona bis Pichlarn-Aigen. Ein besonderer Dank an Lenka Taylor für viele Kongress-Highlights.

Und allen anderen, die mir Windschatten gespendet haben. Besonders B. Weiss.

Poètes, magiciens, artisans, chercheurs, créateurs, comment décrire une tradition qui se renouvelle au fil des mois, des saisons, des années, pour vous faire redécouvrir des saveurs d'antan ou explorer des parfums de voyage (Oberweis et al). Villmools merci, Martine, fir d'Schokolassäiten vum Liewen !!!

Meinen Eltern

Life is like a box of chocolates – you never know what you're gonna get.

Forrest Gump



---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Gentherapie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Die Entwicklung der Gentherapie .....	1
1.1.2 Gentransfersysteme (Vektoren).....	2
1.1.2.1 Virale Gentransfersysteme.....	3
1.1.2.2 Nicht-virale Gentransfersysteme .....	3
<b>1.2 Konzept der Arbeit</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Herstellung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Zelluläre Assoziation und Prozessierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme</b> .....	<b>10</b>
1.4.1 Zelluläre Assoziation.....	10
1.4.2 Endozytose .....	11
1.4.2.1 Clathrin-abhängige Endozytose .....	12
1.4.2.2 Clathrin-unabhängige Endozytose: Caveolae-abhängige Endozytose und lipid rafts.....	13
1.4.2.3 Clathrin-unabhängige Endozytose: Makropinozytose .....	15
1.4.2.4 Weitere Clathrin-unabhängige Endozytose .....	16
1.4.3 Zelluläre Prozessierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme...	18
1.4.4 Methoden zur Untersuchung der Aufnahme und Prozessierung von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen.....	20
1.4.4.1 Durchflusszytometrie.....	20
1.4.4.2 Konfokale Mikroskopie .....	21
1.4.4.3 Spectral Bio-Imaging .....	23
<b>1.5 Intrazelluläre Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme</b> .....	<b>24</b>
1.5.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Systems für die Dissoziationsanalytik .....	24
1.5.2 Methoden zur Untersuchung der Dissoziation von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen.....	27
1.5.2.1 Durchflusszytometrie.....	27
1.5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie .....	29
<b>1.6 Zellmodelle</b> .....	<b>31</b>
1.6.1 A-10 Zellen .....	31
1.6.2 MDCK II Zellen .....	31

<b>2. Material .....</b>	<b>33</b>
2.1 Lipide und Transfektionsreagenzien .....	33
2.2 Plasmide .....	33
2.3 Fluoreszenzfarbstoffe .....	34
2.4 Antikörper .....	35
2.5 Chemikalien und Reagenzien.....	36
2.6 Puffer .....	39
2.7 Zellen.....	40
2.8 Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung .....	40
2.9 Verbrauchsmaterialien.....	41
2.10 Geräte.....	42
<b>3. Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.1 Herstellung und Charakterisierung der Ausgangsliposomen.....	46
3.1.1 Modifizierte Filmmethode.....	46
3.1.2 Extrusion der Ausgangsliposomen .....	46
3.1.3 Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen .....	46
3.1.4 Fluoreszenzfärbung .....	47
3.1.5 Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) .....	48
3.1.6 Quantifizierung des Lipidgehaltes nach Bartlett.....	49
3.2 Plasmidgewinnung und Charakterisierung .....	49
3.2.1 Transformation.....	50
3.2.2 Plasmidisolierung.....	50
3.2.3 Bestimmung der Plasmidkonzentration .....	51
3.2.4 Fluoreszenzfärbung .....	51
3.3 Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen .....	52
3.3.1 Standardprotokoll: Herstellung im kleinen Maßstab durch Pipettieren.....	52
3.3.2 Herstellung im kleinen Maßstab durch Zusammenpumpen.....	54
3.3.3 Herstellung im großen Maßstab durch Zusammenpumpen.....	54
3.3.4 Lyophilisation .....	54
3.3.5 Extrusion von Lipid/DNA-Komplexen.....	55
3.4 Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen.....	55
3.4.1 Größenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie.....	55
3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	56
3.4.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Spektrometrie .....	56

---

3.4.4 Cryo-Transmissions- Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM).....	57
<b>3.5 Zellen.....</b>	<b>58</b>
3.5.1 Kultivierung subkonfluenter Zellen.....	58
3.5.2 Kultivierung konfluenter MDCK II Zellen.....	58
<b>3.6 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>59</b>
3.6.1 Durchflusszytometrische Messung der zellulären Assoziation und Transfektion.....	59
3.6.2 Durchflusszytometrische Messung der Zellaufnahme und Transfektion nach Inkubation mit endozytoseaktiven Substanzen.....	60
3.6.3 Durchflusszytometrische Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	62
<b>3.7 Fluoreszenzmikroskopie mit dem Spectra Cube™.....</b>	<b>63</b>
3.7.1 Kolokalisationsstudien mit Endozytosemarkern.....	63
3.7.2 Kolokalisationsstudien mit Immunofluoreszenz.....	64
3.7.3 Kolokalisationsstudien nach Inkubation mit endozytoseaktiven Substanzen.....	66
3.7.4 Kolokalisationsstudien nach Expression eines Reportergens.....	67
<b>3.8 Fluoreszenzmikroskopie mit dem LSM 510 Meta.....</b>	<b>67</b>
3.8.1 Konfokale Kolokalisationsstudien.....	67
3.8.2 Mikroskopie von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	68
<b>3.9 Transzytose und richtungsabhängige Endozytose.....</b>	<b>69</b>
3.9.1 Richtungsabhängige Endozytose im proliferierenden Zellmodell.....	69
3.9.2 Richtungsabhängige Endozytose im polarisierten Zellmodell.....	70
3.9.3 Transzytose im polarisierten Zellmodell.....	70
<b>3.10 Viabilität und Toxizität von Zellen.....</b>	<b>70</b>
3.10.1 Viabilitätstest.....	70
3.10.2 Toxizitätstest.....	71
<b>3.11 Berechnungen.....</b>	<b>72</b>
3.11.1 Sensitized FRET-Emission.....	72
3.11.2 FRET-Effizienz des Akzeptors ( $E_a$ ).....	73
3.11.3 FRET-Effizienz des Donors ( $E_d$ ).....	73
3.11.4 Statistik.....	74
<b>4. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Herstellung und Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen.....</b>	<b>75</b>
4.1.1 Ausgangsmodell.....	75

4.1.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	75
4.1.1.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) .....	77
4.1.1.3 Transfektionseffizienz .....	78
4.1.2 Variation I des Ausgangsmodells: Veränderung des Herstellungsmaßstabs.....	79
4.1.2.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	80
4.1.2.2 Transfektionseffizienz .....	81
4.1.3 Variation II des Ausgangsmodells: Extrusion der Lipid/DNA-Komplexe .....	85
4.1.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	85
4.1.3.2 Transfektionseffizienz .....	86
4.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	86
4.1.4 Variation III des Ausgangsmodells: Extrusion der Ausgangsliposomen .....	87
4.1.4.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	87
4.1.4.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) .....	91
4.1.4.3 Transfektionseffizienz .....	93
4.1.4.4 HPTLC .....	95
4.1.5 Variation IV des Ausgangsmodells: Ultraschallzerkleinerung der Ausgangsliposomen .....	97
4.1.5.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	97
4.1.5.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) .....	99
4.1.5.3 Transfektionseffizienz .....	100
4.1.6 Diskussion und Ausblick .....	101
<b>4.2 Zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen und Transfektion .....</b>	<b>104</b>
4.2.1 Optimierung des MDCK II Zellmodells.....	105
4.2.1.1 Einfluss des Ladungsverhältnisses auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen .....	105
4.2.1.2 Einfluss der Zelldichte auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen.....	106
4.2.1.3 Einfluss der Transfektionszeit auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen .....	108
4.2.1.4 Einfluss der Komplexgröße auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen .....	108
4.2.2 Zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen in zwei Zellmodellen.....	109
4.2.2.1 Zelllinien-Abhängigkeit der Assoziation von Lipid/DNA-Komplexen.....	110
4.2.2.2 Bestimmung von zellulärer Assoziation und zellulärer Aufnahme .....	111

---

4.2.2.3 Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen .....	112
4.2.3 Endozytoseprofil der Zellen .....	113
4.2.3.1 Zelluläre Aufnahme von Endozytosemarkern.....	113
4.2.4 Einfluss verschiedener Endozytosewege auf die Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen.....	114
4.2.4.1 Inkubation mit Endozytose-Inhibitoren .....	115
4.2.4.2 Inkubation mit Endozytose-Enhancern.....	118
4.2.5 Diskussion und Ausblick .....	120
<b>4.3 Zelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen.....</b>	<b>123</b>
4.3.1 Zelluläre Prozessierung von Endozytosemarkern und Lipid/DNA-Komplexen	123
4.3.1.1 Transferrin.....	124
4.3.1.2 Cholera-Toxin (Untereinheit B).....	124
4.3.1.3 Lactosylceramid .....	125
4.3.1.4 Dextran .....	125
4.3.2 Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen zu zellulären Kompartimenten.....	127
4.3.2.1 Kolokalisation mit frühen Endosomen der Clathrin-Endozytose.....	128
4.3.2.2 Kolokalisation mit Endosomen der Caveolae-Endozytose .....	132
4.3.2.3 Kolokalisation mit Aktin .....	134
4.3.2.4 Kolokalisation mit Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum .....	134
4.3.2.5 Kolokalisation mit späten Endosomen und Lysosomen .....	137
4.3.3 Einfluss verschiedener Endozytosewege auf die Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen.....	143
4.3.3.1 Inkubation mit Endozytose-Inhibitoren .....	143
4.3.3.2 Inkubation mit Endozytose-Enhancern.....	145
4.3.4 Diskussion und Ausblick .....	146
<b>4.4 Transzytose und richtungsabhängige Endozytose     von Lipid/DNA-Komplexen .....</b>	<b>149</b>
4.4.1 Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen im polarisierten Zellmodell MDCK II .	150
4.4.1.1 Das polarisierte Zellmodell MDCK II .....	150
4.4.1.2 Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen im polarisierten Zellmodell MDCK II .....	151
4.4.2 Richtungsabhängige Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen im Zellmodell MDCK II .....	152

---

4.4.2.1 Polarisiertes Zellmodell MDCK II.....	152
4.4.2.2 Proliferierendes Zellmodell MDCK II .....	153
4.4.3 Diskussion und Ausblick .....	155
<b>4.5 Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen .....</b>	<b>156</b>
4.5.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET)-Systems für die Dissoziationsanalytik.....	156
4.5.1.1 Herstellung und Charakterisierung.....	156
4.5.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Cy3-DNA und Cy5-DOPE .....	156
4.5.1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Cy3-DNA und Cy5-DOPE im zellulären Modell .....	160
4.5.2 Anwendung I: Intrazelluläre Dissoziationskinetik von Lipid/DNA-Komplexen ..	164
4.5.2.1 Konfokale Kolokalisationsstudien.....	164
4.5.2.2 FRET-Effizienzen .....	167
4.5.3 Anwendung II: Abhängigkeit der Komplexdissoziation vom Zellmodell .....	170
4.5.3.1 Konfokale Kolokalisationsstudien.....	170
4.5.3.2 Durchflusszytometrische Messung der Kontrollkomplexe .....	171
4.5.3.3 FRET-Effizienzen .....	173
4.5.4 Diskussion und Ausblick .....	174
<b>4.6 Rationelles Design von Lipid/DNA-Komplexen .....</b>	<b>176</b>
4.6.1 Anpassung der Komplexherstellung an die Zielstruktur.....	176
4.6.2 Transfektionseffizienz nach Anpassung der Komplexherstellung .....	177
4.6.3 Diskussion und Ausblick .....	178
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>179</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>184</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
AOTF	<i>acousto-optic tunable filter</i>
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary units</i>
BP	<i>band pass filter</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
Chol	Cholesterol
clz	Chlorpromazin
cm	Zentimeter
Cryo-TEM	Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie
CTX	Cholera-Toxin
d	hydrodynamischer Durchmesser
2/3-D	zwei/dreidimensional
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DC 30	DC-Cholesterol + DOPE 3/7 (m/m)
Dextran 40 000	Dextran mit einem molekularen Gewicht von durchschnittlich 40 000 Da
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
E	FRET-Effizienz
Em	Emission
Exc	Excitation
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fil	Filipin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FL	Fluoreszenzkanal
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
x g	x-fache Erdbeschleunigung
gen	Genistein
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
I	Fluoreszenzintensität
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
kb	Kilobasen
Ig	Immunglobulin
$\lambda$	Wellenlänge
L	Liter
LacCer	Lactosylceramid
LP	<i>long pass filter</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
m	Masse
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
M	Molar
mol	Mol
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
$M_r$	relative Molmasse
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
N	Normalität
NA	Numerische Apertur
NNLS	<i>Non-Negatively constrained Least Squares</i>
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
$\Omega$	Ohm

---

p	piko
Pa	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Pearson's coefficient</i>
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i>
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Polydispersitätsindex
PMA	Phorbolmyristataacetat
R <sub>f</sub>	<i>relative to front</i>
rF	relative Luftfeuchtigkeit
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SEM	<i>standard error mean</i>
\$	US Dollar
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolette-Strahlung
V	Volumen
V	Volt
ζ	Zetapotential



# 1. Einleitung

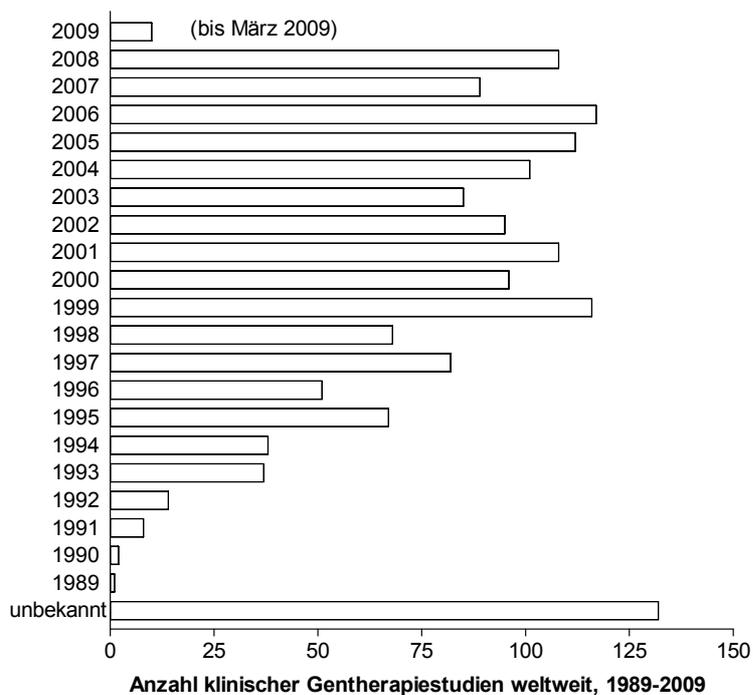
## 1.1 Gentherapie

### 1.1.1 Die Entwicklung der Gentherapie

Die Ursprünge der Gentherapie liegen in der „genetischen Revolution“, der Entwicklung molekularbiologischer Methoden wie DNA-Sequenzierung, DNA-Klonierung, Gentransfer und einige Jahre später der siRNA-Technologie (Nabel 2004). Diese ermöglichten seit den 1970er Jahren ein zunehmendes Verständnis der Zusammenhänge von Genetik und Krankheit (Orkin 1986).

Die Gentherapie entwickelte sich aus der Idee, pathogene genetische Defekte durch die Therapie der betroffenen Gene unmittelbar zu behandeln. Um einen genetischen Defekt erfolgreich zu therapieren, muss eine „Ersatz“-DNA (therapeutische DNA) in die Körperzellen des zu behandelnden Patienten eingebracht werden (*Transfektion*). Die *in vivo* Anwendung der Gentherapie besitzt ein enormes Potenzial für die Medizin und steuert damit einen Markt an, dessen Volumen von Ökonomen bis 2010 auf 1,2 Milliarden \$ geschätzt wurde (datamonitor 2005).

Ein Blick auf die Entwicklung der letzten Jahre zeigt jedoch, dass die Anzahl klinischer Studien zwar konstant ist, der Durchbruch dieser Therapieform in den nun bald 20 Jahren klinischer Anwendung jedoch ausgeblieben ist (Abb. 1-1).



**Abbildung 1-1: Statistik klinischer Gentherapiestudien**  
[\(http://www.wiley.co.uk/genotherapy/clinical/\)](http://www.wiley.co.uk/genotherapy/clinical/)

Nachdem die 1990er Jahre von zahlreichen Pionierarbeiten auf diesem Gebiet geprägt waren, konnte in den letzten Jahren eine erste Bilanz gezogen werden. Die Immunogenität und die *insertionelle Mutagenese* wurden als wesentliche Schwachstelle der Gentherapie ausgemacht (Nabel 2004; Edelstein *et al.* 2007). Als *insertionelle Mutagenese* bezeichnet man Mutationen des Genoms, die durch den Einbau therapeutischer DNA in aktiv transkribierte Gene ausgelöst werden (Winckler 2009). Dies führt zu potenziell schwerwiegenden Mutationen wie der Aktivierung von Proto-Onkogenen mit anschließender Leukämogenese (Winckler 2009). Die Bilanz der ersten 20 Jahre klinischer Anwendung der Gentherapie fällt daher nüchtern aus: trotz erster therapeutischer Erfolge, insbesondere bei der Behandlung der schweren Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency*, SCID) (Nabel 2004; Winckler 2009), haben sich mit der Immunreaktion auf virale Gentransfersysteme sowie der Leukämogenese unerwartet starke Nebenwirkungen eingestellt. Eine Verbesserung des gentherapeutischen Konzepts bedarf eines kontrollierbaren Gentransfers mit verträglichen Gentransfersystemen. Im Folgenden werden die bedeutendsten Gentransfersysteme kurz vorgestellt.

### **1.1.2 Gentransfersysteme (Vektoren)**

Der Erfolg einer gentherapeutischen Behandlung hängt von der Effizienz ab, mit der die therapeutische DNA in die betroffenen Körperzellen eingebracht werden kann. Phosphatgruppen verleihen der DNA eine negative Eigenladung, die sie zu einem der höchst geladenen Polymere überhaupt macht (Bustamante *et al.* 2003). Die Plasmamembran der Zellen weist ebenfalls negative Ladungen an ihrer Außenseite auf (Olivotto *et al.* 1996; Yeung *et al.* 2006), die durch Proteine, Glykolipide, Proteoglykane und unter apoptotischen Bedingungen durch negativ geladene Phospholipide aufgebaut werden (Alberts *et al.* 2008).

Daher wird DNA von Zellen kaum aufgenommen (Patil *et al.* 2005). Gelangt DNA dennoch in das Zellinnere, wird diese dort durch die Zellkernmembran weitgehend vom Genom der Zelle getrennt und von intrazellulären Nukleasen abgebaut (Finn *et al.* 2005; Zuhorn *et al.* 2007a). Dies ist ein effizienter Schutz der Zellen vor fremdem Erbgut, der für eine erfolgreiche gentherapeutische Anwendung überwunden werden muss. Dafür werden Gentransfersysteme benötigt, die eine zelluläre Aufnahme der therapeutischen DNA sowie einen Schutz vor Nukleaseabbau gewährleisten (Khalil *et al.* 2006).

### 1.1.2.1 Virale Gentransfersysteme

Die Grundlagenforschung befasst sich heute verstärkt mit der Suche nach optimierten Gentransfersystemen. Beim Einsatz viraler Vektoren konzentriert sich die Forschung auf die Entwicklung enttoxifizierter Systeme, die eine verringerte Immunogenität aufweisen. So konnte die Immunogenität von Adenovirus-basierten Vektoren durch das Ausschalten aller viralen Gene reduziert werden (Morsy *et al.* 1998; Thomas *et al.* 2003). Daneben wurden verstärkt virale Vektoren entwickelt, deren Ursprungsviren keine pathogenen oder entzündlichen Schäden verursachen (z.B. Adeno-assoziierte Viren, AAV) (Thomas *et al.* 2003). Um die Gefahr *insertioneller Mutagenese* zu verringern, wurde außerdem der Einsatz von Transposasen sowie anderer Integrasen überprüft, die einen Einbau der therapeutischen DNA in ein aktives Gen verhindern sollen (Olivares *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2003).

### 1.1.2.2 Nicht-virale Gentransfersysteme

Daneben gewinnt die Entwicklung nicht-viraler Gentransfersysteme an Bedeutung, da diese Systeme eine geringe Toxizität und Immunogenität garantieren (Wasungu & Hoekstra 2006; Li & Szoka 2007). Darüber hinaus ist eine Herstellung im Großmaßstab möglich (Clement 2005; Wasungu & Hoekstra 2006). Diesen Vorteilen nicht-viraler Systeme steht die im Vergleich mit viralen Vektoren ineffiziente Transfektion von Körperzellen entgegen (Nabel 2004). Die Forschung im Bereich nicht-viraler Gentransfersysteme konzentriert sich heute daher auf eine Verbesserung der Transfektionseffizienz.

Um eine effizientere Transfektion zu erreichen, wurde eine Vielzahl verschiedener Lipide und Polymere für den Gentransfer getestet (Häfele 2007; Rawat *et al.* 2007), ohne dass ein für eine therapeutische Anwendung ausreichendes Niveau erreicht werden konnte (Wasungu & Hoekstra 2006).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung, zellulären Prozessierung und intrazellulären Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme. Diese nicht-viralen Gentransfersysteme sind bereits seit 1987 beschrieben (Felgner *et al.* 1987). Der Anteil klinischer Genthapiestudien, die auf solche Systeme zurückgreifen, liegt 2009 bei 6,9 % (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Für eine intensivere Anwendung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme bedarf es einer effizienteren Transfektion *in vivo* (Li & Szoka 2007).

## 1.2 Konzept der Arbeit

Für eine Verbesserung der Transfektionseffizienz beim Einsatz lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme ist es zunächst notwendig, die Hindernisse zu identifizieren, die einer effizienten Transfektion im Wege stehen (Zuhorn *et al.* 2007a).

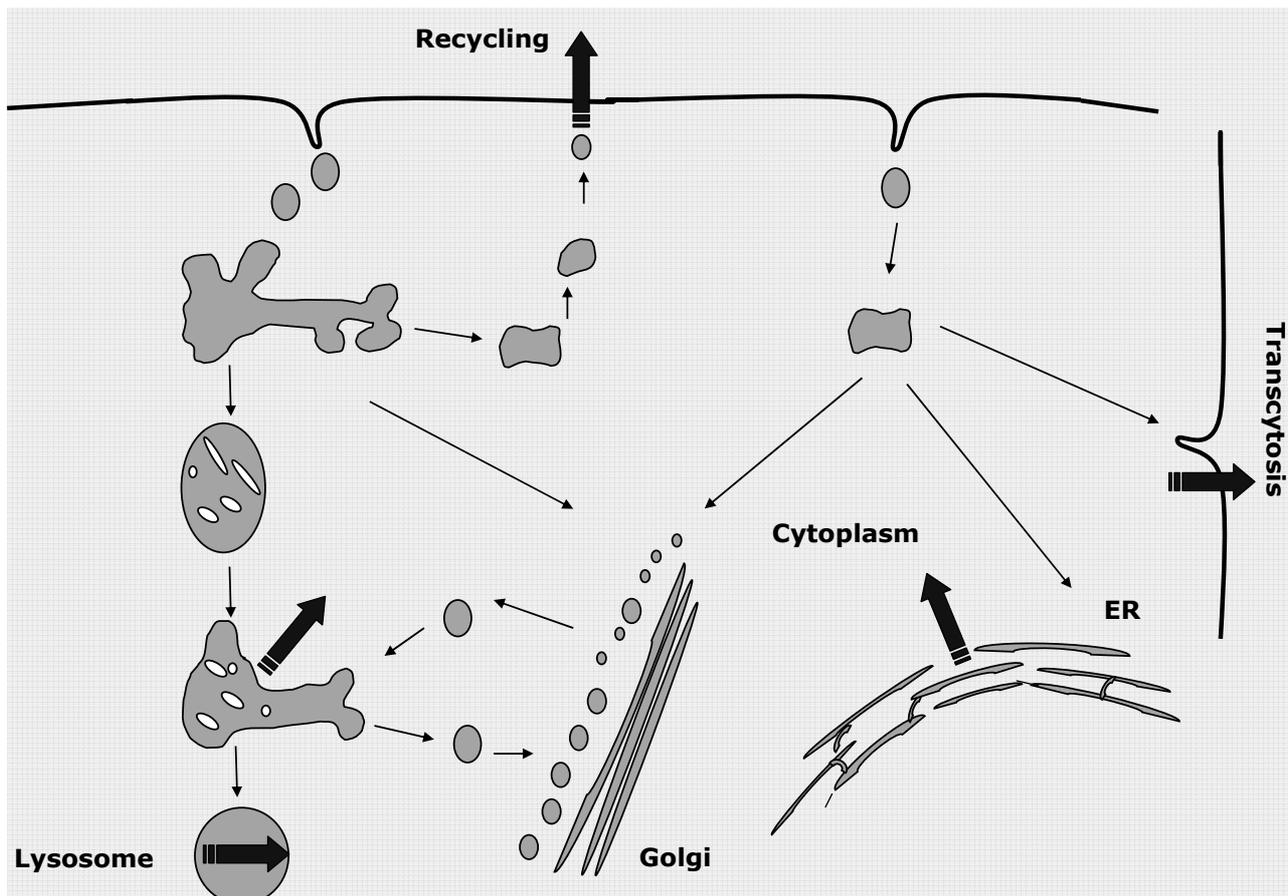
Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Aufklärung des Transfektionsweges lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme. Für eine effiziente Transfektion von Zielzellen muss die therapeutische DNA in den Zellkern der Zellen transportiert und dort transkribiert werden (Khalil *et al.* 2006). Die Zelle besitzt eine Reihe von Abwehrmechanismen, die eine Expression fremden Erbguts (z.B. von Viren, Bakterien) und damit auch therapeutischer DNA unterbinden (Zabner *et al.* 1995). Die Aufklärung der zellulären Infektion durch Viren und Bakterien hat einige dieser Barrieren aufgezeigt und gleichzeitig Möglichkeiten dargelegt, diese zu umgehen (Sandvig & van Deurs 2005; Tarrago-Trani & Storrie 2007). Mögliche Hindernisse, die einer effizienten Transfektion entgegenstehen könnten, sind:

1. Die zelluläre Aufnahme der Gentransfersysteme (Khalil *et al.* 2006; Lonez *et al.* 2009)
2. Die zelluläre Prozessierung der Gentransfersysteme (Khalil *et al.* 2006; Hoekstra *et al.* 2007; Zuhorn *et al.* 2007a)
3. Die intrazelluläre Dissoziation der Gentransfersysteme
4. Der Abbau freigesetzter DNA durch Nukleasen des Zytoplasmas (Finn *et al.* 2005; Zuhorn *et al.* 2007a)
5. Der Eintritt der DNA in den Zellkern (van der Aa *et al.* 2006)

Die Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung von lipid-basierten nanopartikulärer Gentransfersysteme wird seit einigen Jahren intensiv untersucht (Zabner *et al.* 1995; Zuhorn *et al.* 2002; Goncalves *et al.* 2004; van der Aa *et al.* 2007; Wong *et al.* 2007; Harush-Frenkel *et al.* 2008).

In Abbildung 1-2 sind einige intrazelluläre Prozessierungsmöglichkeiten gezeigt, die aus diesen Arbeiten bekannt sind. Nach Aufnahme in die Zellen ist sowohl ein umgehender Rücktransport aus der Zelle (*Recycling*) (Goncalves *et al.* 2004) als auch ein Ausschleusen der Partikel an der gegenüberliegenden Membranseite beschrieben

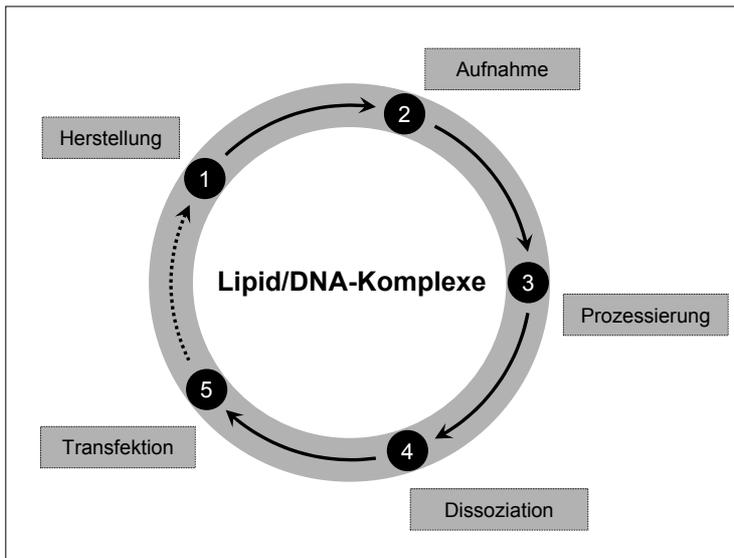
(*Transzytose*) (Harush-Frenkel *et al.* 2008). Verbleiben die Partikel dauerhaft im Zellinneren ist neben dem Transport in späte Endosomen und Lysosomen (Zabner *et al.* 1995; Zuhorn *et al.* 2002; van der Aa *et al.* 2007) eine Prozessierung in das Zytoplasma bekannt (Wong *et al.* 2007). Nur bei zytoplasmatischer Freisetzung der Partikel ist der Transport der therapeutischen DNA in den Zellkern möglich.



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der intrazellulären Prozessierungsmöglichkeiten von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen**

Die vorliegende Arbeit führt Studien der eigenen Arbeitsgruppe fort (Huth 2005; Häfele 2007) und liefert schließlich ein vollständiges Bild der Prozessierung dieser Gentransfersysteme durch tierische Zellen.

Darüber hinaus wird mit der intrazellulären Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme eine weitere Barriere effizienter Transfektion entschlüsselt, die bisher kaum untersucht worden ist.



**Abbildung 1-3: Konzept der Arbeit**

Um den Einfluss einzelner Barrieren auf die Transfektion lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme beurteilen zu können, wird ein erfolgreich transfiziertes Zellmodell mit einem Zellmodell verglichen, das nahezu keine Transfektion zulässt. Mit dieser Betrachtung der zellabhängigen Transfektion erschließt die vorliegende Arbeit ein weiteres Forschungsgebiet, das bisher kaum untersucht ist (Douglas *et al.* 2008).

Die Erkenntnis, welche Barrieren die Transfektion der Zellen besonders stark behindern, fließt anschließend in den Herstellungsprozess der Gentransfersysteme ein. Auf diese Art und Weise kann die Entwicklung effizienterer Transfersysteme rationell durchgeführt werden (Abb. 1-3).

In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen zur Herstellung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme vorgestellt und die möglichen Barrieren einer erfolgreichen Transfektion genauer definiert. Darüber hinaus wird ein Überblick über die wichtigsten Methoden und Methodenentwicklungen dieser Arbeit geliefert.

## **1.3 Herstellung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme**

Zur Gruppe der lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersysteme zählen liposomale Gentransfersysteme, die die therapeutische DNA im hydrophilen Innenraum enthalten,

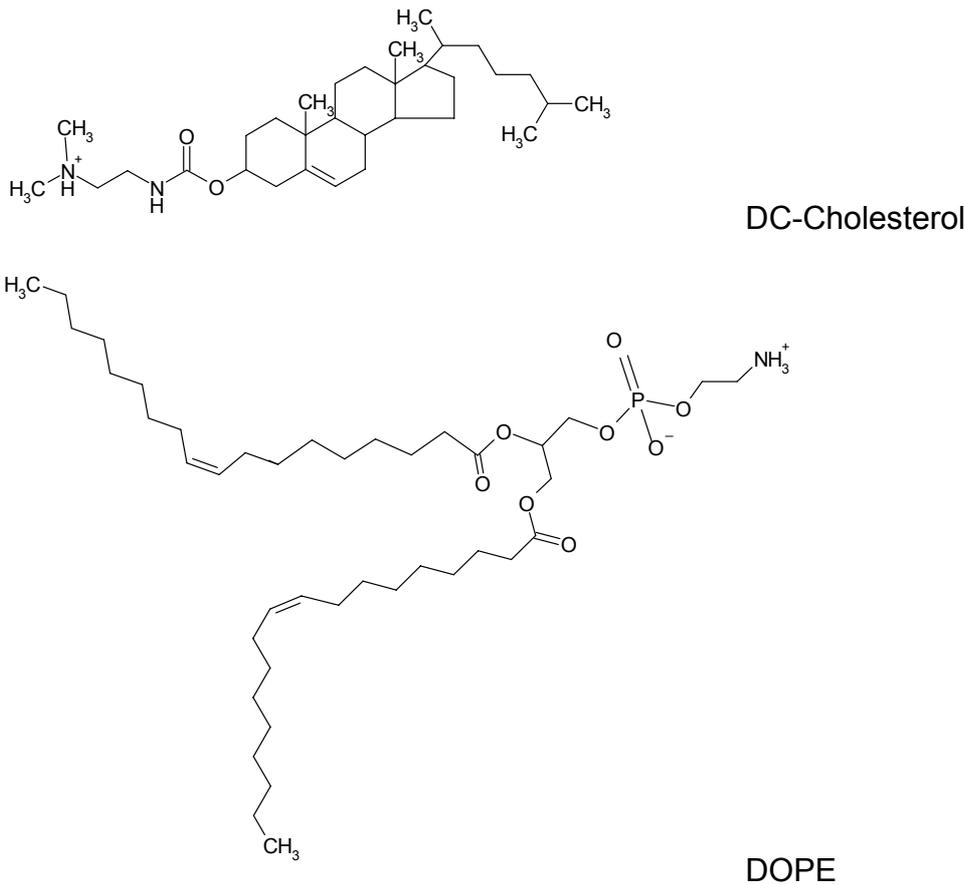
und Lipid/DNA-Komplexe, in denen die negativ geladene DNA mit einem positiv geladenen Lipid komplexiert wird (Rawat *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wird das Konzept der Lipid/DNA-Komplexe (Lipoplexe), das in der eigenen Arbeitsgruppe bereits intensiv erforscht wurde, aufgegriffen (Kiefer 2003; Clement 2005; Häfele 2007).

Die Bildung von Lipid/DNA-Komplexen erfolgt spontan durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladener DNA und einem positiv geladenem Lipid (Felgner *et al.* 1987) und wird entropisch durch die Abgabe der Gegenionen von DNA und Lipid in die Lösung angetrieben (Rodriguez-Pulido *et al.* 2008). Nach heutigem Kenntnisstand verläuft die Komplexbildung über 3 Schritte (Murata *et al.* 1995; Rakhmanova *et al.* 2004):

1. elektrostatische Wechselwirkung zwischen DNA und einem äußeren Lipidmonolayer
2. Ausbildung größerer Strukturen („bean-like“), in denen die DNA komplett von Lipidbilayern umhüllt ist (3 - 5 Schichten)
3. Aggregation mehrerer dieser Einzelstrukturen an „defekten“ Stellen, die Oberflächenladungen und somit neue Kondensationsstellen präsentieren

Um DNA zu komplexieren, wird in den Versuchen dieser Arbeit das kationische Lipid 3 $\beta$ -N[N',N'-Dimethylaminoethan]-carbamoyl]-Cholesterol (DC-Cholesterol) eingesetzt. DC-Cholesterol besitzt aufgrund der kationischen Ammonium-Gruppe und dem Cholesterol-Grundgerüst amphiphile Eigenschaften und stellt ein häufig verwendetes Lipid für den Gentransfer dar (Kiefer *et al.* 2004; Rakhmanova *et al.* 2004) (Abb. 1-4). In der vorliegenden Arbeit wird DC-Cholesterol mit dem Helferlipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) gemischt. DOPE vermittelt den Phasenübergang der Komplexlipide von einer lamellaren in eine invers-hexagonale Phase (Siegel & Epand 1997; Rakhmanova *et al.* 2004; Zuhorn *et al.* 2005; Zuhorn *et al.* 2007a). Diese Eigenschaft könnte die Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen verbessern (vgl. 1.4.3).

Die DC-Cholesterol/DOPE Mischung (3/7, m/m) wird in GMP-Qualität unter der Bezeichnung DC 30<sup>®</sup> vertrieben.



**Abbildung 1-4: Strukturformeln der verwendeten Lipide**

3 $\beta$ -N[N',N'-Dimethylaminoethan]-carbamoylester-Cholesterols-HCL (DC-Cholesterol) und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) werden in einer 3/7 (m/m) Mischung eingesetzt (DC 30<sup>®</sup>).

Die technologische Herausforderung bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen besteht in der kinetischen Kontrolle der spontan ablaufenden Komplexbildungsreaktion (Li & Szoka 2007). Bei unkontrollierter Komplexbildung entstehen inhomogene und häufig sehr große Komplexpartikel (Zabner *et al.* 1995; Rodriguez-Pulido *et al.* 2008). Die direkte Komplexierung durch Zusammenpipettieren oder Zusammenpumpen beider Komponenten stellt eine einfache Herstellungsmethode dar, deren *scale-up* in den Produktionsmaßstab leicht möglich ist (Clement *et al.* 2005). Die Komplexbildung kann durch Einstellen der Ausgangskonzentrationen beider Komponenten, der Ladungsverhältnisse, der Ionenstärke des Dispersionsmittels und durch den Mischprozess selbst beeinflusst werden (Li & Szoka 2007). Daneben wird mit aufwendigeren Methoden wie Detergensdialyse und Ethanol-Dialyse (Ethanolinjektion mit anschließender Dialyse) gearbeitet, um die Komplexbildungsreaktion zu kontrollieren (Li & Szoka 2007). In der vorliegenden Arbeit wird zur Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen ausschließlich die Methode des Zusammenpumpens oder Zusammenpipettierens verwendet.

Der potenzielle Einsatz von Lipid/DNA-Genfersystemen in der Gentherapie stellt besondere Anforderungen an die verwendeten Lipid/DNA-Komplexe und damit an den Herstellungsprozess:

1. *Die Komplexe sollten eine effiziente Transfektion ermöglichen.*
2. *Die Komplexe sollten eine definierte Größe haben.*

Die Transfektion wird durch die Größe der Partikel beeinflusst, da die endozytotische Aufnahme in Zellen größenabhängig erfolgt (Rejman *et al.* 2004). Die Größe der Partikel ist außerdem für den *in vivo*-Einsatz als Genfersystem maßgeblich. Dieser erfordert Partikelgrößen von ~ 200 nm. Größere Komplexe werden über das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) der Leber, der Milz und des Knochenmarks innerhalb von 15 - 30 min aus der Blutbahn eliminiert (Khalil *et al.* 2006; Lewrick 2008; Hillaireau & Couvreur 2009).

3. *Der Scale-up der Komplexherstellung aus dem Labormaßstab in den Produktionsmaßstab muss in GMP-Qualität möglich sein.*

Neben der Effizienz der Transfektion wird das Potenzial eines Genfersystems durch die Möglichkeit einer großtechnischen Herstellung bestimmt (Zelphati *et al.* 1998; Kiefer *et al.* 2004).

4. *Die Komplexe sollten lyophilisierbar und bei Lagerung stabil sein.*

Eine großtechnische Herstellung der Komplexe verlangt gleichzeitig die Lagerstabilität der Komplexe (Zelphati *et al.* 1998; Clement *et al.* 2005; Molina & Anchordoquy 2008).

5. *Die Komplexe sollten eine geringe Zelltoxizität aufweisen.*

Lipid/DNA-Komplexe sind für Zellen untoxisch, solange die Nettoladung der Komplexe neutral oder nur schwach positiv bzw. negativ ist. Mit steigendem Anteil an kationischem Lipid steigt im Regelfall die Zelltoxizität (Kiefer *et al.* 2004).

Die vorliegende Arbeit stellt verschiedene Herstellungsmethoden für Lipid/DNA-Komplexe vor und prüft, inwieweit das oben genannte Anforderungsprofil erfüllt wird. Für die rationelle Entwicklung einer Komplex-Zielstruktur muss darüber hinaus das zelluläre Anforderungsprofil bekannt sein. Der aktuelle Wissenstand von Aufnahme und zellulärer Prozessierung nanopartikulärer Systeme wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

---

## 1.4 Zelluläre Assoziation und Prozessierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme

### 1.4.1 Zelluläre Assoziation

Der erste Kontakt zwischen Lipid/DNA-Komplex und Zielzelle findet an der Zellmembran statt. Diese stellt damit die erste Barriere einer erfolgreichen Transfektion dar.

In der vorliegenden Arbeit werden die extrazelluläre Bindung und die anschließende Internalisierung der Lipid/DNA-Komplexe als zelluläre Assoziation zusammengefasst.

Die extrazelluläre Bindung ist abhängig von der Nettoladung und der Größe der eingesetzten Komplexe (Zelphati *et al.* 1998; Ross & Hui 1999; Rejman *et al.* 2004; Khalil *et al.* 2006; Ewert *et al.* 2008). Die Ladung der Komplexe lässt sich durch das Verhältnis der negativ geladenen DNA zum positiv geladenen Lipid einstellen. Geladene Komplexe zeigen eine stärkere extrazelluläre Bindung als ungeladene Komplexe, da sie mit geladenen Membranabschnitten interagieren können. In diesem Zusammenhang werden Integrin-Rezeptoren (Zuhorn *et al.* 2007b) und negativ geladene Heparin-Sulfat-Proteoglykane (Zuhorn *et al.* 2007a) als Bindungsstellen für positiv geladene Komplexe diskutiert. Für bestimmte kationische Lipide konnte außerdem eine Assoziation mit Toll-like 4-, MD-2- und CD 14-Rezeptoren gezeigt werden (Lonez *et al.* 2009). Diese Rezeptoren sind an der Zellassoziation von bakteriellen Lipopolysacchariden beteiligt (Jerala 2007). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die in der Produktion von Cytokinen (Interleukine, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) resultieren. Kürzlich konnte eine solche zelluläre Aktivierung durch kationische Lipide mit einer Amidin-Kopfgruppe in dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Tanaka *et al.* 2008). Die durch die Aktivierung von Signalkaskaden vermittelte Reaktion der Zelle auf die Assoziation von Lipid/DNA-Komplexen stellt ein neues Forschungsgebiet dar, das bisher kaum betrachtet wurde.

Als Bindungsstelle für anionische Komplexe wird eine unspezifische Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren diskutiert (Rigotti *et al.* 1995; Lonez *et al.* 2009).

Neben der Eigenladung der Komplexe spielt die Größe und damit die Sedimentation der Komplexe auf die Plasmamembran bei der extrazellulären Bindung *in vitro* eine Rolle (Rakhmanova *et al.* 2004; Rejman *et al.* 2004; Khalil *et al.* 2006; Zuhorn *et al.* 2007a). Da neutrale Komplexe sich nicht gegenseitig abstoßen, lagern sie sich häufig zu besonders großen Aggregaten zusammen (Zelphati *et al.* 1998; Zuhorn & Hoekstra 2002; Wasungu &

Hoekstra 2006). Die starke Sedimentation dieser Komplexe erhöht die extrazelluläre Bindung unspezifisch (Ross & Hui 1999).

Darüber hinaus berichten einige Studien von einer Abhängigkeit extrazellulärer Bindung und der Lipidzusammensetzung der Partikel (Lonez *et al.* 2009).

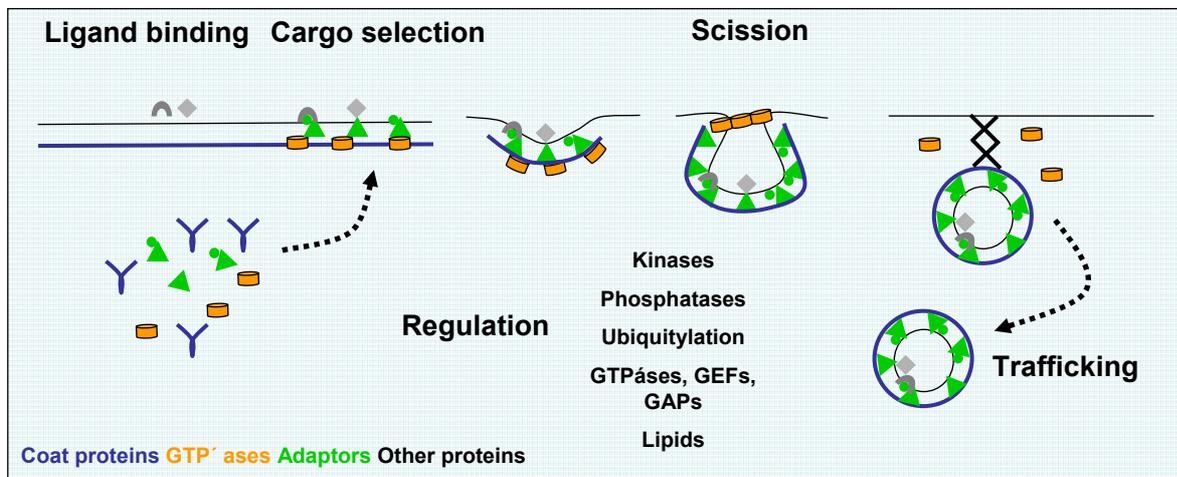
Die Aufklärung der extrazellulären Bindung von Lipid/DNA-Komplexen an die Zielzelle stellt eine wichtige Information für die Entwicklung einer Komplex-Zielstruktur dar: sowohl die Lipidzusammensetzung (Lonez *et al.* 2009), als auch die Größe (Ross & Hui 1999) und Ladung (Payne *et al.* 2007) der Partikel beeinflussen die extrazelluläre Bindung. Ist der Assoziationsmechanismus eines Zellmodells bekannt, kann die Komplexherstellung entsprechend angepasst werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des gezielten Ansteuerns von Zellrezeptoren (*aktives targeting*). Dies ist für Lipid/DNA-Komplexe beschrieben, die mit dem RGD-Peptid an der Oberfläche funktionalisiert sind und somit spezifisch an die Integrin-Rezeptoren der Zielzelle binden können (Harvie *et al.* 2003).

Nach extrazellulärer Bindung der Komplexe an die Plasmamembran erfolgt die Aufnahme in das Zellinnere. Dies gelingt durch das Abschnüren von Komplex-assoziierten Abschnitten der Plasmamembran in das Zellinnere (Endozytose) (Zuhorn *et al.* 2002). Die Fusion der Komplexe mit der Plasmamembran scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen (Oberle *et al.* 2000; Zuhorn & Hoekstra 2002). Die endozytotische Aufnahme der Komplexe stellt einen aktiven Zellprozess dar, der ATP-vermittelt abläuft und an dessen Ende die Komplexe in intrazellulären Vesikeln vorliegen. An der endozytotischen Aufnahme in Zellen wird intensiv geforscht und im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand kurz zusammengefasst.

### 1.4.2 Endozytose

Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von Stoffen in das Innere einer Zelle über das Abschnüren von Abschnitten der Plasmamembran, an denen der zu transportierende Stoff assoziiert vorliegt (Le Roy & Wrana 2005). Dafür muss ein Stoff zunächst erkannt (*cargo selection*) (vgl. 1.4.1), anschließend an der Plasmamembran assoziiert (*ligand binding*) und schließlich in Vesikel eingepackt und abgeschnürt (*scission*) werden (Abb. 1-5). Die einzelnen Endozytoseschritte können unterschiedlich gestaltet sein und dementsprechend können einzelne Endozytosewege unterschieden werden (Mayor & Pagano 2007). Für die Transfektion lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme ist von besonderer Bedeutung, dass die verschiedenen Endozytosewege der Zelle in

unterschiedlichen Endozytosekompartimenten enden (*trafficking, processing*) (Huth 2005). Der Endozytoseweg bestimmt damit das intrazelluläre Schicksal der Gentransfersysteme.



**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Endozytose**

In den letzten Jahren intensiver Endozytoseforschung hat sich die Anzahl potenzieller Endozytosewege ständig vergrößert. In Abbildung 1-7 ist eine aktuelle Aufstellung dargestellt.

### 1.4.2.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Die Entdeckung der Clathrin-abhängigen Endozytose liegt bereits über 40 Jahre zurück (Roth & Porter 1964; Benmerah & Lamaze 2007) und stellt damit den Ausgangspunkt der Endozytoseforschung dar. Die Klassifizierung in Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Endozytose ist heute etabliert und basiert auf der Abgrenzung neu entdeckter Endozytosewege von den inzwischen detailliert beschriebenen Mechanismen der Clathrin-Endozytose (Le Roy & Wrana 2005; Mayor & Pagano 2007; Gong *et al.* 2008).

Clathrin-abhängige Endozytose verläuft sowohl konstitutiv, also unabhängig von einer Ligandenbindung des Rezeptors (z.B. Transferrin, *low density lipoprotein*), als auch liganden-aktiviert (z.B. *epidermal growth factor*) (Benmerah & Lamaze 2007). Die Erkennung von Stoffen erfolgt über membranständige Rezeptoren (vgl. 1.4.1), die darauf hin die Endozytose durch zytoplasmaseitige Endozytosemotive der Rezeptoren aktivieren. Nach Aktivierung werden Membranabschnitte ausgebildet, die eingebuchtet sind und zytoplasmaseitig einen netzartigen Überzug des Proteins Clathrin enthalten (*clathrin coated pits*). Ihre Größe beträgt 100 - 150 nm (Khalil *et al.* 2006). Die Rekrutierung der

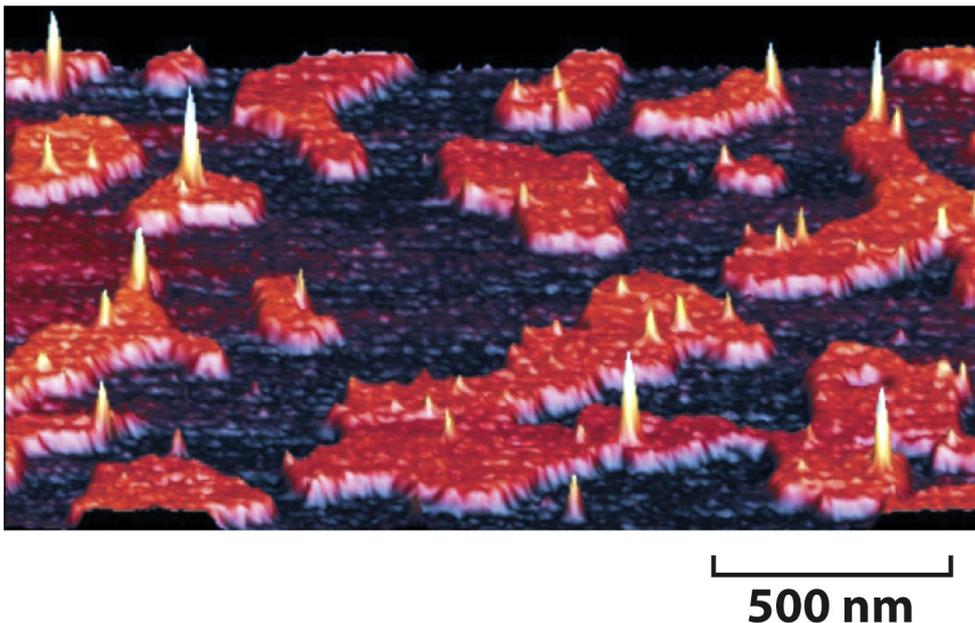
Clathrin-Proteine an die Plasmamembran wird über verschiedene Adaptorproteine (AP-2-Komplex, EPS 15, Epsin) vermittelt, die mit den Endozytosemotiven der Rezeptoren interagieren (Le Roy & Wrana 2005). Das anschließende Abschnüren der Endozytosevesikel katalysiert die GTPase Dynamin. Nach Abstreifen des Clathrin-Überzugs werden die Vesikel zu frühen Endosomen prozessiert (Gruenberg 2001). Von dort können die endozytierten Stoffe über Recycling-Endosomen wieder an die Plasmamembran zurücktransportiert oder zu multivesikulären Körpern, späten Endosomen und Lysosomen weiter prozessiert werden. Ob der Transport zum nächsten endosomalen Vesikel durch Fusion oder Reifung der Ausgangsvesikel entsteht, ist bisher unklar (Spang 2009). Beim Transport zwischen verschiedenen Endosomen spielen Rab-GTPasen eine wichtige Rolle (Le Roy & Wrana 2005; Wong *et al.* 2007; Spang 2009). Während Recycling bei Membranrezeptoren häufig beobachtet wird (LDL-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor), stellt die Prozessierung zu Lysosomen den klassischen Entsorgungsweg der Zelle dar (z.B. EGF). Frühe und späte Endosomen sowie Lysosomen zeichnen sich durch fallende intravesikuläre pH-Werte aus, die durch ATP-abhängige Protonenpumpen aufgebaut werden (Hillaireau & Couvreur 2009). Lysosomen enthalten schließlich eine Vielzahl von Hydrolasen (u.a. Nukleasen, Lipasen), die im sauren Milieu dieser Kompartimente (pH 4,5 - 5,5) hochaktiv sind und so dorthin prozessierte Stoffe enzymatisch abbauen können (Luzio *et al.* 2007). Daneben können einige Stoffe (z.B. Cholera Toxin) aus endosomalen Vesikeln in das Zytoplasma freigesetzt oder zum Golgi-Apparat weiter transportiert werden (Torgersen *et al.* 2001).

#### **1.4.2.2 Clathrin-unabhängige Endozytose: Caveolae-abhängige Endozytose und lipid rafts**

Die Entdeckung omegaförmiger, flacher Einstülpungen der Plasmamembran geht auf elektronenmikroskopische Versuche von Blutkapillaren aus dem Jahr 1953 zurück (Parton & Simons 2007). Sie unterscheiden sich durch ihre Größe von 60 - 80 nm und die Abwesenheit eines Clathrin-Überzugs von den *clathrin coated pits*. Darüber hinaus ist ihr Vorkommen auf einige Zellarten beschränkt, in denen sie dafür besonders häufig auftreten (z.B. glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Pneumozyten).

Heute werden Caveolae-Strukturen den *lipid rafts* der Plasmamembran zugeordnet (Nichols 2003). Dies sind kleine, heterogene Bereiche der Plasmamembran, die einen hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden besitzen. *Lipid rafts* sind dicker als der Rest der Plasmamembran und stellen Interaktionsplattformen für Proteine dar (Abb. 1-6).

Caveolae sind eine Sonderform der *lipid rafts*, in denen das Protein Caveolin durch Cholesterolbindung zur Stabilisierung der *lipid rafts* beiträgt. Es sind 3 verschiedene Caveoline bekannt: Caveolin-1 und Caveolin-2 sind Caveolae-Bestandteile von Nicht-Muskelzellen, während das Protein Caveolin-3 in Muskelzellen vorkommt (Williams & Lisanti 2004). *Lipid rafts* und damit auch Caveolae sind durch ihre Interaktionsmöglichkeiten mit Proteinen Schaltstellen der Zelle und übertragen zahlreiche Signale in das Zellinnere (Signaltransduktion) (z.B. Calcium-Regulation, eNOS-Regulation, Fettsäure-Regulation, Cholesterol-Regulation) (Parton & Simons 2007).



**Abbildung 1-6: Atomic force microscopy von lipid rafts**

Darstellung von *lipid rafts* (rot), die in der Plasmamembran (blau) eingebettet sind. *Lipid rafts* sind Interaktionsplattformen für Proteine (gelb). Aus D.E. Saslowky et al., J. Biol. Chem. 277: 26966-26970, 2002, in (Alberts et al. 2008).

Erst 40 Jahre nach ihrer elektronenmikroskopischen Entdeckung konnte die Beteiligung der Caveolae an der Endozytose bewiesen werden (Carver & Schnitzer 2003; Le & Nabi 2003). Eine Beteiligung der Caveolae an der Endozytose und Transzytose von Albumin konnte ebenso gezeigt werden (Schnitzer et al. 1994) wie an der Infektion einiger Toxine (z.B. Cholera Toxin) (Le & Nabi 2003; Chinnapen et al. 2007).

Der exakte Mechanismus von Zellerkennung, Vesikelbildung und Abschnürung ist noch nicht im Detail verstanden. Wie bei der Clathrin-abhängigen Endozytose wird die Abschnürung der Vesikel durch die GTPase Dynamin vermittelt. Bei der Zellerkennung von Proteinen wird die Beteiligung von Glykophosphatidylinositol-Ankern diskutiert, die

eine Konzentrierung in *lipid rafts* und eine anschließende Endozytose nach Proteinbindung einleiten könnten (Le Roy & Wrana 2005).

Pelkmans beschrieb 2001 die Endozytose des *simian virus 40* (SV 40) nach Assoziation an Caveolae der Plasmamembran in endosomale Vesikel (Caveosomen) und ermöglichte so erste Einblicke in die exakte intrazelluläre Prozessierung (Pelkmans *et al.* 2001). Caveosomen unterscheiden sich von den frühen Endosomen der Clathrin-abhängigen Endozytose durch einen neutralen pH-Wert und die Anwesenheit des Proteins Caveolin. Der Virus wird von dort zum Endoplasmatischen Retikulum der Zellen weiterprozessiert. Eine vergleichbare Prozessierung zum Endoplasmatischen Retikulum und von dort weiter zum Golgi-Apparat ist für Cholera Toxin beschrieben (Chinnapen *et al.* 2007), während Nabi für das Cytokin *autocrine motility factor* eine andere Caveolae-abhängige Prozessierung von den Caveolae der Plasmamembran direkt zum Endoplasmatischen Retikulum beschreibt (Le & Nabi 2003).

Beide zelluläre Prozessierungen ermöglichen die Umgehung des lysosomalen Abbaus und haben daher das Interesse an einem gezielten Ansteuern (*targeting*) der Caveolae-abhängigen Endozytose geweckt (Gumbleton *et al.* 2003; Tarrago-Trani & Storrie 2007; van der Aa *et al.* 2007). Die aktuelle Endozytoseforschung zeigt jedoch, dass das Ansteuern des Caveolae-Wegs nicht automatisch die Umgehung der Lysosomen zur Folge hat. So konnte die Fusion von Endozytosevesikeln, die von Caveolae der Plasmamembran abgeschnürt wurden, mit frühen Endosomen gezeigt werden (Wong *et al.* 2007).

#### **1.4.2.3 Clathrin-unabhängige Endozytose: Makropinozytose**

Während alle anderen Endozytosewege die Aufnahme von Stoffen über Einstülpungen der Plasmamembran vermitteln, bilden sich bei der Makropinozytose 0,2 - 10 µm große Ausstülpungen der Plasmamembran aus (Swanson 2008). Die charakteristische Form und Größe dieser Membranausstülpungen ermöglichte deren Entdeckung bereits im Jahr 1931 (Swanson & Watts 1995). An der Ausbildung und anschließenden Abschnürung von Vesikeln (Makropinosomen) ist das Aktin-Zytoskelett wesentlich beteiligt. Das Abschnüren von der Plasmamembran verläuft nicht Dynamin-abhängig, sondern unter der Beteiligung des Proteins CtBP1/BARS (Miaczynska & Stenmark 2008). Die Regulation der Makropinozytose ist im Detail bisher nicht verstanden (Gong *et al.* 2008). Die Bedeutung der Makropinozytose liegt in der zellulären Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen und der darin gelösten Nährstoffe. Diese Aufnahme findet in einigen Zelltypen konstitutiv statt

(Makrophagen, dendritische Zellen). Daneben ist die Aktivierung der Makropinozytose durch eine Stimulation der Proteinkinase C beschrieben (Swanson 1989). Das intrazelluläre Schicksal der Makropinosomen ist zellabhängig (Khalil *et al.* 2006): sie können zu den Lysosomen der Zelle transportiert werden (Meier & Greber 2003) oder ohne weitere Fusion selbständig in der Zelle fortbestehen und als Recycling-Endosomen fungieren (Swanson & Watts 1995).

Die Phagozytose von Fremdpartikeln (z.B. tote Zellen, Mikroorganismen) verläuft nach einem ähnlichen Muster wie die Makropinozytose (Swanson 2008). Auf die nähere Betrachtung der Phagozytose wird an dieser Stelle allerdings verzichtet, da dieser Aufnahmemechanismus auf spezialisierte Zellen beschränkt ist (Hillaireau & Couvreur 2009).

#### **1.4.2.4 Weitere Clathrin-unabhängige Endozytose**

In den letzten Jahren konnte eine Reihe weiterer Endozytosewege beschrieben werden. Ältere Klassifizierungsversuche unterscheiden die Endozytosewege anhand der unterschiedlichen Ausgestaltung der Plasmamembran. Diesem Ansatz konnte mit der Flotillin-abhängigen Endozytose ein weiterer Endozytoseweg beigefügt werden (Payne *et al.* 2007; Gong *et al.* 2008). Flotillin ist ein Protein der Plasmamembran, das ähnlich wie Caveolin in *lipid rafts* vorkommt und diese stabilisiert (Gong *et al.* 2008). Payne beschreibt die Aufnahme von Proteoglykanen über eine Flotillin-abhängige Endozytose und die zelluläre Prozessierung in späte Endosomen (Payne *et al.* 2007). Dies ist für die Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen interessant, da Proteoglykane als mögliche Bindungsstellen für Lipid/DNA-Komplexe an der Plasmamembran diskutiert werden (vgl. 1.4) (Payne *et al.* 2007).

Neue molekularbiologische Technologien – insbesondere siRNA und *Gen-knock down* - haben der Endozytoseforschung neue Zugangsmöglichkeiten eröffnet (Sandvig *et al.* 2008). Mit Hilfe dieser neuen Techniken wurde die Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran genauer untersucht und festgestellt, dass entweder die GTPase Dynamin oder ersatzweise eine andere GTPase (RhoA-GTPase, Arf6-GTPase, cdc42-GTPase) bei diesem Prozess mitwirkt. Mayor und Pagano entwickelten auf Grundlage dieser Versuche eine GTPase-abhängige Klassifizierung der Endozytosewege (Mayor & Pagano 2007). Den beiden ausschließlich Dynamin-abhängigen Endozytosewegen Clathrin und Caveolae fügen sie dementsprechend die RhoA-abhängige Endozytose, Arf6-abhängige Endozytose und cdc42-abhängige Endozytose hinzu.

Einen weiteren interessanten Klassifizierungsansatz startete Pelkmans im Jahr 2005 mit der Prüfung aller menschlichen Kinasen (*Kinom*) auf eine Beteiligung an der Regulation der Clathrin- und Caveolae-abhängigen Endozytose (Balklava & Grant 2005; Pelkmans *et al.* 2005). Die siRNA-Versuche dieser Arbeit zeigten, dass von den 590 untersuchten Kinasen mehr als 1/3 an der Regulation der Endozytose beteiligt waren. Darüber hinaus konnte neben der Verknüpfung beider Endozytosewege auch die Verknüpfung mit Zellwachstum, Proliferation und Zelladhäsion gezeigt werden.

Bei der intrazellulären Prozessierung der verschiedenen Endozytosewege gibt es vergleichsweise wenige neue Daten. Zwar konnte gezeigt werden, dass Glykophosphatidylinositol-gebundene Proteine nach Abschnürung über die cdc42-GTPase in bisher unentdeckte endosomale Kompartimente prozessiert werden (*GPI-enriched-early-endosomal-compartments*, GEEC), in den meisten Fällen Clathrin-unabhängiger Endozytose zeigte sich jedoch nach zellulärer Aufnahme die Prozessierung in frühe oder späte Endosomen, wie sie für die Clathrin-abhängige Endozytose bekannt ist (Mayor & Pagano 2007).

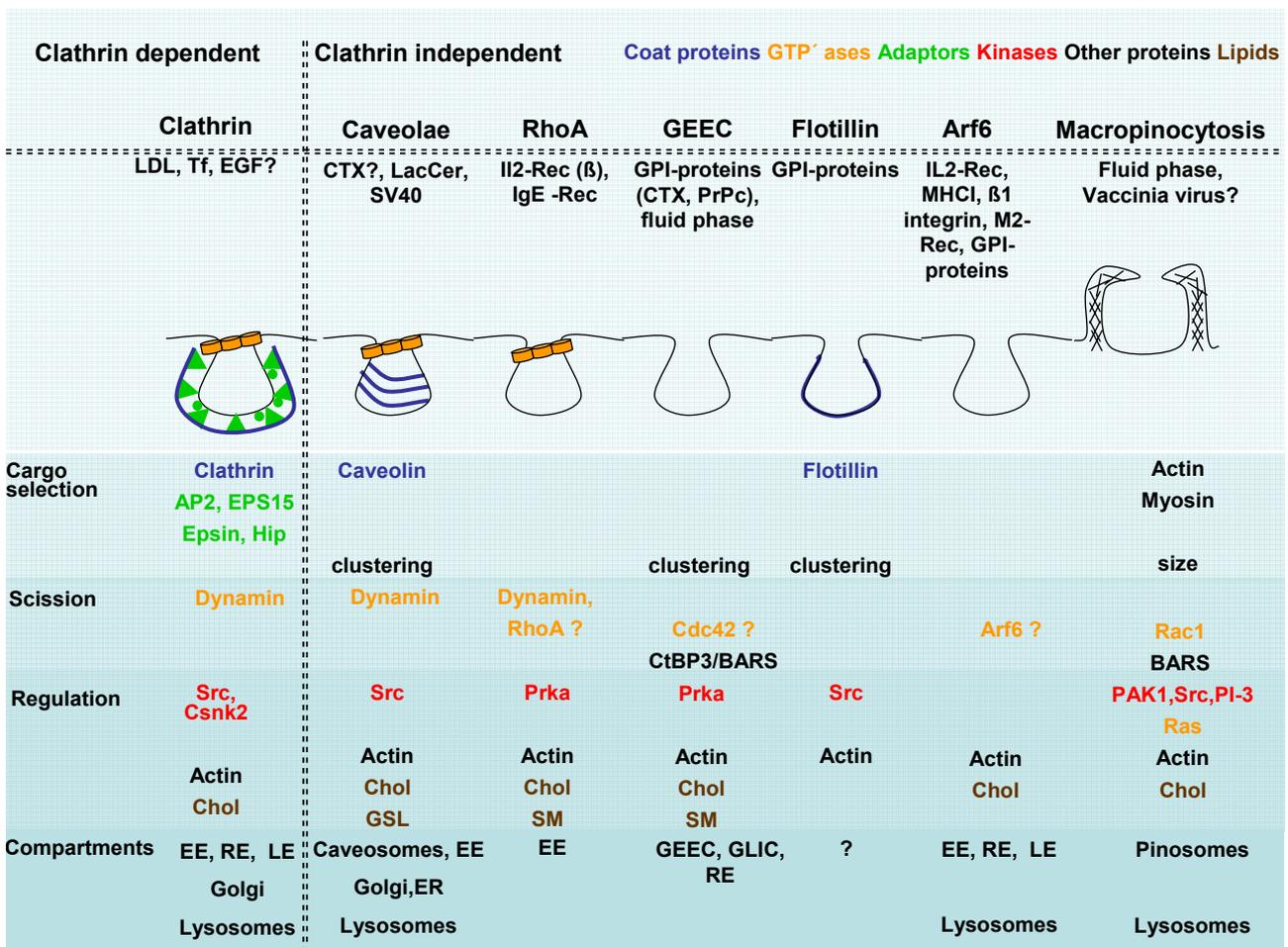


Abbildung 1-7: Übersicht der Endozytosewege

### 1.4.3 Zelluläre Prozessierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme

Die zelluläre Aufnahme und Prozessierung nanopartikulärer Systeme kann grundsätzlich in Phagozytose und „klassische“ Endozytose unterteilt werden (Hillaireau & Couvreur 2009). Durch Phagozytose werden nanopartikuläre Systeme in die Organe des mononukleären Phagozytensystems (MPS), deren Zellen besonders aktiv phagozytieren, transportiert. Dies wird inzwischen sowohl bei der Behandlung von Tumoren des MPS (z.B. Lebermetastasen) als auch bei der antibiotischen, antiviralen und fungiziden Therapie von Krankheitserregern, die sich in den Makrophagen des MPS anreichern (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*), ausgenutzt (Hillaireau & Couvreur 2009). Handelt es sich hingegen nicht um eine Erkrankung der MPS-Organe, führt die Phagozytose zum Abbau der Partikel und ist daher unerwünscht (vgl. 1.3).

Da die Phagozytose auf eine begrenzte Anzahl spezialisierter Zellen beschränkt ist (Hillaireau & Couvreur 2009), konzentriert sich die Entwicklung von Gentransfersystemen auf die „klassischen“ Endozytosewege. Für die Prozessierung nanopartikulärer Systeme sind bisher Clathrin-, Caveolae-Endozytose und Makropinozytose beschrieben (Goncalves *et al.* 2004; Rejman *et al.* 2005; Khalil *et al.* 2006; Wong *et al.* 2007; Hufnagel *et al.* 2009). Die vorliegende Arbeit prüft die Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen entlang dieser drei Endozytosewege.

Als gemeinsame Barriere einer erfolgreichen Transfektion bleibt allen Endozytosewegen der Einschluss der Komplexe in endosomale Vesikel. Für die Clathrin-abhängige Endozytose und die Makropinozytose ist eine Reifung dieser Vesikel (frühe Endosomen, Makropinosomen) bei intrazellulärer Prozessierung beschrieben, die sich in einer pH-Absenkung und Vergrößerung der Vesikel äußert (Spang 2009). Über Caveolae-Endozytose prozessierte Vesikel (Caveosomen) besitzen hingegen einen neutralen pH-Wert und weisen keinen vergleichbaren Reifungsprozess auf (Pelkmans *et al.* 2001).

Für die Freisetzung der Komplexe bzw. der dekomplexierten therapeutischen DNA aus endosomalen Vesikeln werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Hoekstra *et al.* 2007):

1. Osmotische Zerstörung: Für Polyethylenimin-Polyplexe ist die Freisetzung aus Endosomen durch osmotische Zerstörung beschrieben (Akinc *et al.* 2005). Die Polymere werden bei sinkendem pH-Wert innerhalb der Endosomen verstärkt protoniert. Dies führt zum Einströmen von Chlorid-Ionen zum Ladungsausgleich, damit zur Anhebung des osmotischen Drucks und schließlich zum Platzen der

Endosomen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Freisetzung von Lipid/DNA-Komplexen aus endosomalen Vesikeln mit Hilfe osmotisch aktiver Substanzen.

2. Fusion mit der endosomalen Membran: Die Fusion der Komplexe könnte durch eine Phasenumwandlung der Lipidstruktur von lamellar zu invers-hexagonal stimuliert werden. Eine solche Phasenumwandlung wird bei sinkendem pH-Wert möglicherweise durch eine Ladungsänderung des kationischen Lipids ausgelöst. Die Lipidmischung liegt dann nicht weiter lamellar sondern durch das Helferlipid DOPE geprägt invers-hexagonal vor (Siegel & Epand 1997; Rakhmanova *et al.* 2004; Zuhorn *et al.* 2007a). Dadurch wird eine Steigerung der Transfektion ermöglicht (Zuhorn *et al.* 2005). Eine weitere Möglichkeit endosomaler Freisetzung ist die Ionenpaarbildung mit einem anionischen Lipid (Hafez *et al.* 2001; Zuhorn *et al.* 2007a). In diesem Zusammenhang wird der Übergang des anionischen Phospholipids Phosphatidylserin von der Außenseite der endosomalen Membran an die Innenseite (*flip-flop*) und eine anschließende Fusion mit dem kationischen Lipid des Komplexes diskutiert (Xu & Szoka 1996; Zuhorn *et al.* 2007a). Für diese Interaktion bedarf es keiner Absenkung des pH-Werts, so dass die Freisetzung nicht nur aus aciden Endosomen sondern auch aus neutralen Caveosomen erklärt werden kann (Zuhorn *et al.* 2007a). Die Fusion mit der endosomalen Membran könnte zur Destabilisierung und Porenbildung führen und damit die Freisetzung der DNA ermöglichen (Zuhorn *et al.* 2007a).

Die Kenntnis des endozytotischen Aufnahmemechanismus der Lipid/DNA-Komplexe in die Zielzelle ermöglicht die rationelle Anpassung der Komplex-Zielstruktur im Herstellungsprozess: so konnte für die Clathrin-abhängige Endozytose eine Präferenz für Partikelgrößen von 50 - 200 nm in der Zelllinie B16-F10 gezeigt werden, während größere Partikel (500 nm) bevorzugt über Caveolae-abhängige Endozytose aufgenommen werden (Rejman *et al.* 2004; Schiffer 2008). Harush-Frenkel beschreibt die Abhängigkeit von endozytotischer Prozessierung und Ladung der nanopartikulären Systeme und zeigt eine stärkere Prozessierung anionischer Partikel zu den Lysosomen der Zelle (Harush-Frenkel *et al.* 2008). Außer über die Ladung kann die endosomale Freisetzung auch über die Lipidzusammensetzung der Komplexe beeinflusst werden (Hoekstra *et al.* 2007). Neben diesen passiven *targeting*-Strategien ist bei Kenntnis des prozessierenden Endozytoseweges das gezielte Ansteuern (*aktives targeting*) mit Hilfe von oberflächlich gebundenen Liganden (*homing device*) des entsprechenden Endozytosewegs möglich (Lewrick 2008). Beispiele für solche Funktionalisierungen lipid-basierter nanopartikulärer

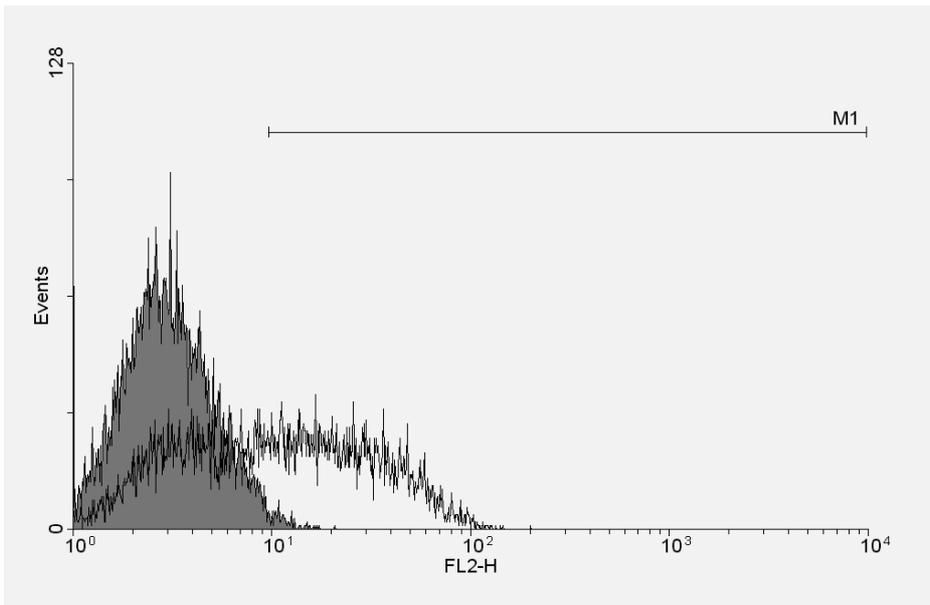
Gentransfersysteme sind Transferrin-modifizierte Lipid/DNA-Komplexe für die Clathrin-abhängige Endozytose (Joshee *et al.* 2002) und Lektin-modifizierte Lipid/DNA-Komplexe für die Caveolae-abhängige Endozytose (Bunjes 2009).

## **1.4.4 Methoden zur Untersuchung der zellulären Assoziation und Prozessierung lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersystemen**

### **1.4.4.1 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein etabliertes optisches Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel, meistens Zellen, analysiert (Darzynkiewicz *et al.* 1999). Die Intensität des Streulichtes, das parallel (*forward scatter*) und gleichzeitig im 90° Winkel (*sideward scatter*) zu einem eintreffenden Laserlicht detektiert wird, ist von der Partikelgröße und -morphologie (Granularität) abhängig. Dadurch kann in jeder Zellprobe die Population vitaler Zellen von derjenigen toter Zellen getrennt werden (*gating*). Die Analyse der zellulären Assoziation fluoreszenzmarkierter Partikel (z.B. Lipid/DNA-Komplexe) erfolgt durch Anregung des Farbstoffs mit einem Laser und Detektion des emittierten Fluoreszenzlichts im 90° Winkel. Je nach verwendetem Farbstoff stehen unterschiedliche Laser (488 und 635 nm) und Emissionsfilter (FL1 – FL4) zur Verfügung. Mit Hilfe des gleichzeitig detektierten Streulichtes lässt sich die Analyse auf die Population vitaler Zellen beschränken. Die Untersuchung der zellulären Transfektion verläuft analog, wobei statt fluoreszenzmarkierten Partikeln ein Reporterogen, das für ein fluoreszierendes Protein codiert, in die Zellen eingebracht wird.

Bei der Auswertung der Daten kann das Ausmaß zellulärer Assoziation bzw. Transfektion durch die Veränderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (*mean*) der betrachteten Zellpopulation ausgedrückt werden. Alternativ kann die Anzahl an Zellen angegeben werden, deren Fluoreszenzintensität durch Assoziation oder Transfektion einen an einer Kontrollpopulation ausgerichteten Schwellenwert (*gate, marker*) überschreitet (Abb. 1-8). In der vorliegenden Arbeit wird das Ausmaß zellulärer Assoziation und Transfektion als Zellanzahl angegeben.



### Abbildung 1-8: Datenanalyse in der Durchflusszytometrie

Repräsentative Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung von A-10 Zellen nach 5h Inkubation von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m). Verschiebung des Fluoreszenzhistogramms im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auswertung über Marker M1 und Anzahl fluoreszierender Zellen (% Gated) oder durchschnittliche Fluoreszenz der Zellpopulation (Median oder Mean).

Um den Aufnahmemechanismus und die zelluläre Prozessierung von internalisierten Partikeln zu untersuchen, werden einzelne Endozytosewege mit Hilfe endozytoseaktiver Substanzen blockiert oder aktiviert (Huth *et al.* 2006).

#### 1.4.4.2 Konfokale Mikroskopie

Marvin Minsky entwickelte und patentierte bereits im Jahr 1957 das erste konfokale Mikroskop (Minsky 1961). Es dauerte jedoch über 30 Jahre, bis in den 1990er Jahren die Weiterentwicklungen der Datenverarbeitung dieser Methode zum entscheidenden Durchbruch verhalfen. Heute ist konfokale Mikroskopie der Goldstandard der Zellmikroskopie und wird daher auch in dieser Arbeit intensiv genutzt.

Um die verschiedenen Anwendungen dieser Technik in der vorliegenden Arbeit zu verstehen, sollen die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie kurz näher erläutert werden. Durch die Wellennatur des Lichts wird eine Punktlichtquelle immer als leuchtende Scheibe mit konzentrischen Kreisen (*airy disk*, nach dem englischen Astronom George B. Airy) im Mikroskop dargestellt, deren Durchmesser durch die numerische Apertur des Objektivs und die Wellenlänge des Lichts bestimmt wird. Zwei Punkte können mikroskopisch aufgelöst werden, wenn der Abstand der beiden Punkte nicht größer ist als deren *airy disk*.

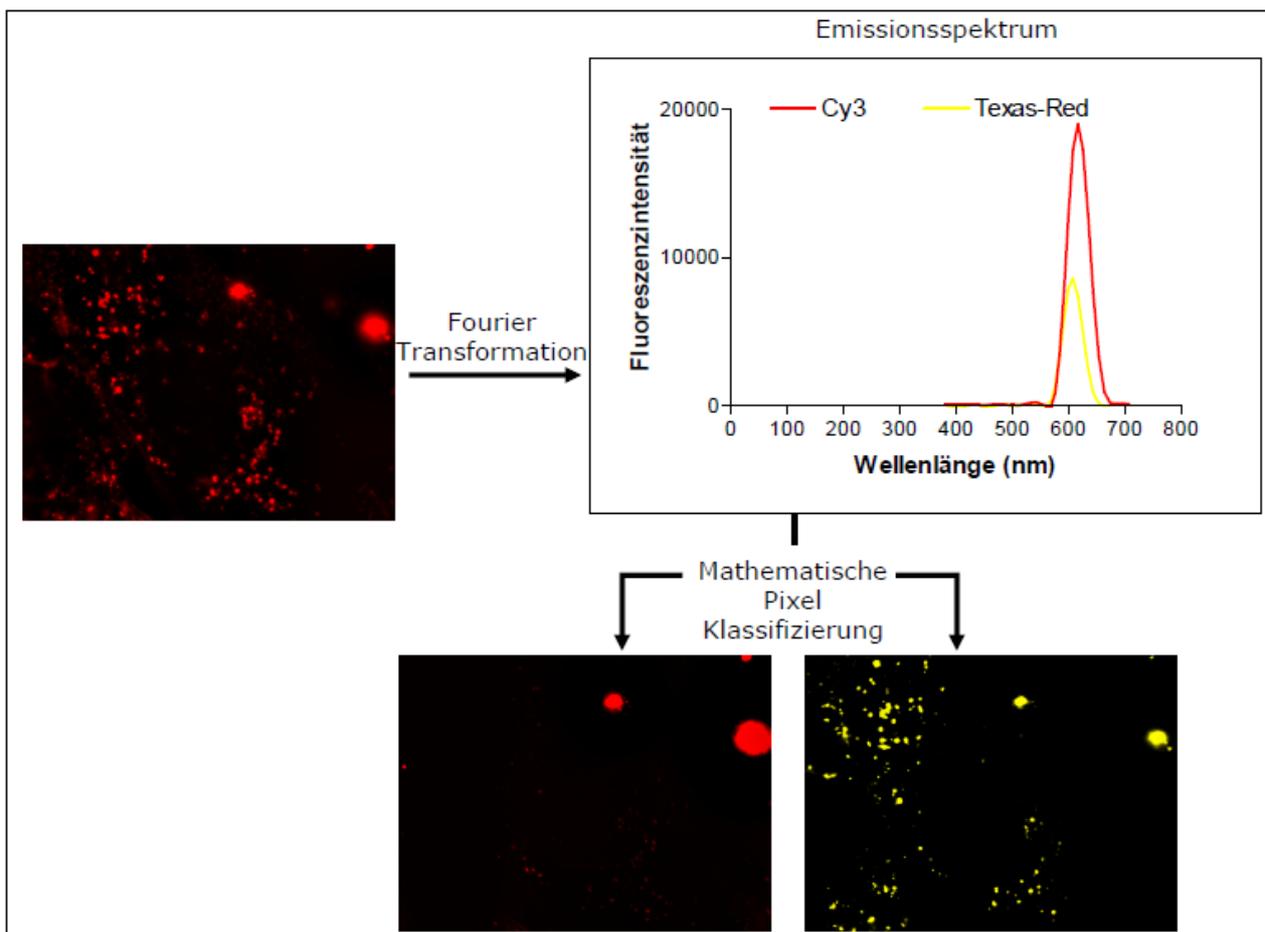
Alle mikroskopischen Methoden besitzen daher eine laterale Auflösung, die durch die Objektivlinsen und den Brechungsindex der Probe begrenzt ist.

Die maximale laterale Auflösung nach Abbe gilt für eine perfekte Optik (keine sphärischen oder chromatischen Aberrationen) und ein planares Objekt. In der Zellmikroskopie handelt es sich jedoch in aller Regel um dreidimensionale Objekte. Bei der Mikroskopie dieser Objekte verschlechtern Fluoreszenz- und Streulichtsignale, die über- oder unterhalb der Brennebene liegen, den Kontrast des Bildes. Diese Störsignale werden im konfokalen Mikroskop durch eine zusätzliche Lochblende ausgeblendet und die Tiefenschärfe somit verbessert. Die maximale laterale Auflösung und Tiefenschärfe eines dreidimensionalen Objekts kann erreicht werden, wenn die Größe der Lochblende dem Durchmesser der *airy disk* des Objekts angepasst wird (Lochblende = 1 *airy disk*). Nur dann arbeitet das Mikroskop konfokal, das heißt Bildpunkt und Objektpunkt haben denselben Fokus. Diese Einstellung wird in dieser Arbeit für alle Kollokalisationsstudien verwendet. Eine stärkere Verkleinerung der Lochblende ist nicht zu empfehlen, da gleichzeitig die Anzahl an Photonen, die den Detektor erreichen, abnimmt. Ein beweglicher *z-Scanning*-Tisch erlaubt zusätzlich das Abtasten einer fokalen Ebene (x,y-Ebene) in z-Richtung. Dank der Weiterentwicklungen in der Datenverarbeitung kann aus den Einzelbildern so ein 3D-Bild generiert werden (*optical sectioning*).

Die konfokale Mikroskopie ermöglicht die exakte räumliche Lokalisierung internalisierter Partikel und fluoreszenzgefärbter Zellkompartimente (Kollokalisation) und liefert somit wichtige Informationen über die zelluläre Prozessierung. Das Ausmaß an Kollokalisation ist mit Hilfe geeigneter Bildbearbeitungssoftware berechenbar und wird als Kollokalkationskoeffizient angegeben.

### 1.4.4.3 Spectral Bio-Imaging

Mit dem *Spectral Bio-Imaging* System SpectraCube™ SD-200H steht ein optisches Messsystem zur Verfügung, das eine Kombination aus Fourier-Spektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie darstellt. Diese Kombination spektrometrischer und spektroskopischer Methoden ermöglicht, in jedem Bildpunkt eines zweidimensionalen Bildes ein komplettes Spektrum des emittierten Lichts zu messen (Malik *et al.* 1996; Huth *et al.* 2004).



**Abbildung 1-9: Spectral Unmixing mit dem SpectraCube™**

Repräsentative Darstellung: MDCK II Zellen nach 5 h Inkubation mit Texas-Red Dextran (gelb) und Lipid/Cy3-DNA-Komplexen (rot).

Die Anwendung von *Spectral Bio-Imaging* ermöglicht die exakte spektrale Auftrennung einer Kolo-kalisation (Abb. 1-9). Die Analyse von Kolo-kalisationsstudien wird in der vorliegenden Arbeit jeweils mit konfokaler Mikroskopie und *Spectral Bio-Imaging* durchgeführt und so eine exakte räumliche und spektrale Auftrennung gewährleistet (Schneider & Süss 2010).

## 1.5 Intrazelluläre Dissoziation lipid-basierter nanopartikulärer Gentransfersysteme

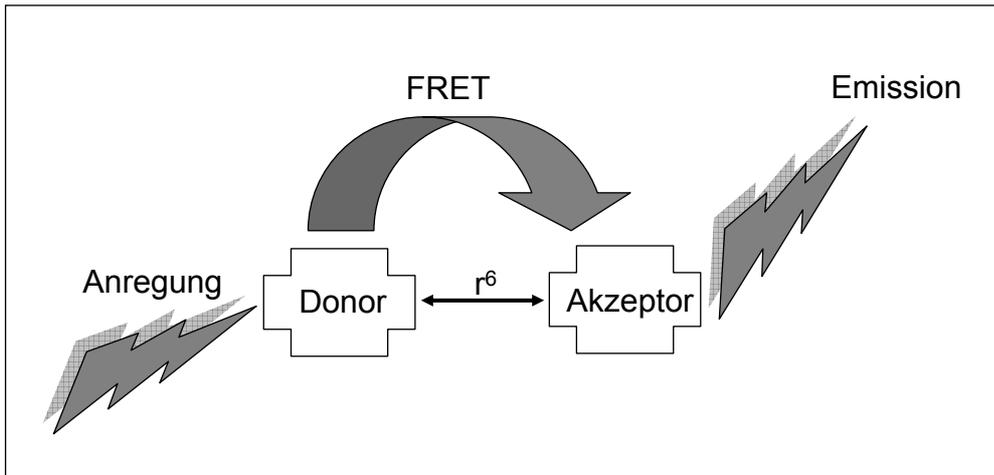
Ein Vergleich der verschiedenen Freisetzungsmechanismen aus endosomalen Vesikeln zeigt, dass je nach zugrunde liegendem Mechanismus der gesamte Komplex oder die DNA alleine in das Zytoplasma freigesetzt wird (vgl. 1.4.3). Neben dem Mechanismus der Komplexdissoziation sind der Ort und die Effizienz der Dissoziation unklar (Hoekstra *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wird daher eine neue Methode entwickelt, um die Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen intrazellulär zu verfolgen.

### 1.5.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Systems für die Dissoziationsanalytik

Lipid/DNA-Komplexe stellen nanopartikuläre Strukturen dar, in denen beide Komponenten, DNA und Lipid, durch elektrostatische Wechselwirkungen einen Komplex bilden (Felgner *et al.* 1987). Im komplexierten Zustand besteht demnach praktisch kein räumlicher Abstand zwischen Lipid und DNA. Erst die Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe trennt beide Komponenten räumlich voneinander. Für die Analyse dieses Vorgangs wird daher eine Methode benötigt, die den Abstand beider Komponenten möglichst sensitiv ( $< 10$  nm) erfassen kann.

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist eine wissenschaftlich etablierte Methode zum Messen kleiner Abstände (1 - 10 nm) (Stryer 1978).

In einem FRET-Prozess überträgt ein kurzweilig angeregter Fluoreszenzfarbstoff (Donor) Energie auf einen benachbarten (1 - 10 nm) längerwelligen Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) (Abb. 1-10). Bei Anregung des Donorfarbstoffes ist demnach eine Emission des Akzeptorfarbstoffes sichtbar. Die Effizienz dieses Energietransfers steigt antiproportional ( $r^6$ ) mit dem Abstand beider Farbstoffe.

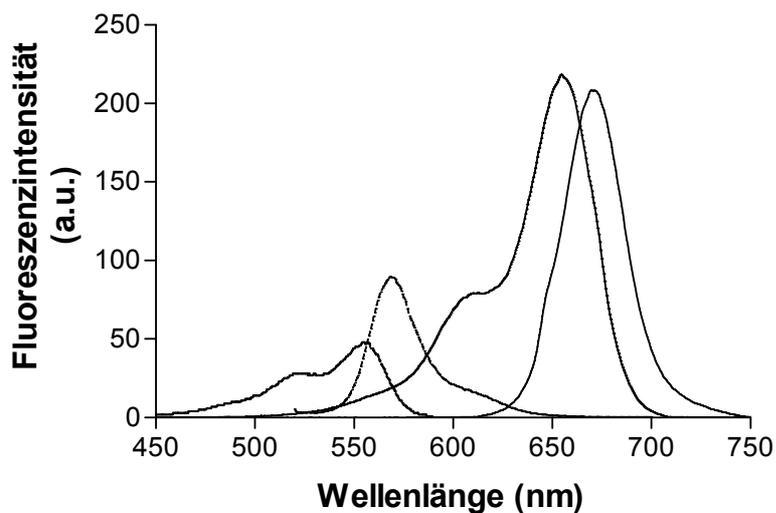


**Abbildung 1-10: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)**

FRET stellt daher eine vielversprechende Methode dar, um die Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen aufzulösen. Im Gegensatz zur Dissoziationsanalytik mittels qRT-PCR-Quantifizierung, die aus dem Komplex freigesetzte DNA erfasst (Ruponen *et al.* 2009), gibt die FRET-Analytik mit der Abstandsänderung beider Komplexkomponenten den Dissoziationsprozess selbst unmittelbar wieder.

Für die Entwicklung eines FRET-Systems für die Dissoziationsanalytik von Lipid/DNA-Komplexen sind folgende Anforderungen bedeutend:

1. Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoff müssen einen effizienten Transfer ermöglichen. Dafür müssen beide Farbstoffe spektral überlappen.
2. Für die zelluläre Anwendung des FRET-Systems ist die Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu berücksichtigen. Da diese im blauen und grünen Spektralbereich deutlich stärker ausgeprägt ist als im roten Spektralbereich, erleichtern langwellige Farbstoffpaare die zelluläre FRET-Messung (Sebestyen *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit wird daher ein Cy3/Cy5 Farbstoffpaar eingesetzt (Abb. 1-11).

**Abbildung 1-11: Fluoreszenzspektren von Cy3-DNA und Cy5-DOPE**

Fluoreszenzspektren der Anregung und Emission von Cy3-DNA (Punkte) und Cy5-DOPE (Linien).

Beide Farbstoffe bilden zusammen ein etabliertes FRET-Paar, in dem Anforderung 1. hinreichend erfüllt ist.

3. Um die Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe mit Hilfe dieses FRET-Paares untersuchen zu können, müssen beide Farbstoffe in den Komplex integriert werden. Matsumoto et al. beschreiben in der Literatur ein FRET-System, in dem beide Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 und Fluorescein) kovalent an die DNA gebunden sind (Matsumoto *et al.* 2009). Da FRET auftritt, wenn beide Farbstoffe sich in einem kurzen Abstand befinden, beschreibt dieses System die Faltung der DNA innerhalb des Komplexes. Da sich bei Dissoziation der Komplexe jedoch ursächlich der Abstand Lipid-DNA ändert und scheint ein FRET-System, das beide Komplexkomponenten betrachtet, sinnvoller. In der vorliegenden Arbeit wird daher sowohl die DNA (Cy3-DNA) als auch das Lipid (Cy5-DOPE) mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.
4. Die intrazelluläre Dissoziationsanalytik der Lipid/DNA-Komplexe verlangt ein FRET-System, das mit den etablierten zytometrischen Fluoreszenzmethoden analysiert werden kann. Dazu zählen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie, da beide Methoden ein Ausgrenzen (*outgating*) aller toten Zellen ermöglichen und ungebundener Fluoreszenzfarbstoff die Messung in der

Regel nicht beeinflusst (Tron *et al.* 1984). Das FRET-Paar Cy3/Cy5 kann mit beiden Methoden analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit gelingt die Umsetzung des beschriebenen Konzeptes in ein für die Dissoziationsanalytik von Lipid/DNA-Komplexen einsetzbares FRET-System. Die Anwendbarkeit dieser neuen Methoden wird in zwei Zellmodellen belegt.

Das Dissoziationsverhalten der verwendeten Lipid/DNA-Komplexe ist wie die zelluläre Aufnahme und Prozessierung ein wichtiger Baustein für die rationelle Komplexherstellung. Falls die Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen in Zellen unvollständig abläuft, kann diese durch Änderung der Ladung und Lipidzusammensetzung der Komplexe verbessert werden. So ist für das Helferlipid DOPE ein Einfluss auf die flüssigkristalline Phase der Komplexlipide beschrieben, der sich in besonders locker gepackten Komplexen äußern kann (Wasungu & Hoekstra 2006).

## **1.5.2 Methoden zur Untersuchung der Dissoziation von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen**

### **1.5.2.1 Durchflusszytometrie**

In den Versuchen dieser Arbeit wird ein FACS-Calibur™ Durchflusszytometer verwendet, das neben einem 488 nm Argon-Laser über einen zweiten Dioden-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm verfügt. Für die Detektion der Fluoreszenzemission werden 4 verschiedene Fluoreszenzkanäle eingesetzt. Damit sind im FACS-Calibur™ die apparativen Voraussetzungen vorhanden, um 4 Fluoreszenzfarbstoffe in einer Zelle gleichzeitig zu messen (Abb. 1-12). Dies wird bei der durchflusszytometrischen FRET-Messung ausgenutzt:

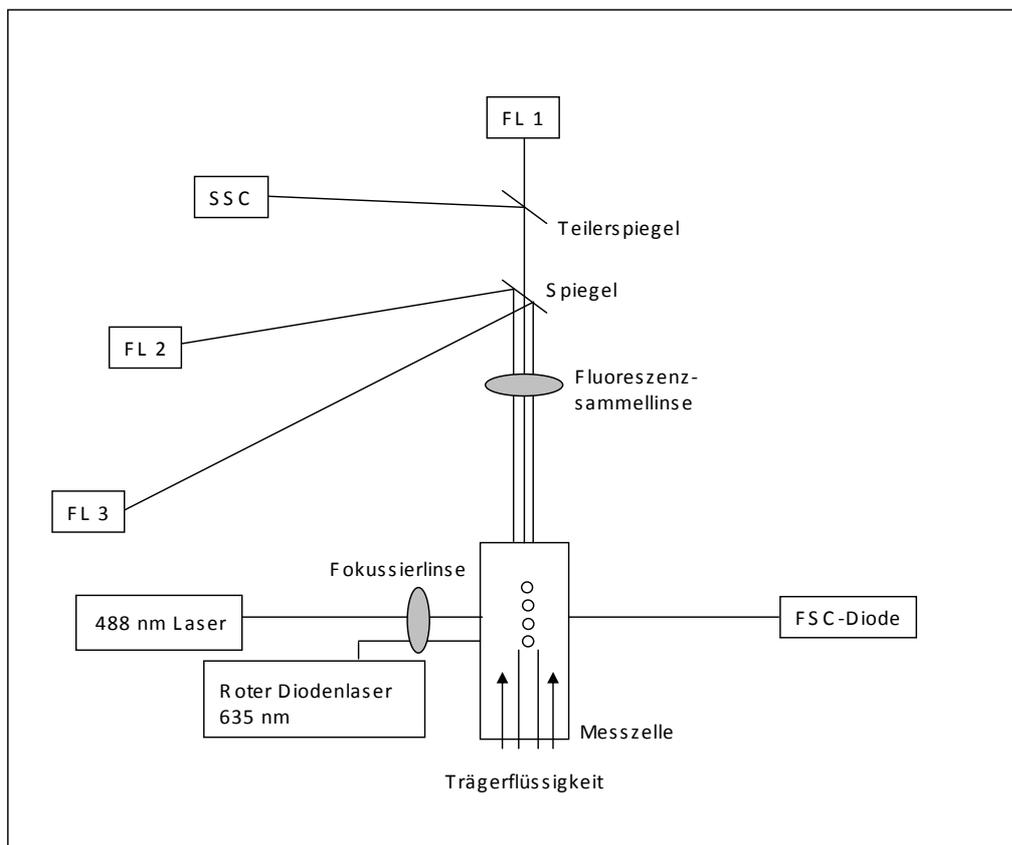
10 000 Zellen werden nach Aufnahme von Cy5-DOPE/Cy3-DNA-Komplexe im Durchflusszytometer einzeln vermessen.

1. Jede Zelle passiert zunächst den roten Diodenlaser, der den Akzeptorfarbstoff Cy5 bei 635 nm optimal anregt. Die Emission (670 nm) wird über den Fluoreszenzkanal 4 ( $661 \pm 8$  nm) gefiltert und am Photomultiplier detektiert.
2. Erst danach passiert die Zelle den Argon-Laser, von dem der internalisierte Farbstoff Cy3 angeregt wird. Während ein Teil der Energie von Cy3 als Eigenfluoreszenz bei 570 nm abgestrahlt wird, wird der andere Teil durch die FRET-Anregung des Akzeptors Cy5 verbraucht, der wiederum bei 670 nm

Fluoreszenzlicht emittiert. Die Emission beider Fluoreszenzsignale erfolgt gleichzeitig, kann durch die Fluoreszenzfilter FL2 ( $585 \pm 15 \text{ nm}$ ) und FL3 ( $> 670 \text{ nm}$ ) allerdings aufgetrennt werden.

3. Die Eigenfluoreszenz der Zelle wird gleichzeitig in FL1 ( $530 \pm 15 \text{ nm}$ ) aufgenommen.

In den durchflusszytometrischen FRET-Versuchen dieser Arbeit werden somit 4 Fluoreszenzsignale jeder Zelle gemessen. Der kritische Punkt dieser Messungen ist die zeitliche Trennung beider Laser-Anregungen. Eine Überlappung beider Anregungen würde zu falsch-positiven FRET-Signalen führen, da das FRET-Signal aus FL3 in diesem Fall durch eine direkte Anregung mit dem Dioden-Laser zu Stande kommen würde. Um derartige Störsignale zu vermeiden, wird die zeitliche Trennung beider Laser-Anregungen durch entsprechende Gerätekalibrierungen (*time delay*) überwacht (siehe 3.6.3).



**Abbildung 1-12: Schematische Darstellung des Durchflusszytometers FACS-Calibur™ aus (Bunjes 2009)**

### 1.5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Als ergänzendes optisches Messsystem für die FRET-Analytik wird ein konfokales Lasermikroskop eingesetzt. Wie das Durchflusszytometer ermöglicht dieses eine spezifische Laser-Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe und eine Detektion gefilterter Emissionssignale, so dass die einzelnen Fluoreszenzsignale getrennt voneinander gemessen werden können. Der wesentliche Unterschied beider optischen Messsysteme liegt daher nicht in der apparativen Konstruktion, sondern in der verwertbaren Stichprobenmenge: eine durchflusszytometrische Messung besteht im Regelfall aus 10 000 Zellen und wird an mindestens 3 Einzelproben durchgeführt. Bei Verwendung eines Objektivs mit geringer Vergrößerung befinden sich auf einem fluoreszenzmikroskopischen Bild der Probe etwa 10 Zellen. Für eine vergleichbare Stichprobenmenge müssten demnach etwa 3000 Bilder aufgenommen und anschließend analysiert werden. Um die statistische Aussagekraft dieser Methode zu verbessern, bedarf es daher einer optimierten Aufnahmetechnik und einem effizienten Auswerteverfahren.

Carpenter entwickelte 2006 für diese Fragestellungen eine neue Bildbearbeitungssoftware, die CellProfiler software (Carpenter *et al.* 2006). CellProfiler arbeitet nach einem *pipeline*-Prinzip, das sich baukastenartig aus verschiedenen flexiblen Modulen zusammensetzt. Die für die FRET-Versuche dieser Arbeit entwickelte *pipeline* ist in Abbildung 1-13 dargestellt. Zunächst werden in einem Ausschnitt der Probe jeweils ein Durchlichtbild sowie 3 Fluoreszenzbilder (Cy3-, Cy5- und FRET-Einstellung) aufgenommen. Mit dem Startmodul „*file processing*“ wird das Laden der Bilddateien und das anschließende Exportieren der Daten automatisiert. Auf diese Weise werden vom gleichen Probenausschnitt jeweils ein Durchlichtbild und die entsprechenden Fluoreszenzbilder eingespeist. Mit dem Folgemodul „*image processing*“ werden die Fluoreszenzbilder automatisch in Graubilder umgewandelt und so für die Analyse vorbereitet. In den Durchlichtbildern werden einzelne Zellen manuell über das Modul „*object identification*“ segmentiert und diese als „Zellen“ definierten Umrisse (*outlines*) auf das Fluoreszenzbild übertragen. Im „*measurement*“ Modul erfolgt die Berechnung der Fluoreszenzintensität dieser Bildpunkte, so dass die Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen schließlich exportiert werden können. Da es sich bei den Fluoreszenzintensitäten der Vergleichsmethode „Durchflusszytometrie“ um Integrale aus Zeit und Spannungssignal am Photomultiplier handelt, wird für die CellProfiler Analyse ebenfalls mit integrierten Fluoreszenzintensitäten, Integralen aus Pixelfäche der Zellen und Spannungssignal am Photomultiplier gerechnet.

Mit Hilfe der CellProfiler software ist es daher möglich, Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen zu messen. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie kann jedes Fluoreszenzsignal darüber hinaus lokalisiert werden (Darzynkiewicz *et al.* 1999). Dadurch lassen sich sowohl assoziierte und internalisierte Partikel leicht trennen, als auch die Fluoreszenzintensität und damit die Konzentration der Partikel in einzelnen Kompartimenten der Zelle bestimmen. Bei der Dissoziationsanalyse von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen können durch Anwendung der CellProfiler software der Ort und das Ausmaß der Dissoziation korreliert werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Aussagekraft dieser Methode durch Korrelation mit durchflusszytometrischen Messungen überprüft. Dazu müssen Durchlichtbilder von Zellen zur Zellerkennung verwendet werden. Während sich in Durchlichtbildern eine automatische Zellerkennung mit dem „*object identification*“ Modul schwierig gestaltet, ist diese für die Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellkompartimenten bereits beschrieben (Lamprecht *et al.* 2007).

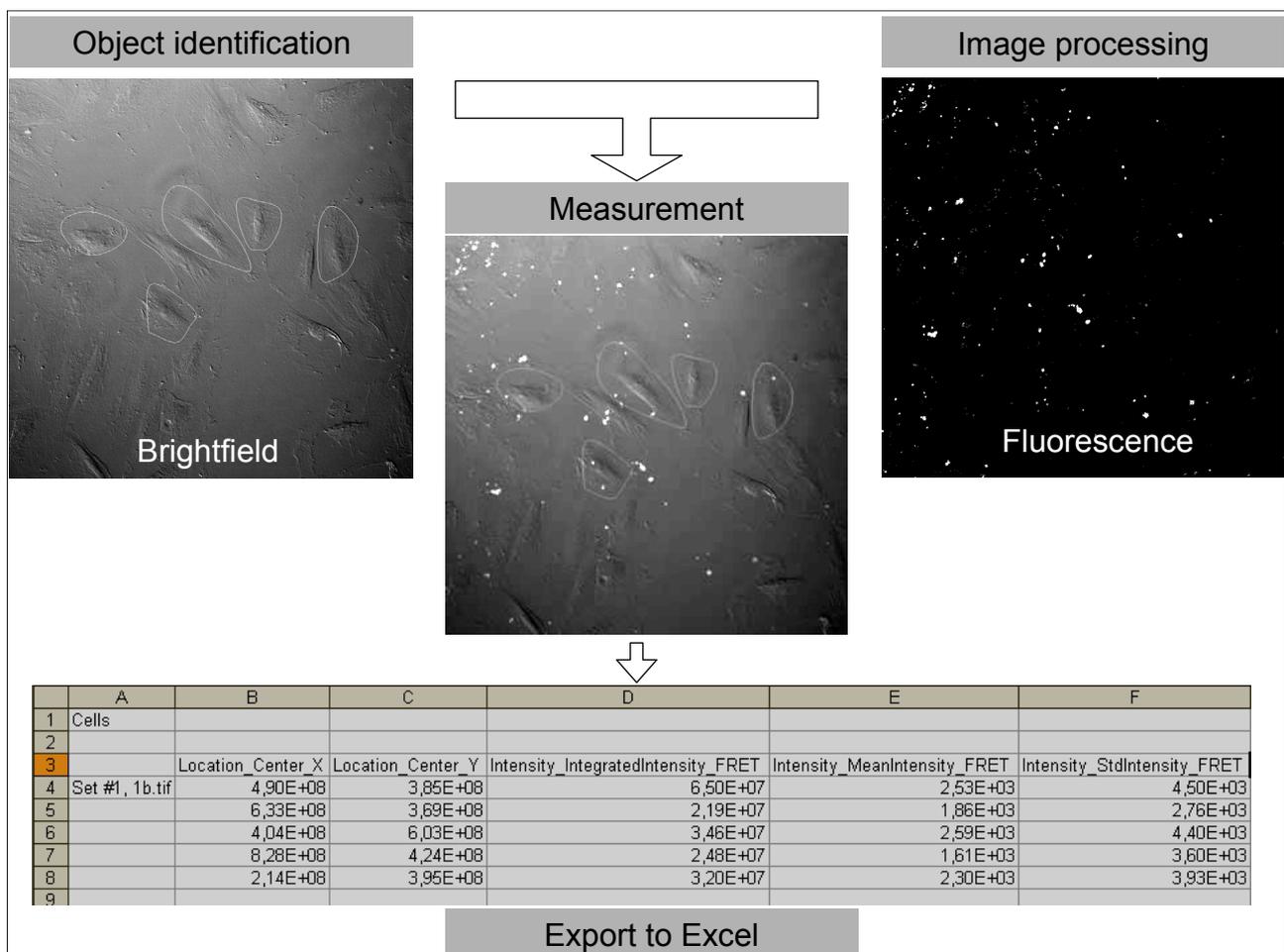


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der CellProfiler-Pipeline

Eine vollautomatische und damit beschleunigte CellProfiler Analyse ist für weitere Arbeiten also möglich, womit dieser Methode für die Endozytoseforschung nanopartikulärer Systeme eine große Bedeutung zukommt. Neben der Messung von Fluoreszenzintensitäten steht eine Vielzahl weiterer Messparameter zur Verfügung. So konnte in einer Kooperationsarbeit mit Herrn Dr. D. Lenz (Biologie II, Universität Freiburg) die Zellviabilität durch CellProfiler Analyse von Fläche und Form von COS-7 Zellen bestimmt werden.

## **1.6 Zellmodelle**

Die Analysen der zellulären Aufnahme, Prozessierung und Dissoziation von lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen werden jeweils in zwei verschiedenen Zellmodellen durchgeführt.

### **1.6.1 A-10 Zellen**

A-10 Zellen sind glatte Muskelzellen aus der embryonalen Rattenaorta. Diese etablierte Zelllinie (Kimes & Brandt 1976) lässt sich mit lipid-basierten nanopartikulären Gentransfersystemen gut transfizieren (Kiefer *et al.* 2004), so dass der Transfektionsweg dieser Gentransfersysteme gut analysiert werden kann. Es handelt sich um eine langsam wachsende Zelllinie mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 70 - 100 Stunden. Die physiologischen Eigenschaften von Muskelzellen lassen eine Aktivität von Clathrin- und Caveolae-abhängiger Endozytose in dieser Zelllinie erwarten (Parton & Simons 2007).

### **1.6.2 MDCK II Zellen**

Die Zelllinie MDCK II ist eine Zelllinie aus den proximalen Nierentubuli eines weiblichen Cocker-Spaniels. Die durchschnittliche Verdopplungszeit der Zellen liegt bei etwa 22 h (Cho *et al.* 1989).

MDCK II Zellen zeigen eine starke Expression von Caveolae-Strukturen an der Plasmamembran und eignen sich daher besonders für die Untersuchung dieses Endozytosewegs (Bush *et al.* 2006). Darüber hinaus beginnen konfluente MDCK II Zellen

zu polarisieren, indem sie unterschiedlich besetzte apikale und basolaterale Zellmembranseiten ausbilden. Mit der Polarisierung der Zellen ändern sich auch die Aktivitäten der Endozytosewege, so dass Caveolae nur noch an der basolateralen Seite der Membran zu finden sind, während *clathrin coated pits* vorwiegend apikal auftreten (Vogel *et al.* 1998). Daher wird dieses Modell bei der Untersuchung richtungsabhängiger Endozytose sowie der Transzytose häufig eingesetzt (Bomsel *et al.* 1989; Dupree *et al.* 1993).

## 2. Material

### 2.1 Lipide und Transfektionsreagenzien

Tabelle 2-1: Lipide und Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	M [g/mol]	Abkürzung	Bezugsquelle
DC-Cholesterol (3 $\beta$ -N[N',N'Dimethylamino ethan)-carbamoyl]-Cholesterol-HCL + DOPE (Dioleoylphosphatidyl ethanolamin) 3:7 (m/m), lyophilisiert	667	DC 30 <sup>®</sup>	Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA
Dioleoylphosphatidyl ethanolamin	743	DOPE	Sigma-Aldrich, Steinheim
3 $\beta$ -N[N',N'Dimethyl aminoethan)-carbamoyl]-Cholesterol-HCL	537	DC-Cholesterol	Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA
Fugene <sup>®</sup> HD	-	Kationische Lipidmischung unbekannter Zusammensetzung	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
TurboFect <sup>™</sup>	-	Kationisches Polymer unbekannter Zusammensetzung	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.2 Plasmide

Tabelle 2-2: Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
Caveolin-eGFP	L. Pelkmans, A. Helenius, ETH Zürich
eGFP-C1	BD Clontech, Heidelberg
-T2.YFP	K. Simons, MPI Dresden

## 2.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2-3: Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Anregung [nm]	Emission [nm]	M <sub>r</sub> [g/mol]	Bezugsquelle
7-Amino-actinomycin D (7-AAD)	546	647	1270	Becton Dickinson, Heidelberg
Bodipy <sup>®</sup> FL C5 Lactosylceramid komplexiert mit BSA	505	511	~66 000	Molecular Probes, Leiden, NL
Choleratoxin Untereinheit B, Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 Konjugat	590	617	~12 000	Molecular Probes, Leiden, NL
Choleratoxin Untereinheit B, Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Konjugat	495	519	~12 000	Molecular Probes, Leiden, NL
Cy5-DOPE	649	679	1381	Eigensynthese
Cy5 monoreaktiver NHS Ester	649	679	753	GE Healthcare, UK
DAPI Lösung 1 nM in PBS	358	461		Molecular Probes, Leiden, NL
FITC Dextran	493	514	40 000	Sigma, Deisenhofen
Label IT <sup>®</sup> Cy <sup>™</sup> 3 Nucleic Acid Labeling Kit	550	570	-	Mirus, Madison, USA
MFP 488 Phalloidin	501	523	1360	MoBiTec, Göttingen
Texas Red Dextran	595	615	70 000	Molecular Probes, Leiden, NL
Transferrin aus humanem Serum, Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	495	519	-	Molecular Probes, Leiden, NL
Transferrin aus humanem Serum, Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	590	617	-	Molecular Probes, Leiden, NL

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2.4.1: Primäre Antikörper**

Primärer Antikörper	Spezifikation	Bezugsquelle
Mouse anti-Caveolin-1 IgG1	Monoklonaler Antikörper gegen Caveolin-1, Klon 2297	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse anti-Caveolin-1 IgM	Monoklonaler Antikörper gegen Caveolin-1, Klon C060	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse anti-EEA1 IgG	Polyklonaler Antikörper gegen EEA1	abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti-LAMP-1	Monoklonaler Antikörper gegen LAMP-1	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 2.4.2: Sekundäre Antikörper**

Sekundärer Antikörper	Anregung [nm]	Emission [nm]	Bezugsquelle
Goat anti-mouse IgG (H+L) MFP 488	501	523	MoBiTec, Göttingen
Goat anti-mouse IgG (H+L) MFP 590	597	624	MoBiTec, Göttingen
Goat anti-mouse IgG1 ( $\gamma$ 1) Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	590	617	Molecular Probes, Leiden, NL
Goat anti-mouse IgM ( $\mu$ -chain specific) FITC	493	514	Sigma-Aldrich, Steinheim
Goat anti-rabbit IgG (H+L) MFP 488	501	523	MoBiTec, Göttingen

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-5: Verbrauchskemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Qualität	M [g/mol]	Abkürzung/ Summenformel	Bezugsquelle
Agar	-	-	-	Difco, Detroit, Michigan, USA
Agarose Ultrapure	-	-	-	USB
Albumin Bovine essential fatty acid free	> 96 %	~66 000	DF-BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniak	p.a.	17,03	NH <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhepta- molybdat Tetrahydrat	p.a.	1235,9	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
BD FACS Clean Solution	-	-	FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS Rinse Solution	-	-	FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS Flow Sheath Fluid	-	-	FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
CellScrub™ Puffer	-	-	CellScrub	Genlantis, San Diego, USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	-	-	CTG	Promega, Mannheim
Chloroform	Ph.Eur	119,4	CHCl <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	>96 % (DC)	319,89	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Chlorpromazin HCl	USP	355,33	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S HCl	Sigma, Deisenhofen
Clathrin Enhancer aus <i>Glypsophila paniculata</i> L.	-	-	-	M.F. Melzig, Freie Universität Berlin
Dimethylsulfoxid	Zellkultur getestet	78,13	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OS DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
1 kb DNA ladder	-	-	-	Promega
Endo Free® Plasmid Mega Kit	-	-	-	Qiagen, Hilden
Essigsäure 100 %	100 %	60,05	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
Ethanol	HPLC	46,01	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	> 98 %	394,33	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Qualität	M <sub>r</sub> [g/mol]	Abkürzung/ Summenformel	Bezugsquelle
Ethylendiamintetra- essigsäure, Natriumsalz	> 99 %	372,24	EDTA	Merck, Darmstadt
Filipin-Komplex von Streptomyces filipinensis	Zellkultur getestet	623-653	C <sub>35</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9-11</sub> Filipin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fiske-Subbarow- Reducer	-	-	-	Fluka, Buchs, Schweiz
Gelatine	Zellkultur getestet	-	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Genistein	> 98 %	270,24	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	> 99 %	92,09	Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-[2-Hydroxyethyl]- piperazin-N'-[2- ethansulfonsäure]	> 99,5 %	238,31	HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	p.a.	60,1	-	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogen- phosphat (Phosphorstandard)	> 99 %	136,09	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka, Deisenhofen
Kaliumhydrogen carbonat	> 99,5 %	100,11	KHCO <sub>3</sub>	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin A Lösung 5 mg/ml	95 % +5 % Kanamycin B/C	582,58	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> · H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Biochrom, Berlin
Kupfer(II)sulfat, wasserfrei	> 99 %	159,61	CuSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Lactosylceramid	> 98 %	960,0	C <sub>53</sub> H <sub>101</sub> NO <sub>13</sub> LacCer	Merck Darmstadt
Methanol	p.a.	32,0	MeOH	Roth, Karlsruhe
Metyl-β-Cyclodextrin	Zellkultur getestet	1310	MβCD	Sigma-Aldrich, Steinheim
MobiGLOW <sup>®</sup>	-	-	MobiGLOW <sup>®</sup>	MoBiTec, Göttingen
Natriumchlorid	Ultra	58,44	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	> 99 %	40,01	NaOH	Merck, Darmstadt
n-Propanol	> 99,5 %	60,1	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	> 95 %	-	(CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Sigma Aldrich, Steinheim
Phorbol-12-myristat- 13-acetat	> 99 %	616,8	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub> PMA	Merck, Darmstadt

<b>Bezeichnung</b>	<b>Qualität</b>	<b>Mr [g/mol]</b>	<b>Abkürzung/ Summenformel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Saccharose	> 99,5 %	342,3	-	Sigma Aldrich, Steinheim
Salzsäure	30 %	36,46	HCl	Merck, Darmstadt
Saponin	8-25 % Sapo genin	-	-	Fluka, Buchs, Schweiz
Schwefelsäure	p.a.	98,08	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Triethylamin	> 99,5 %	101,19	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	Roth, Karlsruhe
4-(1,1,3,3 Tetramethyl- butyl)phenylpoly- ethylenglykol	Für Molekular biologie	576,6	Triton X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid 30 % (m/m)	ACS Qualität	34,0	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, St. Louis, USA
Zwittergent 3-14 <sup>®</sup> 3-(N,N-Dimethyl- myristylammonio)- propansulfonat	> 99 %	363,6	Zwittergent <sup>®</sup>	Merck Biosciences, Bad Soden

## 2.6 Puffer

**Tabelle 2-6: Pufferzusammensetzungen**

Bezeichnung	Substanzen	Molarität	Einwaagen [g/l]
HEPES-Puffer pH 7,4 <sup>a</sup>	HEPES	10 mM	2,4
	NaCl	140 mM	8,18
Ladepuffer in TAE-Puffer pH 7,4 <sup>a</sup>	Bromphenolblau	3,7 mM	2,5
	Saccharose	1,2 M	400
LB-Medium pH 7,4 <sup>a</sup>	Trypton	-	10,0
	Hefeextrakt	-	5,0
	NaCl	-	5,0
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> pH 7,4	NaCl	137 mM	8
	KCl	2,68 mM	0,2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,81 mM	1,11
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM	0,2
PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> pH 7,4	NaCl	137 mM	8
	KCl	2,68 mM	0,2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,81 mM	1,11
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM	0,2
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM	0,1
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	500 µM	0,1
50x TAE-Puffer pH 7,4 <sup>b</sup>	Tris-HCL	2 M	242,3
	EDTA	0,05 M	18,6
TE-Puffer pH 7,4 <sup>a</sup>	TRIS-HCl	10 mM	1,211
	EDTA	1 mM	0,372
Transfektionsmedium pH 7,4 <sup>a</sup>	NaCl	25 mM	1,46
	Saccharose	250 mM	85,58

<sup>a</sup>Der pH-Wert der Lösungen wird bei Bedarf mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf den Sollwert eingestellt.

<sup>b</sup>Der pH-Wert der Lösungen wird bei Bedarf mit Eisessig auf den Sollwert eingestellt.

## 2.7 Zellen

**Tabelle 2-7: Eingesetzte Zelllinien und deren Kultivierung**

Typ	Beschreibung	Kulturmedien und Zusätze	Bezugsquelle
A-10	Glatte Muskelzellen der Ratte	DMEM + 20 % FCS + 1 % Natriumpyruvat	DSMZ, Braunschweig
COS-7	Nierenkarzinomzellen der Grünen Meerkatze	DMEM + 10 % FCS + 1 % Natriumpyruvat	DSMZ, Braunschweig
MDCK II	Distale Tubuluszellen des Hundes	DMEM + 10 % FCS	ATTC (American Type Culture Collection), Manassas, USA
E.coli	Bakterien	LB-Medium	Stratagene, Amsterdam, NL

## 2.8 Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung

**Tabelle 2-8: Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung**

Bezeichnung	Bezugsquelle/Herstellung und Lagerung
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom, Berlin
FCS (fetales Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
DF-BSA Lösung (5 % (m/m))	Frisch hergestellt
Gelatinelösung (0,2 % (m/V))	Sigma Aldrich, München
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd (4 % (m/m)) pH 7,4 <sup>a,b</sup>	Hergestellt und Aliquots bei – 20°C gelagert
PBS (Phosphate buffered saline) mit/ohne Ca/Mg	Biochrom, Berlin
Saponinlösung (1 mg/ml)	Hergestellt und bei 4 °C gelagert
Triton X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypsin 0,5 %/ EDTA 0,25 %	Biochrom, Berlin

<sup>a</sup>Der pH-Wert der Lösungen wird bei Bedarf mit 1 N NaOH auf den Sollwert eingestellt.

<sup>b</sup>Bei der Herstellung der Lösung nicht > 50 °C erhitzen, sonst Depolymerisation des PFA. Alle Lösungen werden in PBS (ohne Ca/Mg) hergestellt.

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-9: Verbrauchsmaterial**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläschen (8,12 mm) und Objektträger	Langenbrinck, Teningen
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einmalspritzen (1, 5, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
F 96 MicroWell™ Platten (Polystyrol, weiß) für Luminometer	Nunc, Wiesbaden
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon® Röhrchen aus PP (15, 50 ml/steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
HPLC Vials, 1,5ml, klar	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanülen (Größe 1 und 20/steril)	Braun, Melsungen
Mikroreaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
Molekularsieb 0,4 nm in Perform mit 2 mm Durchmesser	Merck, Darmstadt
Multiwell-Platten (24, 48 Well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Braun, Melsungen
Petrischalen (100 x 200 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polycarbonatmembranen (200, 400, 800 nm)	Nuclepore, Tuttlingen
Polystyrolröhrchen 3 ml	Sarsted, Nürnberg
Schraubkappen mit Loch, schwarz, mit Septum aus Silicon PTFE 1,3mm, rot	VWR International GmbH, Darmstadt
Sterilfilter 0,2 µm Rotilabo® Sterilfilter 0,2 µm Acrodisc® 13 mm mit HA Tuffryn® Membran (geringe Proteinbindung)	Roth, Karlsruhe Pall, Dreieich
Transwells® 3 µm Polycarbonatmembran	Corning, Berlin

## 2.10 Geräte

**Tabelle 2-10: Konfokales Mikroskop**

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
CCD-Kamera	C4880-80	Zeiss, Jena
Inverses Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop	LSM i-UV 510 meta LSM NLO-510 meta	Zeiss, Jena
Objektiv	20x Plan-Apochromat	Zeiss, Jena
	63x Plan-Apochromat	Zeiss, Jena
	100x Plan-Neofluar	Zeiss, Jena
Quecksilberdampflampe	HBO 200	Zeiss, Jena
Vorschaltgerät	-	Zeiss, Jena
Software	LSM Image Browse Rel. 4.0	Zeiss, Jena
	ImageJ 1.42	National Institutes of Health, USA
	CellProfiler	Broad Institute, USA

**Tabelle 2-11: Spectra Cube™ System**

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
CCD-Kamera	C4880-80	Hamamatsu, Japan
Inverses Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100	Zeiss, Jena
Objektiv	100 x Plan-Neofluar	Zeiss, Jena
Quecksilberdampflampe	HBO 100	Zeiss, Jena
Vorschaltgerät	Attoarc 2	Zeiss, Jena
Spectra Cube™ mit: Interferometer Steuerung	SD-200H	Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel
Tripelbandpassfilterset	AF61-020	AHF Analysentechnik, Tübingen
Software	Spectral Imaging und Spectral View	Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel
	AxioVision Rel. 4.6	Zeiss, Jena

**Tabelle 2-12: Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskop**

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
Cryo-Kammer	Cryo-Box 340719	Zeiss, Jena
Kamera TEM	Proscan HSC 2	Oxford Instruments, Abingdon, USA
Cryo-Probenbehälter	Model 626-DH	Gatan, Warrendale, USA
Grids (Kupfer mit Kohlefilm)	Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon films	Quantifoil Micro Tools, Jena
Transmissionselektronen mikroskop	Leo 912 $\Omega$ -mega	Leo, Oberkochen
Transmissionselektronen mikroskop Software	iTEM 5.0 (Bulid 1054)	Soft Imaging System, Münster

**Tabelle 2-13: HPTLC-Apparatur**

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
Automatische Entwicklungskammer	ADC-2	Camag, Muttenz, CH
DC-Aufsprühgerät	Linomat IV	
Densitometrische DC- Platten-Scanner mit Software	TLC-Scanner III mit CATS4 Software	
Doppeltrogkammer mit Edelstahldeckel	Für 20x10 cm DC-Platten	
Heizplatte	TLC-Platte Heater III	
HPTLC-Platten	20x10 cm Kieselgel 60, WRF <sub>254s</sub>	

**Tabelle 2-14: Andere Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Analysenwaage	BP 301 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 3850 EL	Systec, Wettenberg
Chromatographiesäulen	Econo-Column 1,5 x 5,0 cm	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer Software	FACSCalibur™ CellQuest™ Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	GNA 100	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Evaporationszentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Fluorimeter	LS 50 B	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop mit: Quecksilberdampfampe Vorschaltgerät	Axiovert 40 CFL: HBO 50 Mbq 52 ac-z	Zeiss, Jena
Hamiltonspritzen	10, 50, 100, 500, 1000 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Handextruder	LiposoFast 1000 µl	Avestin, Ottawa, Kanada
Inkubatoren	APT Line CB Hera cell 150	Binder, Tuttlingen Heraeus Instruments, Fellbach
Laborschüttler	Vibramax 100, Heidolph Instruments	Neo Lab, Heidelberg
Laborwaage	LP 3200 D	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 3002	Heidolph, Kelheim
Microplate Luminometer Software	Microlumat Plus LB 96 V WinGlow	EG & Berthold, Bad Wildbad
Minischüttler	Vortexer Reax control	Heidolph, Kelheim
Neubauer-Zählkammer		Multimed, Kirchheim
pH-Meter	CG 843 P	Schott, Mainz
Photonenkorrelations-spektroskop	BI-90 Plus®	BIA-Brookhaven Instruments, Wien, Österreich
Pipetten	Pipetman, Gilson	Laborshop Neolab®, Freiburg
Präzisionsküvette 115F-QS	Quarzglas Suprasil	Hellma, Müllheim

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Pumpen	Ismatec IPS-12	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
	Reglo Digital 4	
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwede
Sicherheitswerkbänke	Herasafe HSP 18 (Zellkultur) Herasafe KSP 18 (Zellkultur)	Heraeus Instruments, Fellbach
Schläuche für Pumpen	1,0 mm Tygon 2001	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
	4,0 mm ITE Sanitech	
TEER-Elektrode	EndOhm®	WPI-Europe, Berlin
Tischlyophilisator	Alpha 2-4 Christ	Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
	Lyophilisator Lyovac GT2	Finn Aqua, Hurth
Umkehrphasensäule	LiChroPrep C-18 40-63 µm	Merck, Darmstadt
Ultraschallspitze	Sonoplus GM70	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
UV/VIS-Spektrophotometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech (Biochrom), Cambridge, GB
Wasseraufbereitung	Milli- Q Academic	Millipore GmbH, Schwalbach
Y-Stück	400 µm	Hausfertigung MPI Golm
	Hibiki Y-1 3mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5417 R	
	Universal 16	Hettich, Tuttlingen
	Mini Centrifuge GMC-060	LFT Labortechnik, Wasserburg

## **3. Methoden**

### **3.1 Herstellung und Charakterisierung der Ausgangsliposomen**

#### **3.1.1 Modifizierte Filmmethode**

Die Lipidmischung DC 30<sup>®</sup> (DC-Cholesterol und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) 3:7 (m/m)) wird vom Hersteller lyophilisiert in 10 mg Einheiten geliefert. Eine 10 mg Einheit wird zunächst in 3,3 ml Chloroform/Methanol 3:1 (V/V) gelöst, in HPLC Vials aliquotiert (100 µl) und das Lösungsmittelgemisch anschließend in einer Evaporationszentrifuge abgedampft. Dabei entstehen Lipidfilme an der Glaswand. Die Aliquots werden bei -20 °C gelagert. Die Lipidmenge pro Aliquot wird mit der Methode nach Bartlett (siehe 3.1.6) bestimmt.

Für die Herstellung von Ausgangsliposomen wird ein Aliquot in sterilfiltriertem Transfektionsmedium aufgenommen und das Lipid 30 min vorgequollen (c = 1 mg/ml). Zur vollständigen Redispergierung wird die Dispersion für drei Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten. Die erhaltenen Ausgangsliposomen können anschließend für die Komplexierung von DNA verwendet werden.

#### **3.1.2 Extrusion der Ausgangsliposomen**

Ausgangsliposomen werden wie unter 3.1.1 beschrieben hergestellt. Anschließend werden diese Ausgangsliposomen zusätzlich durch Polycarbonatmembranen extrudiert. Die Extrusion erfolgt entweder 21-mal durch eine 800 nm und 51-mal durch eine 400 nm Membran oder nur 1-mal durch eine 800 nm Membran.

#### **3.1.3 Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen**

Ausgangsliposomen werden wie unter 3.1.1 beschrieben hergestellt und anschließend in einem Ultraschallbad 10 - 210 min oder mit Hilfe einer Ultraschallspitze 5-mal 30 s im Pulsbetrieb zerkleinert.

### 3.1.4 Fluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzmarkierung der Ausgangsliposomen wird DOPE, ein Bestandteil der DC 30<sup>®</sup>-Mischung, an den Cyaninfarbstoff Cy5 kovalent gebunden. Die Synthese des Endproduktes Cy5-DOPE basiert auf Arbeiten von Kada und wurde in der eigenen Arbeitsgruppe durch Herrn Martin Holzer eingeführt (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) (Kada 2001; Holzer 2009).

Die verwendeten Lösungsmittel werden vor Versuchsbeginn mit einem Molekularsieb (0,4 nm in Perform mit 2 mm Durchmesser) getrocknet.

Für die Synthese werden 3 mg DOPE in 1,2 ml Chloroform/Methanol 1:1 (V/V) gelöst und 25 µl Triethylamin hinzu gegeben. 1 mg Cy5-NHS-Ester wird in 1 ml Methanol gelöst und ebenfalls zum Ansatz gegeben. Nach 3 h Rühren unter Argonatmosphäre werden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und schließlich am Hochvakuum abgedampft. Der getrocknete Rest wird in 50 µl organischer Phase (Ethanol/n-Propanol 5:2 (V/V)) gelöst und danach mit wässriger Phase (gereinigtem Wasser + 0,1 % Eisessig) 1:10 verdünnt. Die Lösung wird auf eine Umkehrphasensäule (*reverse phase*, LiChroPrep) gegeben und Cy5-DOPE schließlich mit 60 % organischer Phase eluiert.

Die Ausbeute Cy5-DOPE wird durch Absorptionsmessung des Eluats bei 646 nm bestimmt. Als molarer Absorptionskoeffizient  $\epsilon$  wird der Cy5 Literaturwert ( $\epsilon_{646\text{nm}} = 250\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) eingesetzt. Eine experimentelle Bestimmung von  $\epsilon$  Cy5-DOPE würde 100 % reine Substanz voraussetzen, die nicht zur Verfügung steht. Die Gehaltsbestimmung ist somit nur eine Annäherung, da die Absorptionskoeffizienten von Cy5 und Cy5-DOPE sich nicht entsprechen müssen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wird eine Ausbeute von 227 µg berechnet.

Das Endprodukt wird lyophilisiert (Lyovac GT2 Finn Aqua, Hurth) und bei -20 °C gelagert. Für die Herstellung der fluoreszenzmarkierten Liposomen werden Cy5-DOPE und ungefärbtes DOPE in Ethanol/n-Propanol 5:2 (V/V) gelöst und im angegebenen Verhältnis gemischt (0,1/1/10 % Cy5-DOPE/DOPE (m/m)). Zu der Lösung wird soviel DC-Cholesterol (gelöst in Chloroform/Methanol 3:1 (V/V)) gegeben, dass eine DC 30<sup>®</sup>-Mischung (DOPE/DC-Cholesterol 7/3 (m/m)) entsteht. Die Lösungsmittel werden in einer Evaporationszentrifuge abgedampft und die entstehenden Lipidfilme direkt weiterverwendet. Alle weiteren Schritte zur Herstellung der Ausgangsliposomen entsprechen 3.1.1. Bei der Redispergierung der gefärbten Lipidmischung ist deutlich erkennbar, dass ein mehrmaliges Auf- und Abpipettieren für eine vollständige

Redispergierung nicht ausreichend ist. Erst eine Ultraschallbehandlung über mehrere Sekunden führt zu einer visuell homogenen Dispersion.

### 3.1.5 Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die HPTLC ist eine analytische Methode, die sowohl die Charakterisierung und Quantifizierung von Phospholipiden wie DOPE (Touchstone & Alvarez 1988; Helmerich & Koehler 2003; Clement 2005) als auch von Cholesterolderivaten wie DC-Cholesterol ermöglicht (Holzer *et al.* 2009). Damit sind beide Bestandteile der DC 30<sup>®</sup>-Lipidmischung analytisch zugänglich.

Für die HPTLC-Analyse werden zunächst eine DOPE-Standardlösung (25 µg/ml in MeOH) und eine DC-Cholesterol-Standardlösung (1 µg/ml in MeOH) hergestellt. Unterschiedliche Volumina der Standardlösungen (DOPE: 2, 6, 10, 16 µl; DC-Cholesterol: 10, 25, 50, 75 µl) werden mit einem Linomat IV-Aufgabeautomaten bandenförmig auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Zur Analyse der DC 30<sup>®</sup>-Lipidmischung wird das Lipid in HEPES-Puffer vorgequollen (500 µg/ml), anschließend mit MeOH 1:20 (V/V) verdünnt und 5, 10, 20 µl dieser Lösung ebenfalls auf die HPTLC-Platte aufgetragen.

Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt mit Hilfe eines vollautomatischen Entwicklungsgerätes (ADC-2). Nach 10-minütiger Sättigung der Kammer und gleichzeitiger Einstellung der Plattenfeuchte in Luft von  $37 \pm 2$  % rF sowie anschließender Konditionierung der Platte im Fließmitteldampf über 15 min wird die Platte über eine Laufstrecke von 5 cm mit dem Fließmittelgemisch CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O 18,75:6,9:0,15:0,35 (V/V/V/V) wie von Clement beschrieben entwickelt (Clement 2005). Nach dem automatischen Trocknen der Platte über 10 min im Kaltluftstrom wird diese für 2 s in eine phosphorsaure Kupfersulfatlösung (10 % (m/V)) eingetaucht, 20 min getrocknet und schließlich 10 min bei 140 °C erhitzt. Die Absorptionen der Lipidspots werden mit einem densitometrischen DC-Platten-Scanner bei 365 nm vermessen und die Ergebnisse mit der Software CATS4 ausgewertet. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Alexander Burghardt (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) durchgeführt.

### 3.1.6 Quantifizierung des Lipidgehaltes nach Bartlett

Diese Quantifizierung der Lipidmischung DC 30<sup>®</sup> basiert auf der spektroskopischen Bestimmung des Phospholipids DOPE nach Bartlett (Bartlett 1959). Dabei werden die enthaltenen Phosphoratome oxidativ verascht und die entstehenden Phosphationen mit Ammoniummolybdatlösung als blauer Komplex spektroskopisch vermessen.

Alle verwendeten Geräte werden zunächst phosphatfrei gespült. Zur Herstellung der benötigten Lösungen wird Millipore<sup>®</sup>-Wasser verwendet. Die Kalibratoren werden als Einzelwerte bestimmt. Für jede DC 30<sup>®</sup>-Charge wird die Phosphatmenge ( $\mu\text{mol}$ ) von 5 Aliquots, die über den in 3.1.1 beschriebenen Aliquotierprozess verteilt gezogen und abgedampft werden, bestimmt. Keine Probe darf den Wert von 0,35  $\mu\text{mol}$  übersteigen. Für die Kalibriergerade werden 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350  $\mu\text{l}$  der 1 mM Phosphat-Standardlösung in Reagenzgläser eingewogen. Die Proben und Kalibratoren werden anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  einer 10 N Schwefelsäure versetzt, intensiv gevortext und für 3 h bei 160 °C vollständig verascht. Danach erfolgt die Zugabe von 140  $\mu\text{l}$  einer 30 %-igen (V/V) Wasserstoffperoxidlösung. Die Versuchsansätze werden für weitere 2 h bei 160 °C inkubiert. Nach Abkühlen werden 4,6 ml frisch hergestellte 0,22 %-ige (m/V) Ammoniummolybdatlösung zugegeben, kurz gemischt und anschließend 200  $\mu\text{l}$  14,8 %-ige (m/V) Fiske-Subbarow-Reducer hinzupipettiert und gevortext. Die Reagenzgläser werden mit Glasmurmeln verschlossen und in den auf 95 °C vorgeheizten Heizblock überführt. Nach 10 min Inkubationszeit lässt man die Proben auf RT abkühlen, vortext und bestimmt die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 830 nm gegen den Leerwert. Es wird eine Kalibriergerade erstellt und die Phosphatmenge ( $\mu\text{mol}$ ) der Proben mittels Interpolation bestimmt. Diese entspricht der Stoffmenge des Phospholipids DOPE in einem Aliquot. Die Gesamtmenge DC 30<sup>®</sup> pro Aliquot wird berechnet, indem die Durchschnittsmenge DOPE der 5 Aliquots auf die Gesamtmenge Lipid pro Aliquot hochgerechnet wird (Verhältnis 7:3).

### 3.2 Plasmidgewinnung und Charakterisierung

Die Arbeiten wurden von Frau Birgit Erhard (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) durchgeführt.

### 3.2.1 Transformation

Die Transformation der Bakterien wird nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  werden die Abstoßungskräfte der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Bakterienmembran reduziert und die Bakterien so „kompetent“ gemacht (Mandel & Higa 1970). Anschließend wird ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit kryokonservierten, kompetenten JM 109 E.coli Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und mit 5 ng der herzustellenden Plasmid-DNA (eGFP-C1) inkubiert. eGFP-C1 vermittelt eine Kanamycin- und eine Neomycin-Resistenz und besitzt eine Vektorgröße von 4,7 kb. Die Suspension wird für weitere 30 min auf Eis und anschließend 10 min ohne Schütteln im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Prozess kann die DNA ins Zellinnere wandern. Danach wird die Suspension mit einem Drygalski-Spatel auf eine kanamycinhaltige Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Regenerationsphase). Zur Langzeitlagerung positiver Klone wird eine Glycerinstammlösung angesetzt (15 % Glycerin, Einfrieren in flüssigem Stickstoff).

### 3.2.2 Plasmidisolierung

Das Kanamycinresistenzgen des eGFP-C1 Vektors vermittelt die Expression des Enzyms Phosphotransferase, das Kanamycin phosphoryliert und so inaktiviert. Dies ermöglicht die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien in kanamycinhaltigen Medien.

Auf diese Weise werden zunächst 4 ml Vorkulturen in kanamycinhaltigem LB-Medium (50 µg/ml) durch Beimpfung des Mediums mit einer Kolonie des Glycerinstocks hergestellt. Diese werden bei 37 °C für 6 h im Inkubator geschüttelt (200 rpm) und anschließend in Erlenmeyerkolben mit 550 ml kanamycinhaltigem LB-Medium überführt, wo sie bei 37 °C unter Schütteln (170 rpm) über Nacht wachsen können. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus diesen Bakterienkulturen wird der Endofree Plasmid Mega Kit von Qiagen<sup>®</sup> verwendet. Nach den Anweisungen des Herstellers werden die Kulturen pelletiert (6000 x g, 15 min, 4 °C), lysiert und über eine Anionenaustauschersäule gereinigt. Während die DNA bei der eingestellten Salzkonzentration und dem vorliegenden pH-Wert an die Säule gebunden ist, werden Proteine, RNA und weitere niedermolekulare Verunreinigungen durch Waschprozesse abgetrennt. Anschließend wird die DNA von der Säule eluiert, mit Ethanol präzipitiert und pelettiert (4500 x g, 60 min, 4 °C), bevor sie mit autoklaviertem TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen wird.

### 3.2.3 Bestimmung der Plasmidkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Plasmid-DNA mit TE-Puffer (pH 7,4) 1:100 verdünnt und spektroskopisch bei 260 und 280 nm vermessen. Unter Anwendung folgender Gleichung kann die Konzentration der Plasmid-Lösung bestimmt werden.

$$c_{DNA} = A_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$c_{DNA}$  Konzentration DNA (mg/ml)

$A_{260}$  Absorption bei 260 nm

Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm lässt sich der Reinheitsgrad der Plasmid-Lösung bestimmen. Ein Verhältnis  $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$  garantiert eine weitgehend protein- und kohlenhydratfreie Lösung (Mülhardt 2003). Es wird nur Plasmid verwendet, das einen Wert  $< 2,0$  aufweist.

### 3.2.4 Fluoreszenzfärbung

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid eGFP-C1 exprimiert das Fluoreszenzprotein GFP, ein 27 kDa großes Protein aus der Qualle *Aequoria victoria*. Durch Mutation konnte die Fluoreszenzintensität dieses Proteins um das 35-fache gesteigert werden, daher der Zusatz eGFP („*enhanced*“ GFP). Die Verwendung dieses Plasmids erlaubt die fluorimetrische Analyse von Zellen nach erfolgreicher Expression des Proteins. Um das Plasmid vor seiner Transfektion und der damit verbundenen GFP Expression fluorimetrisch zu erfassen, muss es mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Dies ist mit dem *labeling kit* der Firma MIRUS möglich. Nach Angaben des Herstellers wird die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 kovalent verbunden und über eine *microspin* Säule aufgereinigt.

Für die Berechnung von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Effizienzen (3.10.2) muss die Anzahl der Farbstoffmoleküle, die von einer DNA gebunden werden (*labeling ratio*), bekannt sein. Dies wird über eine Absorptionsmessung nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die DNA wird dafür zunächst mit 5 M NaCl Ethanollösung präzipitiert, pelettiert und in Puffer A des verwendeten *labeling kits* aufgenommen. Dies ist notwendig, da der Hersteller bei einer Verwendung der *microspin*-Säulen auf erhöhte UV-

Absorptionswerte bei 260 nm hinweist. Die gereinigte DNA kann dann vermessen werden und die Absorption bestimmt werden.

$$A_{DNA} = A_{260} - (A_{Cy3} \times C.F._{.260})$$

$A_{DNA}$	Absorption der DNA
$A_{260}$	Absorption der Cy3-DNA bei 260 nm
$A_{Cy3}$	Absorption Cy3-DNA bei $\lambda_{max}$ Cy3 (550 nm)
$C.F._{.260}$	Korrekturfaktor für Cy3 (laut Hersteller 0,08)

Nach Bestimmung von  $A_{DNA}$  lässt sich das Verhältnis der Basenpaare DNA zu Farbstoffmolekülen berechnen:

$$DNA/Cy3 = \frac{(A_{DNA} \times \epsilon_{Cy3})}{(A_{Cy3} \times \epsilon_{DNA})}$$

$\epsilon_{DNA}$	6600 ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) (laut Hersteller)
$\epsilon_{Cy3}$	150 000 ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) (laut Hersteller)

Das für die FRET-Versuche verwendete Cy3-eGFP-C1 Plasmid hat ein DNA/Cy3-Verhältnis von 40 bp/1 Cy3. Dies entspricht 75 pmol Cy3, die an 1  $\mu$ g DNA gebunden sind.

### 3.3 Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen

#### 3.3.1 Standardprotokoll: Herstellung im kleinen Maßstab durch Pipettieren

Als Standardprotokoll zur Komplexierung von DC 30<sup>®</sup> und eGFP-C1 wird die Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) beschrieben. Die jeweiligen Ausgangsliposomen (siehe 3.1.1 - 3.3.4) werden mit sterilfiltriertem Transfektionsmedium zu einer 0,16  $\mu$ g/ $\mu$ l Dispersion verdünnt. Die zu komplexierende DNA (siehe 3.2) wird mit sterilfiltriertem Transfektionsmedium zu einer 0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l Lösung verdünnt. Für die Komplexierung von 1  $\mu$ g DNA werden 50  $\mu$ l der DNA-Lösung in 50  $\mu$ l der Lipiddispersion pipettiert und der Ansatz für 3 s gevortext. Die Konzentration der so gebildeten Lipid/DNA-Komplexe wird in der vorliegenden Arbeit über die DNA-Konzentration ( $\mu$ g/ $\mu$ l) der Komplexdispersion

definiert. Sie beträgt im angeführten Beispiel 0,01 µg/µl. Alle Schritte erfolgen unter einer Sterilbank. Die so hergestellten Komplexe werden charakterisiert (siehe 3.4) und/oder nach 20 min im Zellversuch eingesetzt.

Das Protokoll wird bei jedem Versuch auf die benötigte Menge komplexierter DNA angepasst, indem die Volumina von Lipiddispersion und DNA-Lösung erhöht bzw. erniedrigt werden.

Die Oberflächenladung der Komplexe wird durch Veränderung des Lipid/DNA-Verhältnisses (m/m) eingestellt. Dabei wird die Konzentration der Lipiddispersion angepasst, während die Konzentration der DNA-Lösung gleich bleibt. So werden immer gleiche Volumina DNA-Lösung und Lipiddispersion zusammenpipettiert und nie das Massenverhältnis der Komplexe durch Erhöhung des Lipiddispersionsvolumens eingestellt. Aus den Massenverhältnissen und den molaren Massen der Substanzen können die Ladungsverhältnisse der Komplexe bestimmt werden.

$$\text{Lipid} / \text{DNA}(+ / -) = \frac{m_{\text{Lipid}} \times 0,3 \times M_{\text{DNA}}}{m_{\text{DNA}} \times M_{\text{Lipid}}}$$

$m_{\text{Lipid}}$  Gesamtlipid (µg)

$m_{\text{Lipid}} \times 0,3$  Masse kationisches Lipid (µg)

$m_{\text{DNA}}$  Masse DNA (µg)

$M_{\text{DNA}}$  325 (g/mol) Molekulargewicht DNA pro Ladung

$M_{\text{Lipid}}$  500 (g/mol) Molekulargewicht DC-Cholesterol (kationisches Lipid)

Für 8:1 (m/m) Lipid/DNA-Komplexe ergibt sich danach ein Ladungsverhältnis Lipid/DNA (+/-) von 1,6.

Alternativ wird die Oberflächenladung durch Veränderung der Lipidzusammensetzung eingestellt. In diesem Fall wird das Lipidverhältnis der Lipidmischung DC 30<sup>®</sup> (DC-Cholesterol/DOPE 3/7 (m/m)) auf ein Lipidverhältnis DC-Cholesterol/DOPE von 1/1 (m/m) verändert. Dieses Lipidverhältnis ist nicht kommerziell erhältlich, sondern wird durch Mischen von Chloroform/Methanol-Lösungen (3:1 (V/V)) der Einzellipide hergestellt.

Da die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten verglichen werden sollen, werden die Ausgangskonzentrationen der DNA-Lösung bzw. der Lipiddispersion teilweise angepasst. Diese Abweichung vom Standardprotokoll wird im Text durch Angabe der DNA-Konzentration vermerkt.

Um den Einfluss der Ausgangskonzentration von DNA bzw. Lipid auf die Komplexbildung zu betrachten, werden bei einigen Versuchen die Konzentrationen beider Komponenten um den Faktor 5 oder 10 erhöht.

### **3.3.2 Herstellung im kleinen Maßstab durch Zusammenpumpen**

Lipiddispersionen und DNA-Lösungen werden wie unter 3.3.1 beschrieben hergestellt. Beide Komponenten werden jedoch nicht durch Zusammenpipettieren vereint, sondern über eine Schlauchpumpe (Ismatec Reglo Digital 4) mit gleicher Geschwindigkeit in ein Y-Stück befördert und dort gemischt. Für die Herstellung im kleinen Maßstab werden Volumina von 250 - 1000 µl zusammengepumpt. Der Durchmesser des Y-Stücks beträgt 400 µm.

### **3.3.3 Herstellung im großen Maßstab durch Zusammenpumpen**

Die Herstellung entspricht Protokoll 3.3.2. Um Komplexe in einem großen Maßstab herstellen zu können, wird eine Ismatec IPS-12 Schlauchpumpe verwendet. Der Durchmesser des Y-Stücks beträgt hier 3 mm. Es werden 19 ml DNA Lösung und 19 ml Lipiddispersion mit gleicher Flussrate zusammengepumpt.

### **3.3.4 Lyophilisation**

Lipid/DNA-Komplexe werden nach einem der beschriebenen Verfahren (siehe 3.3) hergestellt und jeweils 90 µl in 1 HPLC Vial abgefüllt. Für die Lyophilisation wird ein Tischlyophilisator (Alpha 2-4 Christ) verwendet. Die Proben werden zunächst bei - 50 °C und 1000 mbar Kammerdruck 3 h eingefroren. Für die anschließende Primärtrocknung wird der Kammerdruck auf 0,05 mbar gesenkt und bei -20 °C für 42 h getrocknet. Die Sekundärtrocknung erfolgt bei erhöhter Temperatur (30 °C) für weitere 6 h. Nach Abkühlen auf 5 °C kann das lyophilisierte Produkt entnommen werden.

Die Komplexe werden vor dem Versuch in Millipore®-Wasser (90 µl pro Vial) aufgenommen und nach 30 min eingesetzt. Je nach Konzentration der hergestellten Komplexe (3.3.1) wird auf eine Konzentration von 1 µg DNA/100 µl Komplexdispersion mit sterilfiltriertem Transfektionsmedium verdünnt.

### 3.3.5 Extrusion von Lipid/DNA-Komplexen

Lipid/DNA-Komplexe werden nach 3.3.4 hergestellt, lyophilisiert und redispergiert. Anschließend werden die Komplexe 7-mal durch 800 nm, 11-mal durch 400 nm oder 11-mal durch 200 nm Polycarbonatmembranen extrudiert.

## 3.4 Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen

### 3.4.1 Größenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Es werden nach 3.1 Ausgangsliposomen und nach 3.3 Lipid/DNA-Komplexe in sterilfiltriertem Transfektionsmedium hergestellt und mit Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) vermessen. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der mittleren Partikelgröße durch die zeitabhängige Messung von Streulichtintensitäten. Das Streulicht wird erzeugt, indem die Partikel in der Messzelle (Präzisionsküvette aus Quarzglas, Füllvolumen 500 µl) von einem Laserstrahl (635 nm) getroffen werden und Streulichtwellen aussenden. Die Detektion erfolgt im Winkel von 90° zur Richtung des Laserstrahls. Durch die Diffusion der Partikel (Brown'sche Molekularbewegung) in der Messzelle ändert sich der Abstand der Partikel zum Detektor über die Zeit. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Partikelgröße. Da Streulichtwellen auf dem Weg zum Detektor interferieren und das Ausmaß der Interferenz von der zurückgelegten Distanz der Partikel abhängig ist, fluktuiert das Streulichtsignal über die Zeit. Die Streulichtfluktuation ist von der Bewegung der Partikel und damit von ihrer Größe abhängig.

Dieser Zusammenhang wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung für kugelförmige Partikel beschrieben:

$$D = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times d}$$

D Diffusionskoeffizient ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

k Boltzmann-Konstante ( $\text{N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$ )

T Temperatur (K)

$\eta$  dynamische Viskosität ( $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ )

d hydrodynamischer Durchmesser (m)

Alle Messungen werden in sterilfiltriertem Transfektionsmedium durchgeführt und der hydrodynamische Durchmesser der Partikel für einen Brechungsindex von 1,3455 und eine Viskosität von 1,2032 mPa·s wie von Clement beschrieben (Clement 2005) intensitätsgewichtet bestimmt.

Während der hydrodynamische Durchmesser auf die Partikelgröße schließen lässt, gibt der Polydispersitätsindex (PI) die relative Verteilungsbreite an und ist damit ein Maß für die Homogenität der Probe. Beide Größen werden in der vorliegenden Arbeit mit dem BI-90 Plus<sup>®</sup> bei 25 °C bestimmt. Das Gerät verfügt darüber hinaus über die Möglichkeit eine mittlere Größenverteilung (MSD) zu ermitteln. Die Bestimmung basiert auf dem *Non-Negatively constrained Least Squares (NNLS)* Algorithmus und wird ebenso in der Arbeit verwendet.

### 3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es werden 8 µl einer Komplexdispersion (siehe 3.3) mit 4 µl Zwittergentlösung<sup>®</sup> (0,1 % (m/V)) in NaAc-Puffer (pH 6) versetzt und die Komplexe so dissoziiert. Die Probe wird mit 3 µl Ladepuffer verdünnt und eine Gelelektrophorese nach Sambrook (Sambrook 1989) durchgeführt. Dabei wird die Probe in einem 0,5 - 1 % (m/V) Agarosegel 30 min in TAE-Puffer bei 100 V entwickelt. Als Längenstandard dient eine 1 kb Leiter. Nach Erreichen der gewünschten Laufstrecke wird das Gel aus der Kammer entfernt und in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 15 min gefärbt. Die Detektion erfolgt mit einem UV-Transilluminator und einer CCD-Kamera bei 312 nm.

Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Holger Weiß durchgeführt (Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Universität Freiburg).

### 3.4.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Spektrometrie

Folgende Lipid/DNA-Komplexe werden mit unterschiedlicher Färbung (Cy3-DNA und/oder Cy5-DOPE) der Einzelkomponenten nach Protokoll 3.3.1 hergestellt: ungefärbt, einfach gefärbt oder doppelt gefärbt. Die Herstellung erfolgt unter aseptischen Bedingungen, da die Komplexe nach spektrometrischer Untersuchung im Zellversuch eingesetzt werden. Für die Fluoreszenzfärbung der lipophilen Komponente wird 0,1,1 oder 10 % (m/m) Cy5-DOPE zu dem benötigten Anteil an ungefärbtem DOPE gemischt. Die Komplexe werden

in eine Mikroküvette (Füllvolumen 500 µl) überführt und in einem Fluorimeter (LS 50B) bei 25 °C vermessen. Jede Probe wird bei drei unterschiedlichen Einstellungen vermessen: Donor-, Akzeptor- und FRET-Einstellung bei jeweils maximaler Spaltbreite (15 nm).

Die FRET-Messungen werden mit der Dissoziation der Komplexe beendet. Dafür werden 100 µl Zwittergent® (0,1 % (V/V) in NaAc-Puffer) zu 400 µl Komplexdispersion in die Küvette gegeben. Die Probe wird gevortext und nach 10 min vermessen.

**Tabelle 3-1: FRET-Einstellungen am Fluorimeter**

Fluoreszenzfarbstoff			LS 50B	
Fluorophor	Anregung [nm]	Emission [nm]	Monochromator [nm]	Filter [nm]
Donor (Cy3)	550	570	488	560
Akzeptor (Cy5)	649	670	650	670
FRET (Cy3/Cy5)	550	670	488	670

### 3.4.4 Cryo-Transmissions- Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Lipid/DNA-Komplexe werden nach einem der beschriebenen Protokolle (siehe 3.3) hergestellt. Etwa 5 µl der Probe werden auf ein mit einem Kohlefilm präpariertes Kupfernetz (*grid*) aufgetragen (Fukami & Adachi 1965). Das überschüssige Probenvolumen wird mit einem Filterpapier abgesaugt und das Netz in flüssigem Ethan schockgefroren. Anschließend wird das gefrorene probenhaltige Netz unter Stickstoffatmosphäre mit einem Cryo-Transfersystem in das Mikroskop eingebracht und untersucht.

Die Aufnahmen werden bei geringer Strahlenbelastung der Proben im leichten Unterfokus zur Kontraststeigerung mit einer Bildverstärkerkamera (bis 30 000-fache Vergrößerung) abgelichtet. Die Elektronenstrahlintensität wird der Dicke des Probenfilms angepasst. Die Belichtungszeit variiert zwischen 0,5 und 1 s.

Die Aufnahmen wurden von Frau Sabine Barnert (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) erstellt.

## 3.5 Zellen

### 3.5.1 Kultivierung subkonfluenten Zellen

Die verwendeten Zelllinien werden subkonfluent in 100 mm Petrischalen bei 37 °C, 95 % feuchter Luft und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgt ein Medienwechsel und bei etwa 80 % Zellkonfluenz eine Subkultivierung. Dazu werden die Zellen mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, 5 ml, 37 °C) gewaschen und die durch Oberflächenproteine vermittelte Bindung der Zellen an die Plastikoberfläche mit dem proteinverdauenden Enzym Trypsin (1 ml, 0,5 % (m/V)) gelöst. Während A-10 und COS-7 Zellen sich bereits nach 2-3 min von der Petrischale lösen, kann dieser Prozess bei MDCK II Zellen bis zu 10 min dauern. Dies kann beschleunigt werden, indem statt PBS Trypsin bereits zum Waschen der Zellen für 1 min verwendet wird. Die Trypsinreaktion wird durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. MDCK II Zellen werden 1:6 - 1:10 (V/V) und A-10 Zellen 1:10 (V/V) verdünnt und auf eine neue 100 mm Petrischale überführt.

### 3.5.2 Kultivierung konfluenten MDCK II Zellen

MDCK II Zellen beginnen nach vollständiger Konfluenz *in vitro* unterschiedlich besetzte apikale und basolaterale Membranseiten auszubilden (Polarisierung). Daher sind MDCK II Zellen ein in der Literatur häufig verwendetes Zellmodell, um die Endozytoserichtung und Transzytose zu untersuchen.

Dafür werden 12 mm Transwells<sup>®</sup> mit 3 µm Membraneinsätzen verwendet. Diese werden zunächst 20 min mit PBS inkubiert, um ein Vorquellen der Membran zu ermöglichen. Dann werden MDCK II Zellen mit einer Zelldichte von 50 000/Well ausplattiert. Als Zellmedium wird antibiotikafreies DMEM (+10 % FCS) verwendet und jeden Tag ein Medienwechsel (apikal 500 µl, basolateral 1,5 ml) durchgeführt. Um den Zellmonolayer nicht durch hydrostatischen Druck zu zerstören, wird das apikale Well immer zuerst befüllt.

Eine vollständige Konfluenz und das anschließende Ausbilden von *tight junctions* leiten den Polarisierungsprozess ein. Dies kann durch eine gleichzeitige Erhöhung des Membranwiderstandes erfasst und als transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) mit einer EndOhm<sup>®</sup> Elektrode in 2,7 ml Zellmedium gemessen werden. Der TEER-Wert wird jeden Tag bestimmt und der Versuch gestartet, wenn ein Plateau erreicht ist (Literaturwert 150 Ω·cm<sup>2</sup>) (Tuma & Hubbard 2003). Ein unveränderter TEER-Wert am

Ende des Versuchs garantiert, dass der Monolayer im Versuchsverlauf nicht zerstört worden ist.

## 3.6 Durchflusszytometrie

### 3.6.1 Durchflusszytometrische Messung der zellulären Assoziation und Transfektion

Für die durchflusszytometrische Analyse werden Zellen 24 h vor dem Versuch auf Mikrotiterplatten (24-Well-Platten, 500 µl) ausplattiert.

Zur Untersuchung der zellulären Assoziation wird eine Zelldichte von 40 000 Zellen/Well gewählt und mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen (1 µg Cy3-DNA/Well) oder fluoreszenzmarkierten Endozytosemarkern bei 37 °C über den angegebenen Zeitraum inkubiert. Die Herstellung der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe erfolgt nach Standardprotokoll 3.3.1 in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA), wenn nicht anders erwähnt. Für die durchflusszytometrische Aufarbeitung werden die Zellen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 1 ml, 4 °C) gewaschen. Bei der Bestimmung der zellulären Aufnahme von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen muss die extrazelluläre Bindung berücksichtigt werden. Dafür wird mit CellScrub™ Puffer (300 µl, 10 min, 4 °C) gewaschen und so der nicht internalisierte Komplexanteil zerstört (Zuhorn *et al.* 2002). Alternativ wird ein 4 °C Versuch parallel zum Aufnahmeversuch durchgeführt (Torchilin & Weissig 2003). Anschließend werden die Zellen abtrypsinisiert (200 µl) und die Trypsinreaktion mit 800 µl FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (218 x g, 4 min) pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 1 ml, 4 °C) wird erneut zentrifugiert und das Zellpellet abschließend in 200 µl PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 4 °C) aufgenommen. Waschschritte, Zentrifugieren und Lagerung bis zur Analyse erfolgen bei 4 °C, um weitere Endozytoseprozesse zu unterbinden.

Für Transfektionsversuche werden die Zellen mit einer Dichte von 20 000 Zellen/Well aufplattiert, 5 h bei 37 °C mit ungefärbten Lipid/DNA-Komplexen (1 µg DNA/Well) inkubiert und anschließend ein Medienwechsel durchgeführt. Die Zellen werden dann weitere 43 h bei 37 °C kultiviert. Die zelluläre Assoziation muss nicht weiter berücksichtigt werden und die anschließende durchflusszytometrische Aufarbeitung entspricht dem Protokoll der Aufnahmeexperimente.

Die Messung wird mit einem FACS-Calibur™ an 10 000 Zellen durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit einem Argon-Laser (488 nm) angeregt und die Emission in drei Fluoreszenzkanälen (FL1-3) detektiert. Die Zellpopulation wird anhand von Streulichtsignalen (SSC und FSC) so eingegrenzt, dass Zelltrümmer und tote Zellen nicht analysiert werden (*gating*). Die Datenauswertung erfolgt mittels Cell Quest Pro Software (siehe 1.4.4.1). Für die Berechnung von Transfektionseffizienz und Zellaufnahme wird die Anzahl (%) fluoreszierender Zellen herangezogen.

### **3.6.2 Durchflusszytometrische Messung der zellulären Aufnahme und Transfektion nach Inkubation mit endozytoseaktiven Substanzen**

Die Zellen werden wie für die Zellaufnahmeexperimente unter 3.6.1 beschrieben kultiviert. Vor der Inkubation der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe wird die zelluläre Aufnahme allerdings durch Präinkubation mit einer endozytoseaktiven Substanz beeinflusst. Diese Substanzen stimulieren oder hemmen die Endozytoseaktivität der Zellen (Tabelle 3-2). Nach Ablauf der angegebenen Präinkubationszeit werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe (1 µg Cy3-DNA/Well) für 5 h koinkubiert. Die Herstellung der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe erfolgt nach Standardprotokoll 3.3.1 und in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA), wenn nicht anders erwähnt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Messung entspricht 3.6.1. Um den Einfluss der endozytoseaktiven Substanzen auf die Transfektion zu prüfen, werden diese analog den Aufnahmeversuchen vorinkubiert und die resultierende Transfektion wie unter 3.6.1 beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellaufnahme und Transfektion nach Inkubation einer endozytoseaktiven Substanz wird im Verhältnis zu unbehandelten Zellen (100 %-Wert) angegeben.

**Tabelle 3-2: Optimierte Versuchsbedingungen für die Endozytose-Inhibitoren**

Inhibitor	Mechanismus	Präinkubationszeit [min]	Konzentration
Chlorpromazin	Clathrininteraktion (Wang <i>et al.</i> 1993)	60	28 $\mu$ M
M $\beta$ CD	Einschlusskomplex mit Cholesterol (Kilsdonk <i>et al.</i> 1995)	15	5 mM
Filipin	Caveolinbindung (Orlandi & Fishman 1998)	60	10 $\mu$ g/ml
Genistein	Tyrosinkinasehemmung (Parton <i>et al.</i> 1994)	60	200 $\mu$ M

**Tabelle 3-3: Optimierte Versuchsbedingungen für die Endozytose-Enhancer**

Enhancer	Mechanismus	Präinkubationszeit [min]	Konzentration
Clathrin enhancer	Clathrin-vermittelter Ligandentransport am Rezeptor verstärkt (Weng <i>et al.</i> 2009)	0	10 $\mu$ g/ml
Chloroquin	Osmotisch bedingte Lysosomen- degradation (Poole & Ohkuma 1981)	60 - 300	250/500 $\mu$ M
Lactosylceramid	Selektive Caveolaestimulatio n (Sharma <i>et al.</i> 2004)	0	4 $\mu$ g/ml
Phorbol ester	PKC vermittelte Aktivierung der Makropinozytose (Swanson 1989)	0	120 ng/ml

### 3.6.3 Durchflusszytometrische Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Für die durchflusszytometrische Analyse werden Zellen 24 h vor dem Versuch auf Mikrotiterplatten (48-Well-Platten, 500 µl) ausplattiert. Die Zelldichte liegt bei 20 000 Zellen/Well. Die Inkubation erfolgt mit einfach oder doppelt fluoreszenzmarkierten Lipid/DNA-Komplexen (0,5 µg DNA/Well) bei 37 °C. Die Herstellung der Lipid/DNA-Komplexe erfolgt nach Standardprotokoll 3.3.1 und in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA). Die Aufarbeitung zur durchflusszytometrischen Analyse entspricht dem Protokoll in 3.6.1. Bei der Messung wird neben dem Argon-Laser (488 nm) allerdings ein zweiter Dioden-Laser (635 nm) zugeschaltet. Während die drei Fluoreszenzkanäle (FL1 - 3) das durch den Argon-Laser angeregte Signal detektieren, steht ein weiterer Fluoreszenzkanal zur Verfügung (FL4), der zeitlich und örtlich von dem Argon-Laser getrennt nur das durch den Dioden-Laser angeregte Signal detektiert (siehe 1.5.2.1). Dies erfordert eine exakte Geräteeinstellung, die mittels Gerätekalibrierung (*time delay* Kalibrierung mit CaliBRITE™ Beads (Mikropartikel) und FACSCComp™ Software) vor dem Versuch sichergestellt werden muss. Bei exakter Einstellung ist es so möglich, beide Farbstoffe eines doppelt gefärbten Komplexes getrennt voneinander zu detektieren (siehe Tabelle 3-4) (Sebestyen *et al.* 2002). Außerdem kann das FRET-Emissionssignal eines langwelligeren Farbstoffs (FRET-Akzeptor) in FL3 bei ausschließlicher Laser-Anregung eines kurzwelligeren Farbstoffs (FRET-Donor) (488 nm) gemessen werden. Die Auswertung entspricht Protokoll 3.6.1. Für die Bestimmung der FRET-Effizienz wird im Unterschied zu 3.6.1 jedoch mit den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten gerechnet.

**Tabelle 3-4: FRET-Einstellungen am Durchflusszytometer**

Fluoreszenzfarbstoff			FACS Calibur™	
Fluorophor	Anregung [nm]	Emission [nm]	Laser [nm]	Filter [nm]
Donor (Cy3)	550	570	488	FL2 (585±15)
Akzeptor (Cy5)	649	670	650	FL4 (661±8)
FRET (Cy3/Cy5)	550	670	488	FL3 (> 670)

---

## 3.7 Fluoreszenzmikroskopie mit dem Spectra Cube™

### 3.7.1 Kolokalisationsstudien mit Endozytosemarkern

Vor dem Versuch werden Deckgläser (12 mm Durchmesser) autoklaviert, in eine passende Mikrotiterplatte (24-Wells) gegeben und mit 200 µl autoklavierter Gelatinelösung (10 min, 37 °C) benetzt. Die Deckgläser werden mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Die Zellen können 24 h vor Versuchsbeginn auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern mit einer Dichte von 20 000 Zellen/Well (500 µl) ausgesät werden. Nach beendeter Inkubation mit Endozytosemarkern (siehe Tabelle 3-5) und/oder Lipid/Cy3-DNA-Komplexen (1 µg Cy3-DNA/Well, 37 °C) werden die Zellen mit CellScrub™ Puffer (300 µl, 10 min, 4 °C) sowie 2-mal mit PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 4 °C) gewaschen und mit Paraformaldehyd 4 % (m/m) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Herstellung der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe erfolgt nach Standardprotokoll 3.3.1 in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA). Nach erneutem mehrmaligen Waschen und eventuell zusätzlichen Färbeschritten (z.B. DAPI Färbung 700 µl, 20 min, RT) werden die Deckgläser aus der Mikrotiterplatte entnommen und bei RT getrocknet.

Die getrockneten Deckgläser werden mit 3 - 5 µl MobiGLOW® eingebettet, einer Substanz, die das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindert (*antifading*).

Die Proben werden mit einem SpectraCube™ SD-200 H Mikroskop unter Verwendung eines 100x/1,3 NA Öl-Objektivs mikroskopiert. Die spektrale Trennung der Bilder (*spectral unmixing*) wird mit der Software Spectral Imaging 2.5 durchgeführt. Für die weitere Bildanalyse werden die spektral getrennten Bilder mit der SpectraView 1.6 Software und der ImageJ 1.42 Software weiter bearbeitet.

**Tabelle 3-5: Endozytosemarker**

Marker	Farbstoff	Konzentration	Ink. zeit [h]	Endozytoseweg
Dextran 40 000	FITC/ Texas Red	0,5 mg/ml	5	Dextran wird über Makropinozytose aufgenommen ( <i>fluid phase</i> ) (Mercer & Helenius 2008).
Cholera Toxin (CTX)	Alexa Fluor® 488/594	10 µg/ml	5	CTX kann über Clathrin und Caveolae internalisiert werden (Torgersen <i>et al.</i> 2001).
Lactosyl ceramid (LacCer)	Bodipy®	1 µM	5	LacCer wird über Caveolae aufgenommen (Puri <i>et al.</i> 2001).
Transferrin	Alexa Fluor® 488/594	5 µg/ml	5	Transferrin und sein Rezeptor werden über Clathrin endozytiert (Karin & Mintz 1981).

### 3.7.2 Kolokalisationsstudien mit Immunofluoreszenz

Vor dem Versuch werden Deckgläser (8 mm Durchmesser) autoklaviert, in eine passende Mikrotiterplatte (48-Well) gegeben und mit 200 µl autoklavierter Gelatinelösung (10 min, 37 °C) benetzt. Die Deckgläser werden mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Die Zellen können 24 h vor Versuchsbeginn auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern mit einer Dichte von 20 000 Zellen/Well (500 µl) ausgesät werden. Durch die Verwendung von 48-Well-Platten kann die Menge Lipid/Cy3-DNA-Komplex (0,5 µg Cy3-DNA/Well) reduziert werden. Die Herstellung der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe erfolgt nach Standardprotokoll 3.3.1 in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA). Die folgenden Waschschriffe sowie die Fixierung der Zellen entspricht 3.7.1. Für die Kolokalisationen mit antikörpermarkierten Zellkompartimenten (Immunofluoreszenz) müssen die Zellen anschließend permeabilisiert werden. Dafür wird mit Saponin (500 µl, 10 min, RT) oder Triton X-100 (500 µl, 5 min, 4 °C) inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen werden dann durch 30 min Inkubation mit PBS + 10 % FCS (*blocking solution*, RT) blockiert. Anschließend werden die Deckgläser der Mikrotiterplatte entnommen und umgedreht auf einen 50 - 100 µl Tropfen der primären

---

Antikörperlösung platziert. Der Tropfen Antikörperlösung befindet sich dabei auf Parafilm, da durch die große Grenzflächenspannung Parafilm/Lösung ein geringes Flüssigkeitsvolumen benötigt wird. Antikörperkonzentration und Inkubationszeit sind Tabelle 3-6 zu entnehmen. Nach der Inkubation werden die Deckgläser in eine 100 mm Petrischale gegeben und mit PBS 3-mal gewaschen. Für die folgende Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wird analog verfahren. Alle Sekundärantikörper werden 60 min inkubiert. Um ein unspezifisches Binden des Sekundärantikörpers an die Zellen auszuschließen, werden Kontrollen angefertigt, in denen der Sekundärantikörper allein inkubiert wird. Bei Phalloidin handelt es sich nicht um einen Antikörper, sondern um ein fluoreszenzmarkiertes Toxin. Die Anfärbung entspricht jedoch dem Protokoll und wird daher an dieser Stelle erwähnt.

Die Aufarbeitung und anschließende Bildanalyse entspricht 3.7.1. Das Ausmaß der Kollokalisierung beider Fluoreszenzsignale wird mit ImageJ 1.42 Software plugin JaCoP bestimmt und als Mander's Korrelationskoeffizient angegeben. Dieser Koeffizient gibt den Anteil Cy3-DNA Fluoreszenzintensität an, der mit der Fluoreszenz des angefärbten Endozytosekompartiments kollokalisiert, und kann Werte zwischen 0 und +1 annehmen (Bolte & Cordelieres 2006).

**Tabelle 3-6: Fluoreszenzfärbung von Endozytosekompartimenten**

Primärer AK/ Reporter gen	Sekundärer AK/ Farbstoff	Verdünnung [V/V] oder Konz.	Zeit [min]	Endozytoseweg
Mouse anti- EEA1 IgG	Goat anti- mouse IgG (H+L) MFP 488/590	1:25	30	EEA1 ist ein Protein und Bestandteil früher Endosomen (Clathrin) (Mu <i>et al.</i> 1995).
Rabbit anti- LAMP-1	Goat anti- rabbit IgG (H+L) MFP 488	1:20	60	LAMP-1 ist ein Membranprotein später Endosomen und Lysosomen (Clathrin) (Chen <i>et al.</i> 1985).
Mouse anti- Caveolin-1 IgG1	Goat anti- mouse IgG1 ( $\gamma$ 1) Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	1:25	30	Caveolin-1 Protein im Golgi Apparat (Caveolae) (Bush <i>et al.</i> 2006).
Mouse anti- Caveolin-1 IgM	Goat anti- mouse IgM ( $\mu$ -chain specific) FITC	1:25	30	Caveolin-1 in apikalen Endosomen und der Plasmamembran (Bush <i>et al.</i> 2006).
-T2.YFP plasmid	YFP	1 $\mu$ g/Well	48	Expression eines Markerproteins der Golgi-stacks (Keller <i>et al.</i> 2001).
Phalloidin	MFP 488	0,17 $\mu$ M	20	Aktinfilamente (Hoffmeister & Bechthold 2005).

### 3.7.3 Kolokalisationsstudien nach Inkubation mit endozytoseaktiven Substanzen

Die Zellen werden wie für die Zellaufnahmeexperimente unter 3.7.2 beschrieben kultiviert. Vor der Inkubation der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe wird die zelluläre Aufnahme der Zellen allerdings durch Präinkubation mit einer endozytoseaktiven Substanz wie unter 3.6.2

beschrieben beeinflusst. Die Fixierung, Antikörperfärbung und mikroskopische Analyse entspricht 3.7.2.

### **3.7.4 Kolokalisationsstudien nach Expression eines Reportergens**

Das Reportergen –T2.YFP (siehe Tabelle 3-6) wird zunächst transient in MDCK II Zellen transfiziert. Dafür werden die Zellen in gelatinebeschichteten 48-Well-Platten (siehe 3.7.2) mit einer Dichte von 20 000 Zellen/Well ausplattiert. Je 1 µg DNA wird mit Fugene<sup>®</sup> HD (4:2 (V/m, 10 min) komplexiert, mit Medium + 10 % FCS ad 500 µl verdünnt und 3 h inkubiert. Die Inkubation wird durch einen Medienwechsel gestoppt und die Expression des Reportergens im Fluoreszenzmikroskop nach 24 h und 48 h visuell geprüft. Bei erfolgreicher Transfektion werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe inkubiert und die Proben wie unter 3.7.1 beschrieben aufgearbeitet.

## **3.8 Fluoreszenzmikroskopie mit dem LSM 510 Meta**

### **3.8.1 Konfokale Kolokalisationsstudien**

Das Zell- und Inkubationsprotokoll entspricht 3.7. Das verwendete *Laser-Scanning-Mikroskop* LSM 510 Meta UV ist ein inverses Fluoreszenzmikroskop, das mit verschiedenen Lasern (351, 364, 458, 488, 514, 543, 633 nm) und drei Emissionskanälen ausgestattet ist. Die Lochblende des Mikroskops wird auf 1 *airy disk* gestellt, so dass ein konfokales Arbeiten möglich ist (vgl. 1.4.4.2). Für die Aufnahme von 3D-Bildern (*z-stacks*) verfügt das Gerät über einen schnellen *z-Scanning*-Tisch. Dadurch kann eine Bildserie eines 2D-Bildes in 350 nm Abständen in z-Richtung aufgenommen werden und die Einzelbilder schließlich zu einem 3D-Bild zusammengesetzt werden (*optical sectioning*). Für die Aufnahme von Durchlichtbildern wird ein Differential-Interferenzkontrast-Filter (DIC-Filter) eingesetzt. Die Proben werden mit einem 63 x/1,4 NA oder einem 100 x/1,3 NA Öl-Objektiv mikroskopiert und mit der LSM Image Browse Rel. 4.0. Software ausgewertet. Für die Bildbearbeitung wird zusätzlich Axiovision Software und ImageJ 1.42 Software verwendet.

### 3.8.2 Mikroskopie von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Vier verschiedene Komplexe werden verwendet: ungefärbte Komplexe, Komplexe mit einer Einzelfärbung (Cy5-DOPE oder Cy3-DNA) oder Komplexe mit einer Doppelfärbung (Cy5-DOPE und Cy3-DNA). Das Zell- und Inkubationsprotokoll entspricht 3.7.

Für die konfokalen (Lochblende = 1 *airy disk*) Kolokalisationsstudien der doppelt gefärbten Komplexe werden die fixierten Proben mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop LSM 510 Meta UV und einem 20 x/0,75 NA Objektiv mikroskopiert. Cy3 wird bei 543 nm angeregt und die Emission bei 560 - 615 nm detektiert. Für die Anregung von Cy5 wird mit 633 nm eingestrahlt und die Emission > 650 nm detektiert (siehe Tabelle 3-7). Das Ausmaß der Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale wird mit ImageJ 1.42 Software plugin JaCoP bestimmt und als Pearsons Korrelationskoeffizient angegeben. Dieser Koeffizient gibt die Korrelation beider Fluoreszenzsignale an und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen (Bolte & Cordelieres 2006). Eine vollständige, positive Korrelation wird durch den Wert +1 angezeigt, eine vollständige, negative Korrelation durch den Wert -1. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0 liegt keine Korrelation vor.

Für die Quantifizierung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers wird die Lochblende auf 2,5 *airy disks* vergrößert, also nicht konfokal gearbeitet. Dadurch kann die Intensität der Fluoreszenzsignale erhöht und deren Quantifizierung verbessert werden. Obwohl die Funktion der Lochblende in diesen Versuchen nicht voll ausgenutzt wird, ist das verwendete Mikroskop durch die Anwendung eines Lasers einem Weitfeldmikroskop mit Quecksilberdampflampe überlegen. Denn der Laser ermöglicht eine konstante Anregung mit einer diskreten Wellenlänge. Dadurch kann das Auftreten von Autofluoreszenz reduziert werden. Außerdem kann eine gleichmäßigere Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe über längere Messzeiten erzielt werden.

Neben den beiden einfach gefärbten werden nun auch doppelt gefärbte Proben mikroskopiert. Jede Probe wird mit allen in Tabelle 3-7 angegebenen Einstellungen untersucht. Die Fluoreszenzintensitäten der Komplexe in den aufgenommenen Bildern werden mit der Software CellProfiler quantifiziert (vgl. 1.5.2.2). Für die Analyse müssen von jeder Probe mindestens vier Durchlichtbilder und dazugehörige Fluoreszenzbilder aufgenommen werden. Die Fluoreszenzbilder werden dann in Graubilder umgewandelt. Mindestens 50 Zellen werden manuell in den Durchlichtbildern segmentiert, indem die Zellränder gekennzeichnet werden. Anschließend wird die integrierte Fluoreszenzintensität in den segmentierten Zellen der Durchlichtbilder in dem dazugehörigen Graubild ausgewertet.

In den durchgeführten *bleaching*-Experimenten wird Cy5 mit dem 633 nm Laser bei 100 % AOTF gebleicht. Mit der verwendeten LSM Software kann ein *bleaching*-Protokoll aufgestellt werden. In den Versuchen dieser Arbeit werden die Zellen 4-mal mit den Donor- und Akzeptoreinstellungen aus Tabelle 3-7 aufgenommen. Dann erfolgt ein *bleaching* in definierten Regionen der Zellen (*region of interest, ROI*). Es werden *ROI* der Zellen gewählt, die Komplexe enthalten. Anschließend werden die Zellen wieder 4-mal aufgenommen. Dieses Protokoll wird 20-mal wiederholt und vorzeitig gestoppt, wenn die Cy5 Intensität auf < 50 % der Ausgangsintensität fällt. Die Software zeichnet über den Verlauf dieser *bleaching*-Serie die Fluoreszenzintensitäten des Donors und Akzeptors auf.

**Tabelle 3-7: FRET-Einstellung am Fluoreszenzmikroskop**

Fluorophor	Fluoreszenzfarbstoff		LSM 510 Meta UV	
	Anregung [nm]	Emission [nm]	Laser [nm]	Filter [nm]
Donor (Cy3)	550	570	543	560-615
Akzeptor (Cy5)	649	670	633	LP 670
FRET (Cy3/Cy5)	550	670	543	LP 670

### 3.9 Transzytose und richtungsabhängige Endozytose

#### 3.9.1 Richtungsabhängige Endozytose im proliferierendem Zellmodell

MDCK II Zellen werden wie unter 3.5.1 beschrieben auf 3 µm Transwells<sup>®</sup> in einer Zelldichte von 40 000 Zellen/Well kultiviert. Für Aufnahmeversuche wird nach 24 h von der apikalen oder der basolateralen Seite 5 h lang Lipid/Cy3-DNA-Komplex inkubiert (1 µg Cy3-DNA/Well, nach Standardprotokoll 3.3.1 hergestellt) und durchflusszytometrisch (siehe 3.6.1) vermessen. Die Herstellung der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe erfolgt nach 3.3.1 und in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA).

Für Transfektionsversuche werden ungefärbte Komplexe 5 h inkubiert und nach 48 h die Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt.

### **3.9.2 Richtungsabhängige Endozytose im polarisierten Zellmodell**

MDCK II Zellen werden wie unter 3.5.2 beschrieben kultiviert bis ein konstanter TEER-Wert erreicht ist (5 - 7 Tage). Für Aufnahmeversuche werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe nach Standardprotokoll 3.3.1 mit Cy3-DNA hergestellt und für 5 h entweder von der apikalen Seite oder der basolateralen Seite inkubiert (1 µg Cy3-DNA/Well). Die Proben werden schließlich durchflusszytometrisch nach 3.6.1 analysiert.

Für Transfektionsversuche im polarisierten Zellmodell wird analog verfahren, allerdings werden ungefärbte Komplexe für 5 h inkubiert und nach 48 h die Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.6.1).

### **3.9.3 Transzytose im polarisierten Zellmodell**

MDCK II Zellen werden wie unter 3.5.2 beschrieben kultiviert bis ein konstanter TEER-Wert erreicht ist (5-7 Tage). Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden nach Standardprotokoll 3.3.1 mit Cy3-DNA hergestellt. Das Zellmedium wird gegen PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 37 °C) ausgetauscht und die Komplexe werden mit 1 µg DNA/Well über 23 h im apikalen Well inkubiert. Dem apikalen und basolateralen Well werden zu den verschiedenen Zeitpunkten abwechselnd 500 µl Flüssigkeit entnommen, in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas (Füllvolumen 500 µl) überführt und am Fluorimeter (LS 50B) bei 37 °C vermessen (Anregung 548 nm, Emissionsfilter 562 nm, Spaltbreite 5 nm). Unmittelbar nach der Messung wird der Flüssigkeitsinhalt wieder den Wells zugeführt.

## **3.10 Viabilität und Toxizität von Zellen**

### **3.10.1 Viabilitätstest**

Die Lebensfähigkeit (Viabilität) von Zellen in einem durchflusszytometrischen Experiment wird in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des CellTiter-Glo™-Tests nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dieser Test quantifiziert die vorhandene ATP-Menge lysierter Zellen durch eine ATP-abhängige Enzymreaktion. In dieser wird Luciferin durch das Enzym Luciferase in den lumineszierenden Farbstoff Oxyluciferin umgewandelt. Die Lumineszenzintensität verhält sich proportional zur vorhandenen ATP-Konzentration und ermöglicht so die Quantifizierung von ATP. Da der zelluläre ATP-Gehalt von der

metabolischen Aktivität der Zellen abhängig ist, kann so auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden.

Um in einem durchflusszytometrischen Zellversuch den Einfluss einer inkubierten Substanz (z.B. Lipoplex, Inhibitor, Enhancer) auf die Zellviabilität zu testen, wird der Versuch nach 3.6.1 in doppelter Ausführung durchgeführt. Während die eine Hälfte der Proben schließlich am Durchflusszytometer untersucht wird, wird die andere Hälfte der Proben mit Luciferinreagenz und Lysepuffer des Testkits versetzt, geschüttelt (2 min) und 10 min bei RT inkubiert. Das zugesetzte Reagenzvolumen entspricht dabei immer exakt dem Flüssigkeitsvolumen der Wells. Aus jedem Einzelwell werden anschließend 3 Viabilitätsproben (je 200 µl) in eine 96-Well-Platte pipettiert und in einem Luminometer vermessen. Um den Einfluss der inkubierten Substanz auf die Zellviabilität zu bestimmen, wird der Mittelwert der 3 Viabilitätsproben im Verhältnis zur Viabilität unbehandelter Zellen (100 % Kontrolle) angegeben.

### **3.10.2 Toxizitätstest**

Während die Viabilität von Zellen deren Lebensfähigkeit beschreibt, versteht man unter zellulärer Toxizität eine bereits eingetretene Veränderung der zellulären Physiologie (Alberts *et al.* 2008).

Im durchflusszytometrischen Experiment kann die Toxizität einer inkubierten Substanz durch die Streulichtparameter FSC und SSC detektiert werden. Alternativ kann der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse hinzu gegeben werden (0,25 µg/Probe). 7-AAD bindet DNA, kann aber nur die beschädigte Zellmembran apoptotischer Zellen passieren. Nach 20 min Lagerung bei 4 °C wird die Probe wie unter 3.7.1 beschrieben vermessen und 7-AAD in FL3 detektiert.

Die Toxizität der Zellen wird im mikroskopischen Experiment anhand der morphologischen Eigenschaften visuell geprüft.

## 3.11 Berechnungen

### 3.11.1 Sensitized FRET-Emission

Die Fluoreszenzintensität des FRET-Akzeptors wird nach Anregung des Donors gemessen (FRET-Signal). Auf diesem Signal basiert die Berechnung der FRET-Emission. Die Berechnung der *sensitized* FRET-Emission ( $F_c$ ) berücksichtigt darüber hinaus spektrale Überlappungen (*spectral crosstalk*) sowie die Hintergrundfluoreszenz. Die FRET-Emission wird jedoch nicht auf die Konzentration der Farbstoffe normiert.

$F_c$  berechnet sich als (Mitra *et al.* 1996)

$$F_c = I_2^{DA} - I_1^{DA} S_1 - I_3^{DA} S_2$$

Die Zahlenindizes ( $I_{1-3}$ ) geben die Laser und Filtereinstellungen des Mikroskops an:

- $I_1$  Donor-Einstellung (Anregung und Emission des Donors detektiert)
- $I_2$  FRET-Einstellung (Anregung des Donors und Emission des Akzeptors detektiert)
- $I_3$  Akzeptor-Einstellung (Anregung und Emission des Akzeptors detektiert)

Die Buchstabenindizes ( $I_{D,A,DA}$ ) geben die Zusammensetzung der Probe an:

- $I_D$  Donor-Komplex ( Cy3-DNA-Färbung)
- $I_A$  Akzeptor-Komplex (Cy5-DOPE-Färbung)
- $I_{DA}$  FRET-Komplex (Cy3-DNA- und Cy5-DOPE-Färbung)

Die spektralen Überlappungen werden wie folgt berechnet:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D} \quad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D}$$

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A} \quad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A}$$

Da für das Cy3/Cy5-FRET-Paar die Korrekturfaktoren  $S_3$  und  $S_4$  vernachlässigbar klein sind, werden sie nicht weiter berücksichtigt (Sebestyen *et al.* 2002). Alle eingesetzten Fluoreszenzintensitäten werden um den Betrag der Hintergrundfluoreszenz korrigiert.

### 3.11.2 FRET-Effizienz des Akzeptors ( $E_a$ )

Bei der Berechnung der FRET-Effizienz ( $E_a$ ) wird die *sensitized* FRET-Emission zusätzlich normiert (Tron *et al.* 1984). Die Benennung und Berechnung der Fluoreszenzintensitäten und spektralen Korrekturfaktoren entspricht 3.11.1. Außerdem wird ein weiterer Korrekturfaktor ( $\alpha$  Faktor) berechnet. Dieser Korrekturfaktor berücksichtigt die Detektionsempfindlichkeit für das Fluoreszenzsignal des Donors im Verhältnis zu der Detektionsempfindlichkeit für das Fluoreszenzsignal des Akzeptors (Sebestyen *et al.* 2002).

$$\alpha = \frac{I_2^A \times \varepsilon_d \times L_d}{I_1^D \times \varepsilon_a \times L_a}$$

- $\varepsilon_d$  molarer Absorptionskoeffizient Cy3 bei der Anregungswellenlänge 488 nm (150 000 (L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>))
- $\varepsilon_a$  molarer Absorptionskoeffizient Cy5 bei der Anregungswellenlänge 633 nm (250 000 (L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>))
- $L_d$  Verhältnis Farbstoff Cy3/Komplex (75 pmol/1  $\mu$ g DNA)
- $L_a$  Verhältnis Farbstoff Cy5/Komplex (40 pmol/1  $\mu$ g DNA)

Damit lässt sich E wie folgt berechnen (Nagy *et al.* 2006):

$$E_a = \frac{S_2(I_2^{DA} - I_1^{DA}S_1 - I_3^{DA}S_2)}{\alpha I_1^{DA}S_2 + S_2(I_2^{DA} - I_1^{DA}S_1 - I_3^{DA}S_2)}$$

Die FRET-Effizienz des Akzeptors  $E_a$  ist eine häufig verwendete FRET-Angabe bei zellulären Untersuchungen, insbesondere mit dem Durchflusszytometer.

### 3.11.3 FRET-Effizienz des Donors ( $E_d$ )

Der Energietransfer eines FRET-Paares ist nicht nur über die Fluoreszenzintensität des Akzeptors bei Anregung des Donors zugänglich, sondern kann auch über die gleichzeitige Intensitätsabnahme des Donors quantifiziert werden (Horvath *et al.* 2005; Nagy *et al.* 2006):

$$E_d = 1 - \frac{I_1^{DA}}{I_1^D}$$

Die Benennung der Fluoreszenzintensitäten entspricht dabei 3.11.1.

### **3.11.4 Statistik**

Um den statistischen Fehler der Messreihen zu berechnen, wird der Standardfehler (SEM) angegeben.

Darüber hinaus wird in einigen Messreihen dieser Arbeit mit Hilfe des Student t-Tests auf Signifikanz getestet. Dabei wird für die Ergebnisse der FRET-Versuche (vgl. 4.5) ein zweiseitiger, gepaarter Test durchgeführt. Die t-Tests beziehen sich hier auf den Vergleich verschiedener FRET-Berechnungen derselben Messdaten, so dass die Wertepaare voneinander abhängig sind und ein gepaarter t-Test angebracht ist.

In allen anderen Fällen wird ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test angewendet.

Alle statistischen Berechnungen werden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 3.0 durchgeführt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Herstellung und Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen

Die Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen erfolgt durch spontane Assoziation von kationisch geladenem Lipid und negativ geladener DNA (Felgner *et al.* 1987). Diese Selbstassoziation muss durch den Herstellungsprozess kontrolliert werden (Li & Szoka 2007). Im vorliegenden Abschnitt werden verschiedene Herstellungsprozesse miteinander verglichen und geprüft, ob eine Prozesskontrolle möglich ist und das Endprodukt dem Anforderungsprofil eines Gentransfersystems (vgl. 1.3) entspricht.

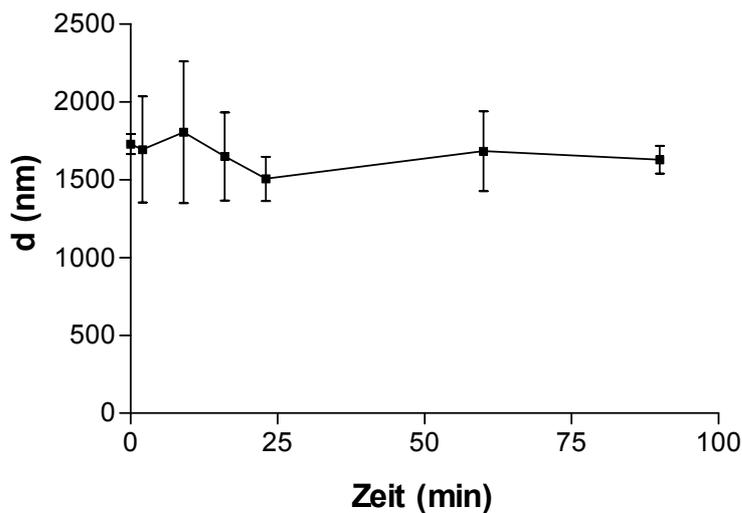
Dabei werden Vorgängerarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe aufgegriffen (Clement 2005; Häfele 2007).

#### 4.1.1 Ausgangsmodell

Als Ausgangsmodell werden Ausgangsliposomen nach 3.1 hergestellt und zu DC 30<sup>®</sup>/eGFP-C1-Komplexen 8/1 (m/m) weiterverarbeitet. Abweichend vom Standardprotokoll 3.3.1 werden die DNA-Lösung (0,068 µg/µl) und die Lipiddispersion (0,5 µg/µl) mit einer Pumpe über ein 400 µm Y-Stück (siehe 3.3.2) gemäß dem Herstellungsprotokoll der Dissertation von Häfele zusammengeführt (Häfele 2007). Dabei entstehen Komplexdispersionen mit einer - verglichen mit dem Standardprotokoll - höheren Konzentration an DNA von 0,033 µg/µl. Das Herstellungsvolumen beträgt 300 - 500 µl.

##### 4.1.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

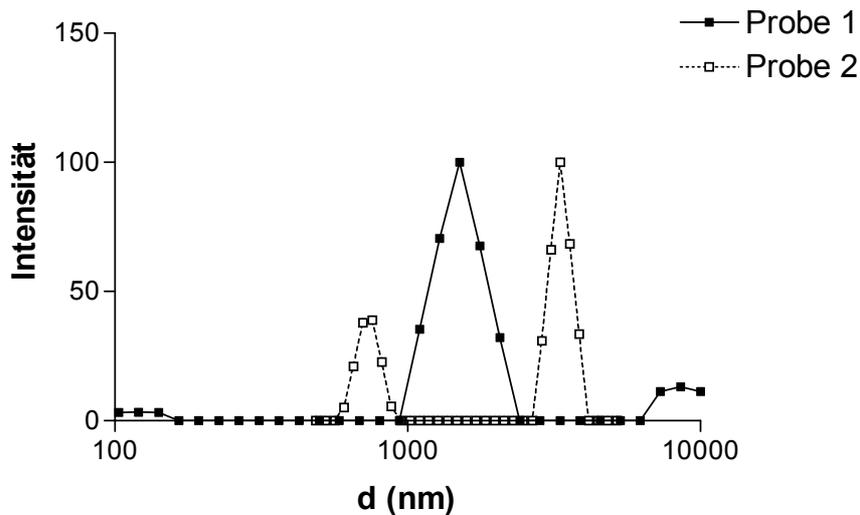
Zunächst werden die Ausgangsliposomen vermessen ( $t = 0$  min) und anschließend mit DNA komplexiert, wie unter 3.3 beschrieben. In Abbildung 4-1 wird die Komplexbildung im PCS-Gerät (siehe 3.4.1) über die Zeit verfolgt. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser ( $d$ ) der Ausgangsliposomen ändert sich nach Zugabe der DNA nicht. Die Komplexbildung spiegelt sich also nicht in einer Größenänderung wider. Es bilden sich Strukturen mit  $d > 1000$  nm. Die starke Polydispersität der Proben (PI 0,24 - 0,34) lässt auf eine inhomogene Größenverteilung schließen.



#### Abbildung 4-1: Partikelgrößenentwicklung bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen

Unextrudierte Ausgangsliposomen ( $t = 0$  min) wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und die hydrodynamischen Durchmesser über 90 min mittels PCS bestimmt ( $n = 2$ ,  $\pm$  SEM der Mittelwerte).

Verschiedene Autoren beschreiben bei Ladungsverhältnissen (+/-) von 1 - 2 eine vergleichbare Aggregation der Lipid/DNA-Komplexe ( $d > 1000$  nm) (Zelphati *et al.* 1998; Wiethoff *et al.* 2002; Zuhorn & Hoekstra 2002). Die Inhomogenität und die Partikelgröße der Proben beeinträchtigen die Berechnung von  $d$  wesentlich (Zuhorn & Hoekstra 2002). Dies wird durch die Standardabweichungen in Abbildung 4-1 bestätigt. Da die Streulichtintensität von der Größe der Partikel abhängt, werden in inhomogenen Proben die Signale kleiner Partikel durch die Signale großer Partikel überstrahlt. Je inhomogener also die Probe und je größer die Durchmesser einzelner Subpopulationen, desto geringer die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der PCS-Ergebnisse. Bei derartigen inhomogenen Proben kann der mittlere hydrodynamische Durchmesser daher nicht mehr durch eine einfache exponentiale Autokorrelationsfunktion erfasst werden, sondern muss durch multiexponentiale Autokorrelationsfunktionen beschrieben werden, in denen jede Partikelgröße ihre eigene Exponentialfunktion einbringt. Dies kann durch einen *Non-Negatively constrained Least Squares Algorithmus* (NNLS-Algorithmus) aufgelöst werden (Wiethoff *et al.* 2002). Die intensitätsgewichtete NNLS-Auswertung der beiden Messungen zeigt eine multimodale Verteilung mit Fraktionen von  $d > 5000$  nm (Abb. 4-2).



#### Abbildung 4-2: Partikelgrößenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe

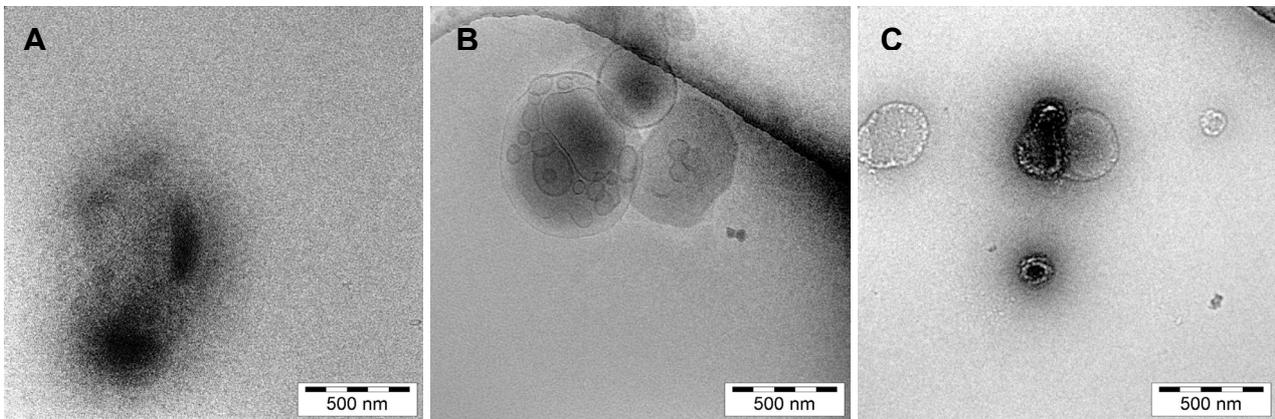
Die beiden Komplexproben aus Abb. 4-1 wurden zum Zeitpunkt 90 min mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet.

Durch Zentrifugation (7000 x g, 10 min, 25°C) kann eine Population abgetrennt werden, die Partikelgrößen > 2000 nm enthält. Im Überstand befinden sich Partikelgrößen mit einem Mittelwert des hydrodynamischen Durchmessers von  $d = 381$  nm aus 2 Chargen. Diese Ergebnisse bestätigen die Multimodalität der Proben, die aufgrund der NNLS-Auswertung unterstellt wurde. Eine vergleichbare Auftrennung von Lipid/DNA-Komplexen durch Zentrifugation ist in der Literatur beschrieben (Hofland *et al.* 1996).

#### 4.1.1.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Die Partikelgrößen und die Partikelgrößenverteilung der Proben werden außerdem mittels Cryo-TEM analysiert (siehe 3.4.4). Komplexproben im Konzentrationsbereich der PCS-Messungen (DNA 0,033  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) enthalten nur sehr wenige elektronenmikroskopisch detektierbare Strukturen. Daher werden die Proben verglichen mit 4.1.1.1 in einer 10-fach höheren Konzentration eingesetzt (DNA 0,334  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Wie von Häfele beschrieben (Häfele 2007), finden sich in der Probe „*fingerprint*“-Strukturen, in denen DNA zwischen Lipidschichten sandwichartig komplexiert ist. Diese Strukturen liegen in einem Größenbereich von  $\sim 500$  nm (Abb. 4-3 Bild A). Daneben sind größere Lipid/DNA-Aggregate und kleine elektronendichte Strukturen (Abb. 4-3 Bild C) sowie anscheinend unkomplezierte Ausgangsliposomen zu sehen (Abb. 4-3 Bild B). Eine vergleichbare

Heterogenität von Lipid/DNA-Komplexen ist in der Literatur bereits beschrieben (Zabner *et al.* 1995; Xu *et al.* 1999; Khalil *et al.* 2006).

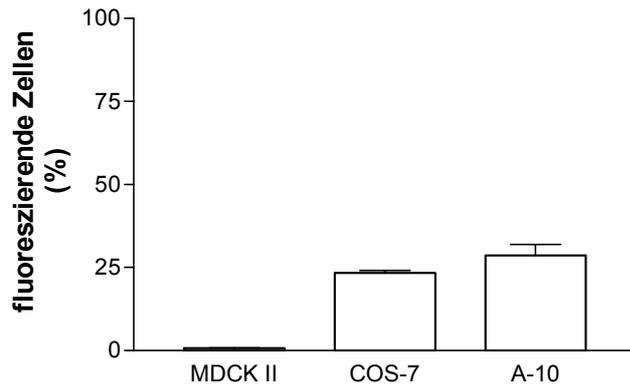


#### **Abbildung 4-3: Strukturanalytik von Lipid/DNA-Komplexen**

Unextrudierte Ausgangsliposomen wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und mittels Cryo-TEM untersucht. Die Aufnahmen A, B und C zeigen repräsentative Komplexstrukturen.

#### **4.1.1.3 Transfektionseffizienz**

Um die Transfektionseffizienz der Komplexe zu quantifizieren, werden verschiedene Zelllinien wie unter 3.6.1 beschrieben mit den Komplexen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Vor der Inkubation werden pro Well je 30  $\mu\text{l}$  Komplexdispersion (0,034  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA) mit 70  $\mu\text{l}$  sterilem Transfektionsmedium verdünnt und 100  $\mu\text{l}$  pro Well inkubiert, so dass je 1  $\mu\text{g}$  DNA pro Well vorliegt. In den durchflusszytometrischen Analysen nach 3.6.1 werden  $28,7 \pm 3,2$  % transfizierte A-10 Zellen,  $23,3 \pm 0,9$  % transfizierte COS-7 Zellen und  $0,7 \pm 0,1$  % transfizierte MDCK II Zellen detektiert (Abb. 4-4).



#### Abbildung 4-4: Transfektion verschiedener Zelllinien

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10, COS-7 und MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

Für die folgenden Transfektionsversuche werden A-10 Zellen ausgewählt, da in diesem Zellmodell aufgrund der basal höheren Transfektionsrate eine Optimierung der Komplexherstellung sowohl als Zu- als auch als Abnahme der Transfektion am empfindlichsten detektierbar ist.

#### 4.1.2 Variation I des Ausgangsmodells: Veränderung des Herstellungsmaßstabs

Mehrere Dissertationen der Arbeitsgruppe haben Herstellung und Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen untersucht und an die Anforderungen der Gentherapie (vgl. 1.3) angepasst. Während Clement in ihrer Dissertation Herstellungsmethoden für den Großmaßstab entwickelt (siehe 3.3.3), beschreibt Häfele die zelluläre Assoziation dieser Komplexe und benötigt daher Herstellungsmethoden, die eine Produktion sehr kleiner Mengen ermöglichen (siehe 3.3.1 und 3.3.2). In der vorliegenden Arbeit werden beide Herstellungsmethoden verglichen.

Für den kleinen Maßstab nach Häfele werden die DC 30<sup>®</sup>-Dispersion (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und die DNA-Lösung (0,068  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) über ein Y-Stück mit einem Durchmesser von 400  $\mu\text{m}$  (siehe Ausgangsmodell 4.1.1) zusammengenippt oder die DNA-Lösung in die Lipiddispersion pipettiert (siehe 3.3.1). Die Volumina der Lipiddispersion und der DNA-Lösung liegen zwischen 200 - 500  $\mu\text{l}$ .

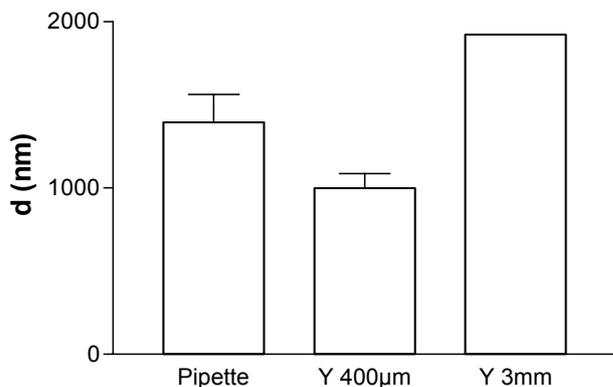
Im Pumpenmodell für den großen Maßstab nach Clement werden 19 ml DC 30<sup>®</sup>-Dispersion (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und 19 ml DNA-Lösung (0,068  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) über ein Y-Stück des Durchmessers 3 mm zusammengenippt (siehe 3.3.3).

Alle Lipid/DNA- Komplexe haben eine Endkonzentration an DNA von 0,033 µg/µl.

Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Ina Stumpf am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Freiburg durchgeführt.

#### 4.1.2.1 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Lipid/DNA-Komplexe werden in beiden Herstellungsmaßstäben hergestellt und die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der 3 hergestellten Proben (Y 3 mm = „großer Maßstab“, Y 400 µm und Pipette = „kleiner Maßstab“) mittels PCS bestimmt. Abbildung 4-5 zeigt für die verschiedenen Herstellungsarten und -maßstäbe unterschiedliche Messergebnisse.

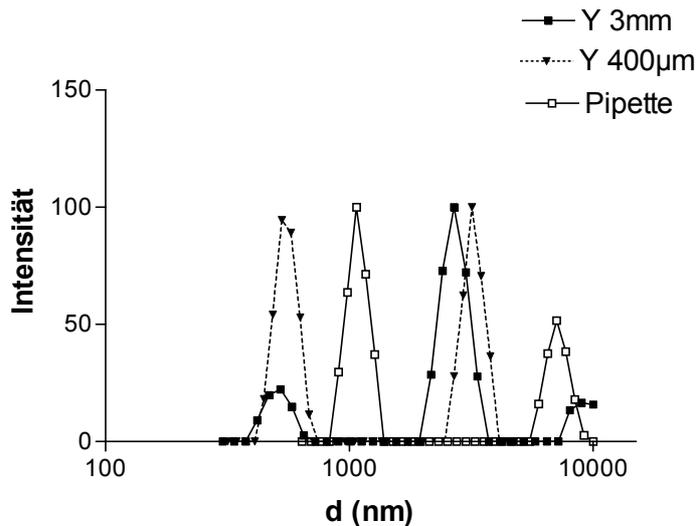


#### Abbildung 4-5: Partikelgrößen bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen in verschiedenen Herstellungsmaßstäben

Unextrudierte Ausgangsliposomen wurden in verschiedenen Herstellungsmaßstäben zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und die hydrodynamischen Durchmesser 90 min nach Herstellung mittels PCS bestimmt (n = 3, ± SEM der Mittelwerte). Aufgrund der Chargengröße konnte Y 3mm nur 1-mal durchgeführt werden.

Die Polydispersitäten aller Messungen sind hoch (PI > 0,27) und deuten auf eine starke Inhomogenität der Proben hin, die die Berechnung von d wesentlich beeinträchtigt. Die Angabe von d, wie bereits unter 4.1.1.1 erwähnt, ist daher eine unpräzise Auswertung.

Die intensitätsgewichtete NNLS-Auswertung der Messung zeigt (Abb. 4-6), dass alle Proben unabhängig von der gewählten Herstellungsmethode eine Multimodalität aufweisen. Bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen entstehen jeweils inhomogene Komplexdispersionen, die Partikelgrößen von  $d > 1 \mu\text{m}$  enthalten (Zelphati *et al.* 1998; Wiethoff *et al.* 2002).

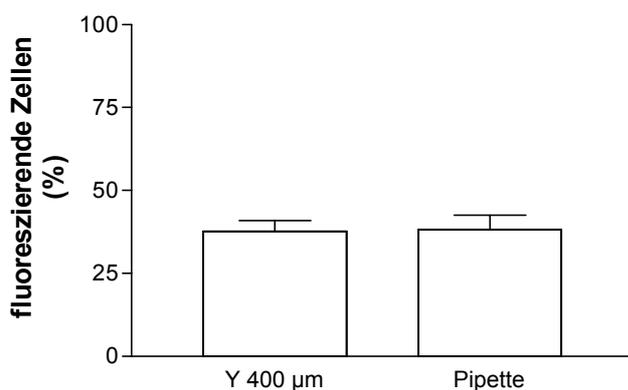


**Abbildung 4-6: Partikelgrößenverteilung bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen in verschiedenen Herstellungsmaßstäben**

Repräsentative Darstellung der Komplexproben aus Abb. 4-5. Die Partikelgrößenverteilungen wurden mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet.

#### 4.1.2.2 Transfektionseffizienz

Für die Herstellung eines kleinen Ansatzes Lipid/DNA-Komplexe stehen, wie bereits erwähnt, mit dem Zusammenpipettieren beider Komponenten (siehe 3.3.1) und dem Zusammenpumpen über ein 400 µm Y-Stück (siehe 3.3.2) zwei Methoden zur Verfügung. Je 250 µl Lipiddispersion und DNA-Lösung werden vereint und gemäß 4.1.1.3 inkubiert.



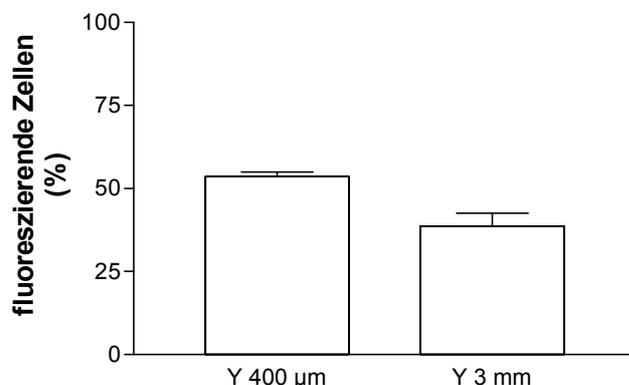
**Abbildung 4-7: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen aus dem kleinen Herstellungsmaßstab**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus dem kleinen Herstellungsmaßstab (n = 18, ± SEM).

In Abbildung 4-7 wird deutlich, dass sich beide Methoden nicht signifikant unterscheiden ( $p = 0,9245$ ). Nach dem Zusammenpumpen über ein  $400\ \mu\text{m}$  Y-Stück werden  $37,7 \pm 5,7\%$  der Zellen transfiziert, nach Zusammenpipettieren beider Komponenten  $38,1 \pm 8,1\%$ . Obwohl das Pumpmodell keine effizientere Transfektion ermöglicht, ist es aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit und des einfacheren Scale-ups zu bevorzugen (Zelphati *et al.* 1998; Clement 2005).

In einem nächsten Schritt wird die Herstellung „kleiner Maßstab“ versus „großer Maßstab“ im Pumpenmodell verglichen (Abb. 4-8). Da ein großes Produktvolumen (38 ml) bei der Verwendung des großen Pumpenmodells anfällt, werden die Komplexe nach Herstellung lyophilisiert und gelagert (siehe 3.3.4). Im Vergleich zum Ausgangsmodell (vgl. 4.1.1) werden die Volumina des kleinen Pumpenmodells auf jeweils  $500\ \mu\text{l}$  Lipiddispersion und DNA-Lösung erhöht, um ebenfalls eine anschließende Lyophilisation zu ermöglichen. Die Transfektion der Komplexe wird unmittelbar nach ihrer Herstellung und nach anschließender Lyophilisation über 15 Wochen weiter bestimmt.

Abbildung 4-8 zeigt die Transfektion der Komplexe beider Pumpenmodelle unmittelbar nach der Herstellung.



#### **Abbildung 4-8: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen aus verschiedenen Herstellungsmaßstäben**

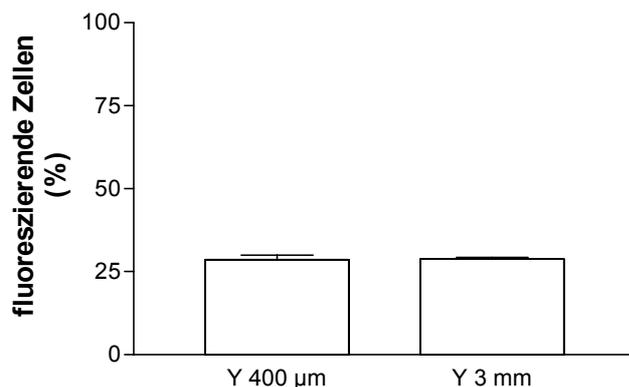
Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus verschiedenen Herstellungsmaßstäben direkt nach der Herstellung ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM).

Die Transfektionseffizienz der im kleinen Maßstab hergestellten Komplexe (Y  $400\ \mu\text{m}$ ) liegt dabei deutlich über den Ergebnissen vergleichbarer Versuche dieser Arbeit mit dem gleichen Pumpenmodell (z.B. 4.1.1.3). Diese Abweichung ist möglicherweise auf eine veränderte metabolische Aktivität der Zellen zurückzuführen. Ein weiterer Unterschied

zwischen der Komplexherstellung dieses Versuchs und Komplexen vergleichbarer Studien dieser Arbeit (z.B. 4.1.1.3) sind die verwendeten Herstellungsvolumina. Diese liegen aufgrund der benötigten Probenzahl für die Untersuchungen der Lagerstabilität selbst im kleinen Herstellungsmaßstab mit 1 ml Komplexdispersion über den sonst verwendeten Volumina von  $< 500 \mu\text{l}$ . Der „kleine Maßstab“ dieses Versuchs ist also bereits ein Scale-up des Ausgangsmodells 4.1.1. Ob eine Veränderung der Herstellungsvolumina im kleinen Pumpenmodell die Transfektion tatsächlich beeinflussen kann, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden, da diese Kenntnis für die Reproduktion von Laborversuchen von wesentlicher Bedeutung ist.

Der Vergleich beider Pumpenmodelle in Abbildung 4-8 zeigt, dass mit dem Modell für den kleinen Maßstab (Y 400  $\mu\text{m}$ ) eine höhere Transfektionseffizienz erzielt werden kann.

Dies könnte an der unterschiedlichen Geometrie der Pumpen, insbesondere der verwendeten Y-Stücke, liegen. In einem weiteren Versuch werden daher Lipoplexe mit dem Pumpenmodell für den kleinen Maßstab hergestellt. Dabei wird einmal das zugehörige Y-Stück mit einem Durchmesser von 400  $\mu\text{m}$ , ein anderes Mal jedoch das 3 mm Y-Stück des großen Pumpenmodells eingebaut. Abbildung 4-9 zeigt, dass das Y-Stück keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz der produzierten Lipoplexchargen hat (Y 400  $\mu\text{m}$   $28,7 \pm 1,3 \%$ , 3 mm  $28,8 \pm 0,5 \%$ ).



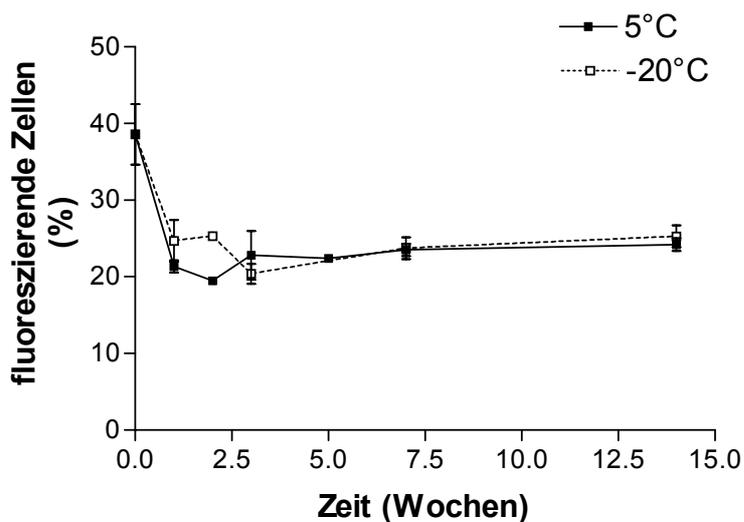
#### Abbildung 4-9: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen nach Austausch des Y-Stücks

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) im kleinen Herstellungsmaßstab ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM). Bei der Herstellung der Komplexe wurden 2 verschiedene Y-Stücke eingesetzt.

Der Unterschied zwischen beiden Modellen kann nicht abschließend geklärt werden. Durchmesser und Material des Y-Stücks beeinflussen die Transfektionseffizienz jedenfalls

nicht. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Probenvolumina oder die eingesetzten Schläuche entscheidend.

Da bei der Herstellung im Großmaßstab eine große Menge Produkt gewonnen wird, ist eine stabile Lagerung notwendig. Die Transfektionseffizienz der Versuchschargen wird daher nach Herstellung ( $t = 0$  Wochen) untersucht, anschließend lyophilisiert (siehe 3.3.4), bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und über 15 Wochen weiter bestimmt.



#### Abbildung 4-10: Transfektion von A-10 Zellen mit lyophilisierten Lipid/DNA-Komplexen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus dem großen Herstellungsmaßstab ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM). Die Komplexe wurden nach der Herstellung ( $t = 0$  Wochen) lyophilisiert und die Transfektion nach Lagerung bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über 15 Wochen untersucht.

Abbildung 4-10 zeigt den Verlauf der Transfektion für die im großen Maßstab hergestellten Komplexe über eine Lagerdauer von 15 Wochen. Unabhängig von der Lagerungstemperatur der Probe nimmt die Transfektionseffizienz nach Lyophilisation ab und erreicht anschließend ein konstantes Niveau von  $\sim 20\%$ . Der zeitliche Verlauf der Transfektion der im kleinen Maßstab hergestellten Komplexe entspricht den Ergebnissen des großen Maßstabs (Daten nicht gezeigt).

Eine derartige Abnahme der Transfektionseffizienz bei Lagerung der Lipid/DNA-Komplexe ist in der Literatur bereits beschrieben (Zelphati *et al.* 1998; Molina & Anchordoquy 2008). Als Ursachen wird die Peroxidation von Lipiden diskutiert, bei der *reactive oxygen species* (ROS, z.B. Radikale) und *thiobarbituric reactive substances* (TBARS, z.B. Aldehyde, Peroxide) entstehen, die beide Komplexkomponenten, DNA und Lipid, bei Lagerung

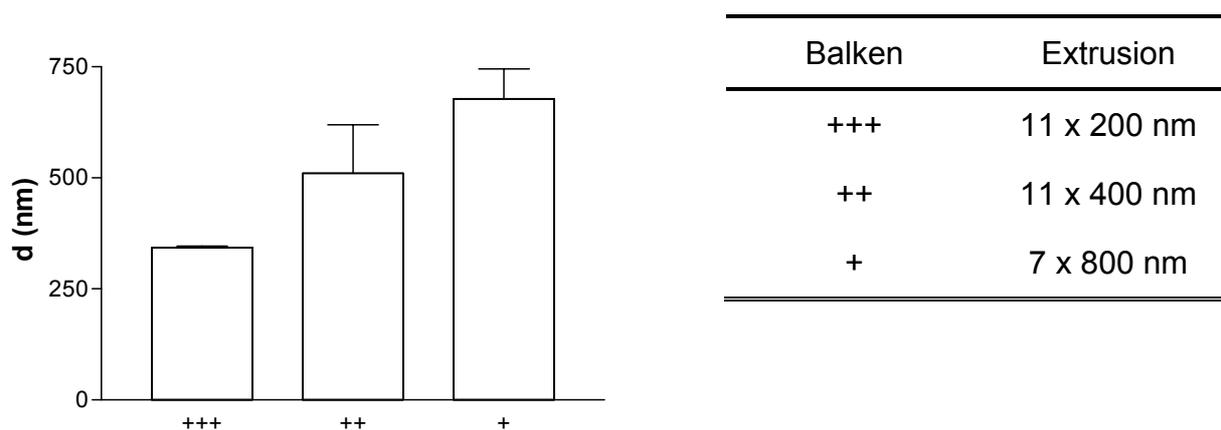
abbauen. Dieser Prozess kann auch durch Lyophilisation nicht verhindert werden (Molina & Anchordoquy 2008).

### 4.1.3 Variation II des Ausgangsmodells: Extrusion der Lipid/DNA-Komplexe

Die Herstellung nach 4.1.1 ergibt Lipid/DNA-Komplexe, deren Größe nicht dem Anforderungsprofil eines Gentransfersystems entspricht (vgl. 1.3). Daher wird in einer ersten Versuchsreihe die Möglichkeit einer Extrusion zur Größeneinstellung der Lipid/DNA-Komplexe geprüft. Die Herstellung der Komplexe entspricht dem Ausgangsmodell 4.1.1 und die anschließende Extrusion der Komplexe wird nach Protokoll 3.3.5 durchgeführt. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Ina Stumpf am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Freiburg durchgeführt.

#### 4.1.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Abbildung 4-11 zeigt, dass die Größe der Lipid/DNA-Komplexe durch Extrusion eingestellt werden kann. Bei einer 11-maligen Extrusion durch eine 200 nm Polycarbonatmembran (+++) können so kleinere Partikelgrößen erzielt werden. Die Mittelwerte der hydrodynamischen Durchmesser von 2 Chargen liegen bei  $343 \pm 3$  nm.

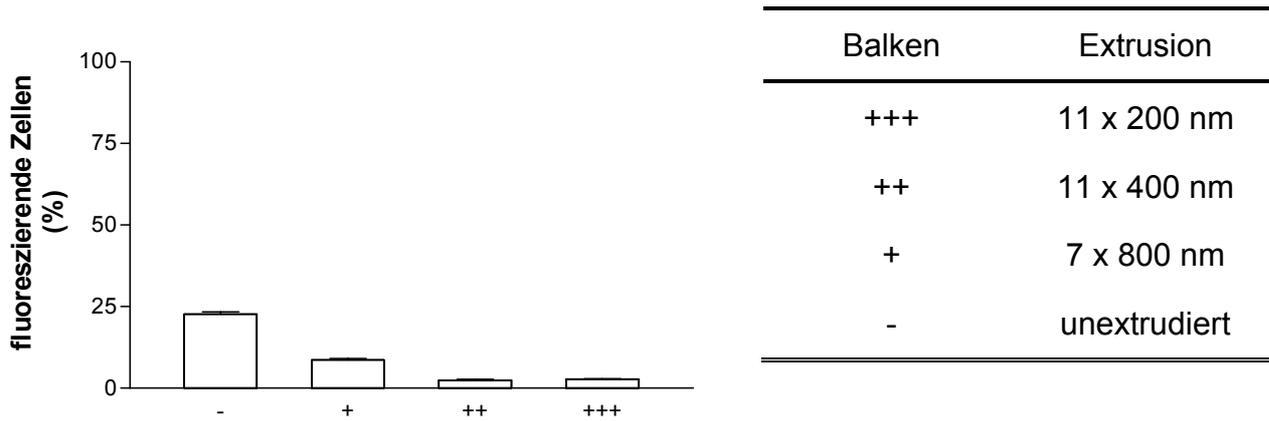


#### Abbildung 4-11: Partikelgrößen nach Extrusion von Lipid/DNA-Komplexen

Unextrudierte Ausgangsliposomen wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und anschließend extrudiert. Die hydrodynamischen Durchmesser wurden 90 min nach Herstellung mittels PCS bestimmt ( $n = 2$ ,  $\pm$  SEM der Mittelwerte).

### 4.1.3.2 Transfektionseffizienz

Die Verdünnung für den Zellversuch entspricht 4.1.1.3. Im Vergleich mit den Komplexen des Ausgangsmodells (vgl. 4.1.1) nimmt die Transfektionseffizienz der Komplexe nach Extrusion signifikant ab. Während unextrudierte Komplexe  $22,7 \pm 0,7$  % der inkubierten A-10 Zellen transfizieren, fällt die Transfektion bei Inkubation extrudierter Komplexe (+++) auf  $2,8 \pm 0,1$  % (Abb. 4-12).

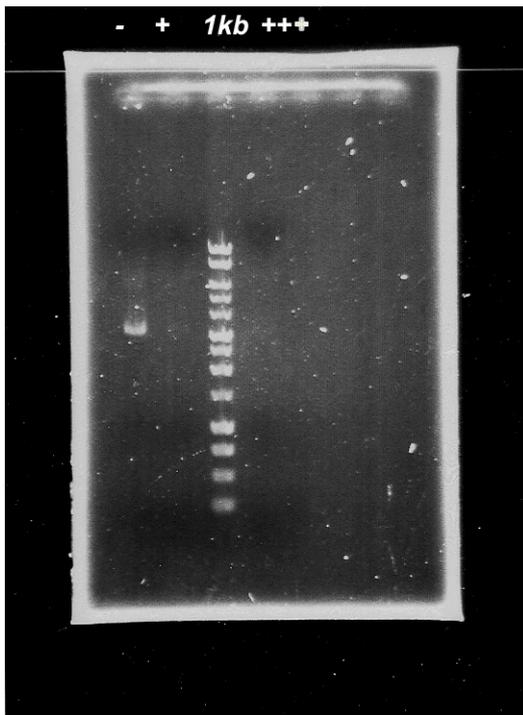


**Abbildung 4-12: Transfektion von A-10 Zellen mit extrudierten Lipid/DNA-Komplexen**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch extrudierte Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

### 4.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Eine mögliche Erklärung für die starke Abnahme der Transfektion nach Extrusion der Komplexe ist die Zerstörung der DNA. Dies kann durch Scherkräfte, wie sie während einer Extrusion auftreten, leicht erfolgen (Bustamante *et al.* 2003). Um diese Hypothese zu prüfen, werden Lipid/DNA-Komplexe extrudiert (+ oder +++) und anschließend mit einem Detergenz dekomplexiert (siehe 3.4.2). Mittels Gelelektrophorese wird auf intakte DNA getestet. Als Kontrolle werden unextrudierte Komplexe (-) mitentwickelt. Wie Abbildung 4-13 zeigt, wird die DNA durch Extrusion der Komplexe fast vollständig degradiert, während die DNA unextrudierter Komplexe als Bande bei ~5 kb zu erkennen ist. Dies entspricht der vom Hersteller angegebenen Größe des eGFP-C1 Plasmids von 4,7 kb. Da die Extrusionsexperimente zu einer Degradation der DNA führen, wurde auf weitere Versuche zur direkten Komplexzerkleinerung verzichtet.



Bahnen	Extrusion
+++	11 x 200 nm
1kb	DNA Leiter
+	7 x 800 nm
-	unextrudiert

**Abbildung 4-13: Agarose-Gelelektrophorese von extrudierten Lipid/DNA-Komplexen**  
Entwicklung von unextrudierten und extrudierten Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) nach Dekomplexierung mit Zwittergent<sup>®</sup>. Detektion der DNA-Banden mittels Ethidiumbromid.

#### 4.1.4 Variation III des Ausgangsmodells: Extrusion der Ausgangsliposomen

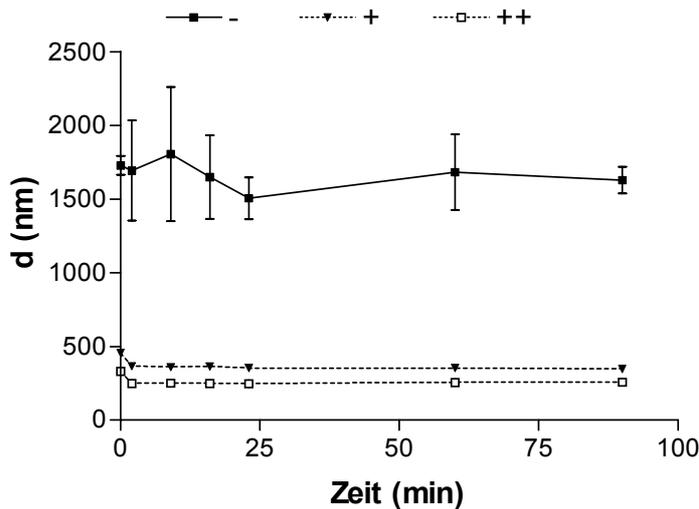
Wie unter 4.1.3.2 gezeigt, führt die direkte Extrusion von Lipid/DNA-Komplexen zu einem Verlust der Transfektionseffizienz. Daher wird als alternative Methode zur Größeneinstellung der Lipid/DNA-Komplexe die Größe der Ausgangsliposomen durch Extrusion reduziert (siehe 3.1.2). Die anschließende Komplexierung der DNA erfolgt durch Zusammenpumpen über ein 400 µm Y-Stück (siehe 3.3.2) und entspricht dem Ausgangsmodell 4.1.1.

Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Ina Stumpf am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Freiburg durchgeführt.

##### 4.1.4.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Ausgangsliposomen für die Lipoplexherstellung werden jeweils unterschiedlich hergestellt: unextrudierte (-), 1-mal durch eine 800 nm Membran extrudierte (+) oder 21-mal durch eine 800 nm und 51-mal durch eine 400 nm Membran (++) extrudierte

Liposomen werden mit DNA komplexiert. Die Größen der Ausgangsliposomen ( $t = 0$  min) sowie die Größen der entstehenden Komplexe werden mittels PCS gemessen (siehe 3.4.1). Abbildung 4-14 zeigt die Entwicklung der mittleren hydrodynamischen Durchmesser über die Zeit.

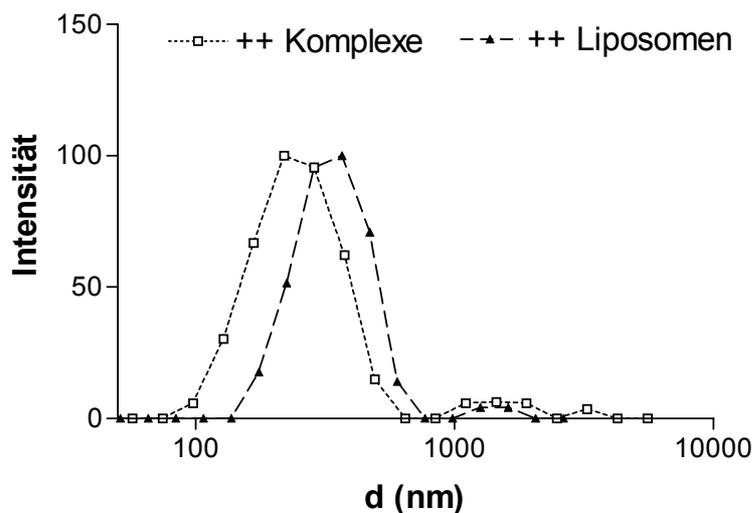


Graph	Extrusion
++	21 x 800 nm 51 x 400 nm
+	1 x 800 nm
-	unextrudiert

**Abbildung 4-14: Partikelgrößenentwicklung bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen aus extrudierten Ausgangsliposomen**

Unextrudierte oder extrudierte Ausgangsliposomen ( $t = 0$  min) wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und die hydrodynamischen Durchmesser über 90 min mittels PCS bestimmt ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM der Mittelwerte).

Eine 1-malige Extrusion durch eine 800 nm Membran (+) reduziert den Mittelwert des hydrodynamischen Durchmesser unextrudierter Liposomen von  $d = 1729 \pm 65$  nm auf  $456 \pm 1$  nm, eine 21-malige mit anschließender 51-maliger Extrusion durch eine 400 nm Membran (++) auf  $330 \pm 0,2$  nm ( $t = 0$  min). Nach Zugabe der DNA werden Partikelgrößen im mittleren Größenbereich von (+)  $357 \pm 3$  nm und (++)  $252 \pm 2$  nm erfasst. Es wird beobachtet, dass die Zählrate der PCS-Messung nach Extrusion (20 - 40 kcps) deutlich unter der Zählrate der unextrudierten Proben (100 - 180 kcps) liegt, obwohl jeweils gleiche Konzentrationen eingesetzt wurden. Die Polydispersität der Komplexproben kann durch Extrusion deutlich verringert werden (PI (+): 0,23 - 0,27 und PI (++): 0,13 - 0,2). Die Messungen sind aufgrund der größeren Homogenität und der geringeren Partikelgrößen gut reproduzierbar (vgl. 4.1.1).



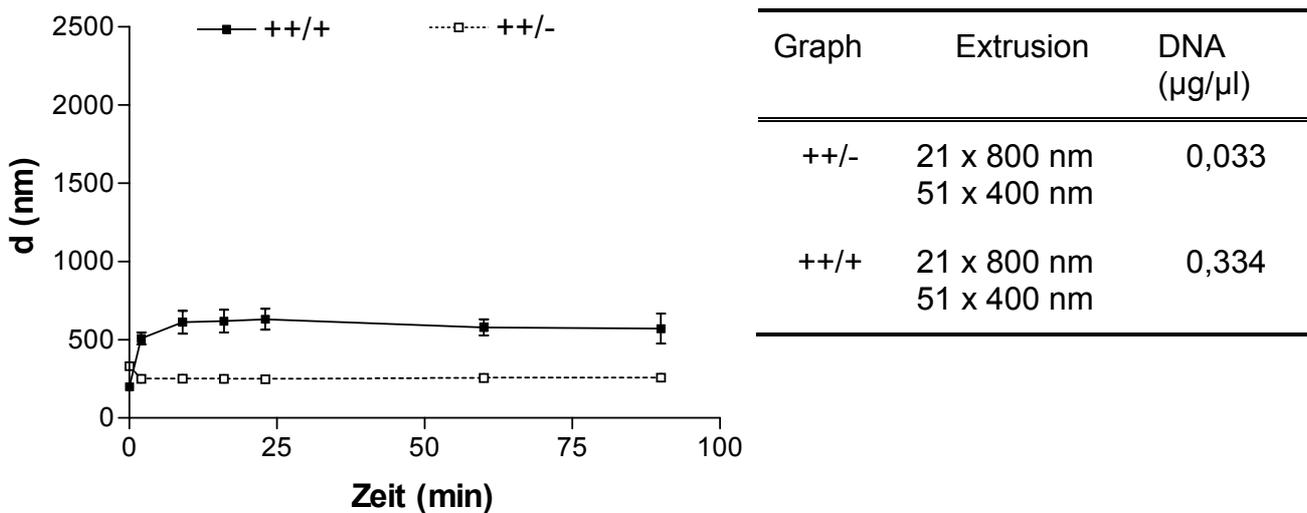
#### Abbildung 4-15: Partikelgrößenverteilung der Ausgangsliposomen und Lipid/DNA-Komplexe

Die 21-mal durch 800 nm und 51-mal durch 400 nm Polycarbonatmembranen extrudierten Ausgangsliposomen (++) der Abb. 4-14 sowie die daraus gebildeten Lipid/DNA-Komplexe wurden zum Zeitpunkt 90 min mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet. Repräsentative Darstellung.

Die NNLS-Auswertungen der PCS-Messungen verdeutlichen, dass die Partikelgrößenverteilung extrudierter Liposomen (++) sich nach DNA-Zugabe nur unwesentlich ändert (Abb. 4-15).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Extrusion der Ausgangsliposomen eine Methode zur Verfügung steht, die Größe der entstehenden Komplexe zu kontrollieren. Die Zählrate und damit die Anzahl der Komplexe verringert sich trotz unveränderter Konzentration der Ausgangskomponenten im Vergleich zum Ausgangsmodell (vgl. 4.1.1) jedoch deutlich und liegt im unteren Bereich der PCS-Auflösung. Daher wird in einer weiteren Versuchsreihe die Konzentration der Ausgangskomponenten 10-fach erhöht.

Bei einer 10-fachen Erhöhung der Ausgangskonzentrationen von DNA-Lösung und Lipiddispersion lässt sich sowohl eine Änderung der Partikelgrößenverteilung als auch eine Änderung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers  $d$  beobachten. Abbildung 4-16 zeigt dies am Beispiel von Lipid/DNA-Komplexen, die aus stark extrudierten (++) Ausgangsliposomen sowohl in der Standardkonzentration (++) als auch in der 10-fachen Konzentration (++) hergestellt wurden.

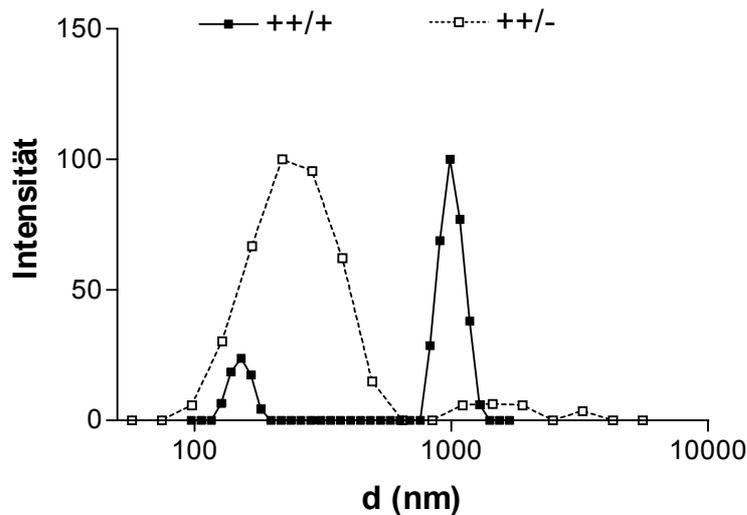


**Abbildung 4-16: Partikelgrößenentwicklung bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen**

Extrudierte Ausgangsliposomen (++) (t = 0 min) wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und die hydrodynamischen Durchmesser über 90 min mittels PCS bestimmt (n ≥ 3, ± SEM der Mittelwerte). Die Herstellung erfolgte in 2 verschiedenen Herstellungs-konzentrationen (++/- und ++/+).

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser d der Verteilung befindet sich nach 10-facher Erhöhung der Konzentration (++) nicht weiter im Bereich der Ausgangsliposomen. Die Messung der hydrodynamischen Durchmesser von > 3 Chargen ergibt für die Ausgangsliposomen einen Mittelwert von  $d = 330 \pm 0,2$  nm und für die resultierenden Komplexe von  $d = 569 \pm 96$  nm.

Der Vergleich der NNLS-Auswertungen unterstreicht die Bildung größerer Komplexstrukturen (Abb. 4-17). Das Maximum der Partikelgrößenverteilung liegt nach 10-facher Konzentrationssteigerung der Ausgangskomponenten im Bereich unextrudiert hergestellter Chargen (vgl. 4.1.1.1). Ein vergleichbarer Einfluss der Ausgangskonzentrationen auf die entstehenden Partikelgrößen von Lipid/DNA-Komplexen ist in der Literatur beschrieben (Zelphati *et al.* 1998).



#### Abbildung 4-17: Partikelgrößenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe bei Herstellung mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen

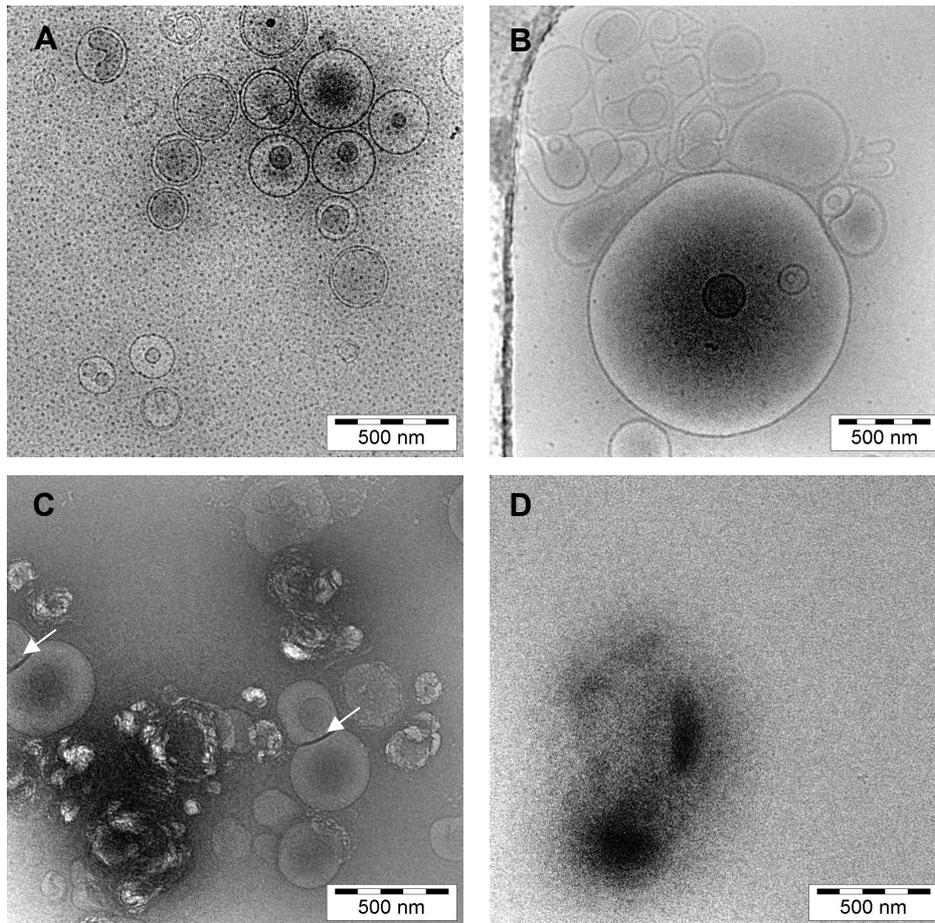
Die 21-mal durch 800 nm und 51-mal durch 400 nm Polycarbonatmembranen extrudierten Ausgangsliposomen (++) der Abb. 4-16 sowie die entstehenden Lipid/DNA-Komplexe wurden zum Zeitpunkt 90 min mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet. Repräsentative Darstellung.

Die Extrusion der Ausgangsliposomen ermöglicht demnach eine Einstellung der Komplexgrößen bei gleichzeitiger Reduktion der Komplexanzahl. Dies ist bei Konzentrationserhöhung der Ausgangskomponenten reversibel.

#### 4.1.4.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Die Größenverteilung der Lipid/DNA-Komplexe wird durch Cryo-TEM-Aufnahmen näher betrachtet (siehe 3.4.4). In der entsprechend dem Ausgangsmodell 4.4.1 präparierten Probe (++) (DNA 0,033 µg/µl) lassen sich nur sehr wenige Komplexe elektronenmikroskopisch erfassen (Daten nicht gezeigt).

Eine elektronenmikroskopische Analyse wird erst nach 10-facher Erhöhung der Probenkonzentration an DNA auf 0,334 µg/µl möglich (vgl. 4.1.1.2) (Abb. 4-18). Neben „fingerprint“-Strukturen treten in der extrudierten Probe Liposomenaggregate auf, zwischen denen DNA komplexiert zu sein scheint (Bild C).



**Abbildung 4-18: Strukturanalytik von Lipid/DNA-Komplexen**

Unextrudierte Ausgangsliposomen (B) oder 21-mal durch 800 nm und 51-mal durch 400 nm Polycarbonatmembranen extrudierte Ausgangsliposomen (A) wurden mittels Cryo-TEM untersucht. Durch Zugabe der DNA wurden die Ausgangsliposomen (B) zu den Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) (D) und die Ausgangsliposomen (A) zu (C) komplexiert. Pfeile kennzeichnen charakteristische Liposomenaggregate.

Rakhmanova et al. zeigen in ihren Untersuchungen zu Lipid/DNA-Komplexen, dass extrudierte Ausgangsliposomen seltener durch DNA-Zugabe aufgebrochen werden als unextrudierte Ausgangsliposomen (Rakhmanova *et al.* 2004). Dieser Effekt könnte die veränderte Komplexstruktur extrudierter Ausgangsliposomen erklären. In der Literatur werden solche Strukturen darüber hinaus bei hohen DNA/Lipid-Verhältnissen beschrieben (Huebner *et al.* 1999). Dies könnte ein Hinweis auf Lipidverlust durch Extrusion sein und die unter 4.1.4.1 erwähnte verringerte Zählrate der PCS-Messungen dieser Proben erklären. In Abschnitt 4.1.4.4 wird ein möglicher Lipidverlust analysiert.

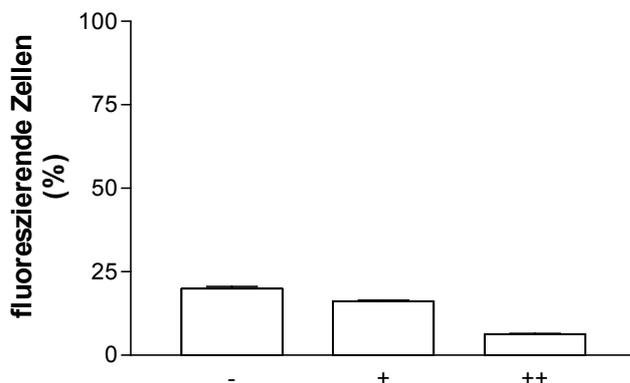
#### 4.1.4.3 Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wird durch die Größe der Lipid/DNA-Komplexe beeinflusst (Ito *et al.* 1990; Felgner *et al.* 1994; Ross & Hui 1999; Rakhmanova *et al.* 2004; Wasungu & Hoekstra 2006).

Wie unter 4.1.4.1 gezeigt, ermöglicht die Extrusion der Ausgangsliposomen eine Verringerung der Partikelgröße. Hier wird die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von einer derartigen Partikelgrößeneinstellung untersucht.

Die Herstellung der Komplexe entspricht dem Ausgangsmodell 4.1.1, die anschließende Verdünnung und Inkubation 4.1.1.3.

Wie in Abbildung 4-19 zu sehen, verringert sich die Transfektionseffizienz nach Extrusion der Ausgangsliposomen. Diese fällt von  $19,9 \pm 0,7$  % nach 1-maliger Extrusion durch eine 800 nm Membran (+) auf  $16,2 \pm 0,2$  %. Eine 21-malige Extrusion durch eine 800 nm Membran gefolgt von einer 51-maligen Extrusion durch eine 400 nm Membran reduziert die Transfektion signifikant ( $p = 0,0022$ ) auf  $6,3 \pm 0,2$  %.



Balken	Extrusion
++	21 x 800 nm 51 x 400 nm
+	1 x 800 nm
-	unextrudiert

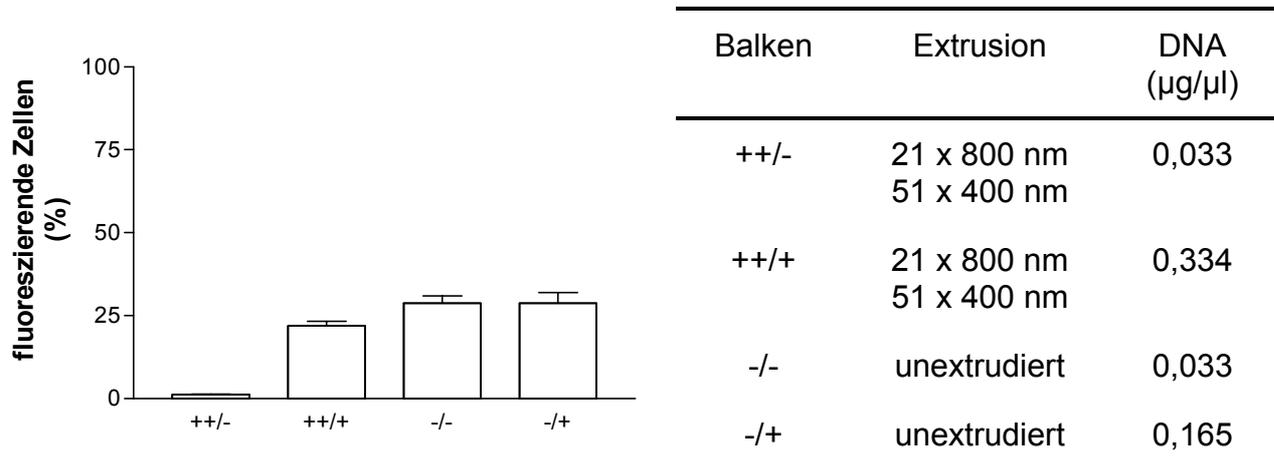
#### Abbildung 4-19: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen aus extrudierten Ausgangsliposomen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus unextrudierten oder extrudierten Ausgangsliposomen ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

In den Abschnitten 4.1.4.1 und 4.1.4.2 ist gezeigt, dass eine Konzentrationserhöhung der Ausgangskomponenten die Partikelgrößenverteilung wieder in den Bereich größerer hydrodynamischer Durchmesser verschiebt und die Anzahl an Komplexen ansteigt.

Abbildung 4-20 zeigt am Beispiel extrudierter Ausgangsliposomen (++), dass mit der 10-fachen Konzentrationssteigerung der Ausgangskomponenten (++/+) auch die Transfektionseffizienz zunimmt. Eine 10-fache Konzentrationserhöhung der

Ausgangskomponenten bei der Herstellung steigert die Transfektionseffizienz somit von  $1,2 \pm 0,19 \%$  (++) auf  $21,9 \pm 1,4 \%$  (+++). Die Konzentration der Komplexe ist in diesen Versuchen nur während der Herstellung erhöht. Für die Zellinkubation werden die Komplexdispersionen auf die Ausgangskonzentration zurück verdünnt (DNA  $0,033 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und analog 4.1.1.3 im Zellversuch eingesetzt.



**Abbildung 4-20: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen bei Herstellung mit verschiedener Ausgangskonzentration**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus unextrudierten oder extrudierten Ausgangsliposomen ( $n \geq 3, \pm \text{SEM}$ ). Die Herstellung erfolgte in 2 verschiedenen Herstellungskonzentrationen.

Die Transfektionseffizienz der Komplexe aus extrudierten Ausgangsliposomen liegt dennoch weiterhin unter der Transfektionseffizienz von Lipid/DNA-Komplexen aus unextrudierten Ausgangsliposomen (-/-) ( $28,7 \pm 3,2 \%$ ). Die Transfektionseffizienz dieser Komplexe kann durch eine Konzentrationserhöhung (-/+) hingegen nur schwach gesteigert werden ((-/-):  $20,0 \pm 0,7 \%$ ; (-/+):  $28,7 \pm 3,2 \%$ ).

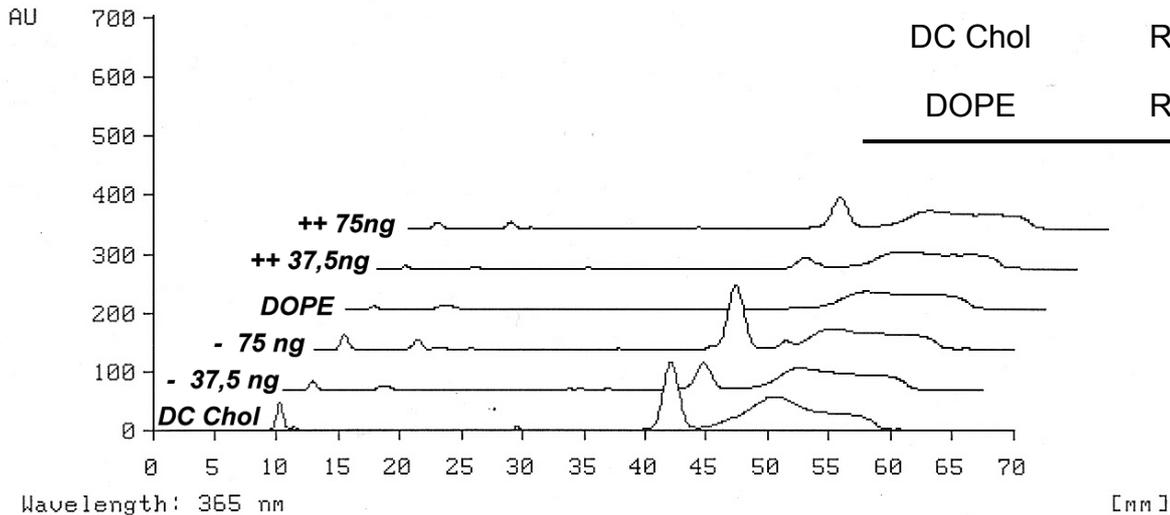
Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Extrusion der Ausgangsliposomen zwar zu einer Verkleinerung der entstehenden Komplexgrößen führt, die Transfektionseffizienz dieser Komplexe allerdings stark abnimmt. In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse publiziert (Zelphati *et al.* 1998). Zelphati *et al.* begründen die effizientere Transfektion größerer Komplexe mit deren Sedimentation, die eine stärkere zelluläre Assoziation ermöglicht. Andere Arbeiten diskutieren hingegen eine stärkere Transfektion kleiner Komplexe und begründen dies mit der Größenpräferenz der aktiven Endozytosewege (Khalil *et al.* 2006). Die Verringerung der Transfektion in den vorliegenden Versuchen könnte dann durch einen Lipidverlust während des Extrusionsprozesses erklärt werden. Denn eine Reduktion des Lipid/DNA-Massenverhältnisses von 8/1 (m/m) in den neutralen

(5:1 m/m) oder negativen Ladungsbereich (< 5/1 m/m) verringert die Transfektionseffizienz (Clement 2005; Ewert *et al.* 2008). Die Cryo-TEM- (vgl. 4.1.4.2) und PCS-Studien (vgl. 4.1.4.1) dieses Abschnitts deuten auf einen solchen Lipidverlust hin. Um die Ursache des Transfektionsverlusts eindeutig zu klären, wird im Folgenden ein möglicher Lipidverlust während der Extrusion untersucht.

#### 4.1.4.4 HPTLC

Die Lipidkonzentration nach Extrusion (++) der Ausgangsliposomen wird mit der Lipidkonzentration unextrudierter Ausgangsliposomen (-) mittels Bartlett-Assay (siehe 3.1.6) verglichen. Es wird ein Lipidverlust von  $46,0 \pm 3 \%$  quantifiziert. Diese Angabe bezieht sich ausschließlich auf das Phospholipid DOPE der DC 30<sup>®</sup>-Lipidmischung, da nur dieses im Bartlett-Assay erfasst wird. Daher wird mit der HPTLC eine zweite Bestimmungsmethode eingeführt (Abb. 4-21) (siehe 3.1.5). Unter Verwendung des Fließmittelgemisches  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  (18,75/6,9/0,15/0,35 V/V/V/V) ist eine Trennung der beiden Lipidbestandteile möglich (Clement 2005). Der DOPE-Spot wird bei einem  $R_f$ -Wert von 0,12, der DC-Cholesterol-Spot bei einem  $R_f$ -Wert von 0,66 detektiert. Der Lipidverlust wird über eine Reduktion der Peakflächen (Peakfläche (++)/Peakfläche (-)) für 2 verschiedene Konzentrationen berechnet. Die HPTLC-Bestimmung ergibt für die DOPE-Konzentration eine Reduktion von  $52,4 \pm 16,5 \%$  nach Extrusion (++)). Die hohe Standardabweichung dieser Bestimmung lässt sich durch die geringen Peakflächen und eine konzentrationsabhängige Aufspaltung des DOPE-Peaks erklären. Auf eine Optimierung der Versuchseinstellungen wird verzichtet, da mit dem Bartlett-Assay bereits eine Bestimmungsmöglichkeit besteht. Die DC-Cholesterol-Konzentration mittels HPTLC ergibt einen Lipidverlust von  $47,6 \pm 4,8 \%$ .

Bahn	Extrusion
++	21 x 800 nm 51 x 400 nm
-	unextrudiert
DC Chol	Referenz
DOPE	Referenz



**Abbildung 4-21: HPTLC-Lipidanalytik extrudierter Ausgangsliposomen**

Repräsentative Auftrennung von unextrudierten (-) und 21-mal durch 800 nm und 51-mal durch 400 nm Polycarbonatmembranen extrudierten DC 30<sup>®</sup> Ausgangsliposomen (++) in die Bestandteile DOPE und DC-Cholesterol durch HPTLC.

Die Lipidquantifizierung zeigt, dass bei der Extrusion von Ausgangsliposomen (++) ein Lipidverlust auftritt. Dieser betrifft beide Komponenten der DC 30<sup>®</sup>-Mischung gleichermaßen und erklärt sowohl die Strukturveränderungen in der Cryo-TEM als auch den Transfektionsverlust. Da eine Erhöhung der Ausgangskonzentrationen den Transfektionsverlust ausgleicht, könnte der Lipidverlust durch eine Oberflächensättigung der Polycarbonatmembran bedingt sein. Auf derartige Wechselwirkungen wird in der Literatur hingewiesen (Rakhmanova *et al.* 2004).

Die Extrusion von Ausgangsliposomen stellt damit eine Methode zur Größeneinstellung der Komplexe dar, die aufgrund des auftretenden Lipidverlusts jedoch schlecht kontrollierbar ist.

#### **4.1.5 Variation IV des Ausgangsmodells: Ultraschallzerkleinerung der Ausgangsliposomen**

Da sich die Extrusion der Ausgangsliposomen zur Einstellung der Komplexgröße durch den auftretenden Lipidverlust als unbrauchbar erweist, wird mit der Ultraschallzerkleinerung eine zweite Methode getestet. Diese hat den Vorteil, dass es sich hierbei um eine Eintopfmethodik handelt, ein Lipidverlust also praktisch auszuschließen ist. Die Ausgangsliposomen werden dabei durch unterschiedlich lange Expositionszeiten im Ultraschallbad oder durch eine Behandlung mit der Ultraschallspitze nach 3.1.3 zerkleinert. Die weitere Herstellung der Komplexe entspricht dem Ausgangsmodell 4.1.1.

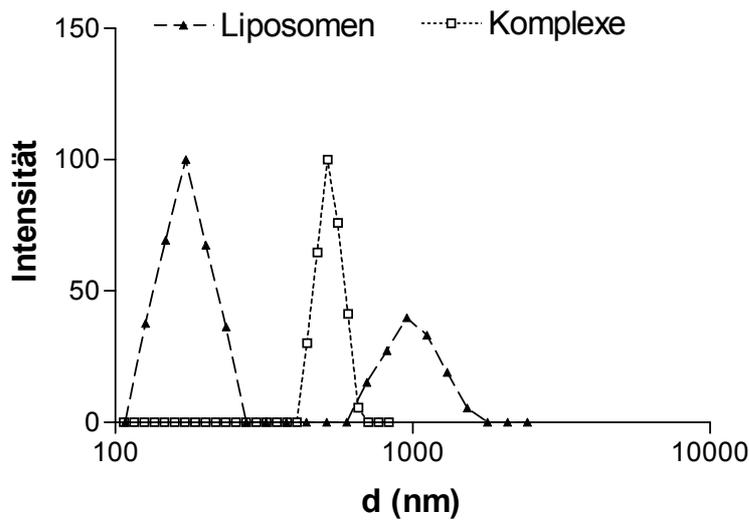
##### **4.1.5.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)**

Die NNLS-Auswertung der Proben ist in Abbildung 4-22 zu sehen. Im Gegensatz zu extrudierten Proben (vgl. 4.1.4.1) verschiebt sich die Partikelgrößenverteilung nach DNA-Zugabe hier deutlich. Weder Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von  $d > 1000$  nm noch Partikel im Bereich der Ausgangsliposomen ( $d = 161$  nm) sind zu finden. Die Ausgangskonzentration der Komplexdispersion ist in diesen Versuchen im Vergleich zum Ausgangsmodell (vgl. 4.1.1) erniedrigt (DNA =  $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Bei Ultraschallbehandlung höher konzentrierter Komplexdispersionen (DNA =  $0,034 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) liegt das Maximum der NNLS-Auswertung weiter bei  $d > 1000$  nm.

Die Polydispersität der entstehenden Komplexe ist verglichen mit denen durch Extrusion zerkleinerten größer (PI:  $0,16 - 0,28$ ). Die Zählrate der PCS-Messungen liegt höher und deutet daher darauf hin, dass kein Lipidverlust auftritt (vgl. 4.1.4.1).

Durch Zentrifugation ( $7000 \times g$ , 10 min,  $25^\circ\text{C}$ ) kann im Gegensatz zu Lipid/DNA-Komplexen aus unextrudierten Ausgangsliposomen (vgl. 4.1.1.1) keine Population, die Partikelgrößen  $> 2000$  nm enthält, abgetrennt werden.

Vergleichbare Komplexe konnten nach einer Partikelzerkleinerung der Ausgangsliposomen durch 210 min Exposition im Ultraschallbad gebildet werden (Daten nicht gezeigt).

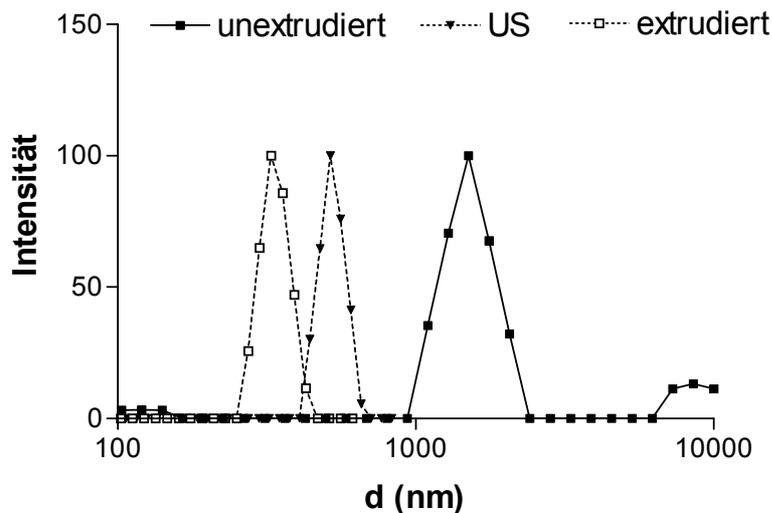


**Abbildung 4-22: Partikelgrößenverteilung von Lipid/DNA-Komplexen aus ultraschallzerkleinerten Ausgangsliposomen**

Ultraschallzerkleinerte Ausgangsliposomen sowie die entstehenden Lipid/DNA-Komplexe wurden zum Zeitpunkt 90 min mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet. Repräsentative Darstellung.

Der Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von Lipid/DNA-Komplexen aus unextrudierten, ultraschallzerkleinerten und extrudierten Ausgangsliposomen zeigt, dass sich die Partikel der ultraschallzerkleinerten Proben in einem mittleren Partikelgrößenbereich befinden (Abb. 4-23).

Diese Ergebnisse belegen, dass der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Komplexe durch Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen indirekt eingestellt werden kann. Der Mittelwert des hydrodynamischen Durchmessers aus 4 Messungen liegt bei  $d = 434 \pm 35$  nm und damit im Bereich der extrudierten Proben in 10-facher Konzentration ( $578 \pm 52$  nm).

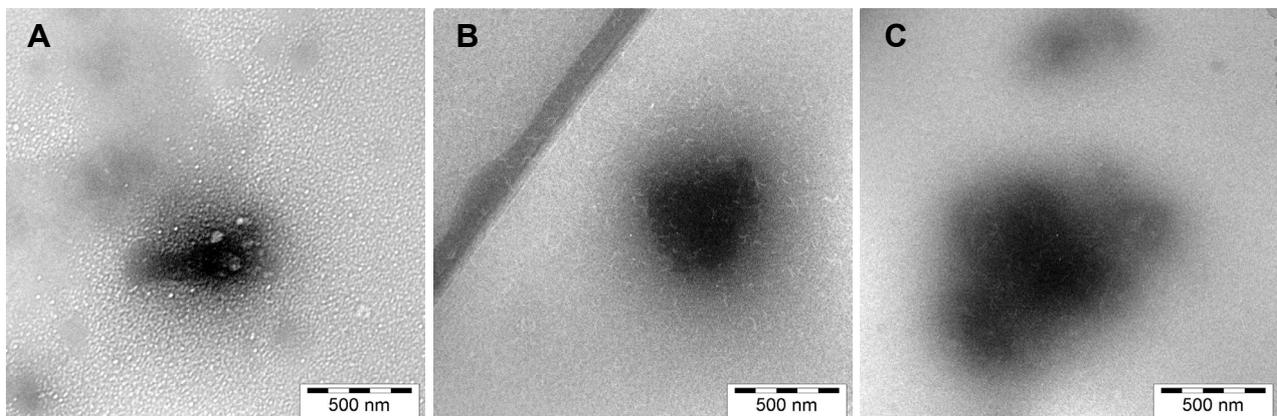


**Abbildung 4-23: Partikelgrößenverteilung von Lipid/DNA-Komplexen verschiedener Herstellungsmethoden**

Unextrudierte, ultraschallzerkleinerte (US) oder 21-mal durch 800 nm und 51-mal durch 400 nm Polycarbonatmembranen extrudierte Ausgangsliposomen wurden mit DNA zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert. Die Partikelgrößenverteilung zum Zeitpunkt 90 min wurde mittels NNLS-Algorithmus ausgewertet. Repräsentative Darstellung.

#### 4.1.5.2 Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Der Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen auf die entstehenden Komplexe (DNA 0,334  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) kann mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe 3.4.4) nicht gezeigt werden.



**Abbildung 4-24: Strukturanalytik von Lipid/DNA-Komplexen aus ultraschallzerkleinerten Ausgangsliposomen**

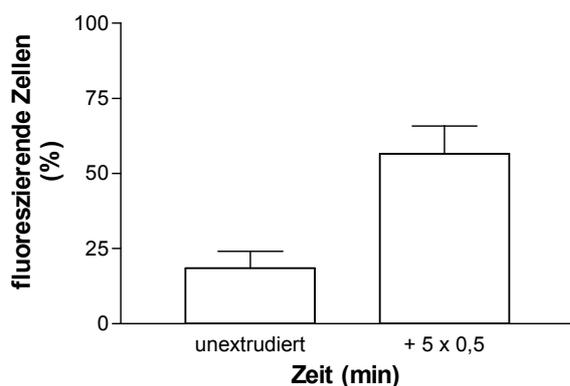
Ultraschallbehandelte Ausgangsliposomen wurden zu Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) komplexiert und mittels Cryo-TEM untersucht. Die Aufnahmen A, B und C zeigen repräsentative Komplexstrukturen.

Die Aufnahmen unterscheiden sich unwesentlich von den Aufnahmen aus 4.1.1.2. Insbesondere die Anzahl der mikroskopierten Komplexe ist für eine Analyse wie in 4.1.1.2 zu gering. Auf eine Konzentrationserhöhung analog den unextrudierten bzw. extrudierten Proben wird an dieser Stelle verzichtet, da keine PCS-Ergebnisse in diesem Konzentrationsbereich vorliegen (vgl. 4.1.5.1). Im Vergleich zu den Komplexen extrudierter Ausgangsliposomen (vgl. 4.1.4.2) können keine Strukturen gefunden werden, die auf einen Lipidverlust hindeuten.

#### 4.1.5.3 Transfektionseffizienz

Die Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen liefert PCS-Ergebnisse, die auf eine Zerkleinerung der Ausgangsliposomen und der daraus gebildeten Lipid/DNA-Komplexe hindeuten. In den folgenden Versuchen wird die Transfektionseffizienz dieser Komplexe untersucht.

Eine Ultraschallzerkleinerung der Ausgangsliposomen mit der Ultraschallspitze (5 x 0,5 min) steigert die Transfektion der Komplexe von  $17,5 \pm 3,1$  % auf  $56,6 \pm 4,1$  % signifikant ( $p = 0,0001$ ) (Abb. 4-25). Diese Steigerung konnte nur bei entsprechender Zerkleinerung der Ausgangsliposomen erreicht werden. Eine Behandlung im Ultraschallbad über Zeiträume von  $< 210$  min führt ebenso zu einer Abnahme der Transfektion wie eine Konzentrationserhöhung der Ausgangsliposomen (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den Literaturangaben (Felgner *et al.* 1994).



**Abbildung 4-25: Transfektion von A-10 Zellen mit Lipid/DNA-Komplexen aus ultraschallzerkleinerten Ausgangsliposomen**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) aus unextrudierten und ultraschallzerkleinerten Ausgangsliposomen (5 x 0,5 s) ( $n \geq 5$ ,  $\pm$  SEM).

Die Steigerung der Transfektionseffizienz beweist, dass die Zerkleinerung der Ausgangsliposomen die Größe und damit die Transfektionseffizienz der entstehenden Lipid/DNA-Komplexe beeinflusst.

Eine Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen ermöglicht so die Größeneinstellung der Lipid/DNA-Komplexe, ohne einen der Extrusion vergleichbaren Lipidverlust zu bedingen.

Obwohl eine Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen in der Literatur bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen häufig beschrieben wird (Ito *et al.* 1990; Felgner *et al.* 1994; Ross & Hui 1999), ist eine der vorliegenden Arbeit vergleichbare Steigerung der Transfektion nicht publiziert. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass in den meisten publizierten Studien eine Zerkleinerung im Ultraschallbad für Zeiträume  $< 60$  min eingesetzt wird (Felgner *et al.* 1994; Ross & Hui 1999). Unter diesen Bedingungen sinkt die Transfektionseffizienz auch in der vorliegenden Arbeit.

#### 4.1.6 Diskussion und Ausblick

Diese Versuchsreihe stellt den Herstellungsprozess von Lipid/DNA-Komplexen vor und führt Methoden zur Charakterisierung dieser Komplexe ein.

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) der Partikel bzw. Partikelgrößenverteilungen gehört zu den Standardmethoden im Bereich nanopartikulärer Systeme, da die Bestimmung schnell durchführbar ist und die Proben nicht zerstört werden (Torchilin & Weissig 2003). Bei der Analyse von Lipid/DNA-Komplexen stößt diese Methode allerdings aus mehreren Gründen an ihre Grenzen:

1. Unter Berücksichtigung des eingestrahlt Laserlichts ist anzunehmen, dass neben der Rayleigh-Streuung (Gültigkeit: Wellenlänge Laser  $\gg$  Partikelgröße) auch Mie-Streuung (Gültigkeit: Wellenlänge Laser  $\sim$  Partikelgröße) auftritt (Rakhmanova *et al.* 2004).
2. Bei der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen entstehen - besonders bei Herstellung über die modifizierte Filmmethode - sehr breite Größenverteilungen mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern von  $d > 500$  nm. Da in einer intensitätsgewichteten Auswertung unterschiedlich große Partikel auch unterschiedlich starke Messsignale ergeben (Rayleigh-Streuung), ist die Messung bei einem PI von  $> 0,25$  schwer auswertbar.

3. Da Lipid/DNA-Komplexe außerdem keine kugelförmigen Strukturen sind, stören Streulichtschwankungen, die durch die Rotation der Komplexe verursacht werden (Torchilin & Weissig 2003).

Die Größenbestimmung von Lipid/DNA-Komplexen mittels PCS stellt daher immer eine Abschätzung und nie eine exakte Bestimmung der Partikelgröße dar (Rakhmanova *et al.* 2004).

Als weitere Methode der Partikelgrößenanalyse wird Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) vorgestellt. Bei der Untersuchung von Lipid/DNA-Komplexen fällt auf, dass in den elektronenmikroskopischen Proben nur eine sehr geringe Anzahl Komplexe zu finden ist. Dies könnte auf Schwierigkeiten bei der Probenpräparation hindeuten, die bei der Cryo-TEM eine besondere Rolle spielt. Durch die Beschleunigung des Einfrierprozesses ist es möglich, einen dünnen Film aus amorphem Eis zu erhalten. Nur ein extrem dünner Film ( $< 0,5 - 1 \mu\text{m}$ ) verhindert den mehrmaligen Kontakt eines Elektrons mit Materie (*inelastic scattering*). So verursacht ein dickerer Probenfilm immer einen höheren Anteil *inelastic scattering* und dadurch einen deutlich schlechteren Bildkontrast (McIntosh *et al.* 2005). Dies erschwert die elektronenmikroskopische Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen, da allein deren Größe ( $0,5 - 1 \mu\text{m}$ ) die Herstellung eines dünnen Films bereits erschwert (Gustafsson *et al.* 1995).

PCS und Cryo-TEM sind Standardmethoden der Partikelgrößenanalyse nanopartikulärer Systeme. Die Anwendung beider Methoden bei der Analyse von Lipid/DNA-Komplexen wird in der vorliegenden Arbeit nicht zuletzt dadurch erschwert, dass sich die analysierten Komplexe teilweise nicht mehr im nanopartikulären Bereich befinden. Damit ist eine wesentliche Anforderung an das Komplexprofil nicht erfüllt (vgl. 1.3).

Daher werden Variationen des Herstellungsprozesses vorgestellt, welche die Produktion nanopartikulärer Lipid/DNA-Komplexe ermöglichen und damit die Charakterisierung und den Einsatz dieser Komplexe in der Gentherapie verbessern sollen. Es wird deutlich, dass der Herstellungsprozess von einer großen Anzahl an Parametern (Volumina, Konzentration, Pump-/Pipettiermodell, Lyophilisation, Lagerung usw.) abhängig ist und die Eigenschaften (Größe, Struktur, Ladung) der Komplexe durch die Variation dieser Parameter beeinflusst werden können. Anhand dieser Ergebnisse kann mit der Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen eine Methode eingeführt werden, die eine Einstellung der resultierenden Partikelgrößen ermöglicht.

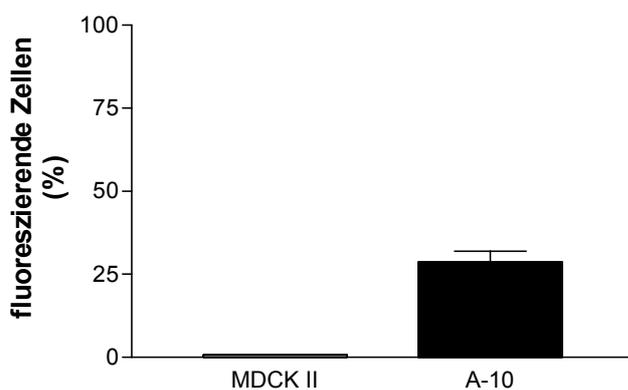
Die Optimierung der therapeutischen Verwendbarkeit verlangt darüber hinaus zu verstehen, welche Komplexstruktur, -ladung und -größe die effizientesten Lipid/DNA-

Komplexe liefert. Diese Frage ist empirisch kaum zu beantworten. Gelingt es hingegen, das Anforderungsprofil zellulärer Systeme an diese Komplexe zu verstehen, kann eine Zielstruktur entwickelt und der Herstellungsprozess rationell an diese angepasst werden. Dies stellt die Grundlage der Endozytoseforschung dar. Im Rahmen dieser Untersuchungen wird die Aufnahme und zelluläre Prozessierung der Lipid/DNA-Komplexe und folglich das zelluläre Anforderungsprofil untersucht. Die Endozytoseforschung ist daher Bestandteil des folgenden Kapitels.

## 4.2 Zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen und Transfektion

In Abschnitt 4.1 dieser Arbeit wird deutlich, dass für eine rationelle Entwicklung von Lipid/DNA-Komplexen das Anforderungsprofil der Zellen bekannt sein muss. In den folgenden Abschnitten werden daher die einzelnen Schritte einer erfolgreichen Transfektion untersucht. Dazu zählen: zelluläre Aufnahme, Prozessierung und intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen.

Die Zelllinie A-10 wird von Lipid/DNA-Komplexen sehr effizient transfiziert und eignet sich daher besonders zur Analyse der verschiedenen Transfektionsschritte. Wie in Abschnitt 4.1 bereits erwähnt, kann je nach Herstellung der Komplexe eine Transfektion von > 50 % der Zellen erzielt werden. Ein Wechsel des Zellmodells kann die Transfektionseffizienz der Lipid/DNA-Komplexe jedoch deutlich verringern. Zu den schlecht transfizierbaren Zellen zählen insbesondere Primärzellen, aber auch bestimmte Zelllinien wie die epitheliale Hundenierenzelllinie MDCK II. Diese zeigt für die in dieser Arbeit verwendeten Lipid/DNA-Komplexe eine überraschend niedrige Transfektion. Die Expression des eGFP-Plasmids kann in < 1% der analysierten Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden (siehe 3.6.1) (Abb. 4-26).



### Abbildung 4-26: Transfektion verschiedener Zelllinien

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 und MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

Die Zelllinien-Abhängigkeit der Transfektion wird in der Literatur häufig beschrieben, ist jedoch nicht eingehender untersucht (Wong *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wird der Transfektionsprozess - beginnend mit der zellulären Aufnahme über die zelluläre Prozessierung bis hin zur intrazellulären Dissoziation der Komplexe - in der effizient

transfizierten Zelllinie A-10 und der ineffizient transfizierten Zelllinie MDCK II definiert und beide Prozesse miteinander verglichen.

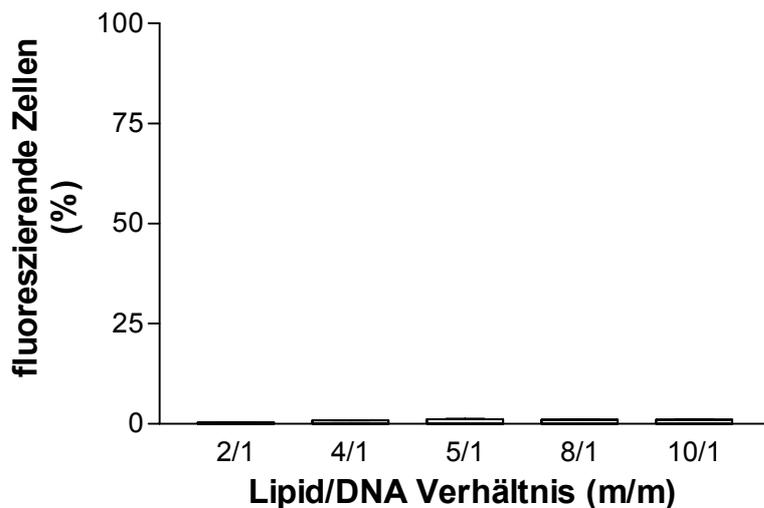
Die Aufklärung des Transfektionsprozesses verspricht die Entschlüsselung der zellulären Barrieren, die einer erfolgreichen Transfektion bestimmter Zelllinien und damit möglicherweise auch der Transfektion *in vivo* im Weg stehen. Die Gegenüberstellung einer effizient und einer ineffizient transfizierten Zelllinie stellt ein einfaches Modell dar, um diese zellulären Barrieren zu definieren und auf die Bedeutung der einzelnen Schritte für eine effiziente Transfektion schließen zu können.

## **4.2.1 Optimierung des MDCK II Zellmodells**

Um auszuschließen, dass die niedrige Transfektion der MDCK II Zelllinie lediglich durch ein ungeeignetes Transfektionsprotokoll verursacht wird, werden folgende Parameter des Standardprotokolls (siehe 3.3.1 und 3.6.1) verändert: Größe und Ladung der Lipid/DNA-Komplexe, Zelldichte und Transfektionszeit.

### **4.2.1.1 Einfluss des Ladungsverhältnisses auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen**

In Abschnitt 4.1 wird beschrieben, dass die zelluläre Transfektion von A-10 Zellen durch eine Anpassung der Eigenschaften der Lipid/DNA-Komplexe beeinflusst werden kann. Neben der Größe der Komplexe spielt hier insbesondere die Ladung eine bedeutende Rolle. Daher wird in einer ersten Versuchsreihe die Ladung der Komplexe durch eine Veränderung des Lipid/DNA-Verhältnisses variiert (siehe 3.3.1).



**Abbildung 4-27: Transfektion mit unterschiedlich geladenen Lipid/DNA-Komplexen**  
Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe mit den Massenverhältnissen 2/1 - 10/1 ( $n \geq 7$ ,  $\pm$  SEM).

Lipid/DNA-Komplexe werden inkubiert und die zelluläre Transfektion nach 48 h durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.6.1). Während in der Literatur eine steigende Transfektion mit zunehmendem Lipid/DNA-Verhältnis und damit positiver Ladung der Komplexe beschrieben wird (Xu *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2003; Kiefer *et al.* 2004; Clement 2005; Ewert *et al.* 2008), kann die Transfektion der MDCK II Zelllinie durch eine solche Veränderung der Komplexe nicht optimiert werden.

In den folgenden Versuchsreihen werden daher jeweils Lipid/DNA-Komplexe mit einem Massenverhältnis von 8/1 eingesetzt. Diese Komplexe besitzen eine schwach positive Nettoladung (Ladungsverhältnis (+/-): 1,6) und stellen daher einen Kompromiss aus niedriger Toxizität und starker zellulärer Assoziation dar (Kiefer *et al.* 2004).

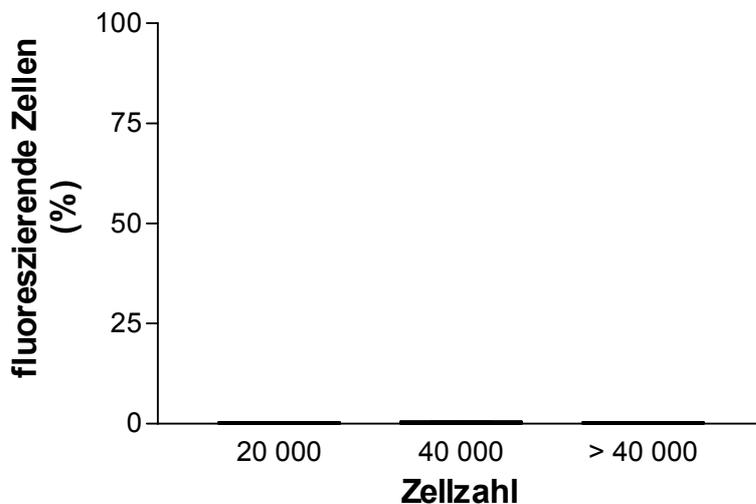
#### 4.2.1.2 Einfluss der Zelldichte auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen

Die nach 3.6.1 ausplattierte Zellzahl beeinflusst die Zellaufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen, insbesondere in der Epithelzelllinie MDCK II. Diese bildet bei einsetzender Konfluenz einen Monolayer aus und beginnt anschließend zu polarisieren (vgl. 4.4), wodurch die Aufnahme- und Transfektionsfähigkeit der Zellen deutlich reduziert wird (Tuma & Hubbard 2003; Zuhorn *et al.* 2007b; Harush-Frenkel *et al.* 2008). Die schlechte Transfizierbarkeit epithelialer Monolayer erklärt Zuhorn mit der Polarisierung der Zellen: Rezeptoren, die eine Komplexbindung eingehen können (z.B. Integrin  $\beta$ 1) (vgl.

1.4.1) und so die zelluläre Aufnahme vermitteln, liegen im polarisierten Zellmodell ausschließlich basolateral vor und sind somit für die Komplexe nicht mehr zugänglich. Andere begründen die schlechte Transfizierbarkeit dieser Zellen mit der geringen Endozytoseaktivität der Monolayer (Zuhorn *et al.* 2007b; Harush-Frenkel *et al.* 2008). Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der Abwesenheit von Caveolae-Strukturen an der apikalen Zellmembran (von Bonsdorff *et al.* 1985; Vogel *et al.* 1998), wodurch eine Caveolae-Endozytose im Monolayer unterbunden wird.

Um zu gewährleisten, dass keine polarisierten Zellen vorliegen, wird in einer weiteren Versuchsreihe die Zellzahl daher verringert.

Für den Versuch werden 20 000 und 40 000 Zellen 24 h oder 40 000 Zellen 96 h vor Komplexinkubation pro Einzelwell ausplattiert und gemäß 3.6.1 analysiert. Die 96 h kultivierten Zellen bilden dabei bereits einen Monolayer aus, während die 24 h Kulturen subkonfluent vorliegen. Wie Abbildung 4-28 zeigt, kann die Transfektion bei Verringerung der Zelldichte nicht wesentlich gesteigert werden.



#### Abbildung 4-28: Transfektion verschiedener Zelldichten

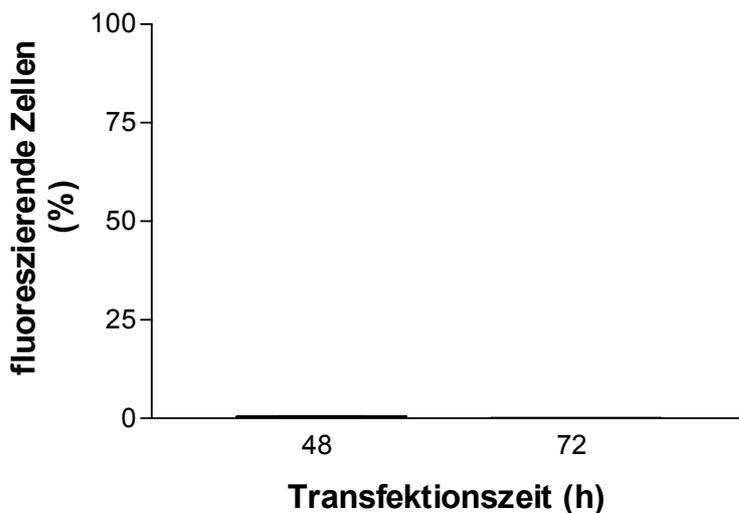
Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM). Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit einer Zelldichte von 20 000 und 40 000 Zellen ausplattiert oder 96 h vorher mit 40 000 Zellen (> 40 000).

In den folgenden Versuchsreihen wird mit einer Ausgangszelldichte von 20 000 Zellen weitergearbeitet. Dies ist das messtechnische Minimum für eine anschließende durchflusszytometrische Messung von 10 000 Zellen.

#### 4.2.1.3 Einfluss der Transfektionszeit auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen

Als weiterer Parameter wird die Transfektionszeit des Standardprotokolls von 48 h (siehe 3.6.1) auf 72 h erhöht. Damit wird ausgeschlossen, dass die mangelnde Transfektion in Wirklichkeit durch eine verzögerte Transfektion verursacht wird.

Die Transfektion kann durch eine Verlängerung der Transfektionszeit allerdings nicht erhöht werden (Abb. 4-29).



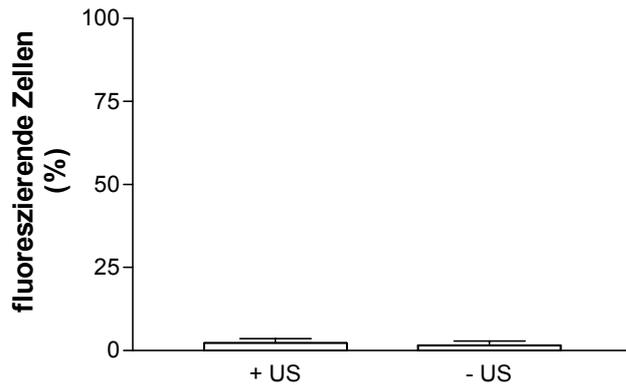
#### Abbildung 4-29: Transfektion über verschiedene Zeiträume

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 nach 48 h und 72 h (m/m) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

In den folgenden Versuchsreihen wird eine Transfektionszeit von 48 h verwendet.

#### 4.2.1.4 Einfluss der Komplexgröße auf die Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen

Wie in Abschnitt 4.1.4 erwähnt, kann die Transfektionseffizienz in A-10 Zellen durch eine Verkleinerung der Komplexgrößen erhöht werden. Daher werden in einer weiteren Versuchsreihe im Standardprotokoll (siehe 3.6.1) statt unextrudierter Ausgangsliposomen ultraschallzerkleinerte Ausgangsliposomen gemäß 4.1.5.3 eingesetzt und die Transfektion bestimmt. Die Partikelgrößenverteilung der Komplexe entspricht 4.1.5.1.



#### **Abbildung 4-30: Transfektion mit Lipid/DNA-Komplexen unterschiedlicher Größe**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) ( $n = 6, \pm \text{SEM}$ ). Die Größe der Komplexe wurde durch Zerkleinerung der Ausgangsliposomen mit der Ultraschallschallspitze für  $5 \times 30 \text{ s}$  (+ US) eingestellt und die Transfektion mit Komplexen aus unbehandelten Ausgangsliposomen (- US) verglichen.

In MDCK II kann die Transfektion durch diese Maßnahme geringfügig auf  $2,3 \pm 0,6 \%$  gesteigert werden.

In den folgenden Versuchen werden zunächst weiterhin unextrudierte Ausgangsliposomen verwendet.

#### **4.2.2 Zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen in zwei Zellmodellen**

Die Transfektion von MDCK II Zellen lässt sich auch durch eine Anpassung des Transfektionsprotokolls nicht wesentlich steigern. Daher werden die Komplexe weiter nach dem Standardprotokoll 3.3.1 hergestellt und die Transfektion gemäß 3.6.1 durchgeführt.

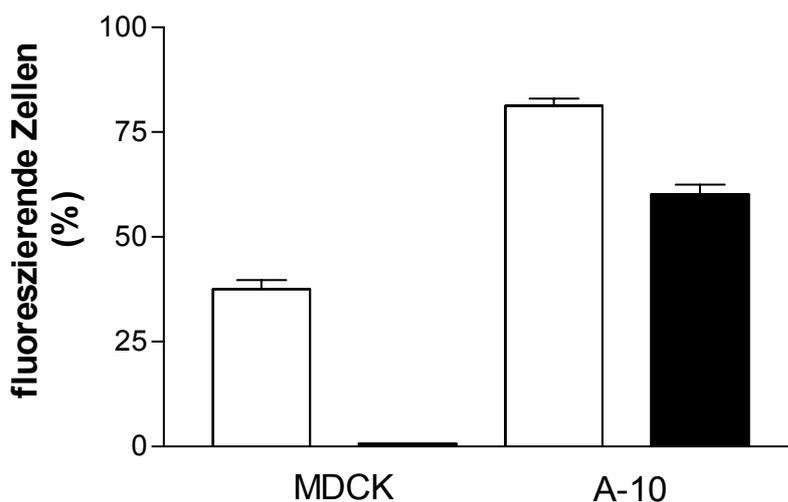
In einer weiteren Versuchsreihe werden so die zellulären Barrieren, die einer erfolgreichen Transfektion entgegenstehen, im MDCK II Zellmodell charakterisiert und anschließend mit dem A-10 Modell verglichen.

Werden Lipid/DNA-Komplexe derselben Charge in zwei unterschiedlichen Zellmodellen inkubiert, stellt die zelluläre Aufnahme der Komplexe die erstmögliche zellabhängige Barriere dar.

#### 4.2.2.1 Zelllinien-Abhängigkeit der Assoziation von Lipid/DNA-Komplexen

Um zu überprüfen, inwieweit die Transfektion der Zellen durch die Assoziation der Lipid/DNA-Komplexe bestimmt wird, werden durchflusszytometrische Versuche nach 3.6.1 durchgeführt. Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden dazu 5 h bei 37 °C mit A-10 sowie MDCK II Zellen inkubiert. Abbildung 4-31 zeigt, dass die Komplexe von A-10 Zellen signifikant ( $p < 0,0001$ ) stärker assoziiert werden ( $81,3 \pm 1,7 \%$ ) als von MDCK II Zellen ( $37,5 \pm 1,7 \%$ ).

Die unterschiedliche Assoziation der Komplexe führt zu einer unterschiedlichen Anzahl transfizierter Zellen (A-10:  $64,0 \pm 3,0 \%$  und MDCK:  $0,9 \pm 0,1 \%$ ) in beiden Zellmodellen. Die zellabhängige Transfektionseffizienz kann daher durch die unterschiedliche Assoziation der Komplexe in beiden Zellmodellen teilweise erklärt werden.



#### Abbildung 4-31: Assoziation und Transfektion verschiedener Zelllinien

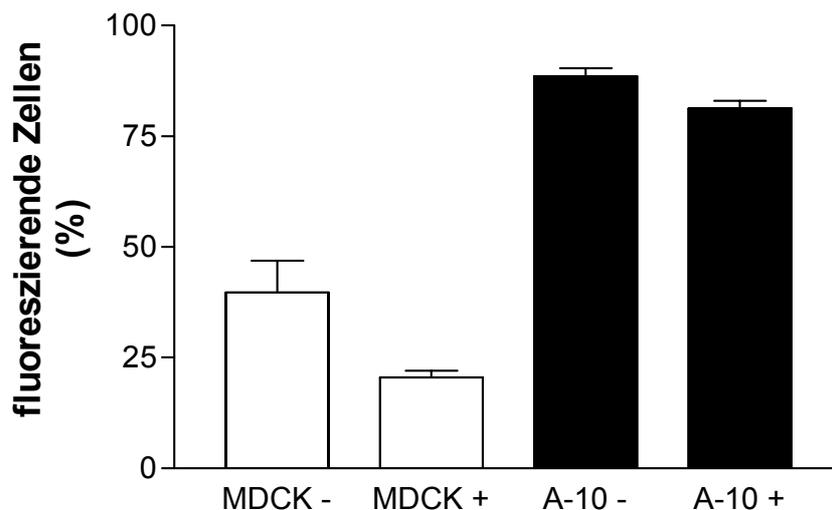
Durchflusszytometrische Bestimmung der Assoziation (weiße Balken) von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) und der Transfektion (schwarze Balken) in A-10 und MDCK II Zellen ( $n \geq 5$ ,  $\pm$  SEM).

Der Zusammenhang zwischen zellulärer Assoziation und Transfektion ist nahe liegend und in der Literatur bereits beschrieben (Zabner *et al.* 1995; Zuhorn *et al.* 2002; Douglas *et al.* 2008). Die mangelnde Transfektion der MDCK II Zelllinie kann in Anbetracht der zellulären Komplexassoziation von 37,5 % jedoch nicht hinreichend erklärt werden.

#### 4.2.2.2 Bestimmung von zellulärer Assoziation und zellulärer Aufnahme

Die durchflusszytometrische Analyse zellulärer Assoziation erfasst neben vollständig internalisierten Komplexen auch solche, die an der Plasmamembran gebunden vorliegen (Huth *et al.* 2006). Daher wird geprüft, inwieweit es sich bei der in 4.2.2.1 ermittelten Assoziation tatsächlich um zelluläre Internalisierung und nicht um extrazelluläre Bindung der Komplexe an der Plasmamembran handelt.

Zur Bestimmung der extrazellulären Bindung der Komplexe an der Plasmamembran werden die Zellen nach Inkubation der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe mit CellScrub™ Puffer gewaschen (MDCK + und A-10 +) (siehe 3.6.1). Dieser Puffer zerstört nicht internalisierte Komplexe (Zuhorn *et al.* 2002). Die Differenz der durchflusszytometrischen Messungen einer Probe, die 1-mal mit und 1-mal ohne CellScrub™ Puffer gewaschen wird, gibt den Anteil extrazellulär gebundener Komplexe an.



#### Abbildung 4-32: Zelluläre Assoziation und Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen

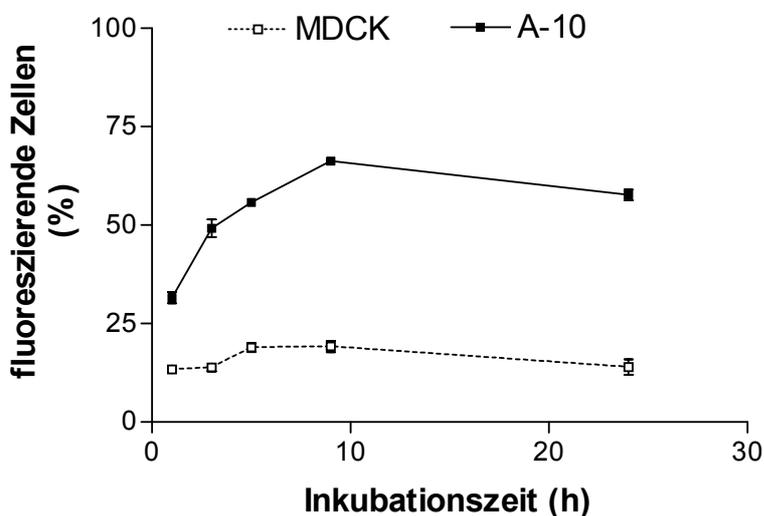
Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) in A-10 und MDCK II Zellen ( $n \geq 5$ ,  $\pm$  SEM). Die zelluläre Assoziation (-) wird von der reinen zellulären Aufnahme (+) der Komplexe durch Inkubation mit dem CellScrub™ Puffer unterschieden.

Die Anzahl fluoreszierender MDCK II Zellen sinkt nach Entfernung der extrazellulär assoziierten Komplexe mit Hilfe des CellScrub™ Puffers von  $39,7 \pm 7,3$  % auf  $20,5 \pm 1,5$  % (Abb. 4-32). Die Hälfte der Komplexe befindet sich daher an die Zellen gebunden und nicht vollständig internalisiert. Bei A-10 Zellen ist der Anteil extrazellulär assoziierter Komplexe deutlich geringer.

In den folgenden Aufnahmeversuchen werden die Zellen jeweils nach Inkubation der Komplexe mit CellScrub™ Puffer gewaschen und die extrazellulär assoziierten Komplexe somit entfernt.

#### 4.2.2.3 Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen

Des Weiteren wird die Aufnahmekinetik der Lipid/DNA-Komplexe in MDCK II und A-10 Zellen genauer definiert. Dafür werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe in einem Zeitraum von 1 - 24 h mit den Zellen inkubiert und die zelluläre Aufnahme durchflusszytometrisch verfolgt (siehe 3.6.1).



**Abbildung 4-33: Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) in MDCK II und A-10 Zellen nach Inkubationszeiten von 1 - 24 h ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

Die Aufnahme der Komplexe setzt nach einer Inkubationszeit von 1 h verstärkt ein und verdoppelt sich im weiteren Inkubationsverlauf (Abb. 4-33). In beiden Zelllinien ist nach einer starken initialen Aufnahme der Komplexe ein zweiter Anstieg nach 5 h zu erkennen. Die A-10 Zelllinie zeigt in den ersten 3 h einen steileren Anstieg der Komplexaufnahme. Darüber hinaus unterscheiden sich beide Zellmodelle wiederum im Ausmaß der Aufnahme.

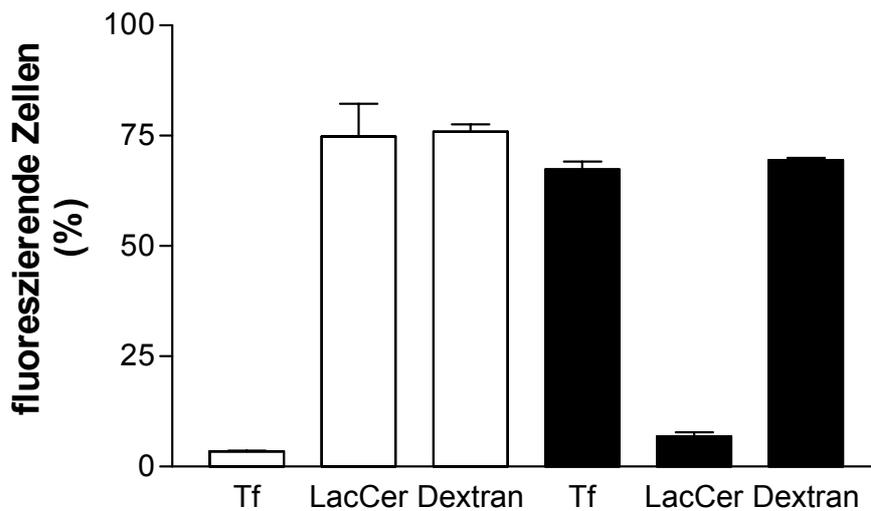
### 4.2.3 Endozytoseprofil der Zellen

Um die unterschiedliche Aufnahme der Komplexe in beiden Zellmodellen verstehen zu können, muss der jeweilige zelluläre Aufnahmemechanismus aufgeklärt werden. In der Literatur wird Endozytose als der Hauptaufnahmemechanismus nanopartikulärer Systeme angesehen (Khalil *et al.* 2006; Wasungu & Hoekstra 2006; Hoekstra *et al.* 2007; Rawat *et al.* 2007). Eine unterschiedliche Aufnahme der Komplexe muss demnach mit einer unterschiedlichen Endozytoseaktivität beider Zellmodelle zusammenhängen. Untersuchungen zur Endozytose nanopartikulärer Systeme werden durch die Tatsache erschwert, dass dieser Prozess über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen („Endozytosewege“) ablaufen kann (vgl. 1.4.2), die unterschiedliche Aufnahmekinetiken sowie intrazelluläre Prozessierungen aufweisen (Benmerah & Lamaze 2007; Mayor & Pagano 2007; Mills 2007; Gong *et al.* 2008; Sandvig *et al.* 2008; Swanson 2008). In einer ersten Versuchsreihe wird daher untersucht, welche Endozytosewege in den beiden Zellmodellen aktiv sind, um so das Endozytoseprofil beider Zelllinien zu erstellen. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Annette Steinbach (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) durchgeführt.

#### 4.2.3.1 Zelluläre Aufnahme von Endozytosemarkern

Für die Aufklärung aktiver Endozytosewege werden die Zellen 5 h mit fluoreszenzmarkierten Markersubstanzen inkubiert (siehe 3.6.1), deren zellulärer Aufnahmemechanismus exakt bekannt ist („Endozytosemarker“). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich dabei auf Endozytosewege, die als Aufnahmewege nanopartikulärer Systeme beschrieben sind. Dazu zählen: Clathrin- und Caveolae-Endozytose sowie Makropinozytose. Als Endozytosemarker werden Transferrin für Clathrin (Karin & Mintz 1981), das Glykosphingolipid Lactosylceramid für Caveolae (Singh *et al.* 2003) und Dextran 40 000 für Makropinozytose ausgewählt (Mercer & Helenius 2008).

Nach Inkubation der Marker werden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (siehe 3.6.1).



#### Abbildung 4-34: Aufnahme von Endozytosemarkern

Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme von Endozytosemarkern in A-10 (schwarze Balken) und MDCK II Zellen (weiße Balken) ( $n = 3, \pm$  SEM). Fluoreszenzmarkiertes Transferrin (Tf), Lactosylceramid (LacCer) und Dextran 40 000 wurden jeweils 5 h inkubiert.

Der Makropinozytose-Marker Dextran 40 000 wird von beiden Zellen vergleichbar stark aufgenommen (MDCK II:  $69,4 \pm 0,5$  %, A-10:  $75,8 \pm 1,6$  %). Der Clathrin-Marker Transferrin hingegen wird von der Zelllinie A-10 ( $67,3 \pm 1,9$  %) deutlich stärker internalisiert als von der Zelllinie MDCK II ( $3,4 \pm 1,7$  %). Für den Caveolae-Marker zeigt sich ein umgekehrtes Aufnahmeverhalten beider Zelllinien (MDCK II:  $74,8 \pm 7,4$  %, A-10:  $6,9 \pm 1,0$  %). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Zelllinien unterschiedliche Endozytoseprofile aufweisen. Damit stehen ein Clathrin- und ein Caveolae-dominantes Endozytosemodell einander gegenüber. In einer weiteren Versuchsreihe wird geprüft, welche der aktiven Endozytosewege an der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen beteiligt sind.

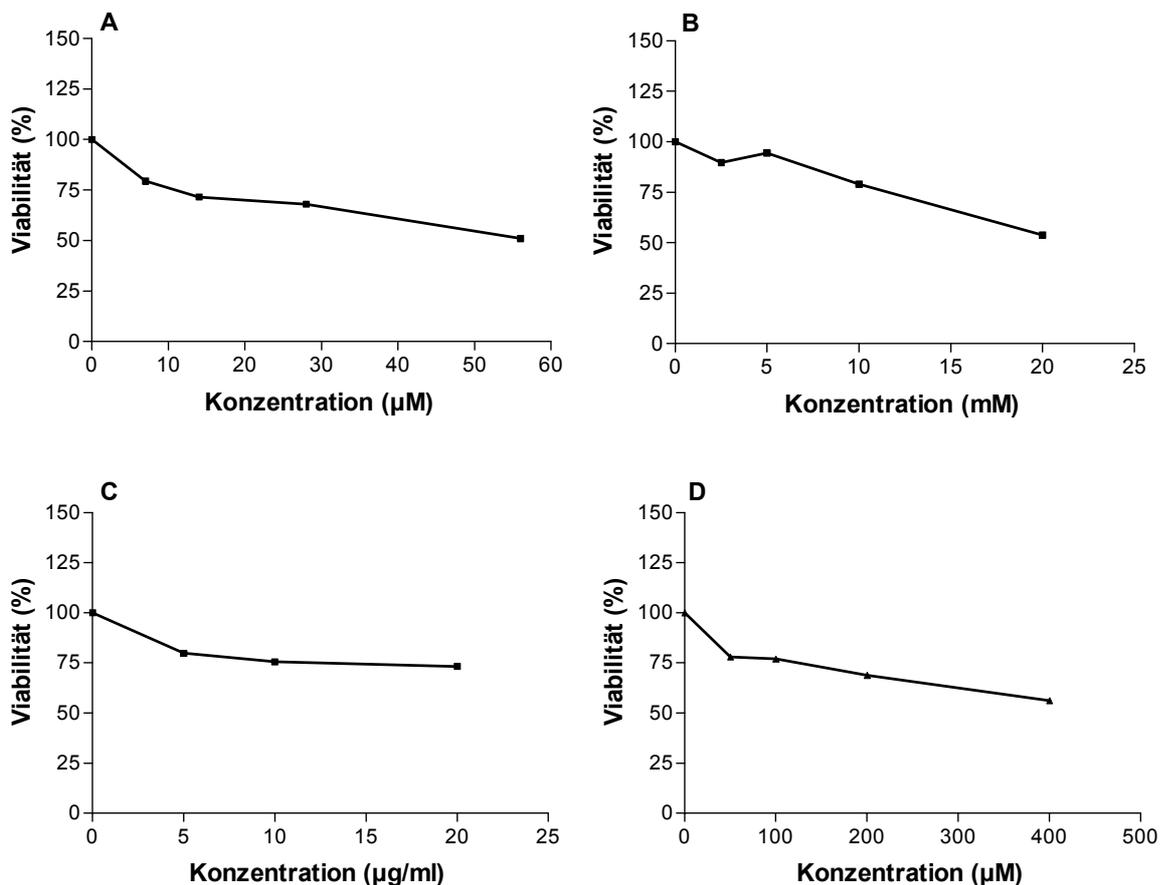
#### 4.2.4 Einfluss verschiedener Endozytosewege auf die Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen

Der Beitrag der aktiven Endozytosewege zur zellulären Aufnahme der Lipid/DNA-Komplexe wird mit Hilfe endozytoseaktiver Substanzen untersucht, die einen der aktiven Endozytosewege möglichst selektiv hemmen oder aktivieren. Durch Koinkubation mit Lipid/DNA-Komplexen kann durch Hemmung oder Steigerung der Komplexaufnahme so der Einfluss des jeweiligen Endozytoseweges analysiert werden (Huth *et al.* 2006).

#### 4.2.4.1 Inkubation mit Endozytose-Inhibitoren

Als Endozytose-Inhibitoren stehen insbesondere Hemmstoffe der Clathrin- und Caveolae-Aufnahme zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden als Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin (Wang *et al.* 1993; Yao *et al.* 2002) und als Caveolae-Inhibitoren Filipin (Orlandi & Fishman 1998) und Genistein (Parton *et al.* 1994) gewählt. Das Cyclodextrin M $\beta$ CD hemmt beide Endozytosewege gleichermaßen (Kilsdonk *et al.* 1995; Rodal *et al.* 1999).

Ein Problem bei der Inkubation mit Inhibitoren ist die Zelltoxizität, die entweder durch die pharmakologische Wirkung der inkubierten Substanz oder die verwendeten Lösungsmittel (z.B. DMSO) verursacht wird (von Gersdorff *et al.* 2006). Da die toxischen Effekte von Inkubationsdauer und Inhibitorkonzentration abhängig sind, wird für diese Versuche die Zellviabilität bei den entsprechenden Versuchsbedingungen überprüft (Abb. 4-35).



#### Abbildung 4-35: Einfluss von Endozytose-Inhibitoren auf die Zellviabilität

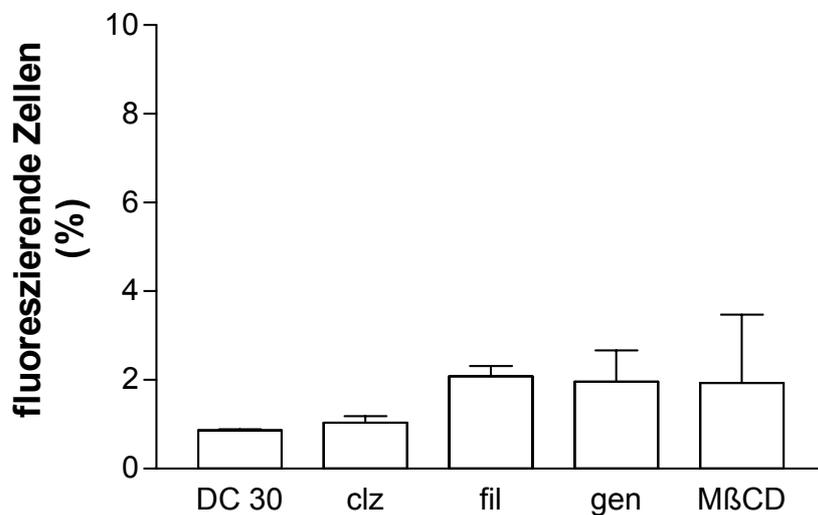
MDCK II Zellen wurden mit den Endozytose-Inhibitoren Chlorpromazin (A), Filipin (C) und Genistein (D) 60 min und M $\beta$ CD (B) 15 min in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Die anschließende Koinkubation mit Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) erfolgte über 5 h und die Messung der Zellviabilität mit Hilfe des Cell Titer-Glo™ Tests. Relative Viabilität bezogen auf die nur mit Lipid/DNA-Komplexen inkubierte Kontrolle (n = 3).

Auf Basis dieser Daten werden folgende Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt:

**Tabelle 4-1: Optimierte Versuchsbedingungen für die Endozytose-Inhibitoren**

Inhibitor	Mechanismus	Präinkubationszeit [min]	Konzentration
Chlorpromazin	Clathrininteraktion	60	28 $\mu$ M
M $\beta$ CD	Einschlusskomplex mit Cholesterol	15	5 mM
Filipin	Caveolinbindung	60	10 $\mu$ g/ml
Genistein	Tyrosinkinasehemmung	60	200 $\mu$ M

Obwohl damit eine Zelltoxizität der inkubierten Substanzen weitgehend ausgeschlossen werden kann, wird die Toxizität der Zellen während dem Versuch zusätzlich anhand eines 7-AAD-Assays bestimmt.



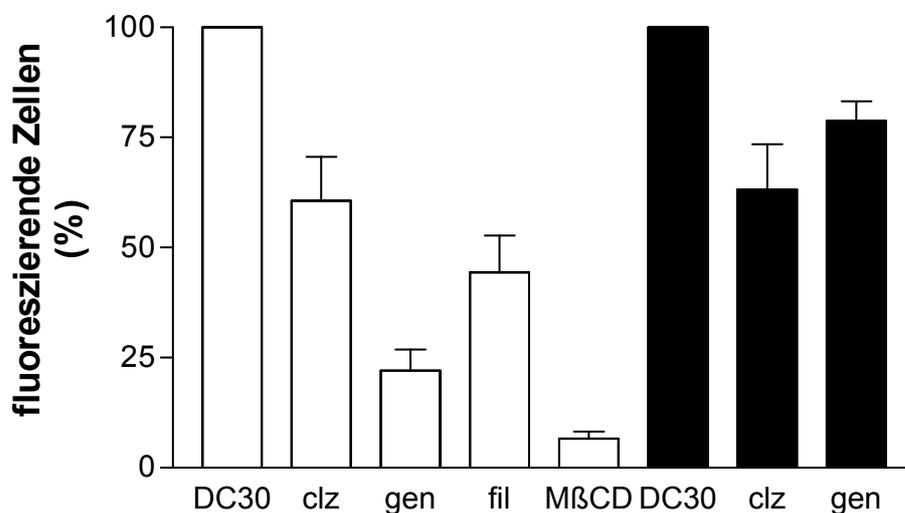
**Abbildung 4-36: Einfluss von Endozytose-Inhibitoren auf die Zelltoxizität**

MDCK II Zellen wurden mit den Endozytoseinhibitoren Chlorpromazin (clz), M $\beta$ CD, Filipin (fil) oder Genistein (gen) und Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) entsprechend Tabelle 4-1 koinkubiert. Die Messung der Zelltoxizität erfolgte durchflusszytometrisch mit 7-AAD (n = 2,  $\pm$  SEM).

Der Anteil toxischer Zellen liegt bei allen Inhibitoren bei < 5 %. Eine Reduktion der Komplexaufnahme ist damit nicht auf toxische, sondern auf pharmakologische Effekte

zurückzuführen. Die Viabilität der Zellen wird analog im A-10 Zellmodell sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Ausführlichere Daten zur Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von Inhibitorkonzentration und Inkubationsdauer finden sich in dem Abschlussbericht des im Rahmen dieser Arbeit betreuten Mitarbeiterpraktikums von Frau Anna Gronert am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Freiburg.

Die Inhibitoren werden nach 3.6.2 vorinkubiert und die Auswirkung auf die Komplexaufnahme durchflusszytometrisch bestimmt. In den Versuchen der A-10 Zelllinie wird die Inhibitorpalette auf die spezifischsten Substanzen reduziert.



#### Abbildung 4-37: Beeinflussung der Aufnahme durch Endozytose-Inhibitoren

Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) in MDCK II (weiße Balken) und A-10 Zellen (schwarze Balken) nach Inkubation mit Chlorpromazin (clz), Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) Genistein (gen) oder Filipin (fil) entsprechend Tabelle 4-1. Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (DC 30) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

Dabei wird sowohl in der MDCK II Zelllinie als auch in der A-10 Zelllinie die Komplexaufnahme durch die Blockade der Clathrin- und der Caveolae-Endozytose gehemmt. Beide Zelllinien nehmen Lipid/DNA-Komplexe bevorzugt über den jeweils aktivsten Endozytoseweg auf, so dass in der Clathrin-dominanten Zelllinie A-10 die Clathrin-Endozytose und in der Caveolae-dominanten Zelllinie MDCK II die Caveolae-Endozytose überwiegt. Eine stärkere Hemmung der Komplexaufnahme ist in diesen Versuchen nicht zu erwarten, da in Kontrollversuchen die Aufnahme von Endozytosemarkern nicht stärker blockiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

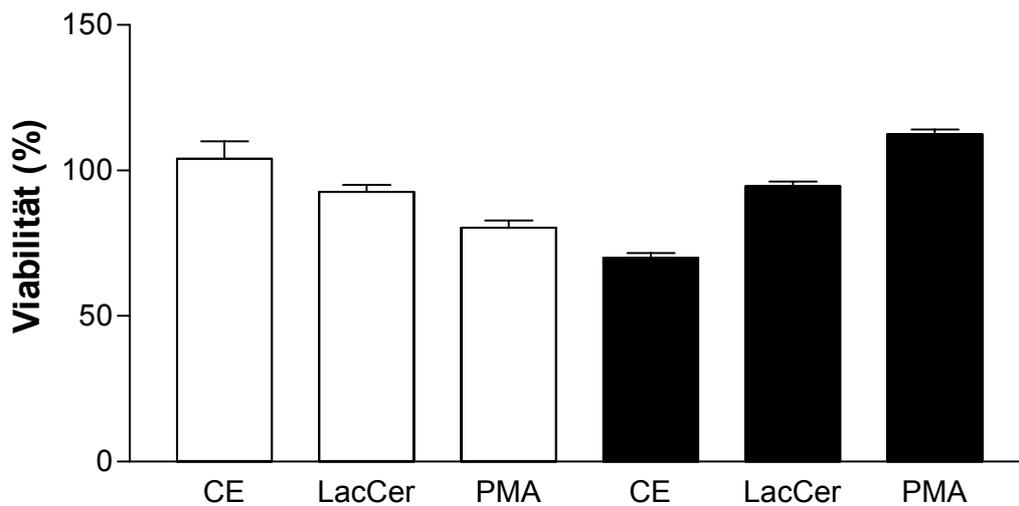
#### 4.2.4.2 Inkubation mit Endozytose-Enhancern

In der vorliegenden Arbeit wird außerdem ein Ansatz verfolgt, der für die Endozytoseforschung im Bereich nanopartikulärer Systeme neu ist: die selektive Aktivierung einzelner Endozytosewege. Ein wesentlicher Vorteil bei der Analyse von Lipid/DNA-Komplexen liegt hierbei in der Steigerung von Aufnahme und Transfektion. Dadurch können Veränderungen niedriger Aufnahme- und Transfektionswerte, wie sie in der MDCK II Zelllinie vorliegen, besser detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Endozytose-Enhancer verwendet: ein Saponingemisch aus *Glypsophila paniculata* L. aus der Forschungsgruppe von Herrn Matthias F. Melzig (Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin) wird als Clathrin-Enhancer inkubiert (Weng *et al.* 2009). Das Glykosphingolipid Lactosylceramid wird selbst über Caveolae-Endozytose internalisiert, gilt darüber hinaus aber auch als Caveolae-Enhancer (Singh *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2004): Lactosylceramid vermittelt das Aufkonzentrieren von  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren an der Plasmamembran und deren Caveolae-vermittelte Endozytose (Sharma *et al.* 2005). Diese membranständigen Proteine dienen als Rezeptoren für viele extrazelluläre Liganden, unter anderem Lipid/DNA-Komplexe (Zuhorn *et al.* 2007b) (vgl. 1.4.1).

Phorbolester wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) steigern über eine Aktivierung der Proteinkinase C die Makropinozytose (Swanson 1989; Smart *et al.* 1994; Aballay *et al.* 1999).

Die Viabilität der Zellen wird analog den Inhibitorversuchen in einer Reihe von Vorversuchen überprüft und beträgt dabei immer > 70 % (Abb. 4-38).



#### Abbildung 4-38: Einfluss von Endozytose-Enhancern auf die Zellviabilität

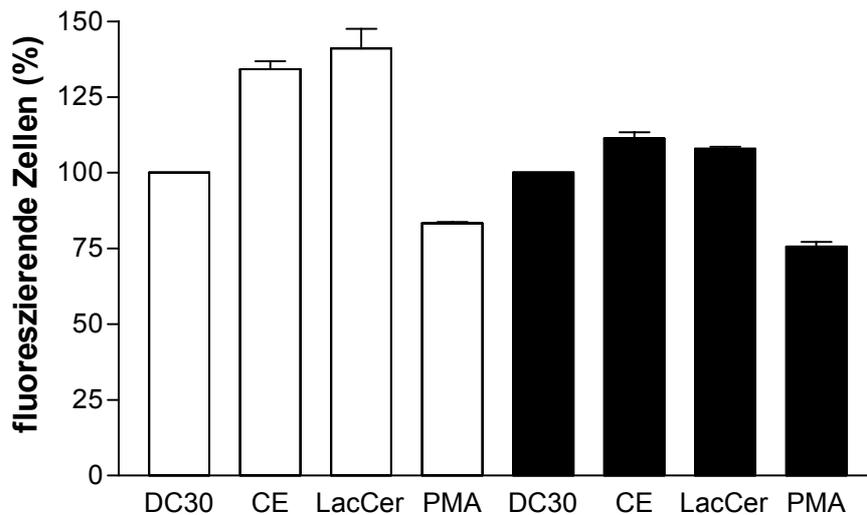
MDCK II (weiße Balken) und A-10 Zellen (schwarze Balken) wurden mit den Endozytose-Enhancern Saponin (CE), Lactosylceramid (LacCer) oder Phorbol ester (PMA) und Lipid/DNA-Komplexen 8/1 (m/m) entsprechend Tabelle 4-2 für 5 h koinkubiert. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des Cell Titer-Glo™ Tests bestimmt. Relative Viabilität bezogen auf die nur mit Lipid/DNA-Komplexen inkubierte Kontrolle (n = 3, ± SEM).

Auf Grundlage dieser Vorversuche werden die Enhancer-Konzentrationen wie folgt festgelegt:

**Tabelle 4-2: Optimierte Versuchsbedingungen für die Endozytose-Enhancer**

Enhancer	Mechanismus	Präinkubationszeit [min]	Konzentration
Clathrin enhancer	Clathrin-vermittelter Ligandentransport am Rezeptor verstärkt	0	10 µg/ml
Lactosylceramid	Selektive Caveolaestimulation	0	4 µg/ml
Phorbol ester	PKC vermittelte Aktivierung der Makropinozytose	0	120 ng/ml

Die Endozytose-Enhancer und Lipid/DNA-Komplexe werden jeweils 5 h koinkubiert und die Veränderung der Komplexaufnahme durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.6.2).



#### Abbildung 4-39: Beeinflussung der Aufnahme durch Endozytose-Enhancer

Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) in MDCK II (weiße Balken) und A-10 Zellen (schwarze Balken) nach Inkubation mit Saponin (CE), Lactosylceramid (LacCer) oder Phorbol ester (PMA) entsprechend Tabelle 4-1. Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (DC 30) (n = 3,  $\pm$  SEM).

Eine Aktivierung von Clathrin- und Caveolae-Endozytose steigert die Aufnahme der Lipid/DNA-Komplexe. Diese Ergebnisse entsprechen den Daten der Inhibitorversuche.

Die Inkubation mit Phorbol ester inhibiert die Komplexaufnahme, so dass die Beteiligung der Makropinozytose ausgeschlossen werden kann. Die Reduktion der Aufnahme kann hier durch die Aktivierung der Proteinkinase C erklärt werden, die gleichzeitig bei der Regulation anderer Endozytosewege (u.a. Caveolae) eingeschaltet ist (Smart *et al.* 1994; Aballay *et al.* 1999).

Die Komplexaufnahme kann in MDCK II Zellen stärker gesteigert werden als in A-10 Zellen.

#### 4.2.5 Diskussion und Ausblick

Die Auswahl der beiden Zellmodelle A-10 und MDCK II basiert auf der unterschiedlichen Transfektionseffizienz lipid-basierten Gentransfers. Der vorliegende Abschnitt erörtert den Einfluss der zellulären Aufnahme auf die Transfizierbarkeit beider Zellmodelle.

Ein Einfluss der zellulären Aufnahme auf die Transfektionseffizienz kann anhand der vorliegenden Versuche bestätigt werden. Die Festlegung der Endozytoseprofile beider Zellmodelle liefert eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Aufnahmeraten beider

Zellmodelle. Es wird deutlich, dass die einzelnen Endozytosewege mit unterschiedlicher Aktivität in beiden Zellmodellen ablaufen. Daher wird untersucht, welche Endozytosewege an der Aufnahme der Lipid/DNA-Komplexe beteiligt sind.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass beide Zelllinien Lipid/DNA-Komplexe über Clathrin- und Caveolae-Endozytose aufnehmen. Dies entspricht den Angaben der Literatur (Zuhorn *et al.* 2002; Rejman *et al.* 2005; Wong *et al.* 2007). Das Clathrin-dominante Zellmodell A-10 internalisiert die Komplexe hierbei verstärkt über Clathrin-Endozytose, während das Caveolae-dominante Zellmodell MDCK II die Caveolae-Endozytose bevorzugt. Da die Komplexe von dem Clathrin-dominanten Zellmodell A-10 deutlich stärker internalisiert werden, kann eine Präferenz der Komplexe zu diesem Endozytoseweg unterstellt werden. Die in Abschnitt 4.1 ermittelte Größenverteilung der Komplexe beinhaltet Komplexgrößen, die zur Größenpräferenz beider Endozytosewege passen (Rejman *et al.* 2004). In diesem Zusammenhang ist der Ausschluss der Makropinozytose in beiden Zellmodellen jedoch erstaunlich.

Für die Analysen dieser Versuchsreihe werden Endozytose-Inhibitor und Endozytose-Enhancer Experimente durchgeführt. Die Anwendung von Endozytose-Enhancern ist in diesem Zusammenhang in der Literatur nicht beschrieben und eine kritische Diskussion dieser Methode wird daher bisher nicht geführt. Im Gegensatz dazu werden Inhibitor-Versuche zur Analyse der endozytotischen Aufnahme nanopartikulärer Systeme häufig durchgeführt (Zuhorn *et al.* 2002; Rejman *et al.* 2005; Huth *et al.* 2006; von Gersdorff *et al.* 2006; Foerg *et al.* 2007; van der Aa *et al.* 2007; Wong *et al.* 2007). Einige Probleme dieser Methode sind daher inzwischen offensichtlich:

1. Die Spezifität der eingesetzten Inhibitoren für einen Endozytoseweg ist selten gewährleistet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Inhibitoren mit der höchsten Spezifität eingesetzt. So gilt Chlorpromazin als Clathrin-Inhibitor, der keinen Einfluss auf die Caveolae-Endozytose besitzt (Ivanov 2008). Die für einige Zellen des Immunsystems beschriebene zusätzliche Beeinflussung der Phagozytose kann in den Versuchen dieser Arbeit vernachlässigt werden, da Phagozytose in Nierenepithelzellen (MDCK II) und glatten Muskelzellen (A-10) keine Rolle spielt (Khalil *et al.* 2006). Die Spezifität des Caveolae-Inhibitors Filipin wird kritisch betrachtet, da eine Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen wurde (Harder *et al.* 1997; Ivanov 2008). Daher wird mit Genistein ein zusätzlicher Inhibitor der Caveolae-Endozytose verwendet. Die über Genistein vermittelte

Tyrosinkinase-Hemmung beeinflusst jedoch auch die Makropinozytose (Mercer & Helenius 2008).

2. Das Konzentrationsfenster zwischen spezifischer pharmakologischer Wirkung der Substanzen und einer unspezifischen Toxizität ist häufig gering (von Gersdorff *et al.* 2006). Daher wird in der vorliegenden Arbeit die Viabilität der Zellen für jede eingesetzte Inhibitor-Konzentration bestimmt.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Inhibitor-Versuche nach Möglichkeit optimiert wurden, sind die Spezifität der pharmakologischen Wirkung und damit die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse dieser Versuche im folgenden Abschnitt mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden abgesichert. Ein weiterer interessanter Ansatz für nachfolgende Arbeiten ist außerdem die Anwendung spezifischer molekularbiologischer Methoden (*knock down-Zellmodelle, Dominant-negative-Zellmutanten*), mit denen Proteine der Endozytose gezielt ausgeschaltet oder hoch reguliert werden können (Choudhury *et al.* 2006; Wong *et al.* 2007).

Der Vergleich eines effizient transfizierten Zellmodells mit einem ineffizient transfizierten Zellmodell deutet desweiteren darauf hin, dass die zelllinienabhängige Aufnahme der Komplexe die zelllinienabhängige Transfektion der Komplexe nicht hinreichend erklären kann. Neben der Absicherung der Inhibitor- und Enhancer-Versuche wird im folgenden Abschnitt daher die intrazelluläre Prozessierung der Komplexe in beiden Zellmodellen näher betrachtet. Wie bereits erwähnt, steuern die verschiedenen Endozytosewege unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente an („intrazelluläre Prozessierung“) (Benmerah & Lamaze 2007; Mayor & Pagano 2007; Sandvig *et al.* 2008) (vgl. 1.4.2). Die Clathrin-Fraktion der Lipid/DNA-Komplexe könnte daher zu anderen Kompartimenten transportiert werden als die Caveolae-Fraktion. Da auf diese Weise Zielkompartimente, in denen Komplexe intrazellulär abgebaut werden (z.B. Lysosomen), je nach Endozytoseweg angesteuert oder umschifft werden können, stellt dies eine weitere zelllinienabhängige Transfektionsbarriere dar (Zabner *et al.* 1995; Khalil *et al.* 2006). Die unterschiedlichen Endozytoseprofile beider Zellmodelle könnten daher nicht nur Grund für die unterschiedliche Aufnahme der Komplexe sein, sondern auch eine unterschiedlich effiziente intrazelluläre Prozessierung bedingen.

## 4.3 Zelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen

In den Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen (vgl. 4.2) konnte gezeigt werden, dass Lipid/DNA-Komplexe in den Zellmodellen A-10 und MDCK II über Clathrin- und Caveolae-Endozytose aufgenommen werden. Die Endozytoseaktivitäten beider Wege sind im jeweiligen Zellmodell unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies erklärt die unterschiedlich starke Aufnahme der Komplexe in beiden Zellmodellen. Die Analyse der Komplexendozytose mit Hilfe endozytoseaktiver Substanzen (vgl. 4.2.4) ist in ihrer Aussagekraft jedoch beschränkt (Ivanov 2008). Daher werden die Ergebnisse des Abschnitts 4.2 mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden überprüft.

Anschließend werden diese Arbeiten mit der Untersuchung der intrazellulären Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen entlang der beiden aktiven Endozytosewege fortgeführt. Dabei wird insbesondere die Beteiligung lysosomaler Abbaukompartimente geprüft (vgl. 1.4.2.1).

Wie in Abschnitt 4.2 wird die Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen in zwei Zellmodellen untersucht. Da in den Zellmodellen A-10 und MDCK II Clathrin- und Caveolae-Endozytose unterschiedlich stark aktiv sind (vgl. 4.2.3), könnte die Prozessierung in lysosomale Abbaukompartimente mit unterschiedlicher Aktivität ablaufen und so zur unterschiedlichen Transfektion der Zellmodelle beitragen.

Die Herstellung von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) erfolgt gemäß dem Standardprotokoll 3.3.1 und die zelluläre Prozessierung der Komplexe wird mit durchflusszytometrischen Inhibitor- und Enhancer-Versuchen sowie mit fluoreszenzmikroskopischen Kollokalisationsstudien gemäß 3.6.2, 3.7 und 3.8 untersucht.

### 4.3.1 Zelluläre Prozessierung von Endozytosemarkern und Lipid/DNA-Komplexen

In einer ersten Versuchsreihe wird die zelluläre Prozessierung der Lipid/DNA-Komplexe mit den zellulären Prozessierungen von Endozytosemarkern verglichen. Endozytosemarker sind Substanzen, deren zelluläre Prozessierungen über Endozytose verlaufen und in der Literatur detailliert beschrieben sind. Dafür werden fluoreszenzgefärbte Endozytosemarker der Clathrin-, der Caveolae-Endozytose und der Makropinozytose 5 h mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen koinkubiert (siehe 3.7.1). Die Komplexe werden nach 3.3.1 hergestellt und besitzen ein Massenverhältnis (Lipid/DNA)

von 8/1. Bei Kolokalisation beider Farbstoffe liegen Endozytosemarker und Komplexe in gleichen Endozytosekompartimenten vor. Dies deutet auf die Beteiligung des gleichen Endozytoseweges hin.

Alle Kolokalisationsstudien werden mittels *Spectral Bio-Imaging* und konfokaler Mikroskopie analysiert (siehe 3.7.1 und 3.8.1).

#### **4.3.1.1 Transferrin**

Das Glykoprotein Transferrin bindet Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und transportiert dieses in die Zellen. Nach Bindung an den Transferrin-Rezeptor an der Plasmamembran wird Transferrin mit dem gebundenen Eisen über Clathrin-Endozytose in die Zellen aufgenommen (Karin & Mintz 1981; Pelkmans *et al.* 2001). Die intrazelluläre Eisenabgabe aus dem Transferrin/Transferrin-Rezeptor/Eisen-Komplex wird durch die pH-Absenkung in frühen Endosomen stimuliert. Transferrin und sein Rezeptor werden anschließend über Recycling-Endosomen zurück an die Plasmamembran transportiert.

Da die zelluläre Prozessierung von Transferrin bekannt ist, wird Transferrin als etablierter Marker der Clathrin-Endozytose eingesetzt (Zuhorn *et al.* 2002; Huth *et al.* 2006; Foerg *et al.* 2007; van der Aa *et al.* 2007). Eine intrazelluläre Kolokalisation einer inkubierten Probe mit Transferrin ist somit ein Beweis für eine Beteiligung der Clathrin-Endozytose.

Fluoreszenzmarkierte Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden mit fluoreszenzmarkiertem Transferrin 5 h in MDCK II Zellen koinkubiert und mittels *Spectral Bio-Imaging* (Daten nicht gezeigt) und konfokaler Mikroskopie auf Kolokalisation geprüft.

Die Kolokalisation beider Farbstoffe (Abb. 4-40 A) beweist die Beteiligung der Clathrin-Endozytose an der intrazellulären Prozessierung von Lipid/Cy3-DNA-Komplexe und bestätigt damit die Ergebnisse der Aufnahme-Versuche (vgl. 4.2.4).

#### **4.3.1.2 Cholera-Toxin (Untereinheit B)**

Die zelluläre Aufnahme und damit Infektion der Zelle dieses aus dem Bakterium *Vibrio cholera* stammenden Toxins erfolgt über Caveolae-Endozytose. Cholera-Toxin besteht aus 5 identischen B-Untereinheiten und einer einzelnen A-Kette. Die B-Untereinheit bindet spezifisch an das Glykosphingolipid  $\text{G}_{\text{M}1}$  der Plasmamembran, einem Bestandteil der Caveolae-Strukturen und gewährleistet den intrazellulären Transport zum Endoplasmatischen Retikulum (Chinnapen *et al.* 2007). Erst hier erfolgt die Abspaltung der

A-Kette, die anschließend in das Zytoplasma freigesetzt wird und dort die toxische Wirkung über eine Erhöhung der cAMP-Spiegel verursacht.

Die B-Untereinheit des Cholera-Toxins wird daher als Marker der Caveolae-Endozytose herangezogen, dessen Spezifität allerdings kritisch betrachtet wird (Torgersen *et al.* 2001; Singh *et al.* 2003). So konnte gezeigt werden, dass die Endozytose von Cholera-Toxin je nach Caveolin-1 Expression der Zellen über Caveolae oder Clathrin ablaufen kann (Torgersen *et al.* 2001).

Fluoreszenzmarkierte Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden mit fluoreszenzmarkiertem Cholera-Toxin (B-Untereinheit) 5 h in MDCK II Zellen kokubiert und die Kolokalisation mittels *Spectral Bio-Imaging* (Daten nicht gezeigt) und konfokaler Mikroskopie geprüft.

Die Kolokalisation beider Farbstoffe (Abb. 4-40 C) beweist die Caveolae-Endozytose der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe und bestätigt damit die Aufnahme-Versuche (vgl. 4.2.4).

#### 4.3.1.3 Lactosylceramid

Glykosphingolipide sind Bestandteile der zellulären Plasmamembran, wo sie im Verbund mit Cholesterol die *lipid rafts* der Plasmamembran ausbilden. *Lipid rafts* bieten den Proteinen der Plasmamembran ein spezielles Umfeld, das diese Membranregionen als Andock- und Interaktionsplattformen mit extrazellulären Substanzen qualifiziert (vgl. 1.4.2.2). So sind sie unter anderem an der Aktivierung Clathrin-unabhängiger Endozytosewege beteiligt. Caveolae sind eine Caveolin-1-reiche Untergruppe der *lipid rafts* (Carver & Schnitzer 2003; Nichols 2003; Parton & Simons 2007).

Lactosylceramid ist ein Glykosphingolipid, das sich nach zellulärer Inkubation in den *lipid rafts* der Plasmamembran anreichert und anschließend Caveolae-vermittelt endozytiert wird (Puri *et al.* 2001).

In Abbildung 4-40 B kolokalisieren fluoreszenzmarkiertes Lactosylceramid und Lipid/Cy3-DNA-Komplexe nach 5 h Inkubation in MDCK II Zellen. Dies belegt die Beteiligung der Caveolae-Endozytose an der intrazellulären Prozessierung der Komplexe in diesem Zellmodell.

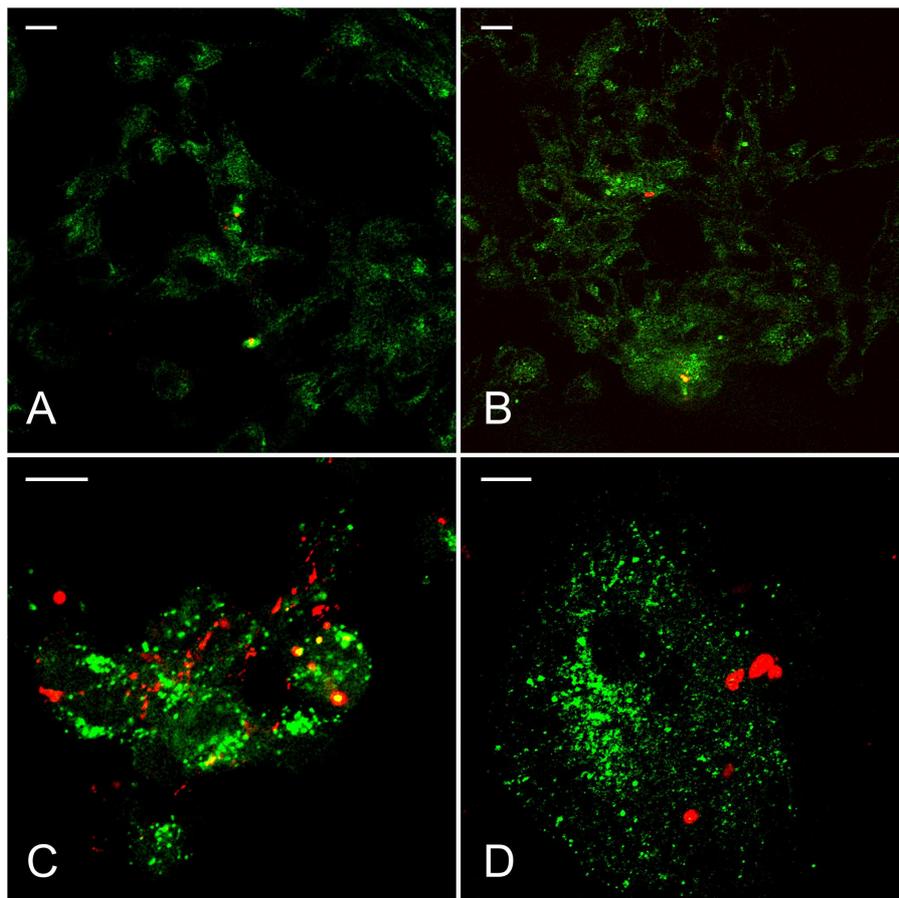
#### 4.3.1.4 Dextran

Gelöstes hochmolekulares Dextran ( $M_r$  40 000) wird von Zellen über Makropinozytose aufgenommen (Huth *et al.* 2006; Mercer & Helenius 2008). Fluoreszenzmarkiertes Dextran kolokalisiert mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen nach 5 h Inkubation in MDCK II Zellen nicht

(Abb. 4-40 D). Eine Beteiligung der Makropinozytose an der intrazellulären Prozessierung der Komplexe kann daher ausgeschlossen werden.

Bei der Verwendung fluoreszenzmarkierten Dextrans für Kollokalisationsstudien ist Folgendes zu beachten:

Die Fixierung des Dextrans für die fluoreszenzmikroskopische Analyse bedarf eines Farbstoffkonjugates, das zusätzlich mit Aminosäuren modifiziert und damit fixierbar ist. Die zum Zeitpunkt dieser Arbeit auf dem Markt befindlichen fixierbaren Dextrane (u.a. Texas-Red, Lucifer Yellow, FITC) sind jedoch negativ geladen und damit für eine Kollokalisationsstudie mit positiv geladenen Lipid/Cy3-DNA-Komplexen unbrauchbar. In den Versuchen dieser Arbeit wird daher FITC-Dextran verwendet, das keine derartige Modifikation enthält. Wie den Fluoreszenzbildern zu entnehmen, wird FITC-Dextran bei der Probenaufarbeitung trotz fehlender Fixierung jedoch nicht ausgewaschen (siehe 3.7.1). Dies lässt sich durch den Einschluss des Dextrans in endosomale Vesikel erklären.



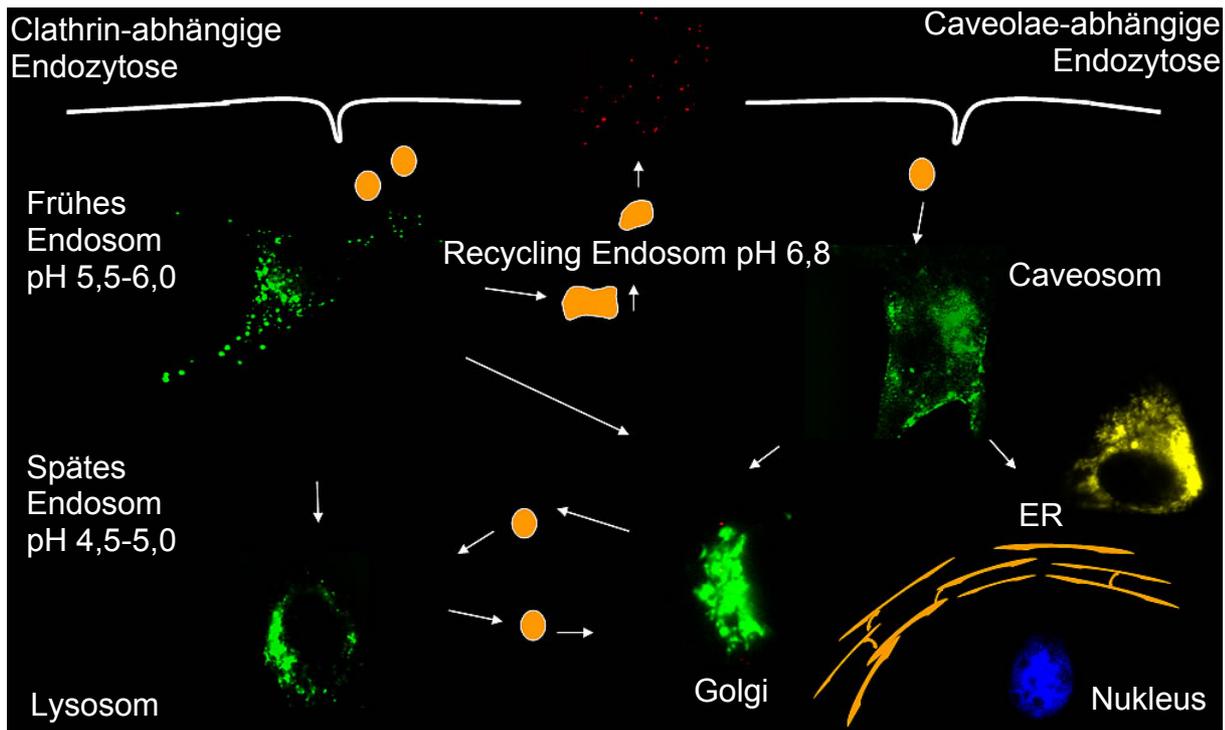
**Abbildung 4-40: Lipid/DNA-Komplexe und Endozytosemarker**

MDCK II Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) und Transferrin-AlexaFluor<sup>®</sup>488 (A), Bodipy<sup>®</sup>Lactosylceramid (B), Cholera-Toxin-AlexaFluor<sup>®</sup>488 (C) oder FITC-Dextran (D) 5 h inkubiert. Konfokale Mikroskopie. Größenmaßstab = 10 µm.

Der Vergleich der zellulären Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen und Endozytosemarkern bestätigt die Ergebnisse der Aufnahmeversuche aus 4.2: die Komplexe werden über Clathrin- und Caveolae-Endozytose aufgenommen und anschließend über beide Wege intrazellulär prozessiert. Wie das Beispiel Cholera-Toxin, das lange Zeit als spezifischer Caveolae-Marker angesehen wurde, zeigt, ist die Spezifität dieser Marker und damit die Aussagekraft der Ergebnisse beschränkt. Der Vergleich der Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen und Endozytosemarkern wird daher nur in der MDCK II Zelllinie durchgeführt. Für eine eindeutige Aufklärung der zellulären Prozessierung, insbesondere der lysosomalen Degradation, ist die direkte Kollokalisierung von Komplexen und Endozytosekompartimenten notwendig, die in weiteren Versuchsreihen in beiden Zellmodellen untersucht wird.

#### **4.3.2 Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen zu zellulären Kompartimenten**

Die exakte Aufnahme und Prozessierung nanopartikulärer Systeme lässt sich erst durch Kollokalisationsstudien mit den Zielkompartimenten der verschiedenen Endozytosewege feststellen. Daher werden in einer weiteren Versuchsreihe alle Zielkompartimente der nach 4.2 und 4.3.1 fokussierten Endozytosewege, Clathrin und Caveolae, mit Fluoreszenzfarbstoffen nach 3.7.2 und 3.7.4 angefärbt: frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen für die Clathrin-Endozytose, sowie Caveolae-Strukturen der Plasmamembran, Caveolin-1-haltige Endosomen, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum für die Caveolae-Endozytose.



**Abbildung 4-41: Fluoreszenzfärbungen der Endozytosekompartimente**

Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden anschließend nach 3.3.1 in einem Massenverhältnis von 8/1 (Lipid/DNA) hergestellt und nach 3.7.2 inkubiert. Die Kolokalisationsstudien fluoreszenzgefärbter Lipid/Cy3-DNA-Komplexe mit den jeweiligen Kompartimenten ermöglichen anschließend die Kartographie der Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen.

#### 4.3.2.1 Kolokalisation mit frühen Endosomen der Clathrin-Endozytose

Frühe Endosomen entstehen nach dem Abschnüren der *clathrin coated pits* von der Plasmamembran (Gruenberg 2001; Le Roy & Wrana 2005) (vgl. 1.4.2.1). Um die Kolokalisation mit Lipid/DNA-Komplexen zu prüfen, wird das Membranprotein EEA1 früher Endosomen mittels Immunofluoreszenz angefärbt (Mu *et al.* 1995). In beiden Zelllinien können so Kolokalisationen mit frühen Endosomen detektiert werden.

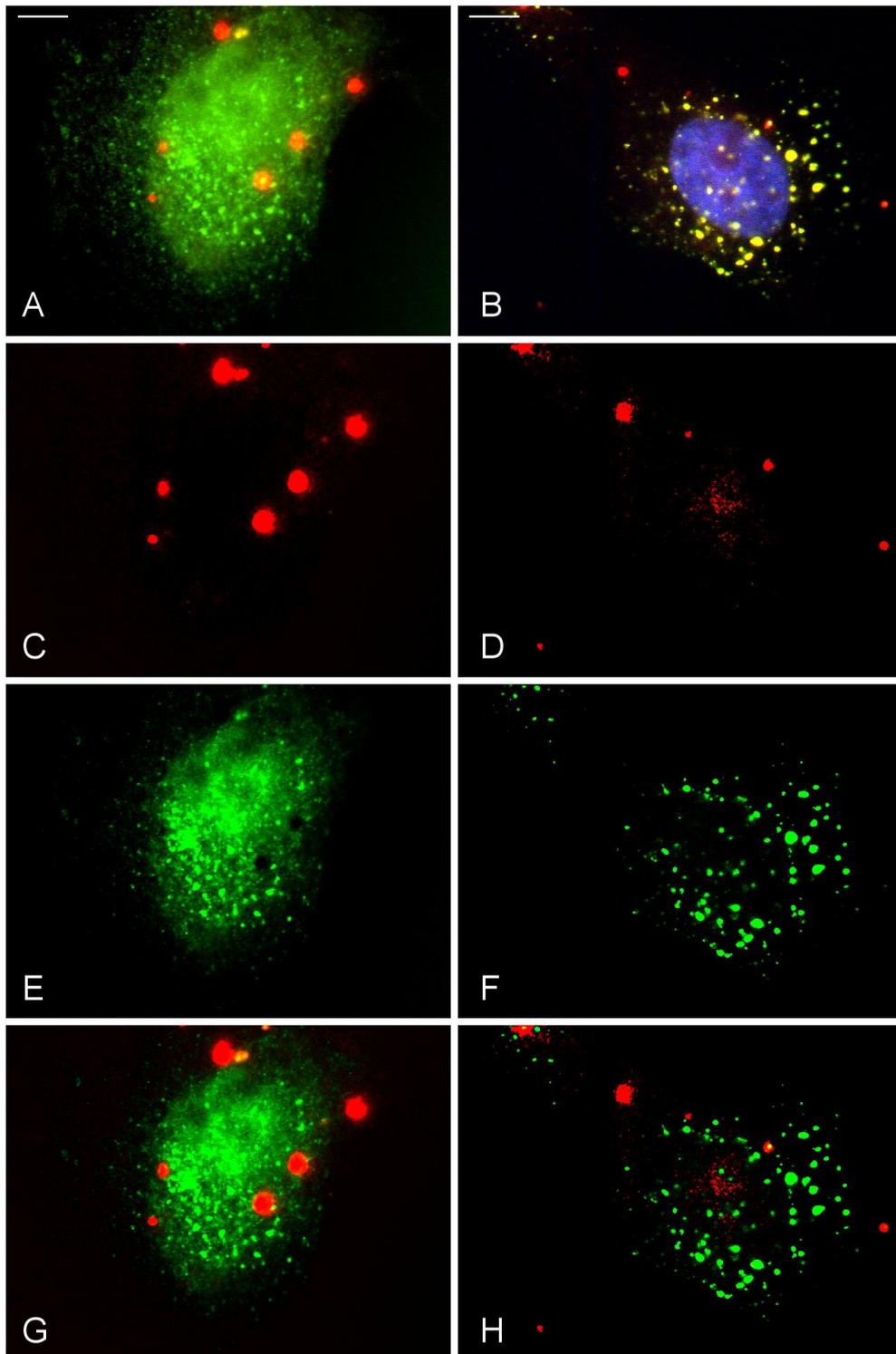
In Abbildung 4-42 ist die vollständige spektrale Auftrennung mittels *Spectral Bio-Imaging* dargestellt (vgl. 1.4.4.3). Zunächst wird mit dem SpectraCube™ das Originalbild aufgenommen (Abb. 4-42 A,B). Diese Bilder werden mit Hilfe der *Spectral Imaging* Software über einen integrierten *unmixing*-Algorithmus (SUN-Algorithmus) spektral aufgelöst (Abb. 4-42 C-F). Für die Kolokalisationsanalyse werden diese Einzelbilder mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ wieder übereinander gelegt (Abb. 4-42 G,H). Bei der Kolokalisationsanalyse mittels *Spectral Bio-Imaging* handelt es sich um eine

---

etablierte Methode (Huth *et al.* 2004; Huth 2005; Huth *et al.* 2006; van der Aa *et al.* 2007). Daher wird in den folgenden Kolokalisationsstudien auf die Darstellung der kompletten Datenreihen verzichtet und ausschließlich das zur Kolokalisationsanalyse verwendete Endformat (Abb. 4-42 G,H) wiedergegeben.

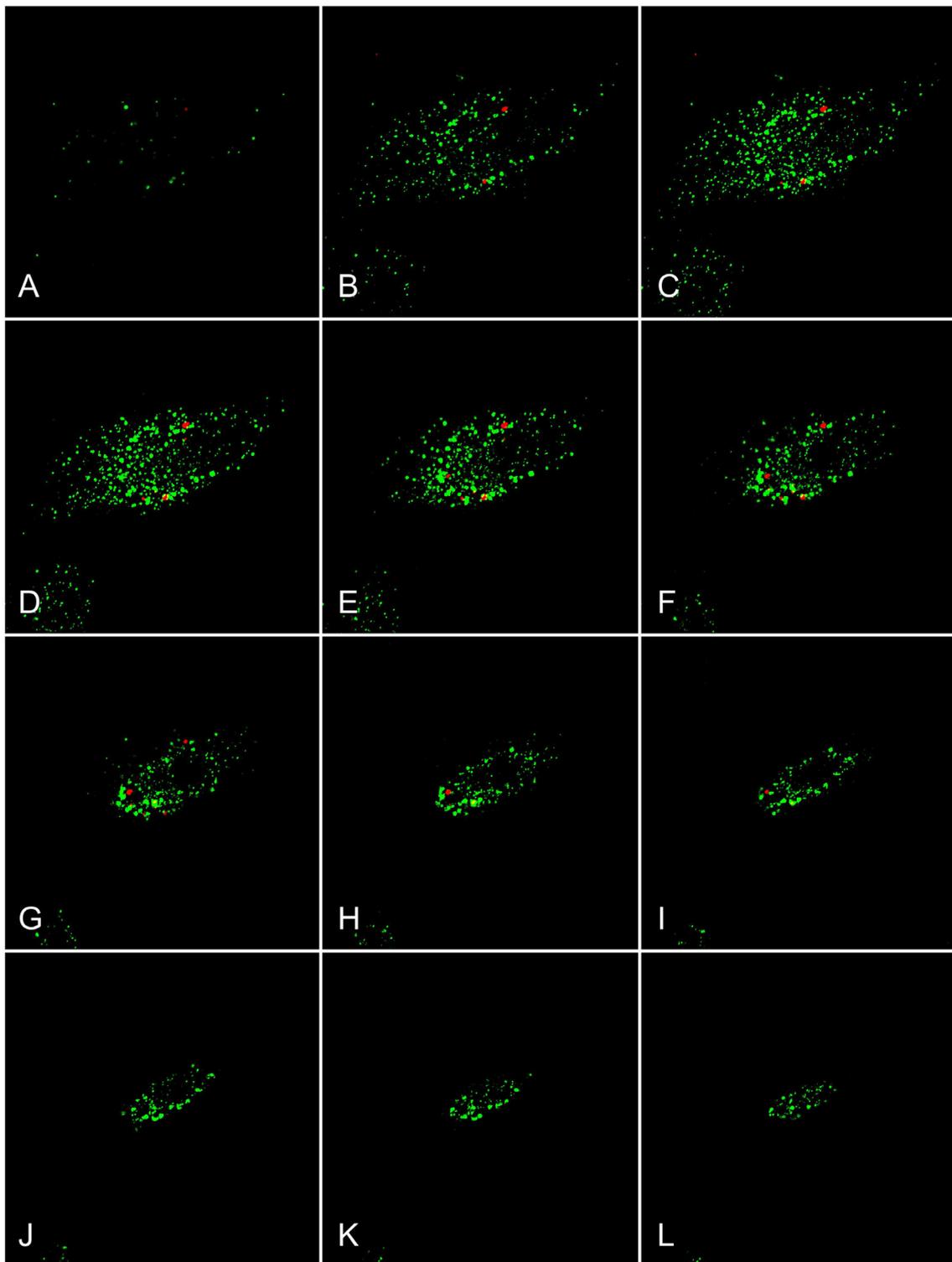
In der Zelllinie A-10 befinden sich Lipid/Cy3-DNA-Komplexe in früh-endosomalen Kompartimenten bereits nach 1 h Inkubation, in MDCK II Zellen tritt eine deutliche Kolokalisation erst nach längerer Inkubationszeiten auf (5 h). Diese zeitliche Verzögerung entspricht den Aufnahmekinetiken des MDCK II Zellmodells in 4.2.2.3.

Bei der Durchführung dieser Kolokalisationsstudie ist Folgendes zu beachten: frühe Endosomen sind die kleinsten Endozytosevesikel der Zelle und fusionieren oder wachsen in relativ kurzer Zeit zu größeren Endosomen (Karin & Mintz 1981; Gruenberg 2001; Spang 2009). Die konfokale Mikroskopie ermöglicht die Auflösung dieser kleinen Strukturen in einer hohen räumlichen Auflösung (Minsky 1961). Durch die Beschränkung auf eine Schnittebene der Probe befinden sich allerdings nur sehr wenige Endosomen und Komplexe im Fokus. Dies kann durch die Analyse mehrerer Schnittebenen (*z-stack*) verbessert werden (Abb 4-43). Die *z-stack* Analyse dieser Versuche bestätigt die Kolokalisation von Lipid/DNA-Komplexen und frühen Endosomen.



**Abbildung 4-42: Lipid/DNA-Komplexe und frühe Endosomen**

A-10 (A,C,E,G) und MDCK II (B,D,F,H) Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 1 bzw. 5 h inkubiert. Frühe Endosomen wurden mit einem primären EEA1 Antikörper detektiert. *Spectral Bio-imaging*. A,B: Originalbild. Spektral aufgelöste Einzel- farbdarstellungen von Lipid/Cy3-DNA-Komplex (C,D) und EEA1 (E,F). G,H: Überlagerung der Einzel- farbdarstellungen. Größenmaßstab = 10  $\mu$ m.



**Abbildung 4-43: Lipid/DNA-Komplexe und frühe Endosomen**

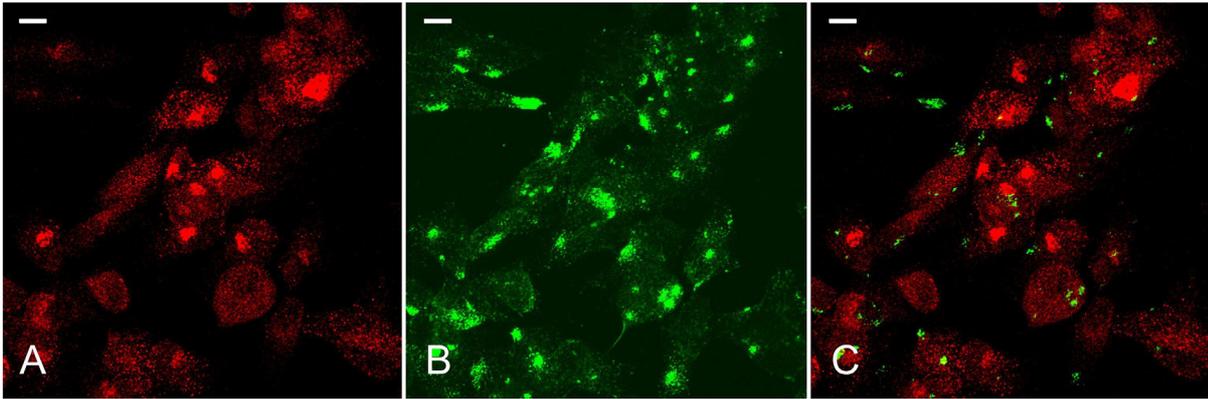
MDCK II Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 5 h inkubiert. Frühe Endosomen wurden mit einem primären EEA1 Antikörper detektiert. Konfokale Mikroskopie. Bildgalerie (A-L) verschiedener Horizontalschnitte in 350 nm Abständen (*z-stacks*) einer Zelle. Überlagerung der Einzelkanäle. Größenmaßstab = 10  $\mu$ m.

#### 4.3.2.2 Kolokalisation mit Endosomen der Caveolae-Endozytose

Caveolae sind Sonderformen der *lipid rafts*, sphingolipid- und cholesterolreicher Plattformen der Plasmamembran, die das Protein Caveolin-1 enthalten (Yamada 1955; Parton & Simons 2007). Caveolin-1-haltige Endosomen werden nach Abschnüren der Caveolae von der Plasmamembran angesteuert (Pelkmans *et al.* 2001; Carver & Schnitzer 2003; Nichols 2003). Pelkmans beschreibt in seinen Studien zur Endozytose des Virus SV 40 als Erster die Existenz dieser Endosomen, die er als Caveosomen bezeichnet (Pelkmans *et al.* 2001). Caveosomen unterscheiden sich von frühen Endosomen durch einen neutralen pH-Wert und die Abwesenheit früh-endosomaler Marker wie EEA1 (vgl. 1.4.2.2).

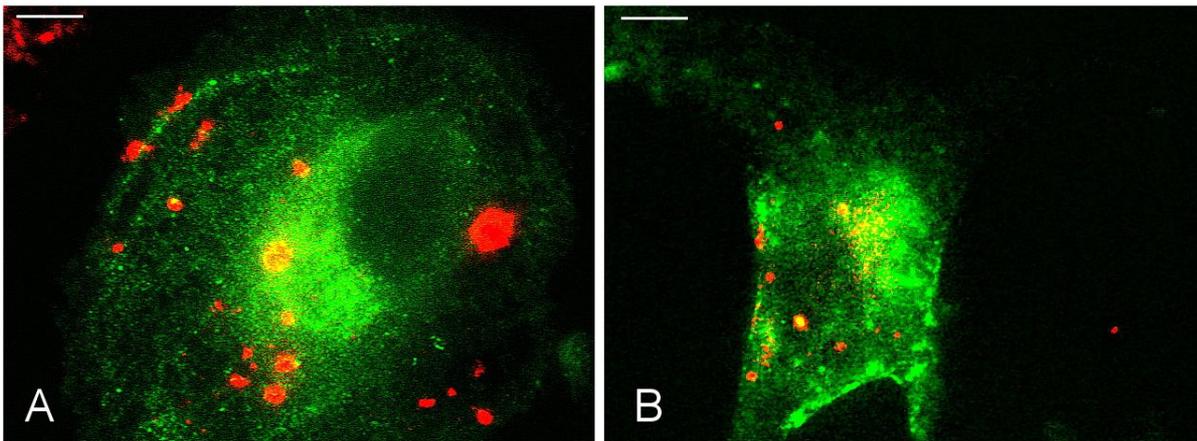
Alle Caveolin-1-haltigen Kompartimente der Zelle (u.a. ER, Golgi-Apparat, Caveosomen) können mit Caveolin-1 Antikörpern mittels Immunofluoreszenz angefärbt werden (Bush *et al.* 2006). Bush beschreibt darüber hinaus eine Möglichkeit, diese verschiedenen Kompartimente zu unterscheiden: Caveolin-1 präsentiert in Golgi-Apparat und Plasmamembran, möglicherweise aber auch in weiteren Kompartimenten, unterschiedliche Antigenstrukturen (Dupree *et al.* 1993; Scherer *et al.* 1995; Scheiffele *et al.* 1998; Luetterforst *et al.* 1999; Pol *et al.* 2005; Bush *et al.* 2006). Die Exposition des Caveolin-1 Epitops ist außerdem von den verwendeten Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen abhängig (Bush *et al.* 2006). Auf diese Weise ist es möglich, Caveolin-1 der Plasmamembran und der endosomalen Vesikel von Caveolin-1 des Golgi-Apparats mit verschiedenen Caveolin-1 Antikörpern unter definierten Permeabilisierungs- und Fixierungsbedingungen zu unterscheiden.

Diesen Arbeiten entsprechend werden die Caveolin-1-Pools der Plasmamembran und der endosomalen Vesikel von denen des Golgi-Apparats getrennt angefärbt. In Abbildung 4-44 ist zu erkennen, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen verschiedene Caveolin-1-haltige Kompartimente angefärbt werden können. Die Anfärbung des Golgi-Apparats detektiert dabei allerdings nicht ausschließlich den Caveolin-1-Pool des Golgi-Apparats sondern auch einige endosomale Vesikel.



#### Abbildung 4-44: Caveolin-1 Kompartimente der Zellen

Verschiedene Caveolin-1 Pools der MDCK II Zellen wurden angefärbt. Konfokale Mikroskopie. A: Einzelkanalbild von Caveolin-1 des Golgi-Apparats und endosomaler Vesikel mit Mouse anti-Caveolin-1 IgG1 Antikörper nach Saponin-Permeabilisierung. B: Einzelkanalbild von Caveolin-1 der Plasmamembran und endosomaler Vesikel mit Mouse anti-Caveolin-1 IgM und Triton X-100 Permeabilisierung. C: Überlagerung der Einzelkanäle. Größenmaßstab = 10 µm.



#### Abbildung 4-45: Lipid/DNA-Komplexe und Caveolin-1 der Plasmamembran und der endosomalen Vesikel

A-10 (A) und MDCK II (B) Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 5 h inkubiert. Caveolin-1 der Plasmamembran und endosomaler Vesikel wurden mit Mouse anti-Caveolin-1 IgM nach Triton X-100 Permeabilisierung detektiert.

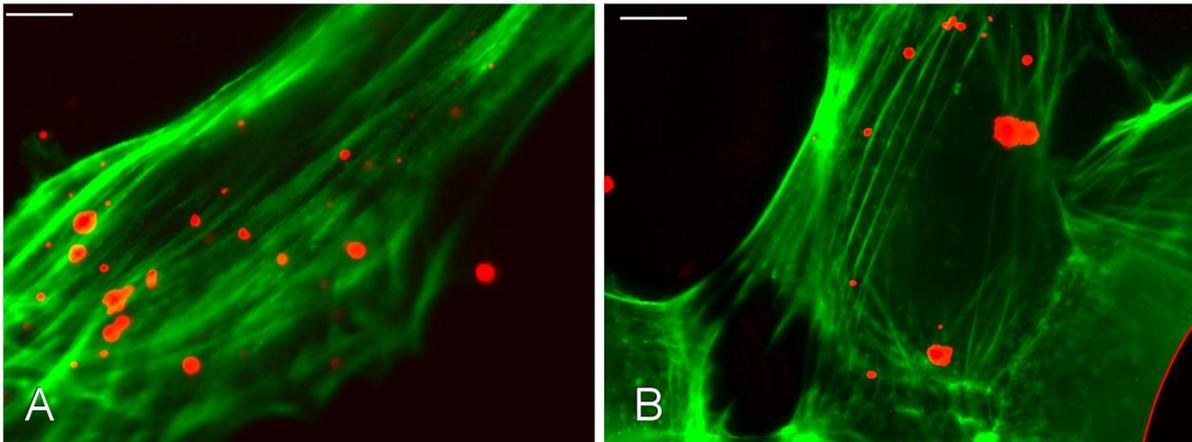
*Spectral Bio-imaging*. A,B: Überlagerung der spektral aufgelösten Einzelfarbdarstellungen. Größenmaßstab = 10 µm.

In einer ersten Versuchsreihe wird die Kollokalisierung der Komplexe mit dem Caveolin-1-Pool der Plasmamembran und der endosomalen Vesikel untersucht.

Lipid/Cy3-DNA-Komplexe kollokalisieren in beiden Zelllinien mit den so angefärbten Caveolin-1 Pools der Plasmamembran und der endosomalen Vesikel nach 5 h Inkubationszeit.

#### 4.3.2.3 Kolokalisation mit Aktin

Das Abschnüren der Endozytosevesikel von der Plasmamembran und der anschließende Transport durch das Zytoplasma wird nach heutigem Kenntnisstand bei allen Endozytosewegen über das Aktin-Zytoskelett vermittelt (Lanzetti 2007; Sandvig *et al.* 2008). Daher wird die Kolokalisation der Lipid/Cy3-DNA-Komplexe mit dem Aktin-Zytoskelett geprüft.



**Abbildung 4-46: Lipid/DNA-Komplexe und Aktinfilamente**

A-10 (A) und MDCK II (B) Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 1 h inkubiert. Aktinfilamente wurden mit Phalloidin detektiert. *Spectral Bio-imaging*. A,B: Überlagerung der spektral aufgelösten Einzelfarbdarstellungen. Größenmaßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

Das Aktin-Zytoskelett wird mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, einem Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), angefärbt. Phalloidin bindet mit hoher Affinität an Aktinfilamente (F-Aktin) (Hoffmeister & Bechthold 2005). In beiden Zelllinien kolokalisieren Lipid/Cy3-DNA-Komplexe nach 1 h Inkubation mit dem Aktin-Zytoskelett. Dies ist ein weiterer Beweis für die endozytotische Prozessierung der Komplexe in beiden Zellmodellen.

#### 4.3.2.4 Kolokalisation mit Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum

Der Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum sind weitere intrazelluläre Kompartimente, die als Zielort Clathrin- und Caveolae-vermittelter Endozytose beschrieben sind (Tarrago-Trani & Storrie 2007). Für Clathrin-Endozytose ist die Prozessierung von späten Endosomen zum Golgi-Apparat für Shiga-Toxin, Ricin und Cholera-Toxin beschrieben (Sandvig & van Deurs 2005; Tarrago-Trani & Storrie 2007). Bei Caveolae-vermittelter Endozytose gibt es eine Reihe von Beispielen, in denen beide

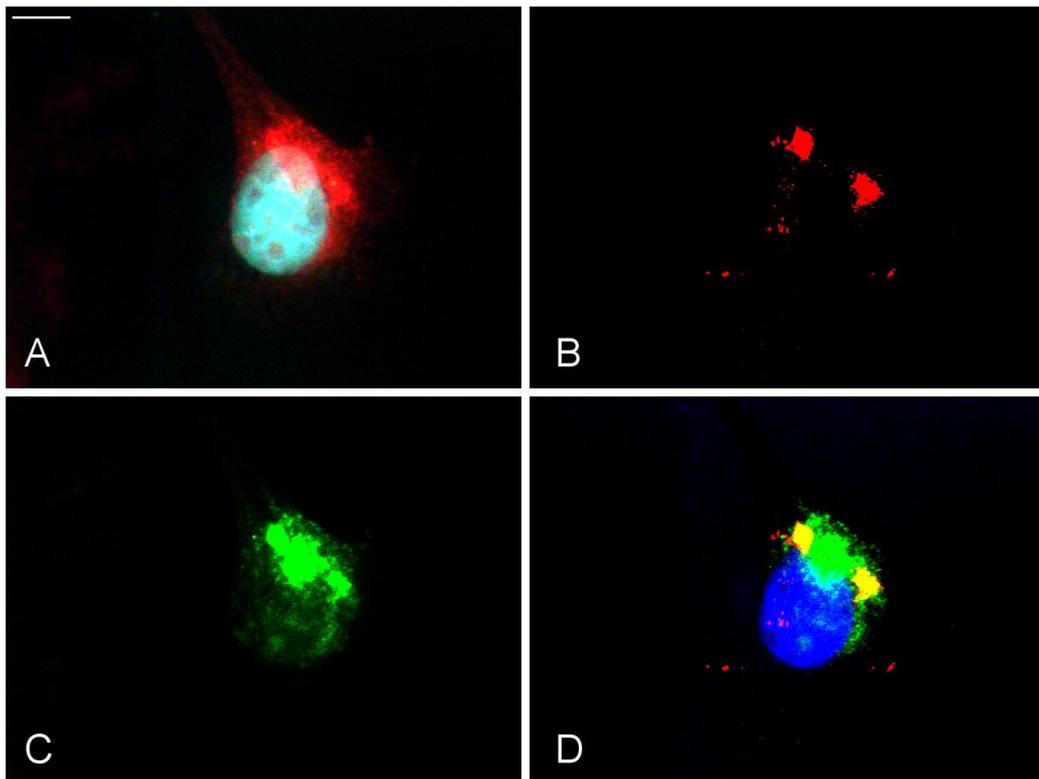
Kompartimente angesteuert werden. So wird der SV 40 Virus von Caveosomen direkt zum Endoplasmatischen Retikulum als Zielkompartiment prozessiert (Gruenberg 2001; Pelkmans *et al.* 2001; Tarrago-Trani & Storrie 2007). Cholera-Toxin gelangt auf ähnliche Weise zum Endoplasmatischen Retikulum, wird von dort aber weiter zum Golgi-Apparat befördert (Chinnapen *et al.* 2007). Ebenfalls über Caveolae, allerdings über eine andere Route, gelangt der *autocrine motility factor* (AMF) zum Endoplasmatischen Retikulum (Le & Nabi 2003; Tarrago-Trani & Storrie 2007).

Um die Beteiligung beider Kompartimente an der zellulären Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen zu prüfen, werden beide Kompartimente mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.

Wie in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben, ist das Protein Caveolin-1 ein wesentlicher Bestandteil von Caveolae-Strukturen der Plasmamembran. Daneben existieren jedoch weitere intrazelluläre Caveolin-1-haltige Kompartimente, beispielsweise der Golgi-Apparat, die aufgrund einer veränderten Antigenstruktur durch Immunofluoreszenz getrennt nachgewiesen werden können (Bush *et al.* 2006). Eine Kollokalisationsstudie mit diesem Caveolin-1 Pool ist ein Nachweis für die gemeinsame weitere intrazelluläre Prozessierung der Komplexe mit dem Protein Caveolin-1.

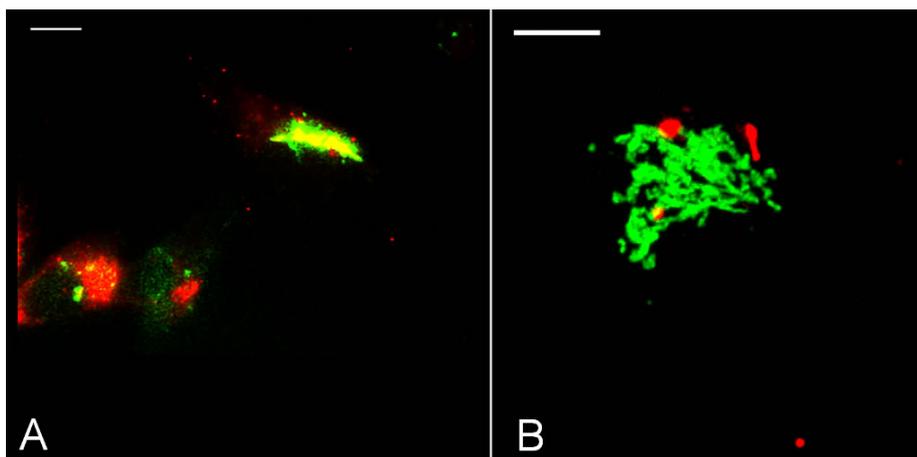
Lipid/Cy3-DNA-Komplexe werden 5 h in MDCK II Zellen inkubiert und anschließend der Caveolin-1 Pool des Golgi-Apparats angefärbt. Da die verwendeten Farbstoffe Cy3 und AlexaFluor<sup>®</sup> 594 spektral überlappen, wird die Kollokalisationsanalyse ausschließlich mit *Spectral Bio-Imaging* ausgeführt.

Abbildung 4-47 zeigt die Kollokalisierung beider Farbstoffe am Rand der angefärbten Golgi-Strukturen. Dies bestätigt, dass Lipid/DNA-Komplexe über Caveolin-1-haltige Endosomen intrazellulär prozessiert werden. Derartige Kollokalisierungen treten in der gesamten Probe allerdings nur selten auf. Die Bedeutung des Golgi-Apparats als Zielkompartiment der Lipid/DNA-Komplexe kann anhand dieser Studien nicht bewiesen werden, da es sich bei den kollokaliserten Strukturen auch um Caveolin-1-haltige Endosomen in der Nähe des Golgi-Apparats handeln könnte (vgl. 4.3.2.2).



**Abbildung 4-47: Lipid/DNA-Komplexe und Caveolin-1 des Golgi-Apparats bzw. endosomaler Vesikel**

MDCK II Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 5 h inkubiert. Caveolin-1 wurde mit Mouse anti-Caveolin-1 IgG1 Antikörper nach Saponin-Permeabilisierung detektiert. *Spectral Bio-imaging*. A: Originalbild. Spektral aufgelöste Einzelcolor-darstellungen von Lipid/Cy3-DNA-Komplex (B) und Caveolin-1 (C). D: Überlagerung der Einzelcolor-darstellungen. Größenmaßstab = 10  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4-48: Lipid/DNA-Komplexe und Golgi-Apparat**

A: Detektion des Golgi-Apparats durch Caveolin-1 mit Mouse anti-Caveolin-1 IgG1 Antikörper nach Saponin-Permeabilisierung sowie durch Expression des -T2YFP Plasmids in MDCK II. *Spectral Bio-imaging*. Überlagerung der Einzelcolor-darstellungen. B: MDCK II Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 5 h inkubiert und der Golgi-Apparat durch Expression des -T2YFP Plasmids detektiert. Konfokale Mikroskopie. Überlagerung der Einzelkanäle. Größenmaßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

Daher wird eine weitere Golgi-Färbung durchgeführt: das Plasmid –T2YFP wird mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz Fugene<sup>®</sup> HD in MDCK II Zellen transfiziert (siehe 3.7.4) und nach Expression eines YFP-Fusionsproteins als Marker der Golgi-stacks (Keller *et al.* 2001) die Kolokalisation mit der Caveolin-1 Immunofärbung des Golgi-Pools geprüft (siehe 3.7.2). Wie Abbildung 4-48 A zeigt, kolokalisieren beide Farbstoffe. Die Caveolin-1 Färbung tritt neben dem Golgi-Apparat wiederum auch in einigen endosomalen Vesikeln auf (vgl. 4.3.2.2). Anschließend wird die Kolokalisation mit 5 h inkubierten Lipid/Cy3-DNA-Komplexen analysiert (Abb. 4-48 B). In den konfokalen Aufnahmen befinden sich einige Komplexe in der Nähe des Golgi-Apparats. Eine vollständige Kolokalisation kann jedoch nur selten gefunden werden.

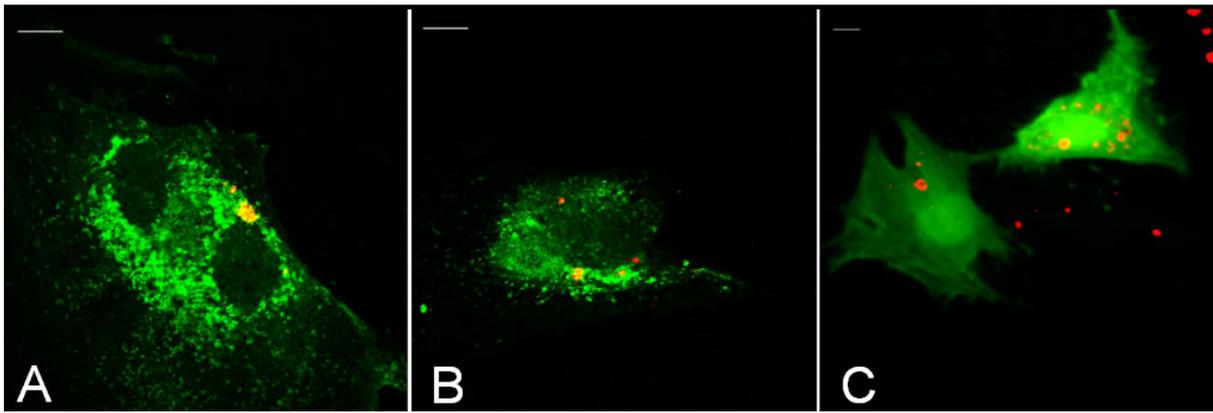
Diese Ergebnisse zeigen, dass der Golgi-Apparat in der zellulären Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen keine wesentliche Rolle spielt. Dagegen kann die Beteiligung Caveolin-1-haltiger Endosomen bestätigt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Kolokalisation mit dem Endoplasmatischen Retikulum nicht näher betrachtet.

#### **4.3.2.5 Kolokalisation mit späten Endosomen und Lysosomen**

Da der Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum als Zielkompartimente der Komplexe ausgeschlossen werden können, bleiben späte Endosomen, Lysosomen oder die vollständige Freisetzung der Komplexe in das Zytoplasma als mögliche zelluläre Zielkompartimente.

Ein etablierter Marker für späte Endosomen und Lysosomen ist das endosomale Membranprotein LAMP-1 (Chen *et al.* 1985; Lippincott-Schwartz & Fambrough 1986; Kostich *et al.* 2000). Für die folgenden Kolokalisationsstudien wird LAMP-1 mittels Immunofluoreszenz angefärbt (siehe 3.7.2).



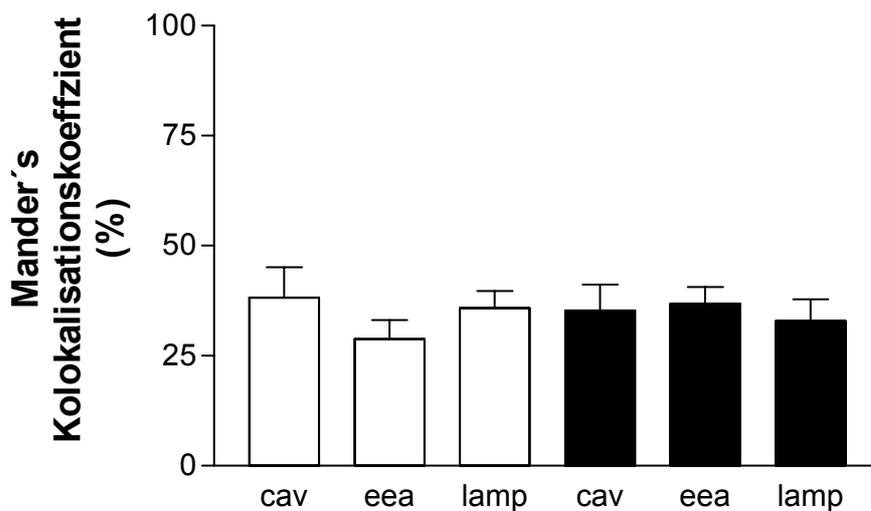
**Abbildung 4-49: Lipid/DNA-Komplexe und späte Endosomen/Lysosomen**

A-10 (A) und MDCK II Zellen (B) wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) 5 h inkubiert und späte Endosomen/Lysosomen mit einem primären LAMP-1 Antikörper detektiert.

C: Inkubation von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) in A-10 Zellen für 48 h. Expression des eGFP Plasmids. Konfokale Mikroskopie. Überlagerung der Einzelkanäle. Größenmaßstab = 10 µm.

In beiden Zelllinien kolokalisieren Lipid/Cy3-DNA-Komplexe nach 5 h Inkubation mit LAMP-1 (Abb. 4-49 A,B). Die Kolokalisationen treten in der gesamten Probe auf.

Die Kolokalisationsstudien dieser Arbeit beweisen damit die Existenz von internalisierten Komplexen in Clathrin- und Caveolae-Kompartimenten. Aufgrund der geringen Zellanzahl pro Bild kann jedoch keine Aussage über das Ausmaß dieser Kolokalisationen gemacht werden. Um die Aussagekraft dieser Studien zu verbessern, wird daher für eine größere Bildanzahl der Mander's Kolokalisationskoeffizient bestimmt (Bolte & Cordelieres 2006) (Abb. 4-50). Dieser Koeffizient gibt den Anteil Cy3-DNA-Fluoreszenz an, der pro Bild mit den Endozytosekompartimenten kolokalisiert. Beide Zellmodelle weisen eine starke Kolokalisation der Komplexe mit den Endozytosekompartimenten der Clathrin- und der Caveolae-Endozytose auf. In dem Caveolae-dominanten Zellmodell MDCK II ist das Ausmaß der Kolokalisation mit den Caveolae-Kompartimenten erhöht. Dies entspricht den Aufnahmeversuchen aus Kapitel 4.2. In dem Clathrin-dominanten Zellmodell A-10 können die einzelnen Kolokalisationskoeffizienten nicht miteinander verglichen werden, da verschiedene Inkubationszeiten verwendet wurden.

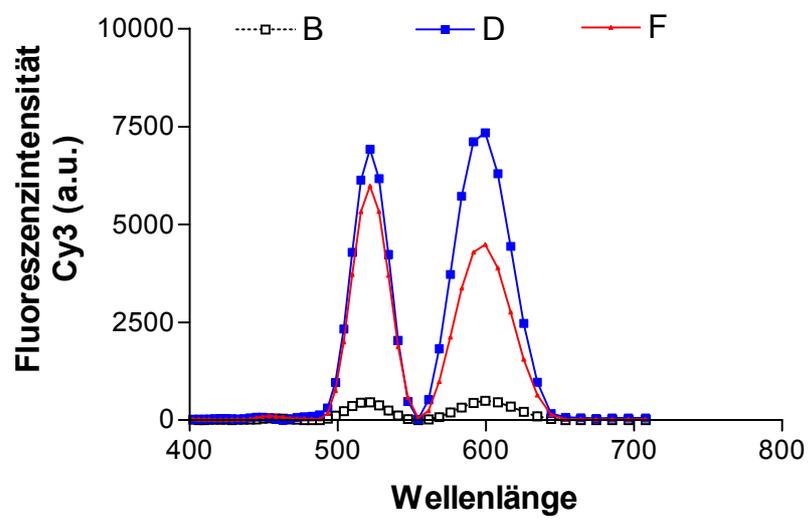
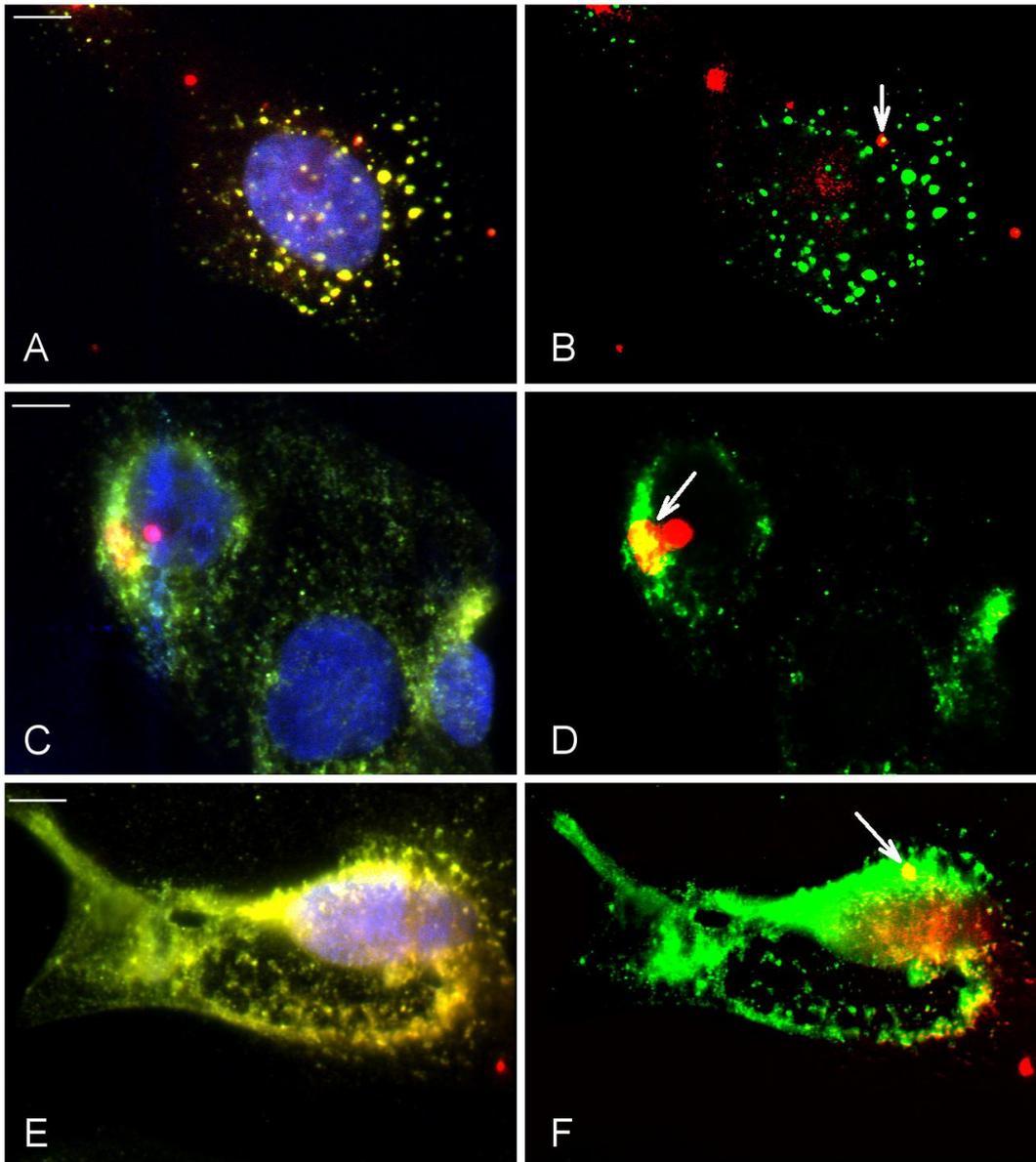


#### Abbildung 4-50: Ausmaß der Kolokalisation mit Endozytosekompartimenten

Die Kolokalisationsstudien wurden entsprechend Abb. 4-43 für frühe Endosomen nach 1 h in A-10 (schwarzer Balken) und 5 h in MDCK II (weißer Balken) (eea), entsprechend Abb. 4-45 für Caveolin-1 (cav) und Abb. 4-49 für späte Endosomen/Lysosomen (lamp) in A-10 (schwarze Balken) und MDCK II (weiße Balken) jeweils nach 5 h durchgeführt und der Mander's Koeffizient mittels ImageJ software bestimmt ( $n \geq 13$ ,  $\pm$  SEM).

Im Folgenden wird die Kolokalisation der Komplexe mit spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten näher betrachtet. Die Größe der kolokalisierten Strukturen deutet auf Akkumulation in diesen Kompartimenten hin. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Kolokalisationen auch in erfolgreich transfizierten Zellen häufig auftreten (Abb. 4-49 C). Darüber hinaus zeigen spektrale Messungen mittels *Spectral Bio-Imaging*, dass sich die Komplexe über lange Zeiträume mit hoher Konzentration in diesen Kompartimenten aufhalten (Abb. 4-51).

Obwohl das Andauern der Kolokalisation nicht auf einen Abbau der Komplexe in diesen Kompartimenten hindeutet, unterscheiden diese Kolokalisationsstudien letztlich nicht zwischen Lysosomen und späten Endosomen. Diese Unterscheidung ist für die Beurteilung der Transfektionseffizienz jedoch bedeutend, da eine Prozessierung in Lysosomen zu einer Degradation der Komplexe führen und damit eine wesentliche Transfektionsbarriere darstellen könnte (Khalil *et al.* 2006; Hoekstra *et al.* 2007; Wong *et al.* 2007).



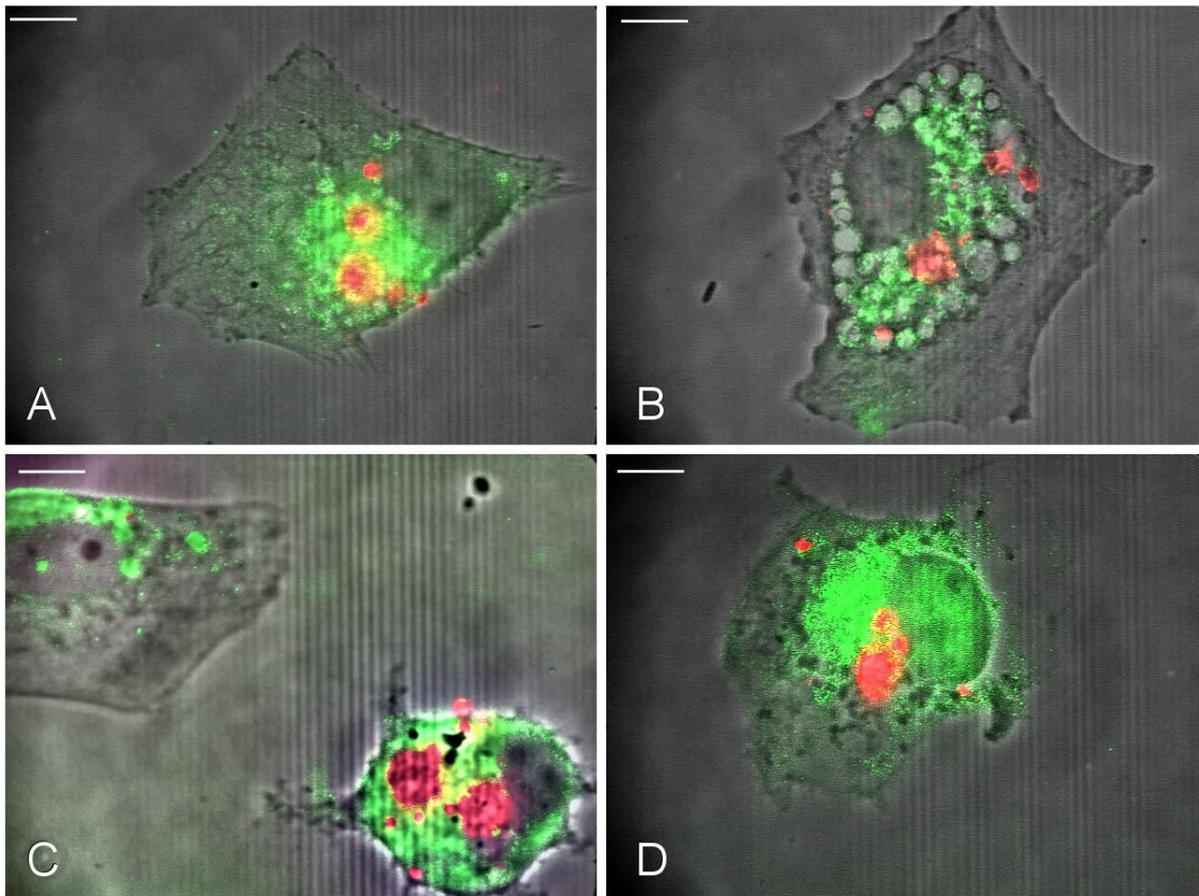
**Abbildung 4-51: Spektrale Untersuchung von Lipid/DNA-Komplexen in frühen und späten Endosomen**

MDCK II Zellen wurden mit Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) inkubiert. Frühe Endosomen wurden mit einem primären EEA1 Antikörper nach 5 h (A,B) und späte Endosomen mit einem primären LAMP-1 Antikörper nach 5 (C,D) und 48 h (E,F) detektiert. *Spectral Bio-imaging*. A,C,E: Originalbild. B,D,F: Überlagerung der spektral aufgelösten Einzelfarbdarstellungen. Größenmaßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

Die angezeigten Fluoreszenzspektren geben die *Spectral Bio-imaging* Messungen der Cy3-Fluoreszenzintensität in den mit Pfeilen markierten Kollokalisationspunkten der Bilder B,D,F wieder.

Lysosomen und späte Endosomen können anhand des pH-Wertes unterschieden werden (Tjelle *et al.* 1996). Chloroquin reichert sich aufgrund basischer Eigenschaften in aciden Lysosomen an, da die Lysosomenmembran für geladene Moleküle weniger permeabel ist. Dies führt zu einer Konzentrierung Chloroquins in den Lysosomen und verursacht ein osmotisch bedingtes Anschwellen sowie eine pH-Anhebung der Lysosomen, wodurch wiederum die Membranpermeabilität erhöht wird (Poole & Ohkuma 1981; Sugioka & Suzuki 1991). Aufgrund der Steigerung der lysosomalen Membranpermeabilität wird Chloroquin häufig zur Stimulation der lysosomalen Freisetzung und damit der Transfektion eingesetzt (Felgner *et al.* 1994; Akinc *et al.* 2005; Wong *et al.* 2007). Bei weiterer Konzentrationserhöhung an Chloroquin platzen die Lysosomen schließlich und der lysosomale Inhalt wird unkontrolliert freigesetzt (Michihara *et al.* 2005).

Nach Inkubation von MDCK II Zellen mit Chloroquin werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe 5 h inkubiert (siehe 3.7.3) und nach Fixierung der Zellen deren lysosomale und spät-endosomale Kompartimente mit einem LAMP-1 Antikörper angefärbt (siehe 3.7.2). Der lysosomotrope Effekt Chloroquins ist in Abbildung 4-52 zu sehen. Trotz Schwellung (Abb. 4-52 B) und anschließendem Platzen der Lysosomen (Abb. 4-52 C,D) bleiben Lipid/Cy3-DNA-Komplexe weitgehend unverändert. Eine diffuse Verteilung des Cy3-Signals, wie es für das LAMP-1-Signal in den Aufnahmen zu sehen ist, bleibt aus. Die Komplexe akkumulieren folglich nicht in den aciden lysosomalen Kompartimenten, sondern in spät-endosomalen, perinukleären Vesikeln. Vergleichbare Ergebnisse sind für andere Lipid/DNA-Komplexe publiziert (Zabner *et al.* 1995; Wong *et al.* 2007).



**Abbildung 4-52: Lipid/DNA-Komplexe und späte Endosomen/Lysosomen nach Chloroquin-Behandlung**

MDCK II (B) Zellen wurden mit Chloroquin für A: 0 min, B,C: 60 min, 250  $\mu$ M oder D: 60 min, 500  $\mu$ M vorinkubiert. Lipid/Cy3-DNA-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 5 h in Anwesenheit (C,D) oder Abwesenheit (A,B) von Chloroquin inkubiert. Die späten Endosomen/Lysosomen der Zellen wurden mit einem primären LAMP-1 Antikörper detektiert. *Spectral Bio-imaging*. Überlagerung der spektral aufgelösten Einzelfarbdarstellungen und der Durchlichtbilder. Größenmaßstab = 10  $\mu$ m.

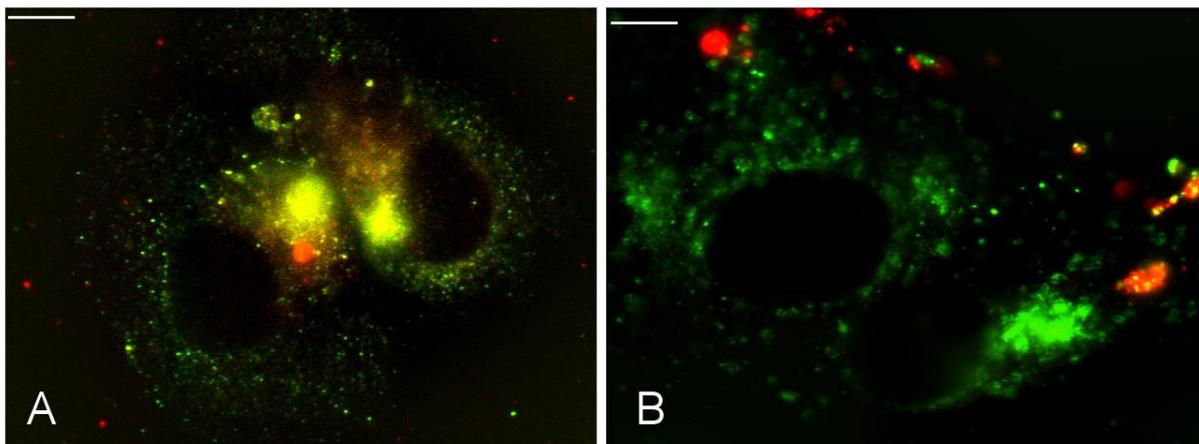
Die Zusammenfassung aller Daten zeigt, dass Lipid/DNA-Komplexe in beiden Zelllinien über Clathrin- und Caveolae-Endozytose internalisiert und intrazellulär weiterprozessiert werden, um schließlich in spät-endosomalen, perinukleären Kompartimenten zu akkumulieren. Die zelluläre Prozessierung der Komplexe unterscheidet sich in beiden Zellmodellen qualitativ nicht.

### 4.3.3 Einfluss verschiedener Endozytosewege auf die Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen

#### 4.3.3.1 Inkubation mit Endozytose-Inhibitoren

Unter Berücksichtigung des charakteristischen und zahlreichen Auftretens akkumulierter Komplexe in spät-endosomalen Kompartimenten zweier Zellmodelle, die ein unterschiedliches Endozytoseprofil aufweisen (vgl. 4.2.3), ist die Prozessierung der Komplexe zu diesen Kompartimenten über beide Endozytosewege, Clathrin und Caveolae, nahe liegend. Dies wird durch Inkubation mit Endozytose-Inhibitoren durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch geprüft (siehe 3.6.2 und 3.7.3). Nach Inkubation der Endozytose-Inhibitoren werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe im Massenverhältnis 8/1 (Lipid/DNA) hergestellt (siehe 3.3.1) und 5 h inkubiert.

Im fluoreszenzmikroskopischen Experiment kann die Akkumulation der Komplexe weder nach Inkubation mit einem Clathrin-Inhibitor, noch nach Inkubation mit einem Caveolae-Inhibitor verhindert werden (Abb. 4-53).



#### Abbildung 4-53: Lipid/DNA-Komplexe und späte Endosomen nach Inhibitor-Behandlung

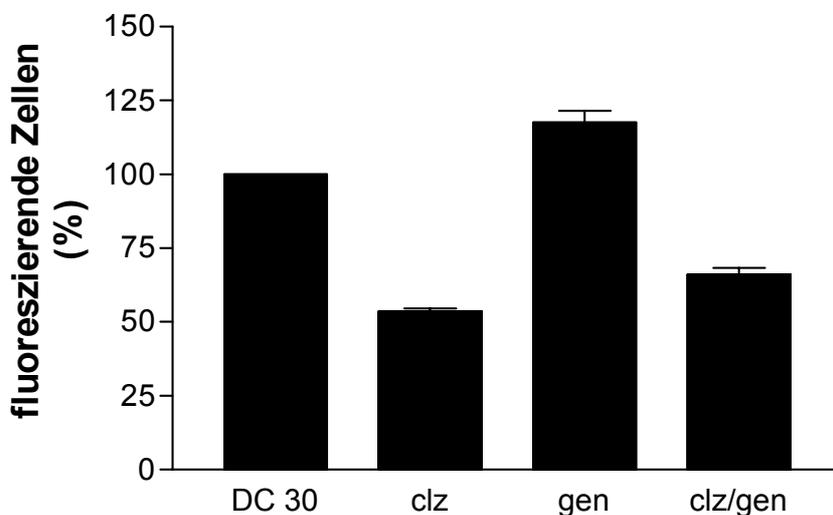
MDCK II Zellen wurden für 60 min mit Chlorpromazin (A) oder Genistein (B) vorinkubiert. Lipid/Cy3-DNA-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 5 h in Anwesenheit des Inhibitors inkubiert. Die späten Endosomen/Lysosomen der Zellen wurden mit einem primären LAMP-1 Antikörper detektiert. *Spectral Bio-imaging*. Überlagerung der spektral aufgelösten Einzelfarbdarstellungen. Größenmaßstab = 10 µm.

Die Akkumulation in spät-endosomalen Kompartimenten erfolgt demnach nach Prozessierung der Komplexe über beide Endozytosewege, Clathrin und Caveolae.

Dies bedeutet, dass beide Endozytosewege die Komplexe gleich prozessieren und eine Transfektion gleichermaßen vermitteln können.

Um die Transfektionseffizienz beider Endozytosewege weiter zu prüfen, wird die Beeinflussung der Transfektion nach Inkubation mit einem Endozytose-Inhibitor quantitativ mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die Versuche werden auf die Zelllinie A-10 beschränkt, da eine Reduktion der Transfektion in der MDCK II Zelllinie nicht mehr detektiert werden kann.

Die Reduktion der Transfektion entspricht dabei weitgehend der Reduktion der Komplexaufnahme (vgl. 4.2.4.1) (Abb. 4-54). Da die Clathrin-Endozytose in A-10 Zellen besonders aktiv ist (vgl. 4.2.3.1) und die Komplexaufnahme verstärkt über Clathrin-Endozytose vermittelt wird (vgl. 4.2.4.1), sinkt die Transfektion der Zellen nach Blockade dieses Endozytoseweges entsprechend stark. Die Hemmung der Caveolae-Endozytose hat keinen Einfluss auf die Transfektion, obwohl die Komplexe zu einem geringen Teil über Caveolae-abhängige Endozytose aufgenommen werden (vgl. 4.2.4.1). Möglicherweise wird durch die Blockade der Caveolae-abhängigen Endozytose über die Versuchsdauer von 48 h eine Stimulation des Clathrin-Wegs ausgelöst (Hoekstra *et al.* 2007).

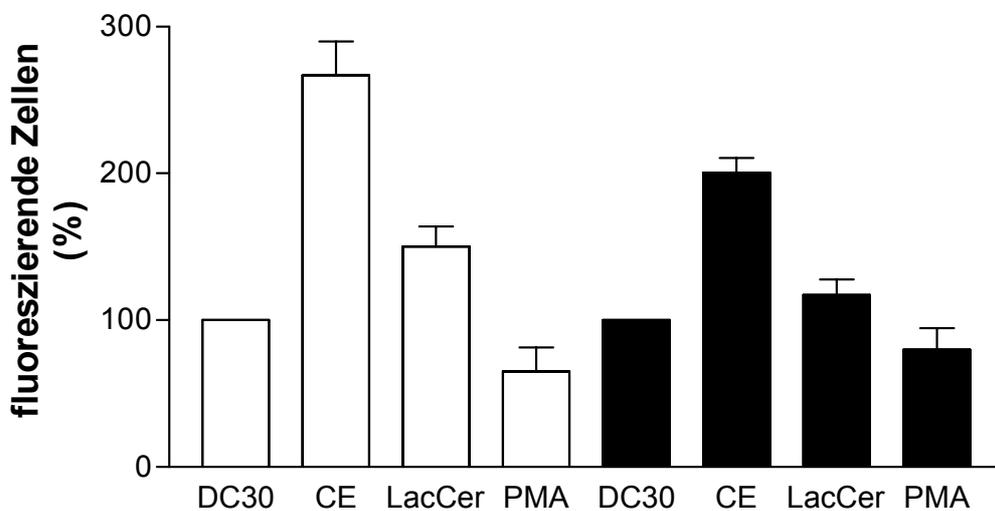


**Abbildung 4-54: Beeinflussung der Transfektion durch Endozytose-Inhibitoren**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von A-10 Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) nach Inkubation mit Chlorpromazin (clz) und/oder Genistein (gen). Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (DC 30) (n = 6, ± SEM).

#### 4.3.3.2 Inkubation mit Endozytose-Enhancern

Die Verwendung von Endozytose-Enhancern hat, wie bereits diskutiert (vg. 4.2.4.2), den Vorteil, dass die Transfektion gesteigert wird und so die MDCK II Zelllinie messtechnisch zugänglich wird. Der Einfluss der einzelnen Endozytosewege auf die Transfektion der Komplexe wird in einer weiteren Versuchsreihe durch Inkubation mit Endozytose-Enhancern getestet (siehe 3.6.2). Nach Präinkubation der Endozytose-Enhancer werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe im Massenverhältnis 8/1 (Lipid/DNA) hergestellt (siehe 3.3.1) und 5 h inkubiert.



#### Abbildung 4-55: Beeinflussung der Transfektion durch Endozytose-Enhancer

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II (weiße Balken) und A-10 Zellen (schwarze Balken) durch Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) nach Inkubation mit Clathrin-Enhancer (CE), Lactosylceramid (LacCer) oder Phorbol ester (PMA). Relative Transfektion bezogen auf die unbehandelte Komplexkontrolle (DC 30) ( $n \geq 4$ ,  $\pm$  SEM).

Die Beeinflussung der Transfektion durch Endozytose-Enhancer der Clathrin-, Caveolae-Endozytose und Makropinozytose entspricht in beiden Zellmodellen den Trends der Aufnahmeversuche (vgl. 4.2.4.2). Während die Makropinozytose an der Prozessierung der Komplexe unbeteiligt ist, sind Clathrin- und Caveolae-Endozytose aktiv beteiligt. Der Effekt des Caveolae-Enhancers Lactosylceramid ist in der MDCK II Zelllinie stärker ausgeprägt (MDCK II:  $150,0 \pm 13,8$  % und A-10:  $117,0 \pm 10,5$  %) und bestätigt die Beobachtung, dass Caveolae-Endozytose hier einen größeren Beitrag zur Prozessierung der Komplexe leistet. Im Gegensatz zu den Aufnahmeversuchen, in denen die Clathrin-Endozytose durch den Enhancer CE, ein Saponingemisch aus *Gypsophila paniculata* L., in der bereits

stark aktiven Zelllinie A-10 nur schwach weiter gesteigert werden konnte, kann die Transfektion der Zellen verdoppelt werden ( $200,7 \pm 10,0 \%$ ). Dies kann durch den Wirkmechanismus der Saponine erklärt werden: diese steigern nicht nur die Clathrin-Endozytose sondern stimulieren gleichzeitig die endosomale Freisetzung der Komplexe (Weng *et al.* 2009). Eine Steigerung der Transfektion kann auch in der MDCK II Zelllinie gezeigt werden, die absolute Transfektion bleibt jedoch weiterhin bei  $< 2 \%$  der Zellen. Die Aussagekraft der prozentualen Ergebnisse ist in diesem Zellmodell daher beschränkt.

Aufgrund dieser Daten kann die endosomale Freisetzung der Komplexe nach Akkumulation in perinukleären, spät-endosomalen Kompartimenten als Transfektionsbarriere bestätigt werden (Khalil *et al.* 2006; Hoekstra *et al.* 2007). Diese Transfektionsbarriere behindert die Prozessierung der Lipid/DNA-Komplexen jedoch nicht vollständig: die niedrige Transfektion der MDCK II Zellen kann durch Stimulation der endosomalen Freisetzung zwar gesteigert werden kann, erreicht jedoch nicht ein den Aufnahmeraten entsprechendes Maß. Ebenso wird die Transfektion im Zellmodell A-10 durch diese Barriere zwar reduziert, ein ausreichender Anteil an Komplexen überwindet die Barriere hingegen problemlos, wie die hohe Transfektionseffizienz verdeutlicht.

#### **4.3.4 Diskussion und Ausblick**

In diesem Abschnitt wird als weitere Transfektionsbarriere die zelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen in zwei unterschiedlich effizient transfizierten Zellmodellen definiert und verglichen. Dafür wird eine Kombination durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden verwendet.

Die durchflusszytometrische Analyse der zellulären Prozessierung basiert auf dem Ausschalten einzelner Endozytosewege mit Hilfe endozytoseaktiver Substanzen. Die Vor- und Nachteile dieser Methode sind bereits diskutiert (vgl. 4.2.5).

Der fluoreszenzmikroskopische Vergleich der zellulären Prozessierung von Endozytosemarkern und nanopartikulären Arzneistoffsystemen wird ebenfalls häufig in der Literatur beschrieben, ermöglicht allerdings keine Aussage über den zellulären Aufenthaltsort der Komplexe. Während noch vor einigen Jahren jedem Endozytoseweg eine einzige zelluläre Prozessierung zugeschrieben wurde, beschreibt die aktuelle Literatur nämlich eine wesentlich komplexere Verknüpfung der Endozytosewege (Liberali *et al.* 2008; Sandvig *et al.* 2008). So wird für die Caveolae-Endozytose neben der Prozessierung über Caveosomen zu Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum

(Pelkmans *et al.* 2001; Le & Nabi 2003) inzwischen auch eine Fusion mit frühen Endosomen mit anschließender Prozessierung zu Lysosomen beschrieben (Wong *et al.* 2007). Die Kolokalisation der Komplexe mit einem Endozytosemarker bedeutet daher weder zwingend, dass beide über den gleichen Endozytoseweg in das gemeinsame Kompartiment prozessiert worden sind, noch dass beide in einem weiteren Prozessierungsschritt nicht voneinander getrennt werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wird daher das Repertoire etablierter Fluoreszenzfärbungen für Zielkompartimente der Endozytosewege ausgebaut (Häfele 2007). Damit besteht nun ein Sortiment verschiedener Fluoreszenzfärbungen, die eine Anfärbung aller Zielkompartimente der Clathrin- und Caveolae-Endozytose ermöglichen (Schneider & Süss 2010). Die Kombination der fluoreszenzmikroskopischen Methoden *Spectral Bio-Imaging* und konfokaler Mikroskopie garantieren außerdem eine räumlich und spektral eindeutige Bestimmung der Kolokalisation von Lipid/DNA-Komplexen und Endozytosekompartimenten (Schneider & Süss 2010).

Mit Hilfe dieser methodischen Weiterentwicklungen kann die zelluläre Prozessierung in beiden Zellmodellen charakterisiert werden:

Beide Zellmodelle sind endozytotisch aktiv, betreiben die für die Komplexaufnahme relevanten Endozytosewege, Clathrin und Caveolae, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß (vgl. 4.2.3). Dennoch ergeben die Versuche in beiden Zellmodellen eine vergleichbare zelluläre Prozessierung, die von Clathrin- und Caveolae-Strukturen der Plasmamembran über endosomale Vesikel schließlich zu aufgrund ihrer Größe und Anzahl charakteristischen, perinukleären, spät-endosomal Kompartimenten führt.

Die Akkumulation von Lipid/DNA-Komplexen in solchen Kompartimenten ist bereits beschrieben (Zabner *et al.* 1995; Wong *et al.* 2007). Die endozytotische Prozessierung in diese Akkumulationskompartimente bleibt hingegen kontrovers diskutiert (Zuhorn *et al.* 2002; Rejman *et al.* 2005; Wong *et al.* 2007). Einige Publikationen beschreiben die Präferenz der Komplexe für den Clathrin-Endozytoseweg (Zuhorn *et al.* 2002; Rejman *et al.* 2005). Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen eine effiziente Transfektion über diesen Endozytoseweg. Die Prozessierung der Komplexe erfolgt in beiden Zellmodellen allerdings auch über Caveolae-Endozytose und endet schließlich ebenso in der beschriebenen Akkumulation. Die Caveolae-vermittelte Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen über Caveolin-1-haltige Endosomen zu späten Endosomen ist ebenfalls publiziert (Wong *et al.* 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Ansatz eines Caveolae-Targetings für Lipid/DNA-Komplexe zu hinterfragen (Rejman *et al.* 2005). Denn die für einige Toxine und Viren beschriebene Caveolae-vermittelte Prozessierung abseits spät-endosomaler und lysosomaler Abbauwege (Sandvig & van Deurs 2005; Tarrago-Trani & Storrie 2007) ist für die hier untersuchten Lipid/DNA-Komplexe nicht vorhanden. Eine effizientere Prozessierung über diesen Endozytoseweg steht außerdem im Widerspruch zur schlechten Transfektion der Caveolae-reichen Zelllinie MDCK II.

Die Ergebnisse entsprechen damit der Literatur, wobei die schlechte Transfizierbarkeit bestimmter Zellmodelle trotz effizienter zellulärer Prozessierung für Lipid/DNA-Komplexe bisher nicht publiziert ist. Vergleichbare Ergebnisse sind für den Vergleich viraler und lipid-basierter Gentransfersysteme publiziert (Hama *et al.* 2006).

Als wesentlicher Unterschied beider Zellmodelle kann in dieser Arbeit das unterschiedliche Endozytoseprofil dargelegt werden. Die damit verbundene unterschiedliche Aufnahme der Komplexe kann die Ineffizienz der Transfektion jedoch nicht hinreichend erklären. Daher bleibt für weitere Arbeiten die Untersuchung nachgeschalteter Transfektionsbarrieren von großem Interesse.

Dazu zählen aus heutiger Sicht insbesondere die Dissoziation der Komplexe sowie der Nuklease-Abbau von DNA im Zytoplasma und der Eintritt der DNA in den Zellkern (Finn *et al.* 2005; van der Aa *et al.* 2006; Breuzard *et al.* 2008).

Mit den Weiterentwicklungen der Fluoreszenzfärbung zellulärer Kompartimente sowie der Kombination mikroskopischer Methoden etabliert die vorliegende Arbeit ein Messsystem, das die Analyse der zellulären Aufnahme und Prozessierung weiterer fluoreszenzmarkierter nanopartikulärer Systeme ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieses Messsystem auf die Analyse Doxorubicin-haltiger Liposomen übertragen (Lewrick 2008). Außerdem wird mit Hilfe dieses Messsystems die Regulation des NMDA-Rezeptors (NR1-Untereinheit) in Zusammenarbeit mit Herrn Dieter K. Meyer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung I, Universität Freiburg) untersucht.

## 4.4 Transzytose und richtungsabhängige Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen

In den Abschnitten 4.2 und 4.3 wird untersucht, ob die Aufnahme und zelluläre Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen Transfektionsbarrieren darstellen und die ineffiziente Transfektion der Zelllinie MDCK II im Vergleich zur effizient transfizierten Zelllinie A-10 erklären können. Dabei wird die Beteiligung gleicher Endozytosewege und die intrazelluläre Akkumulation der Komplexe in späten Endosomen in beiden Zellmodellen nachgewiesen. Damit gelangen nachgeschaltete Transfektionsbarrieren in den Fokus. Im vorliegenden Abschnitt wird geprüft, ob es sich bei den beschriebenen spät-endosomalen Akkumulationskompartimenten in der MDCK II Zelllinie um einen Zwischenstopp zellulärer Transzytose handelt.

Transzytose kann als Stofftransport durch Zellen definiert werden. Dabei werden Membranvesikel an einer Seite der Plasmamembran abgeschnürt und auf der anderen Seite der Plasmamembran wieder freigegeben (Tuma & Hubbard 2003; Alkatout 2008). Diese Art des Stofftransports wird von vielen Zellen genutzt, besonders intensiv allerdings von Epithelzellen. Bei Epithelzellen handelt es sich um polarisierte Zellen: sie bilden an der Grenzfläche zum Lumen die apikale Plasmamembranseite aus, während die basolaterale Plasmamembranseite zu dem darunter liegenden Gewebe und zu den Nachbarzellen hin ausgerichtet wird. Beide Plasmamembranseiten unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung (Bomsel *et al.* 1989).

In Epithelzellen wird Transzytose über Caveolae- und Clathrin-Endozytose vermittelt (Bomsel *et al.* 1989; Gagescu *et al.* 2000). Die Arbeitsgruppe von Schnitzer hat auf dieser Basis Caveolae-Targeting-Strategien entwickelt, die eine Transzytose durch Endothelzellen zu den betroffenen Geweben *in vivo* ermöglichen (Oh *et al.* 2007).

Die epitheliale Zelllinie MDCK II stellt ein in der Literatur häufig verwendetes Zellmodell für die Untersuchung der Transzytose dar (Tuma & Hubbard 2003).

Aufgrund der Clathrin- und Caveolae-Prozessierung der Lipid/DNA-Komplexe stellt die Transzytose in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Transfektionsbarriere der epithelialen Zelllinie MDCK II dar.

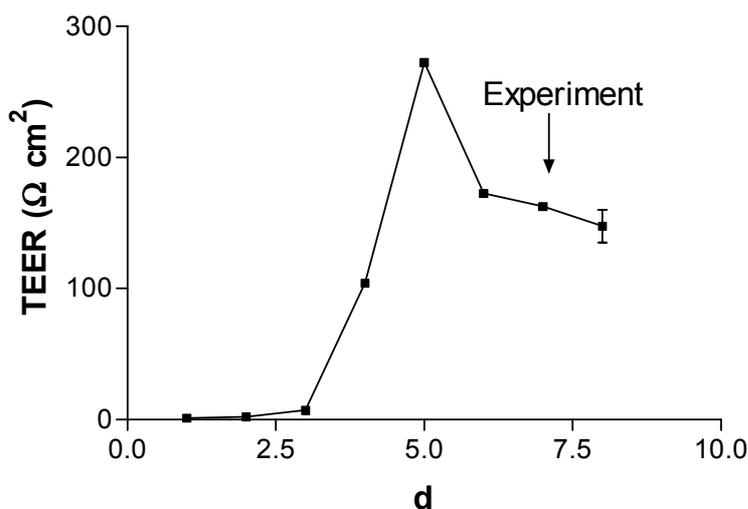
## 4.4.1 Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen im polarisierten Zellmodell MDCK II

### 4.4.1.1 Das polarisierte Zellmodell MDCK II

Um die Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen untersuchen zu können, werden MDCK II Zellen auf Filtermembranen (Transwells<sup>®</sup>) angezchtet, so dass die Aufnahme der Komplexe von der apikalen und die Exozytose an der basolateralen Plasmamembran bestimmt werden kann (siehe 3.5.2) (Bomsel *et al.* 1989; Tuma & Hubbard 2003). Die vollständige Ausbildung eines polarisierten Zellmonolayers mit apikaler und basolateraler Membran kann durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bestimmt werden. Der TEER-Wert steigt mit dem Wachstum des Monolayers und erreicht bei Ausbildung der *tight junctions* schließlich ein konstantes Niveau. Dieses liegt für MDCK II Zellen bei einem TEER-Wert von  $\sim 150 \Omega \text{ cm}^2$  (Tuma & Hubbard 2003).

Für die folgenden Versuchsreihen werden MDCK II Zellen auf Filtermembranen mit einem Porendurchmesser von  $3 \mu\text{m}$  ausplattiert und nach dem Erreichen eines konstanten TEER-Niveaus der Versuch gestartet (3.5.2). Die Porengröße von  $3 \mu\text{m}$  schließt eine Barrierefunktion für Lipid/DNA-Komplexe aus, da der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser der Partikel unter  $3 \mu\text{m}$  liegt (vgl. 4.1.1.1)

Wie Abbildung 4-56 zeigt, werden die Soll-Werte der Literatur nach 7-tägiger Kultivierung der Zellen erreicht.



#### Abbildung 4-56: Transepithelialer elektrischer Widerstand von MDCK II

MDCK II Zellen wurden im Transwell<sup>®</sup> kultiviert und der TEER-Wert mittels EndOhm<sup>®</sup> Elektrode bestimmt (n=2,  $\pm$  SEM).

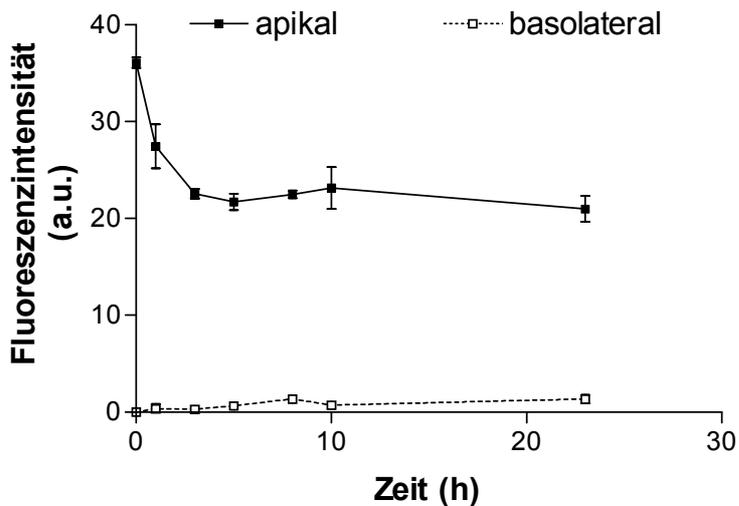
#### 4.4.1.2 Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen im polarisierten Zellmodell MDCK II

Nach Anzucht eines polarisierten Zellmodells (vgl. 4.4.1.1) werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe gemäß dem Standardprotokoll 3.3.1 hergestellt und im apikalen Well für 24 h inkubiert (siehe 3.9.3). Die Abnahme der Komplexkonzentration im apikalen und die durch Transzytose induzierte Konzentrationserhöhung im basolateralen Well wird mit Hilfe eines Fluorimeters gemessen (siehe 3.9.3). Die Unversehrtheit des Zellmonolayers wird durch die erneute Messung des TEER-Werts am Versuchsende garantiert (vgl. 4.4.1.1).

Den Versuchen des Abschnitts 4.2 entsprechend kann aufgrund der zellulären Aufnahme der Komplexe eine Konzentrationsabnahme im apikalen Well gemessen werden (Abb. 4-57). Nach einer Messdauer von 5 h stellt sich eine konstante Komplexkonzentration im apikalen Well ein. Dies entspricht den zellulären Aufnahmeversuchen (vgl. 4.2.2.3), in denen eine starke Aufnahme der Komplexe über 5 h gezeigt werden konnte. Ob eine weitere Reduktion der Komplexkonzentration aufgrund einer Sättigung der Endozytosemechanismen oder einer gleichzeitigen apikalen Exozytose der Komplexe ausbleibt, kann anhand dieser Daten nicht beantwortet werden (Harush-Frenkel *et al.* 2008).

Die Komplexkonzentration steigt im basolateralen Well mit zunehmender Versuchsdauer. Selbst unter Berücksichtigung der stärkeren Verdünnung im basolateralen Well (apikal: 0,5 ml, basolateral: 1,5 ml Inkubationsvolumen) ist die Transzytose der Komplexe allerdings zu gering, um die ausbleibende Transfektion der MDCK II Zellen zu erklären.

Die Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen stellt daher keine wesentliche Transfektionsbarriere dar.



#### Abbildung 4-57: Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen

MDCK II Zellen wurden 7 Tage im Transwell<sup>®</sup> kultiviert (siehe Abb. 4-56) und nach apikaler Zugabe von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen 8/1 (m/m) die Fluoreszenzintensität im apikalen und basolateralen Well über 24 h fluorimetrisch bestimmt (n = 2, ± SEM).

### 4.4.2 Richtungsabhängige Endozytose von Lipid/DNA-Komplexen im Zellmodell MDCK II

#### 4.4.2.1 Polarisiertes Zellmodell MDCK II

Das epitheliale Zellmodell MDCK II besitzt dank der Ausbildung polarisierter Zellmonolayer große Bedeutung für die Untersuchung der Transzytose. In der unterschiedlichen Zusammensetzung der basolateralen und apikalen Zellmembran steckt darüber hinaus großes Potenzial für die Endozytoseforschung (Bomsel *et al.* 1989; Dupree *et al.* 1993; Vogel *et al.* 1998; Gagescu *et al.* 2000; Foerg *et al.* 2007; Harush-Frenkel *et al.* 2008). So konnte gezeigt werden, dass Caveolae-Strukturen im polarisierten Zellmodell MDCK II ausschließlich an der basolateralen Plasmamembran zu finden sind (Vogel *et al.* 1998). Die Clathrin-Endozytose hingegen ist an der apikalen Plasmamembran aktiv (von Bonsdorff *et al.* 1985).

Das polarisierte MDCK II Zellmodell ermöglicht daher die Betrachtung richtungsabhängiger Endozytose (apikal-basolateral oder basolateral-apikal) (Gagescu *et al.* 2000) und damit die getrennte Untersuchung von Clathrin-Endozytose als apikale und Caveolae-Endozytose als basolaterale zelluläre Aufnahme. Auf diese Weise kann die Prozessierung nanopartikulärer Gentransfersysteme ohne den Einsatz endozytoseaktiver Substanzen analysiert werden (vgl. 4.2.4). Dieses Potenzial nutzen Harush-Frenkel *et al.*

erstmalig für die Untersuchung der endozytotischen Prozessierung unterschiedlich geladener Nanopartikel (Harush-Frenkel *et al.* 2008).

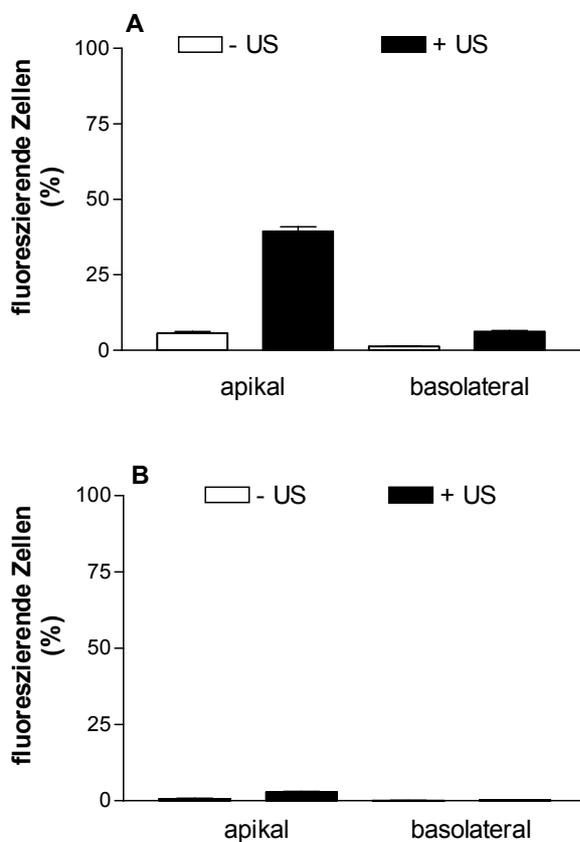
In der vorliegenden Arbeit wird dieses Modell auf die Untersuchung von Lipid/DNA-Komplexen übertragen. Nach Ausbildung eines polarisierten Monolayers werden Lipid/Cy3-DNA-Komplexe 5 h lang von der apikalen oder basolateralen Seite inkubiert und die Zellaufnahme durchflusszytometrisch gemessen, um den Beitrag von Clathrin- und Caveolae-Endozytose zu bestimmen (siehe 3.9.2). Die Aufnahme der Komplexe in den polarisierten Monolayer ist dabei allerdings so gering, dass basolaterale und apikale Aufnahme nicht unterschieden und daher keine Aussage über die Bedeutung der beiden Endozytosewege getroffen werden kann (Daten nicht gezeigt). Dies kann durch die Aktivitätsabnahme der Endozytose im polarisierten Zellmodell erklärt werden (Foerg *et al.* 2007). Die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen ist dann durchflusszytometrisch nicht mehr bestimmbar.

#### 4.4.2.2 Proliferierendes Zellmodell MDCK II

Da die Untersuchung der richtungsabhängigen Endozytose im polarisierten Zellmodell für Lipid/DNA-Komplexe nicht möglich ist, werden MDCK II Zellen mit einer geringeren Zelldichte auf die Transwells<sup>®</sup> ausplattiert (siehe 3.9.1) (Foerg *et al.* 2007). In diesem „proliferierenden“ Zellmodell ist noch kein polarisierter Monolayer ausgebildet, der Großteil der Filterporen aber bereits durch Zellen belegt, so dass keine freie Diffusion der Komplexe zwischen apikalem und basolateralem Well stattfindet. Nach 5 h Inkubation von Lipid/Cy3-DNA-Komplexen wird die zelluläre Aufnahme der Komplexe durchflusszytometrisch analysiert (siehe 3.9.1). Neben Komplexen, die nach dem Standardprotokoll hergestellt wurden (siehe 3.3.1), werden Komplexe eingesetzt, deren Partikelgröße durch Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen verkleinert wurde (siehe 3.1.3 und 3.3.1). Die Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen erfolgt 5 h im Ultraschallbad. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser und die Größenverteilung der Komplexe entsprechen 4.1.5.1 (Mittelwert von  $d = 434$  nm aus  $n = 4$ , PI 0,16 - 0,28).

Dabei kann eine stärkere Aufnahme der Komplexe an der apikalen Plasmamembran festgestellt werden (Abb. 4-58 A). Bei Einsatz kleinerer Komplexe ist die zelluläre Aufnahme signifikant höher ( $p = 0,0008$ ) als bei größeren Komplexen und die Präferenz zur apikalen Membran ebenfalls signifikant ( $p = 0,002$ ). Dies erklärt die stärkere Transfektion kleinerer Komplexe (Abb. 4-58 B), die in Abschnitt 4.1.5.3 bereits für A-10 Zellen gezeigt werden konnte.

Die stärkere zelluläre Aufnahme kleinerer Komplexe steht im Widerspruch zu einigen Veröffentlichungen (Liu *et al.* 1997; Zelphati *et al.* 1998; Khalil *et al.* 2006; van der Aa *et al.* 2007). Diese gehen von einer stärkeren zellulären Assoziation und damit Aufnahme größerer Komplexe aus, die durch die größenabhängige Sedimentation auf die Zelloberflächen erklärt wird (vgl. 1.4.1). Berücksichtigt man allerdings die Präferenz der aktiven Endozytosewege Clathrin und Caveolae für Partikelgrößen von 50 - 500 nm (Rejman *et al.* 2004) (vgl. 1.4.3), ist die stärkere zelluläre Aufnahme von kleineren Lipid/DNA-Komplexen nachvollziehbar.



**Abbildung 4-58: Aufnahme und Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen im proliferierenden Zellmodell**

MDCK II Zellen wurden 1 Tag im Transwell<sup>®</sup> kultiviert und fluoreszenzmarkierte Lipid/Cy3-DNA-Komplexe 8/1 (m/m) (A) oder ungefärbte Lipid/DNA-Komplexe 8/1 (m/m) (B) im apikalen oder basolateralen Well 5 h inkubiert. Die Größe der Komplexe wurde durch Zerkleinerung der Ausgangsliposomen über 5 h im US-Bad (+ US) eingestellt und mit Komplexen aus unbehandelten Ausgangsliposomen (- US) verglichen. Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme (A) nach 5 h und Transfektion (B) nach 48 h (n = 3, ± SEM).

### 4.4.3 Diskussion und Ausblick

In diesem Abschnitt wird die Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen im polarisierten und proliferierenden Zellmodell MDCK II vorgestellt. Dabei kann die Transzytose der Komplexe als wesentliche Transfektionsbarriere ausgeschlossen werden.

Das verwendete polarisierte Zellmodell besitzt darüber hinaus großes Potenzial für die Endozytoseforschung, da der Einfluss der Endozytosewege Clathrin und Caveolae ohne den Einsatz endozytoseaktiver Substanzen untersucht werden kann. Der Nutzen dieses Modells konnte bereits gezeigt werden (Harush-Frenkel *et al.* 2008) und könnte für die Untersuchung weiterer nanopartikulärer Systeme, eine starke zelluläre Aufnahme vorausgesetzt, hilfreich sein.

Das proliferierende Zellmodell erlaubt die Analyse der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen. In der vorliegenden Arbeit kann die Präferenz der Komplexe für die apikale Plasmamembranseite gezeigt werden. Damit wird die Affinität der Komplexe zu Clathrin-abhängiger Internalisierung und Prozessierung bestätigt (vgl. 4.2.5 und 4.3.4). Die Anpassung der Komplexgrößen an die bevorzugten Substratgrößen der aktiven Endozytosewege verbessert die zelluläre Aufnahme und damit die Transfektion und ist ein erstes Beispiel für den Erfolg des rationellen Designs von Lipid/DNA-Komplexen (vgl. 4.6). Für eine intensivere Nutzung des proliferierenden Zellmodells in der Endozytoseforschung, insbesondere einer Analyse der beteiligten Endozytosewege, bedarf es jedoch einer weiteren Charakterisierung des Zellmodells. So muss geprüft werden, ob die Zellen trotz unvollständiger Polarisierung bereits eine Differenzierung von Clathrin- und Caveolae-Endozytose an der Plasmamembran zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass weder zelluläre Aufnahme noch zelluläre Prozessierung oder Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen Barrieren darstellen, die eine effiziente Transfektion verhindern und die Transfektionsunterschiede verschiedener Zellmodelle erklären können. Im folgenden Abschnitt wird mit der intrazellulären Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe eine weitere potenzielle Transfektionsbarriere untersucht.

## 4.5 Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen

### 4.5.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Systems für die Dissoziationsanalytik

Die Endozytoseuntersuchungen der Abschnitte 4.2 - 4.4 zeigen, dass Lipid/DNA-Komplexe verschiedene Zelllinien trotz hoher Aufnahmezeiten und vergleichbarer zellulärer Prozessierung unterschiedlich stark transfizieren. Eine weitere mögliche zelluläre Barriere ist die intrazelluläre Dissoziation der Komplexe. Dies wird in den folgenden Versuchsreihen untersucht.

#### 4.5.1.1 Herstellung und Charakterisierung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Paar für die Dissoziationsanalytik der Lipid/DNA-Komplexe eingesetzt (vgl. 1.5). Dafür wird Cy3 nach 3.2.4 kovalent an die DNA gebunden. DC 30<sup>®</sup>-Ausgangsliposomen werden nach 3.1.4 mit einem unterschiedlichen Anteil Cy5-DOPE hergestellt (0,1/1/10 % Cy5-DOPE/DOPE (m/m)). Beide Komponenten werden nach dem Standardprotokoll 3.3.1 mit DNA (0,005 µg/µl) zu Lipid/DNA-Komplexen 8:1 (m/m) komplexiert. Für die Berechnungen der FRET-Emissionen und FRET-Effizienzen (siehe 3.11) werden neben den doppelt gefärbten Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Komplexen einfach gefärbte (Cy3-DNA = Donor-Komplexe oder Cy5-DOPE = Akzeptor-Komplexe) und ungefärbte Komplexkontrollen hergestellt.

Die Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen der FRET-Komplexe sowie der Komplexkontrollen werden mittels PCS untersucht und mit dem NNLS-Modus ausgewertet (siehe 3.4.1). Die Polydispersitäten der Komplexproben liegen zwischen 0,2 - 0,28. Die Maxima der Partikelgrößenverteilungen befinden sich in einem Größenbereich zwischen 461 - 1425 nm. Aufgrund der Breite der Partikelgrößenverteilung (vgl. 4.1) lässt sich kein wesentlicher Größenunterschied zwischen FRET-Komplexen und Komplexkontrollen feststellen, außer dass lediglich Lipid/Cy3-DNA-Komplexe (Donor-Komplexe) eine zweite Partikelpopulation bei ~ 200 nm zeigen.

#### 4.5.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Cy3-DNA und Cy5-DOPE

Um zu überprüfen, ob FRET zwischen den beiden FRET-Partnern (Cy3-DNA und Cy5-DOPE 1 % (m/m)) stattfindet, werden die Komplexe fluoreszenzspektrometrisch

untersucht (siehe 3.4.3). Nach Anregung des Donors bei 488 nm wird die Fluoreszenzemission des Akzeptors bei 670 nm gemessen (FRET-Einstellung, siehe 3.4.3). Für die FRET-Komplexe kann eine Akzeptoremission nach Anregung des Donors gemessen werden, die bei den einfach gefärbten Komplexkontrollen nicht auftritt. Dieses FRET-Signal wird mit Hilfe verschiedener FRET-Berechnungen der Literatur quantifiziert (siehe 3.11):

Nach Korrektur der Hintergrundfluoreszenz sowie spektraler Überlappungen wird die *sensitized* FRET-Emission  $F_c$ , wie unter 3.11.1 beschrieben, bestimmt ( $14,4 \pm 2,4$ ) (Abb. 4-59 A).

Darüber hinaus wird die FRET-Effizienz  $E_a$  berechnet, die das Akzeptorsignal zusätzlich normiert (3.11.2).  $E_a$  der FRET-Komplexe beträgt  $66,7 \pm 3,0$  %.

Die FRET-Effizienz kann nicht nur über das Emissionssignal des Akzeptors (FRET-Einstellung, siehe 3.4.3) bestimmt werden, sondern auch über die gleichzeitige Reduktion des Donoremissionssignals (Donor-Einstellung siehe 3.4.3). Diese ergibt sich aus dem Energieverlust, der bei der FRET-Anregung des Akzeptors verloren geht, und wird als *Donor-Quenching* ( $E_d$ ) bezeichnet. In Abbildung 4-59 A beträgt  $E_d$   $66,7 \pm 1,6$  % und entspricht damit  $E_a$ .

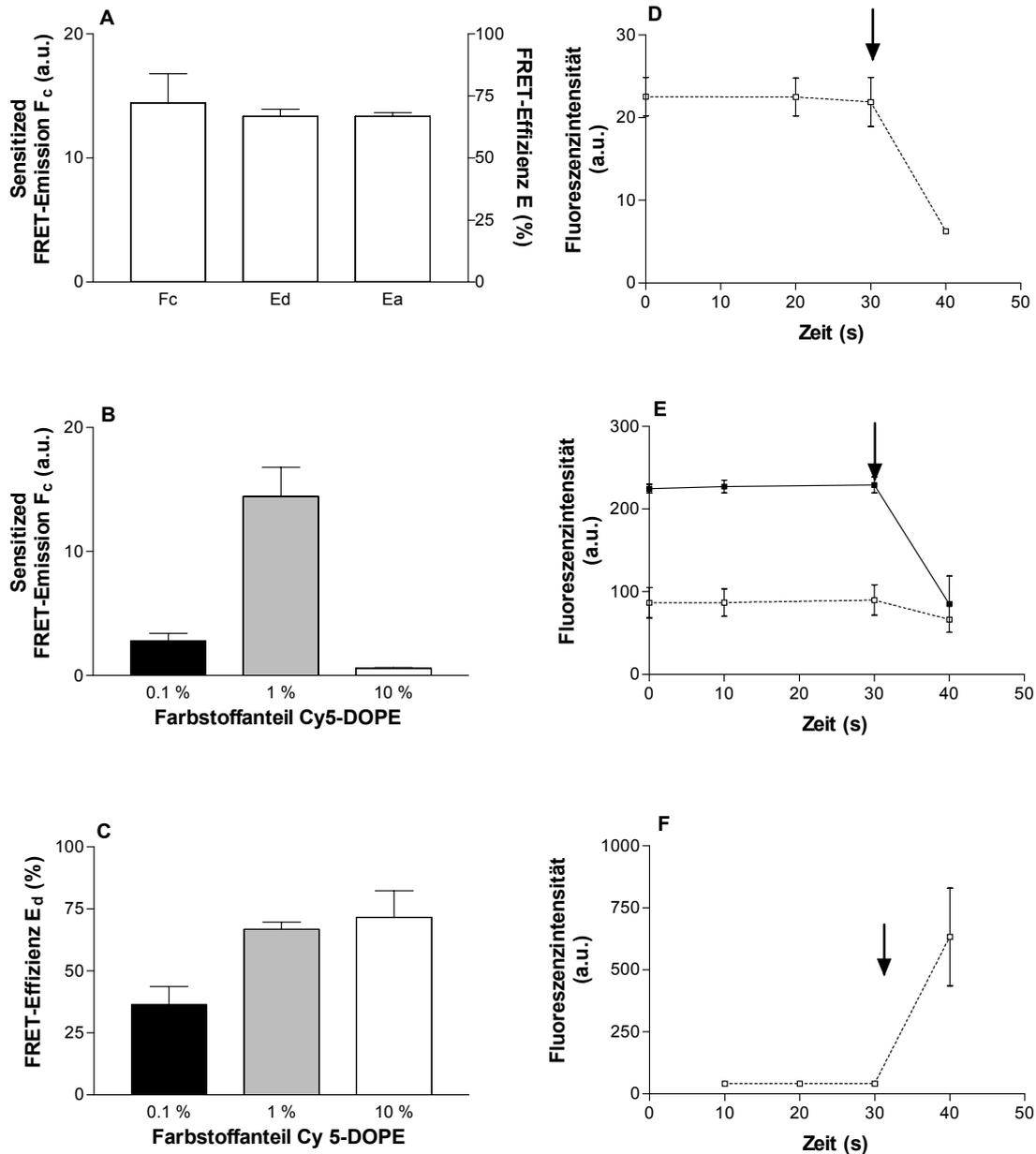
In einer weiteren Versuchsreihe wird untersucht, ob das FRET-Signal durch Veränderung des Cy5-DOPE Massenanteils der Ausgangsliposomen gesteigert werden kann (Abb. 4-59 B,C).

Eine Reduktion des Cy5-DOPE Farbstoffanteils verringert das FRET-Signal.  $F_c$  fällt auf  $2,6 \pm 0,99$ ,  $E_d$  auf  $36,4 \pm 7,3$  %. Beim Einsatz eines höheren Cy5-DOPE Farbstoffanteils (10 % Cy5-DOPE) fällt  $F_c$  von 14,4 auf  $0,5 \pm 0,13$ . Die Donoremission  $E_d$  bleibt hingegen unverändert ( $71,6 \pm 10,7$  %). Das Abweichen des Donorsignals kann in diesem Fall mit einem konzentrationsabhängigen *Quenching* des Farbstoffs Cy5 erklärt werden (Gruber *et al.* 2000). Das *Quenching* des Donors wird bei hohen Cy5-Konzentrationen nicht mehr allein durch den Energietransfer des FRET bestimmt. Dies zeigt, dass eine verlässliche FRET-Analytik immer die Analytik des Donor- und des Akzeptorsignals berücksichtigen muss.

Das FRET-Signal kann in allen Versuchsreihen durch eine Dissoziation der Komplexe mit Zwittergent<sup>®</sup> gelöscht werden (siehe 3.4.3) (Abb. 4-59 D). Gleichzeitig wird durch die Komplexzerstörung das *Donor-Quenching* aufgehoben, so dass das Donor-Emissionssignal von Kontrolle und FRET-Komplex sich wieder entsprechen (Abb. 4-59 E). Interessanterweise steigt das Cy5-DOPE Fluoreszenzsignal bei höheren Konzentrationen

(10 % Cy5-DOPE) nach Komplexdissoziation stark an (Abb. 4-59 F). Dies bestätigt das konzentrationsabhängige *Quenching* des Cy5-DOPE Farbstoffes, durch das die Fluoreszenzintensität von Cy5-DOPE im Komplex reduziert wird. Dies wird durch Dissoziation des Komplexes aufgehoben.

Die in dieser Arbeit gemessenen FRET-Emissionen und FRET-Effizienzen deuten im Vergleich zu bereits beschriebenen FRET-Systemen für Lipid/DNA-Komplexe auf einen effizienten Energietransfer hin (Zhang *et al.* 2003; Matsumoto *et al.* 2009).



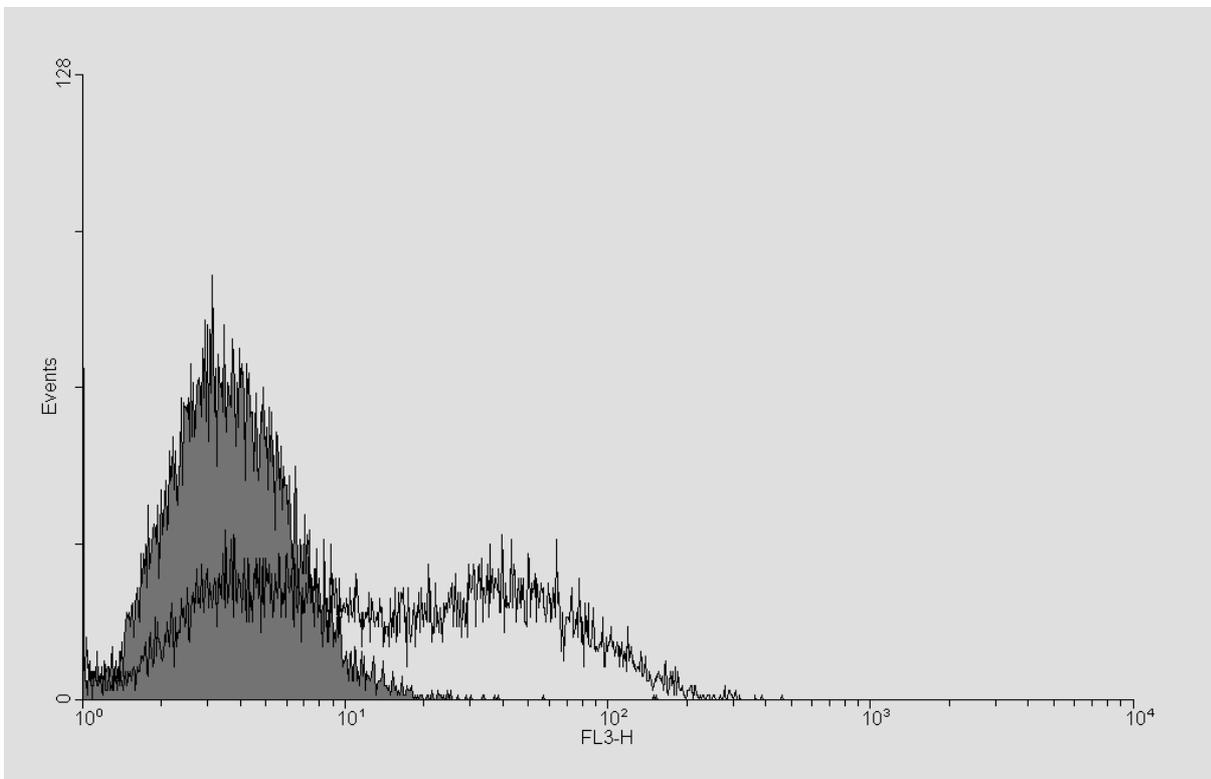
#### Abbildung 4-59: Fluorimetrische Bestimmung des Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe und Kontrollkomplexe 8/1 (m/m) wurden fluorimetrisch vermessen (siehe Einstellungen 3.4.3). A: Berechnung der *sensitized* FRET-Emission  $F_c$  und der FRET-Effizienzen  $E_a$  und  $E_d$  für Komplexe mit 1 % Cy5-DOPE (m/m). B,C: Veränderung des Cy5-DOPE Anteils auf 0,1 und 10 %. D-F: Dissoziation der Komplexe mit einem zwitterionischen Detergenz. Inkubation des Detergenz wird durch Pfeil angezeigt. D: FRET-Emission der FRET-Komplexe (1 % Cy5-DOPE). E: Donor-Emission der FRET-Komplexe (1 % Cy5-DOPE) (Punkte) und Donor-Komplexe (Linie). F: Akzeptor-Emission der Akzeptor-Komplexe (10 % Cy5-DOPE) ( $n \geq 2$ ,  $\pm$  SEM).

### 4.5.1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Cy3-DNA und Cy5-DOPE im zellulären Modell

Nachdem ein effizienter Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen Cy3-DNA und Cy5-DOPE innerhalb der untersuchten Lipid/DNA-Komplexe gezeigt werden konnte, wird in der folgenden Versuchsreihe geprüft, ob sich dieses Signal auch intrazellulär bestimmen lässt. Dafür werden A-10 Zellen 3 h mit den verschiedenen Komplexen inkubiert. Die Zellen werden anschließend durchflusszytometrisch (siehe 3.6.3) oder fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.8.2) analysiert und anhand dieser Daten die FRET-Effizienzen  $E_d$  und  $E_a$  berechnet. Auf die Berechnung der *sensitized* FRET-Emission  $F_c$  wird verzichtet, da eine Normierung und damit eine Berücksichtigung der Farbstoffkonzentration in Zellversuchen notwendig sind. Schließlich ist die metabolische Aktivität der Zellen und damit die Komplexaufnahme und Farbstoffkonzentration jeder Probe natürlichen Schwankungen unterworfen.

In der durchflusszytometrischen Messung werden Lipid/DNA-Komplexe von 78 % der Zellen aufgenommen (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den Daten der Endozytoseexperimente (vgl. 4.2.2.1).



**Abbildung 4-60: FACS-Histogramm des intrazellulären FRET**

Repräsentative durchflusszytometrische Messung einer ungefärbten Komplexkontrolle (schwarz) und einer FRET-Komplexprobe bei FRET-Einstellung des Gerätes (vgl. 3.6.3).

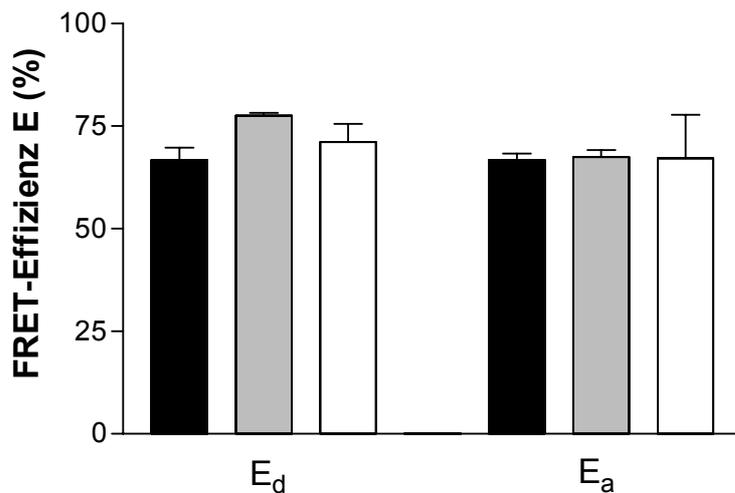
Wie in den Fluorimeterversuchen (vgl. 4.5.1.3) wird die Fluoreszenzemission des Akzeptors nach Anregung des Donors durchflusszytometrisch gemessen (FRET-Einstellung, siehe 3.6.3). Die FRET-Komplexe zeigen bei dieser Einstellung eine starke Fluoreszenz des Akzeptors (Abb. 4-60).

Auf Grundlage dieser FRET-Emission wird die FRET-Effizienz  $E_a$  bestimmt ( $67,4 \pm 1,6 \%$ ) (Abb. 4-61). Dieser Wert entspricht den Berechnungen vor der zellulären Inkubation (vgl. 4.5.1.2) und zeigt an, dass Lipid/DNA-Komplexe nach zellulärer Aufnahme zunächst unverändert, nämlich vollständig komplexiert, vorliegen.

Dies wird durch die FRET-Effizienz  $E_d$  ( $77,5 \pm 0,7 \%$ ) bestätigt. Im Gegensatz zu den Vorversuchen 4.5.1.2, in denen keine zelluläre Inkubation stattfindet, unterscheiden sich  $E_d$  und  $E_a$  hier signifikant ( $p < 0,05$ ). Dies kann durch die Berechnung beider Effizienzen begründet werden (3.11.2 und 3.11.3):

Bei der Berechnung von  $E_d$  ist zu berücksichtigen, dass bei der Normierung zwei unterschiedliche Proben miteinander verglichen werden ( $I_{DA}$  = FRET-Komplex und  $I_D$  = Donor-Komplex). Dies setzt die exakt gleiche zelluläre Aufnahme beider Komplexe voraus. Denn nur in diesem Fall liegen in beiden Fällen gleiche Farbstoffkonzentrationen vor und die Fluoreszenzintensitäten  $I_{DA}$  und  $I_D$  unterscheiden sich ausschließlich durch den Energiebetrag des FRET (Horvath *et al.* 2005). Da eine exakt gleiche zelluläre Aufnahme der verschiedenen Komplexe nicht bewiesen werden kann (unterschiedliche Farbstoffe und damit PMT-Einstellungen des Durchflusszytometers), ist die Bestimmung von  $E_d$  für Lipid/DNA-Komplexe fehlerbehaftet.

Dieser Fehler könnte bei einer stärkeren Aufnahme der Donor-Kontrollen zur Steigerung der FRET-Effizienz  $E_d$  im Zellversuch führen. Da die Partikelgröße einen wesentlichen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme hat (Rejman *et al.* 2004), könnte das Auftreten der zusätzlichen Partikelpopulation von  $\sim 200$  nm bei Donor-Komplexen (vgl. 4.5.1.1) eine solche Zunahme der zellulären Aufnahme erklären. Die Zunahme von  $E_d$  nach zellulärer Inkubation bedeutet anschaulich eine zunehmende Komplexierung beider Komponenten nach Zellaufnahme. Ein steigendes Signal nach zellulärer Aufnahme scheint mit diesem FRET-System allerdings unwahrscheinlich.



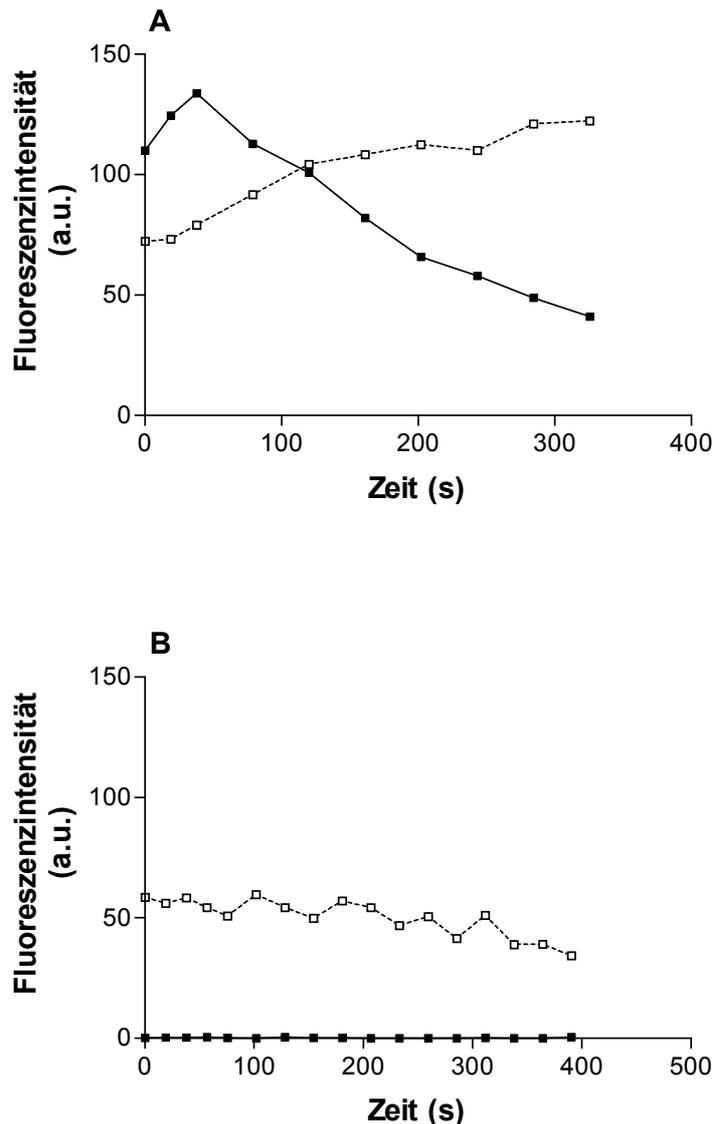
#### Abbildung 4-61: Berechnung der intrazellulären FRET-Effizienz

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe und Kontrollkomplexe 8/1 (m/m) wurden 3 h in A-10 Zellen inkubiert und die Fluoreszenzemissionen durchflusszytometrisch (graue Balken) oder fluoreszenzmikroskopisch (weiße Balken) gemessen. Berechnung der FRET-Effizienzen  $E_d$  und  $E_a$  und Vergleich mit den fluorimetrischen Versuchen (schwarze Balken, vgl. Abb. 4-59) ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM).

Mit der Fluoreszenzmikroskopie wird eine zweite zytometrische Methode eingeführt.

Dafür werden 4 Bilder der nach Kompleinkubation fixierten Zellen aufgenommen, darin > 50 Zellen mit Hilfe der CellProfiler Software segmentiert und die Fluoreszenzintensitäten bestimmt (siehe 3.8.2). Wie in den durchflusszytometrischen Experimenten liegt  $E_d$  ( $71,1 \pm 4,4$  %) über  $E_a$  ( $67,1 \pm 10,7$  %). Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant von den durchflusszytometrischen Ergebnissen ( $p > 0,8$ ).

Bei fluoreszenzmikroskopischer Analyse kann die FRET-Effizienz darüber hinaus über die Fluoreszenzveränderung des Donors beim Ausbleichen (*bleaching*) des Akzeptors bestimmt werden (siehe 3.8.2). In diesen Versuchen wird der Akzeptor durch Ausbleichen mit Hilfe eines Lasers zerstört (*bleaching*) und der FRET-Prozess dadurch unterbrochen (Wouters *et al.* 1998; Breunig *et al.* 2006). Dies führt zu einem Intensitätsanstieg der Donoremission, da der zuvor als FRET abgegebene Energiebetrag in Abwesenheit des Akzeptors nun wieder als Donorfluoreszenz emittiert wird. Dieser Prozess ist in Abbildung 4-62 A bei FRET-Komplexen zu erkennen. Die Donoremission der Kontrollkomplexe bleibt hingegen unverändert (Abb. 4-62 B).



#### Abbildung 4-62: Photobleaching des Akzeptors mit dem Fluoreszenzmikroskop

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe (A) und einfach gefärbte Donor-Komplexe (B) 8/1 (m/m) wurden 3 h in A-10 Zellen inkubiert. Cy5-DOPE wurde in den fixierten Zellen mit einem Laser bei 633 nm ausgebleicht und der Verlauf der Donor-Fluoreszenz (Punkte) und Akzeptor-Fluoreszenz (Linie) verfolgt (vgl. Donor- und Akzeptor-Einstellungen 3.8.2). Darstellung des repräsentativen Verlaufs.

Bei der Bestimmung der FRET-Effizienz über das Akzeptor-bleaching werden einzelne Lipid/DNA-Komplexe in definierten ROI (*regions of interest*) mikroskopiert. Die Stichprobenmenge ist dementsprechend klein. Die Anwendung dieser Methode setzt daher voraus, dass die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Lipid/DNA-Komplexe vergleichbar sind. Da die Zusammensetzung einzelner Lipid/DNA-Komplexe jedoch variiert (Breunig *et al.* 2006), unterscheiden sich die Fluoreszenzintensitäten einzelner Komplexe erheblich. Daher wird in der vorliegenden Arbeit auf eine Berechnung dieser

FRET-Effizienz verzichtet. Die gleiche Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration gilt für die Berechnung der FRET-Effizienz über die Kinetik des Donor-*bleachings* (Nagy *et al.* 1998), die ebenfalls in der Literatur häufig zu finden ist. Bei Verwendung des Cy3/Cy5 FRET-Paares wird das Donor-*bleaching* außerdem durch die hohe Photostabilität des Cy3-Farbstoffes erschwert (Jares-Erijman & Jovin 2003).

Mit Cy3-DNA/Cy5-DOPE kann somit ein neues FRET-System eingeführt werden, das allen Anforderungen einer Dissoziationsanalytik für Lipid/DNA-Komplexe entspricht:

Dieses FRET-System ermöglicht einen effizienten FRET, der auch in zellulären Systemen mit durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Methoden quantifizierbar ist. Ein vergleichbares FRET-System ist bisher nicht publiziert.

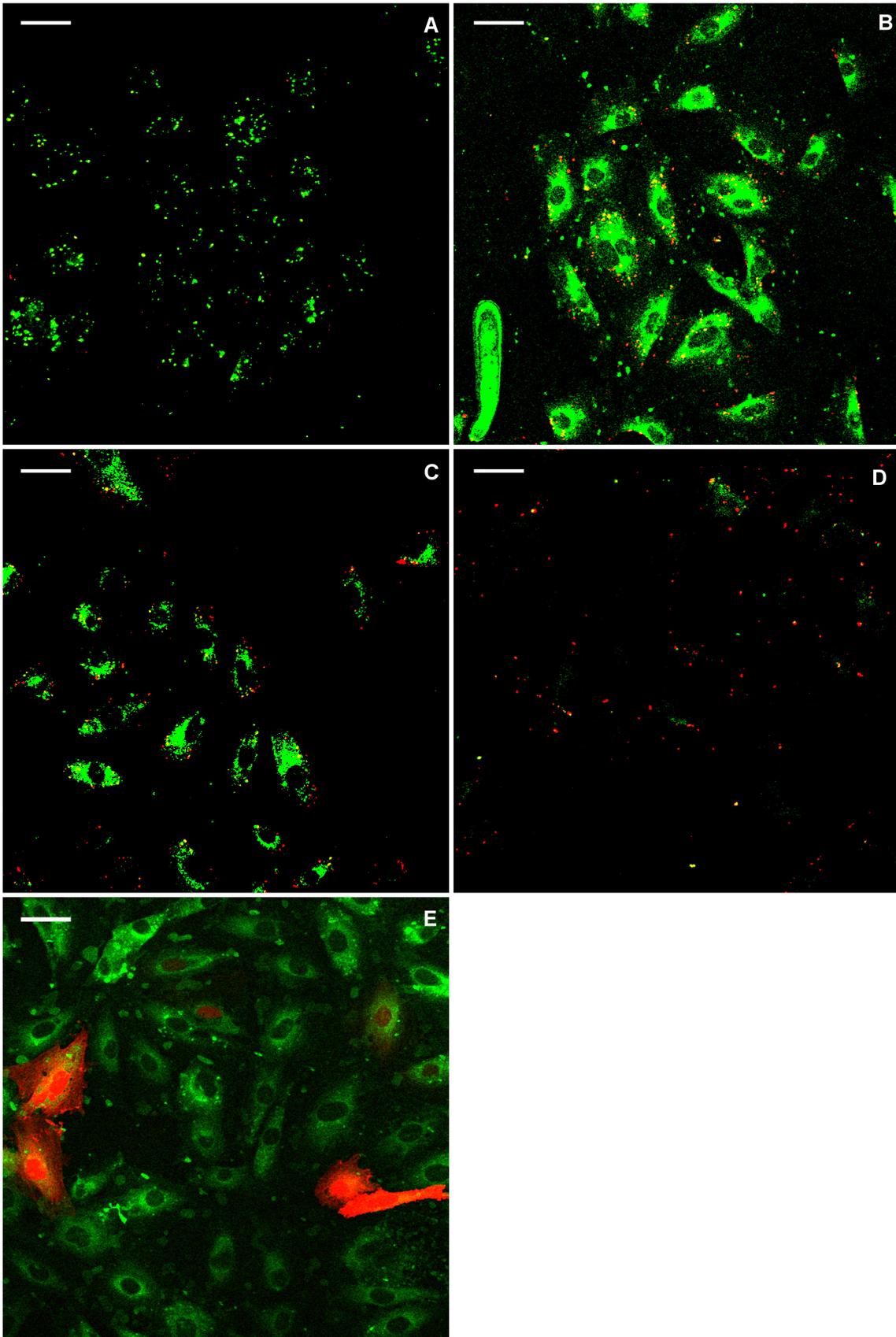
#### **4.5.2 Anwendung I: Intrazelluläre Dissoziationskinetik von Lipid/DNA-Komplexen**

Als erste Anwendung des Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Systems wird die intrazelluläre Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe kinetisch untersucht. Dafür werden A-10 Zellen nach dem Standardprotokoll (siehe 3.6.1) mit gemäß 4.5.1.1 hergestellten Lipid/DNA-Komplexen transfiziert. 3, 5, 9 und 24 h nach Start der Komplexinkubation werden die Zellen durchflusszytometrisch (siehe 3.6.3) und fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.8.2) analysiert. Neben der Berechnung der FRET-Effizienzen (siehe 3.11.2 und 3.11.3) wird die intrazelluläre Dissoziation auch durch konfokale Kolokalisationsstudien verfolgt (siehe 3.8.2).

##### **4.5.2.1 Konfokale Kolokalisationsstudien**

In den konfokalen Aufnahmen der 3 h mit FRET-Komplexen inkubierten Zellen (Abb. 4-63 A) kolokalisieren beide Fluoreszenzsignale (Cy3-DNA und Cy5-DOPE). Das Ausmaß dieser Kolokalisation wird als Pearson's Korrelationskoeffizient (PC) quantifiziert. Dieser Koeffizient gibt die Korrelation beider Fluoreszenzsignale an, die bei PC = +1 maximal, bei PC = 0 nicht vorhanden ist (Bolte & Cordelieres 2006). Die Kolokalisationsstudie von Cy3-DNA und Cy5-DOPE nach 3 h ergibt einen PC von 0,59. Die starke Kolokalisation von Cy3-DNA und Cy5-DOPE deutet an, dass zu diesem Zeitpunkt beide Komplexkomponenten komplexiert vorliegen. Dies bestätigt das Ergebnis der  $E_a$ -Berechnung (vgl. 4.5.1.3).

Nach 5 h Inkubation (Abb. 4-63 B) tritt ein zusätzliches Cy5-DOPE-Signal im Zytoplasma auf, das nicht mehr mit Cy3-DNA kolokalisiert. Eine ähnliche zelluläre Verteilung wird für PEI/DNA-Komplexe in der Literatur beschrieben (Itaka *et al.* 2004). Durch einen Medienwechsel werden die Lipid/DNA-Komplexe aus dem Überstand entfernt und die intrazelluläre Dissoziation weiter verfolgt. Das zytoplasmatische Cy5-DOPE-Signal bleibt weitere 4 h unverändert (Abb. 4-63 C). Gleichzeitig beginnt nun in ersten Zellen die GFP-Expression des Plasmids. Mit den konfokalen Aufnahmen nach 24 h wird der Versuch beendet. Die GFP-Expression ist nun stärker ausgeprägt (Abb. 4-63 E) und das zytoplasmatische Cy5-DOPE-Signal ist abgeschwächt. Im Gegensatz dazu bleibt das Cy3-DNA-Signal auch nach 24 h weitgehend unverändert (Abb. 4-63 D). Die Berechnung des Kolokalisationskoeffizienten PC ( $PC_{24\text{ h}} = 0,16$ ) quantifiziert die Abnahme der Kolokalisation beider Signale (PC-Verhältnis:  $PC_{24\text{ h}}/PC_{3\text{ h}} = 70\%$ ) und zeigt damit die Dissoziation der Komplexe an.

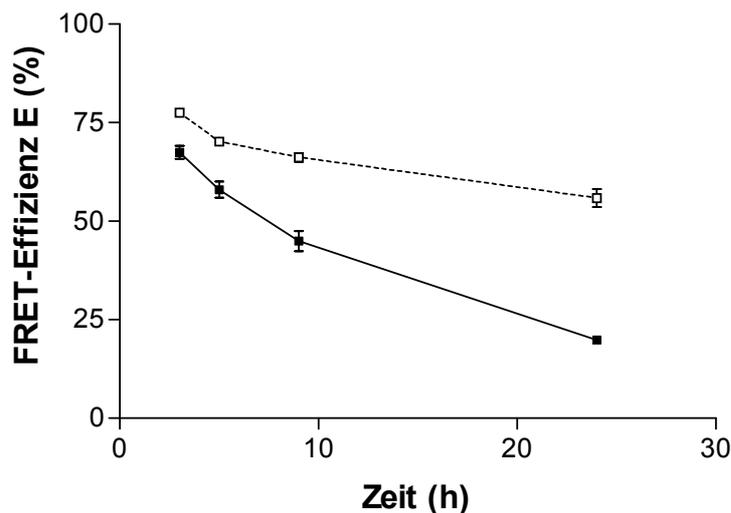


**Abbildung 4-63: Kolokalisation von Cy3-DNA und Cy5-DOPE**

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h (A-D) in A-10 Zellen inkubiert. Überlagerung der Einzelbilder von Donor- (rot) und Akzeptorfluoreszenz (grün) (siehe 3.8.2). E: GFP-Expression (rot) nach 24 h. Konfokale Mikroskopie. Größenmaßstab = 50 μm.

#### 4.5.2.2 FRET-Effizienzen

Die FRET-Effizienz  $E_a$  wird zunächst durchflusszytometrisch zu den Zeitpunkten 3, 5, 9 und 24 h bestimmt (Abb. 4-64). Wie unter 4.5.1.3 beschrieben und durch die konfokalen Aufnahmen bestätigt, liegen Lipid/DNA-Komplexe nach zellulärer Aufnahme (3 h) zunächst unverändert komplexiert vor ( $E_a = 67,4 \pm 1,6 \%$ ). Mit zunehmender Inkubationsdauer sinkt  $E_a$  (5 h:  $E_a = 58,0 \pm 2,1 \%$  und 9 h:  $E_a = 45,0 \pm 2,1 \%$ ) und erreicht am Versuchsende (24 h) schließlich ein Minimum ( $E_a = 19,9 \pm 0,3 \%$ ). Zu diesem Zeitpunkt exprimieren 10 % der Zellen bereits GFP (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass Lipid/DNA-Komplexe effizient in A-10 Zellen dissoziieren (FRET-Verhältnis:  $E_a$  24 h/ $E_a$  3 h = 30 %). Infolgedessen kann freie DNA im Zellkern abgelesen und GFP exprimiert werden. Die Entwicklung der  $E_a$ -Werte bestätigt damit die konfokalen Studien.

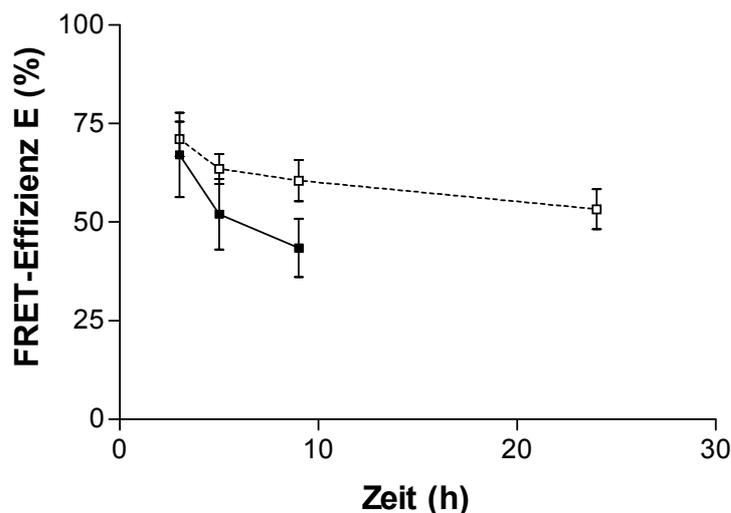


#### Abbildung 4-64: Durchflusszytometrische Bestimmung der intrazellulären FRET-Kinetik

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe und Kontrollkomplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h in A-10 Zellen inkubiert und die Fluoreszenzemissionen durchflusszytometrisch gemessen. Berechnung der FRET-Effizienzen  $E_d$  (Punkte) und  $E_a$  (Linie) ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM). Der Ausgangswert von  $E$  (0 h) entspricht den fluorimetrischen Ergebnissen aus Abb. 4-59.

Die Berechnung der FRET-Effizienzen  $E_d$  (Abb. 4-64) resultiert, wie bereits unter 4.5.1.3 beschrieben, zu allen Zeitpunkten in höheren Werten als  $E_a$ . Die schwache Abnahme der FRET-Effizienz (FRET-Verhältnis:  $E_d$  24 h/ $E_d$  3 h = 79 %) widerspricht den Ergebnissen der  $E_a$ -Berechnung und den konfokalen Kollokalisationsstudien. Dieser Widerspruch kann, wie unter 4.5.1.3 diskutiert, durch die Berechnung von  $E_d$  erklärt werden.

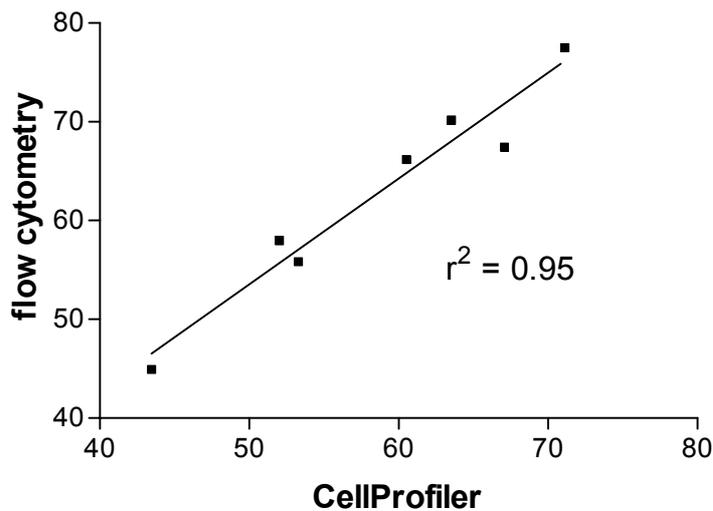
Die FRET-Effizienzen  $E_d$  und  $E_a$  werden darüber hinaus fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Abb. 4-65). Der Verlauf beider FRET-Effizienzen entspricht den durchflusszytometrischen Bestimmungen. Aufgrund der deutlich geringeren Stichprobenmenge (> 50 Zellen) ist diese Bestimmungsmethode der Durchflusszytometrie statistisch unterlegen. Dies zeigt sich in den höheren Standardfehlern der Ergebnisse (7,4 - 10,7 %). Insbesondere verhindert die geringe Stichprobenmenge aber die Berechnung von  $E_a$  zum Zeitpunkt 24 h. Die Berechnung von  $E_a$  (siehe 3.11.2) kann bei sehr niedrigen  $F_c$ -Werten, wie sie bei dissoziierenden Komplexen nach 24 h zu erwarten sind, zu falsch-positiven  $E_a$ -Werten führen ( $E_a > 1$ ) (Horvath *et al.* 2005). Zwar erlaubt die CellProfiler Analyse dieser Studie den Ausschluss dieser Werte, die verbleibende Stichprobenmenge ermöglicht dann jedoch keine statistisch exakte Bestimmung von  $E_a$  mehr.



#### Abbildung 4-65: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären FRET-Kinetik

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe und Kontrollkomplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h in A-10 Zellen inkubiert und die Fluoreszenzemissionen fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Berechnung der FRET-Effizienzen  $E_d$  (Punkte) und  $E_a$  (Linie) ( $n = 3$ ,  $\pm$  SEM). Der Ausgangswert von E (0 h) entspricht den fluorimetrischen Ergebnissen aus Abb. 4-59.

Trotz der statistisch begrenzten Aussagekraft der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse können diese mit den durchflusszytometrischen Daten gut korreliert werden (Abb. 4-66).



**Abbildung 4-66: Korrelation von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie**  
Die FRET-Effizienzen der Abbildungen 4-64 und 4-65 wurden korreliert.

Diese Versuche zeigen, dass die Dissoziationskinetik der Lipid/DNA-Komplexe mit Hilfe des Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Systems aufgelöst werden kann. Lipid/DNA-Komplexe liegen nach kurzen Inkubationszeiten (3 h) intrazellulär unverändert komplexiert vor. Vergleichbare Ergebnisse sind für polymerbasierte Gentransfersysteme publiziert (Itaka *et al.* 2004; Ho *et al.* 2006; Breuzard *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008). Die intrazelluläre FRET-Analytik von Lipid/DNA-Komplexen wird bisher nur in einer Arbeit beschrieben (Matsumoto *et al.* 2009). Matsumoto *et al.* entwickeln in ihrer Arbeit ein FITC-DNA/Cy3-DNA FRET-System. Dieses FRET-System zeigt durch die Doppelfärbung der DNA eine Veränderung der DNA-Faltung innerhalb der Komplexstruktur an (vgl. 1.5.1). Mit diesem System sind FRET-Werte nach kurzer Zellinkubation nicht messbar, möglicherweise weil die *Sandwich*-Struktur der Komplexe zu diesem Zeitpunkt zu wenige DNA-DNA Kontakte zulässt (Matsumoto *et al.* 2009). Das hier verwendete Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-System gibt hingegen die tatsächliche räumliche Trennung beider Komponenten und somit die Komplexdissoziation wieder. Dies ermöglicht die vollständige kinetische Auflösung der Dissoziation.

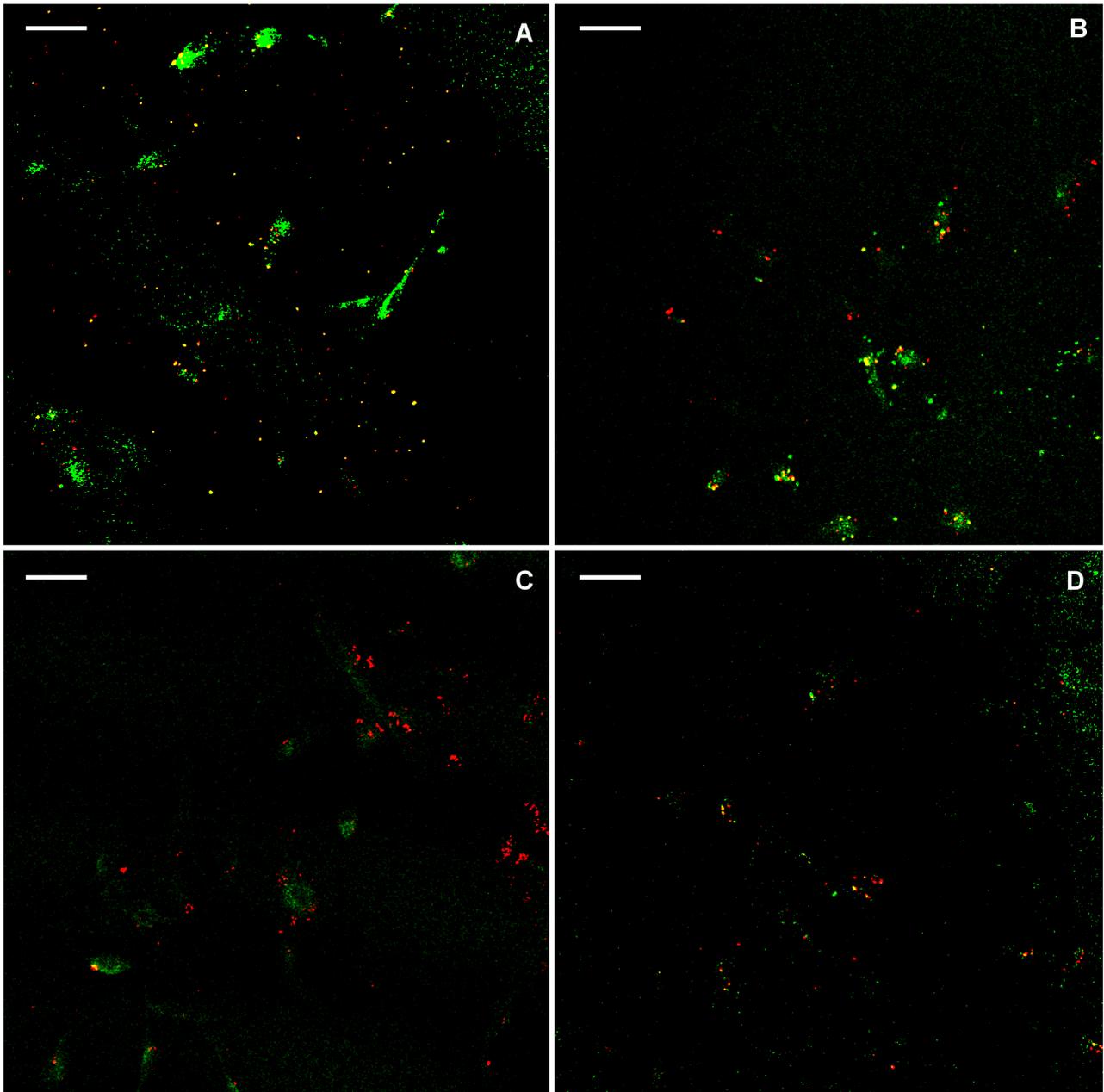
Die FRET-Ergebnisse und konfokalen Aufnahmen beweisen, dass Lipid/DNA-Komplexe mit zunehmender Inkubationsdauer in A-10 Zellen effizient dissoziieren und damit eine erfolgreiche Transfektion ermöglichen. Die effiziente Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen entspricht den bisher veröffentlichten Daten (Matsumoto *et al.* 2009; Ruponen *et al.* 2009).

### **4.5.3 Anwendung II: Abhängigkeit der Komplexdissoziation vom Zellmodell**

Die Abschnitte 4.2 - 4.4 dieser Arbeit betrachten die unterschiedlich effiziente Transfektion von DC 30<sup>®</sup>-Lipoplexen in zwei Zellmodellen: A-10 und MDCK II Zellen. In Abschnitt 4.5.2 kann gezeigt werden, dass Lipid/DNA-Komplexe in der effizient transfizierten Zelllinie A-10 auch effizient intrazellulär dissoziieren. Um die intrazelluläre Dissoziation beider Zelllinien vergleichen zu können, werden die Versuche aus 4.5.2 nun analog in der schwach transfizierten Zelllinie MDCK II durchgeführt.

#### **4.5.3.1 Konfokale Kollokalisationsstudien**

Nach kurzer Inkubation (3 h) Cy3-DNA/Cy5-DOPE gefärbter Lipid/DNA-Komplexe kollokalisieren beide Farbstoffe (PC 3 h = 0,23). Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Kollokalisationsrate ab und erreicht nach 24 h ein Minimum (PC 24 h = 0,059). Damit unterscheiden sich die konfokalen Dissoziationsstudien nicht von den Bildaufnahmen der A-10 Zelllinie (vgl. 4.5.2.1). Allerdings befinden sich in MDCK II Zellen deutlich weniger Komplexe, was aufgrund der Ergebnisse der Aufnahmeversuche zu erwarten ist (vgl. 4.2.2.1). Dies erklärt gleichzeitig die Unterschiede der absoluten PC-Werte in beiden Zellmodellen (Bolte & Cordelieres 2006).



**Abbildung 4-67: Kolokalisation von Cy3-DNA und Cy5-DOPE**

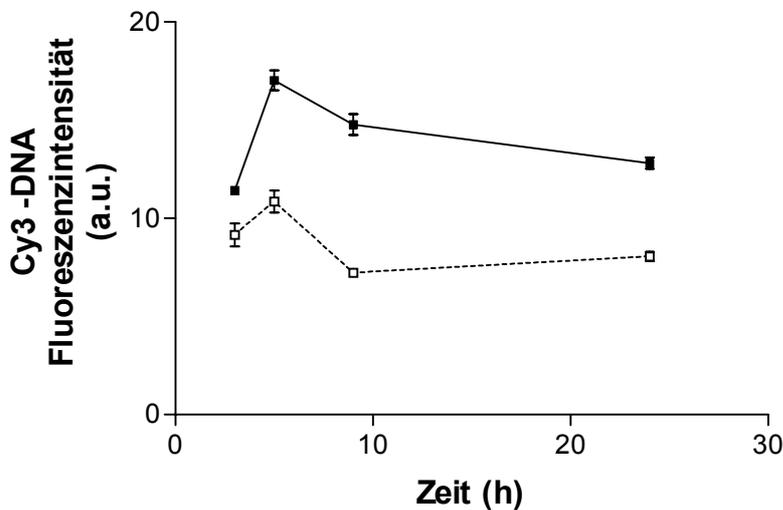
Doppelt gefärbte FRET-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h (A-D) in MDCK II Zellen inkubiert. Überlagerung der Einzelbilder von Donor- (rot) und Akzeptorfluoreszenz (grün) (siehe 3.8.2). Konfokale Mikroskopie. Größenmaßstab = 50  $\mu\text{m}$ .

**4.5.3.2 Durchflusszytometrische Messung der Kontrollkomplexe**

In den Kolokalisationsstudien beider Zellmodelle wird deutlich, dass Lipid/DNA-Komplexe mit zunehmender Inkubationsdauer dissoziieren und dementsprechend die Fluoreszenzsignale der Ausgangskomponenten wieder einzeln auftreten. Dabei ändert sich das Cy3-DNA-Signal über den untersuchten Zeitraum kaum und ist in beiden Zellmodellen vergleichbar. Das Cy5-DOPE-Signal hingegen ändert sich über die Zeit und tritt in der A-10 Zelllinie wesentlich stärker auf.

Wie bereits erwähnt, werden für die Berechnung der FRET-Effizienzen in allen Versuchen einfach gefärbte Kontrollkomplexe mit untersucht. Die durchflusszytometrische Messung dieser Donor- und Akzeptor-Komplexe spiegelt die Entwicklung der Einzelsignale der konfokalen Studien wieder.

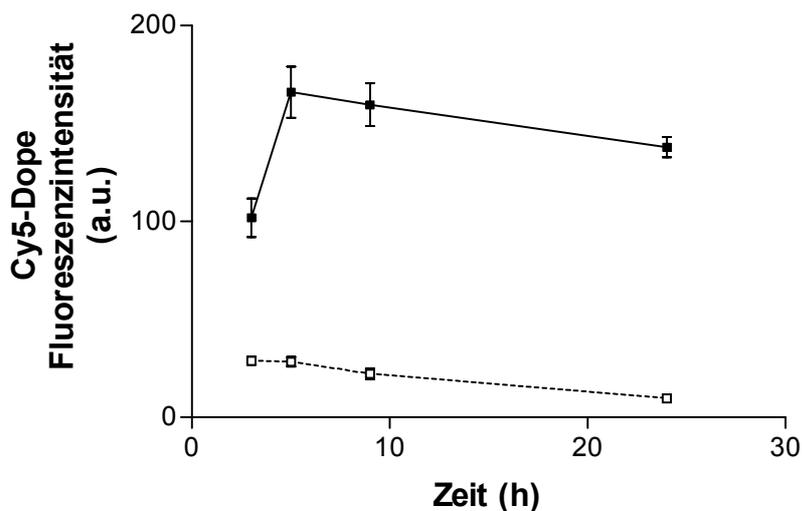
Das Fluoreszenzsignal der Cy3-DNA ändert sich auch in diesen Messungen über die Zeit nur gering (Abb. 4-68). So beträgt das Signal in der Zelllinie MDCK II nach einer Versuchsdauer von 24 h noch 74 % des Ausgangssignals (5 h), in der A-10 Zelllinie noch 75 %. In beiden Zelllinien findet sich damit eine vergleichbare Entwicklung dieses Messsignals.



**Abbildung 4-68: Durchflusszytometrische Bestimmung der Cy3-DNA Kinetik**

Donor-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h in A-10 Zellen (Linie) und MDCK II Zellen (Punkte) inkubiert und die Fluoreszenzemissionen durchflusszytometrisch gemessen (Donor-Einstellung, siehe 3.6.3) (n = 3, ± SEM).

Im Gegensatz dazu kann das Cy5-DOPE-Signal nach 24 h Versuchsdauer in der MDCK II Zelllinie nur noch mit 34 % des Ausgangssignals (5 h), in der A-10 Zelllinie aber mit 83 % detektiert werden (Abb. 4-69). Darüber hinaus werden in beiden Zellmodellen sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten gemessen.



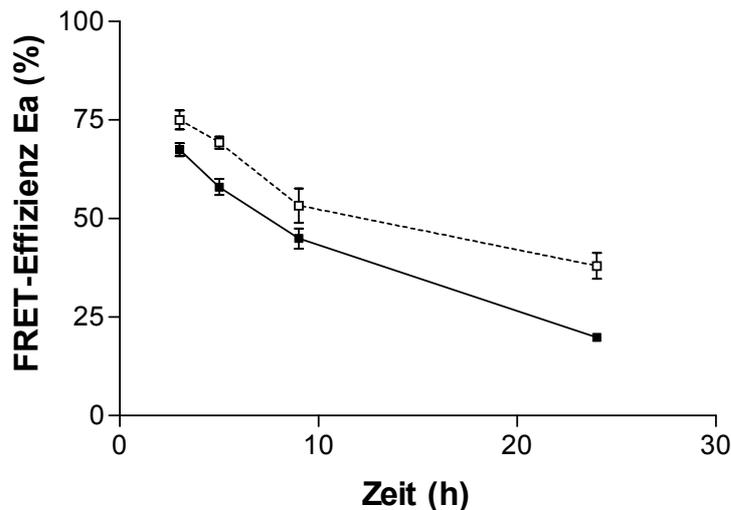
#### Abbildung 4-69: Durchflusszytometrische Bestimmung der Cy5-DOPE Kinetik

Akzeptor-Komplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h in A-10 Zellen (Linie) und MDCK II Zellen (Punkte) inkubiert und die Fluoreszenzemissionen durchflusszytometrisch gemessen (Akzeptor-Einstellung, siehe 3.6.3) ( $n = 3, \pm \text{SEM}$ ).

Dies bestätigt die Beobachtungen der konfokalen Studien. Die starken Unterschiede des Cy5-DOPE-Signals können möglicherweise wiederum durch das konzentrationsabhängige *Quenching* des Cy5-Farbstoffs erklärt werden (vgl. 4.5.1.2). Durch die stärkere Aufnahme der A-10 Zellen könnte das Cy5-DOPE-Signal nach Dissoziation der Komplexe unproportional stark steigen und so den Unterschied zur MDCK II Zelllinie erklären.

#### 4.5.3.3 FRET-Effizienzen

Aufgrund der Ergebnisse der Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Vorversuche (vgl. 4.5.1.3) wird ausschließlich die FRET-Effizienz  $E_a$  berechnet.  $E_a$  wird durchflusszytometrisch zu den Zeitpunkten 3, 5, 9 und 24 h bestimmt (Abb. 4-70). Wie durch die konfokalen Aufnahmen bestätigt, liegen die Lipid/DNA-Komplexe nach zellulärer Aufnahme (3 h) zunächst unverändert komplexiert vor ( $E_a = 75,0 \pm 2,4 \%$ ). Mit zunehmender Inkubationsdauer bis zu 24 h sinkt  $E_a$  (5 h:  $E_a = 69,3 \pm 1,5 \%$  und 9 h:  $E_a = 53,3 \pm 4,4 \%$ ). Mit Versuchsende (24 h) erreicht  $E_a$  den niedrigsten Messwert ( $E_a = 38,0 \pm 3,3 \%$ ).



#### Abbildung 4-70: Berechnung der intrazellulären FRET-Kinetik

Doppelt gefärbte FRET-Komplexe und Kontrollkomplexe 8/1 (m/m) wurden 3, 5, 9 und 24 h in A-10 (Punkte) und MDCK II Zellen (Linie) inkubiert und die Fluoreszenzemissionen durchflusszytometrisch gemessen. Berechnung der FRET-Effizienz  $E_a$  ( $n = 3, \pm \text{SEM}$ ).

Damit zeigt sich auch in der Zelllinie MDCK II eine Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe (FRET-Verhältnis: 24 h/3 h = 50,6 %). Die Dissoziation verläuft dabei nicht so effizient wie in der A-10 Zelllinie (FRET-Verhältnis: 24 h/3 h = 30 %). Bei 50 % Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe sollte jedoch ausreichend dekomplexierte DNA intrazellulär vorliegen, um eine effizientere Transfektion zu ermöglichen.

Die Dissoziation der Lipid/DNA-Komplexe stellt daher in beiden Zellmodellen keine wesentliche Transfektionsbarriere dar. Die Daten dieser Arbeit bestätigen damit die bisher durchgeführten Arbeiten zur intrazellulären Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen (Matsumoto *et al.* 2009; Ruponen *et al.* 2009).

#### 4.5.4 Diskussion und Ausblick

Mit der Entwicklung des Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-Systems kann eine neue Dissoziationsanalytik für Lipid/DNA-Komplexe eingeführt werden.

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen FRET-Systemen (Zhang *et al.* 2003; Matsumoto *et al.* 2009) ermöglicht das Cy3-DNA/Cy5-DOPE FRET-System eine effiziente zytometrische Bestimmung.

Die durchflusszytometrische FRET-Bestimmung der Lipid/DNA-Komplexdissoziation erlaubt die Messung großer Probenmengen und dadurch eine statistisch fundierte Analyse. Eine vergleichbare Analytik ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Als weitere Methode wird die fluoreszenzmikroskopische Analyse getestet. Das Potenzial dieser Methode liegt insbesondere in der exakten Lokalisierung des FRET-Signals. So konnte bereits die Existenz kondensierter und/oder dissoziierter Komplexe im Zellkern analysiert werden (Matsumoto *et al.* 2009). In Fortführung der vorliegenden Arbeit könnte außerdem die Dissoziation der Komplexe in spät-endosomalen Kompartimenten untersucht werden, die als Zielkompartiment der endozytotischen Prozessierung identifiziert werden konnten (vgl. 4.3.2.5). Mit der FRET-Analyse dieser Zielkompartimente könnte die Dissoziationsanalytik so auf die endozytotisch interessanten Kompartimente konzentriert werden. Die meisten fluoreszenzmikroskopischen FRET-Analysen intrazellulärer Dissoziation beschreiben polymerbasierte Gentransfersysteme (Itaka *et al.* 2004; Breunig *et al.* 2006; Ho *et al.* 2006; Breuzard *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008; Matsumoto *et al.* 2009), während Lipid/DNA-Komplexe bislang nicht ausreichend untersucht worden sind.

Um das Potenzial der Fluoreszenzmikroskopie auszuschöpfen, muss die eingeschränkte statistische Aussagekraft verbessert werden (Nagy *et al.* 1998). Dazu wird in der vorliegenden Arbeit die CellProfiler Analyse eingeführt. Diese Software ermöglicht ein *High-Throughput-Screening* von Fluoreszenzbildern (Carpenter *et al.* 2006) (vgl. 1.5.2.2). Die vorliegende Arbeit beweist die Anwendbarkeit dieser Analytik durch Korrelation mit durchflusszytometrischen Daten. Auf Grundlage dieser Arbeit sollte eine Erweiterung der Stichprobenmenge mittels CellProfiler in weiteren Studien möglich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen die endozytotische Prozessierung und die Dissoziation der Komplexe als wesentliche Barrieren einer effizienten Transfektion aus. Die Bedeutung nachgeschalteter Barrieren konnte bei einem Vergleich viraler und lipid-basierter Transfektion bereits demonstriert werden (Hama *et al.* 2007). Die Überlegenheit viraler Transfektion wird in diesen Studien nicht mit einer effizienteren Prozessierung, sondern mit einer effizienteren Transkription und Translation begründet.

## 4.6 Rationelles Design von Lipid/DNA-Komplexen

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.1 zeigen, dass für eine Optimierung der Herstellung von Lipid/DNA-Komplexen, eine Komplex-Zielstruktur entwickelt werden muss. Dafür ist das jeweilige zelluläre Anforderungsprofil zu berücksichtigen. In den Abschnitten 4.2 - 4.5 werden daher zelluläre Aufnahme, Prozessierung und Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen in den Zellmodellen A-10 und MDCK II untersucht. Beide Zellmodelle internalisieren Lipid/DNA-Komplexe über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose. Aus der Literatur sind Präferenzen beider Endozytosewege für bestimmte Partikelgrößen, -ladungen und -formen bekannt (Hillaireau & Couvreur 2009), die als Leitlinien bei der Entwicklung einer Komplex-Zielstruktur dienen können:

1. Partikelgröße: Partikel im Größenbereich 50 - 200 nm werden bevorzugt über Clathrin-Endozytose aufgenommen, während größere Partikel verstärkt über Caveolae-Endozytose prozessiert werden (Rejman *et al.* 2004).
2. Partikelladung: Partikel mit einer positiven Oberflächenladung ( $\zeta = (+15) - (+30)$  mV) werden verstärkt über Clathrin-Endozytose prozessiert (Harush-Frenkel *et al.* 2008).
3. Partikelform: eine eindeutige Zuordnung von Partikelform und Endozytoseweg ist bisher nicht möglich (Hillaireau & Couvreur 2009).

Daraus ergibt sich eine Komplex-Zielstruktur für die Transfektion von MDCK II Zellen: Lipid/DNA-Komplexe sollten Partikelgrößen von 50 - 500 nm sowie positive Oberflächenladungen aufweisen. Dieses Profil steht im Widerspruch zu einigen Literaturdaten. So definiert Rakhmanova einen optimalen Größenbereich für Lipid/DNA-Komplexe von 650 - 1500 nm (Rakhmanova *et al.* 2004), bezieht sich dabei jedoch ausschließlich auf empirische Daten.

### 4.6.1 Anpassung der Komplexherstellung an die Zielstruktur

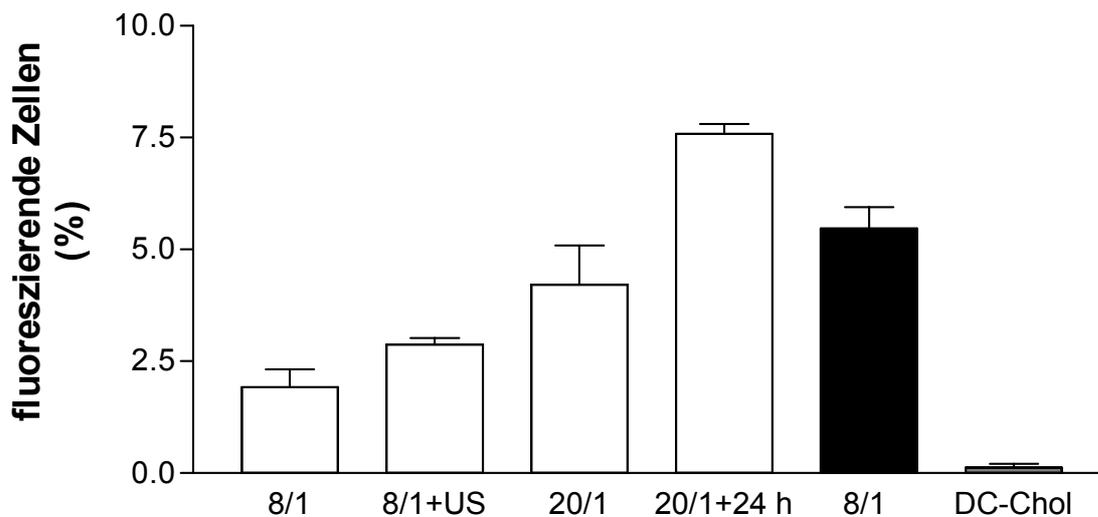
Lipid/DNA-Komplexe werden nach dem Standardprotokoll 3.3.1 hergestellt. Um die Komplexgröße einzustellen, werden die Ausgangsliposomen durch Ultraschallbehandlung (5-mal 30 s Ultraschallspitze) zerkleinert (siehe 3.1.3). Nach Komplexierung dieser

Ausgangsliposomen mit DNA bilden sich Komplexe mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 433,5 nm (vgl. 4.1.5).

Die Standardkomplexe dieser Arbeit bestehen aus einem Lipid/DNA-Verhältnis von 8/1 (m/m) (siehe 3.3.1). Clement zeigt in ihrer Arbeit, dass diese Komplexe trotz einer stöchiometrisch positiven Nettoladung von 1,6 ein negatives Zetapotenzial besitzen (Clement 2005). Daher wird die Oberflächenladung der Komplexe durch Erhöhung des Lipid/DNA-Verhältnisses auf 20/1 (m/m) und durch Variation der Lipidzusammensetzung zu DC-Cholesterol/DOPE 1/1 (m/m) verändert (siehe 3.3.1). Die Ausgangsliposomen dieser modifizierten Lipidzusammensetzung sind mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 405 nm deutlich kleiner als diejenigen der DC 30<sup>®</sup>-Mischung (d = 1730 nm), so dass auf eine Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen verzichtet werden kann.

#### **4.6.2 Transfektionseffizienz nach Anpassung der Komplexherstellung**

Die Transfektion von MDCK II Zellen kann durch eine Anpassung der Komplexgröße und Oberflächenladung leicht gesteigert werden. Den stärkeren Einfluss hat in diesen Versuchen die Anpassung der Oberflächenladung. Dies kann sowohl durch eine Erhöhung des Lipid/DNA-Verhältnisses als auch durch eine Veränderung der DC 30<sup>®</sup>-Lipidmischung zu DC-Cholesterol/DOPE 1/1 (m/m) erzielt werden. Eine weitere Zunahme der Transfektion ist durch eine Inkubation der Komplexe über 24 h möglich. Diese Feststellung passt zur dominanten Caveolae-abhängigen Endozytose in MDCK II Zellen (vgl. 4.2.3), die im Vergleich zur Clathrin-abhängigen Endozytose langsamer abläuft (Hillaireau & Couvreur 2009). Die Partikelgröße der Komplexe kann durch Reduktion des DOPE-Anteils weiter verringert werden. Lipid/DNA-Komplexe, die ausschließlich DC-Cholesterol enthalten, transfizieren MDCK II Zellen jedoch nicht mehr. Dies deutet auf die Rolle des Helferlipids DOPE bei der endosomalen Freisetzung hin (Siegel & Epand 1997; Rakhmanova *et al.* 2004; Zuhorn *et al.* 2005; Zuhorn *et al.* 2007a).



#### Abbildung 4-71: Transfektion verschiedener Lipid/DNA-Komplexe

Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektion von MDCK II Zellen durch Lipid/DNA-Komplexe in verschiedenen Massenverhältnissen. DC-Cholesterol/DOPE 3/7 (m/m) (DC 30<sup>®</sup>) (weiße Balken), DC-Cholesterol/DOPE 1/1 (m/m) (schwarze Balken) Lipidmischungen und reines DC-Cholesterol (grauer Balken) wurden eingesetzt. Teilweise Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen (US) ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  SEM).

#### 4.6.3 Diskussion und Ausblick

In diesen abschließenden Versuchen wird das Konzept der Arbeit, die rationelle Entwicklung von Gentransfersystemen unter Berücksichtigung der zellulären Barrieren (vgl. 1.2), praktisch umgesetzt. Die Untersuchungen der zellulären Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen mit angepasster Partikelgrößenverteilung in Abschnitt 4.4.2.2 zeigen bereits, dass die zelluläre Assoziation und Aufnahme durch diese Maßnahme optimiert werden kann. In diesem Abschnitt wird dargelegt, dass dies gleichzeitig in einer Steigerung der Transfektion resultiert. Ein vergleichbarer Effekt kann durch die Anpassung der Komplexladung erzielt werden. Damit bauen diese Versuche die empirischen Optimierungsversuche (vgl. 4.2.1) auf einer rationellen Grundlage aus. Die Tatsache, dass verglichen mit der Steigerung der zellulären Aufnahme die Transfektion hierbei nur leicht zunimmt, deutet auf nachgeschaltete Transfektionsbarrieren hin (Finn *et al.* 2005; van der Aa *et al.* 2006).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Konzept der vorliegenden Arbeit liegt in der Kombination von biologischer Grundlagenforschung des Gentransfers und der technologischen Entwicklung von Gentransfersystemen. Vor diesem Hintergrund wird die zelluläre Assoziation, Aufnahme und Prozessierung sowie die intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen untersucht. Darüber hinaus wird die Komplexbildung dieser Gentransfersysteme charakterisiert, so dass kritische Parameter des Herstellungsprozesses definiert werden können. In beiden Arbeitsgebieten knüpft die vorliegende Arbeit an Vorgängerarbeiten an (Clement 2005; Huth 2005; Häfele 2007), baut diese aus und verknüpft sie schließlich mit dem Ziel, lipid-basierten Gentransfer zu kontrollieren und effizienter zu gestalten.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

### I Herstellung und Charakterisierung von Lipid/DNA-Komplexen

In der Literatur werden verschiedene Herstellungsverfahren für Lipid/DNA-Komplexe beschrieben, die sich in der Vorbehandlung der Ausgangsliposomen, im Herstellungsmaßstab und dem verwendeten Mischprinzip unterscheiden (Clement 2005; Häfele 2007). Der Vergleich einer Reihe von Herstellungsverfahren am Beispiel von DC 30<sup>®</sup>/eGFP-Komplexen 8/1 (m/m) zeigte, dass der Herstellungsprozess von einer großen Anzahl an Parametern abhängig ist (u.a. Volumina, Konzentration, Pump-/Pipettiermodell, Lyophilisation, Lagerung). Eine besondere technologische Herausforderung liegt in der Kontrolle der Komplexgröße. Das Mischen von unbehandelten Ausgangsliposomen und DNA erzeugte inhomogene Komplexdispersionen mit Partikelgrößen > 5000 nm, die nur mit Hilfe einer *Non-Negatively constrained Least Squares*-Auswertung der PCS-Ergebnisse aufgelöst werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden geprüft, um die Partikelgröße der Komplexe einzustellen. Durch gelelektrophoretische Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer Extrusion der Komplexe die DNA zerstört wird. Die Extrusion der Ausgangsliposomen führte hingegen zu einem starken Verlust beider Lipidkomponenten, der mittels HPTLC-Analytik nachgewiesen werden konnte (DC-Cholesterol 47,6 %, DOPE 46 %). Beide Maßnahmen reduzierten die Transfektionseffizienz der Komplexe daher deutlich. Mit der Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen wurde daher eine neue Methode eingeführt, die eine Einstellung der Komplexgröße ohne Zerstörung der DNA oder Verlust des Lipids ermöglicht.

## II Zelluläre Aufnahme und Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen

Durch die Kombination von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie konnte die zelluläre Aufnahme und Prozessierung von Lipid/DNA-Komplexen in dieser Arbeit aufgeklärt werden. Dazu wurden beide Methoden zunächst weiterentwickelt.

Die Durchflusszytometrie wurde zur quantitativen Bestimmung der zellulären Aufnahme und Transfektion verwendet. Die Hemmung der zellulären Aufnahme nanopartikulärer Systeme durch endozytoseaktive Inhibitor-Substanzen ist bekannt und wurde auch in dieser Arbeit verwendet (Huth 2005). Dieses Konzept wurde durch die Steigerung der zellulären Aufnahme durch endozytoseaktive Enhancer-Substanzen ergänzt und damit auf Zelllinien mit niedriger Transfektionsrate ausgeweitet.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Lipid/DNA-Komplexen intrazellulär lokalisiert. Der Einsatz von Endozytosemarkern ist bewährt, allerdings oftmals unspezifisch. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenzmarkierung aller bekannten Endozytosekompartimente mittels Immunfluoreszenz und Expression von Reporter genen etabliert und so ein zelluläres Koordinatensystem entwickelt, das die eindeutige Lokalisierung nanopartikulärer Systeme wiedergibt.

Innerhalb dieses zellulären Koordinatensystems wurden Lipid/DNA-Komplexe mit einer Kombination aus *Spectral Bio-imaging* und konfokaler Mikroskopie lokalisiert. Mit der Kombination beider fluoreszenzmikroskopischen Methoden konnte eine hohe räumliche und spektrale Auflösung erreicht werden (Schneider & Süss 2010). Hiermit etabliert die vorliegende Arbeit ein Messsystem, das für die Analyse der zellulären Aufnahme und Prozessierung weiterer fluoreszenzmarkierter nanopartikulärer Systeme geeignet ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Messsystem auf die Analyse von Doxorubicin-haltigen Liposomen in Zusammenarbeit mit Frau Felicitas Lewrick (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Freiburg) übertragen (Lewrick 2008). Darüber hinaus wurde die Regulation des NMDA-Rezeptors (NR1-Untereinheit) in Zusammenarbeit mit Herrn Dieter K. Meyer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung I, Universität Freiburg) untersucht.

Die Untersuchungen der Lipid/DNA-Komplexe zeigten, dass diese über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose in Zellen aufgenommen werden. Nach zellulärer Aufnahme erfolgte eine Akkumulation der Komplexe in perinukleären, spät-endosomalen Vesikeln. Die Prozessierung in diese Zellkompartimente verlief über beide Endozytosewege.

Als weiteren Aspekt betrachtete die vorliegende Arbeit die Abhängigkeit der Transfektion vom Zellmodell. Der Vergleich einer effizient transfizierten Zelllinie (> 50 % Transfektion in A-10 Zellen) mit einer ineffizient transfizierten Zelllinie (< 1 % Transfektion in MDCK II Zellen) zeigte, dass Unterschiede in der zellulären Assoziation und Aufnahme vorliegen, während die zelluläre Prozessierung einander entspricht.

Anhand dieser Daten konnten zelluläre Barrieren aufgezeigt werden, die eine erfolgreiche Transfektion der MDCK II Zellen behindern. Eine dieser Barrieren ist die zelluläre Assoziation und Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen. Dies konnte durch die unterschiedlichen Endozytoseprofile beider Zellmodelle bei gleichzeitiger Clathrin-Präferenz der Komplexe erklärt werden. Da Lipid/DNA-Komplexe zwar schwächer, aber dennoch von 21 % des Caveolae-dominanten Zellmodells MDCK II aufgenommen wurden, kann die niedrige Transfektion jedoch nicht ausschließlich durch die Barrierefunktion der Plasmamembran begründet werden.

### **III Transzytose von Lipid/DNA-Komplexen**

Mit der Einführung der MDCK II Zelllinie wurde darüber hinaus ein polarisierendes Zellmodell etabliert. Dieses ermöglichte die Untersuchung der Transzytose als zelluläre Barriere der Transfektion von Lipid/DNA-Komplexen. Die Daten dieser Arbeit schließen eine verstärkte Transzytose der Komplexe aus.

Darüber hinaus konnte das Potenzial dieses Zellmodells für die Untersuchung richtungsabhängiger Endozytose dargelegt werden.

### **IV Intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen**

Als weitere Barriere einer erfolgreichen Transfektion wird die intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen diskutiert (Häfele 2007). Die Entwicklung eines Cy5-DOPE/Cy3-DNA FRET-Systems ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die Analyse des intrazellulären Dissoziationsprozesses.

Die intrazelluläre Messung des FRET-Signals mit einem Durchflusszytometer gestattete die Berechnung von FRET-Effizienzen für eine große Stichprobenmenge. Mit der Cell Profiler Analyse fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen konnte eine weitere zytometrische Methode etabliert werden, die trotz geringerer Stichprobenmengen mit den durchflusszytometrischen Daten gut korreliert werden konnte ( $r^2 = 0,95$ ). Die quantitative Mikroskopie ermöglicht darüber hinaus die Lokalisierung des FRET-Signals und besitzt damit großes Potenzial für weitere Studien.

Mit beiden Methoden wurde die intrazelluläre Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen über einen Zeitraum von 24 h quantifiziert. Die Komplexe dissoziierten sowohl in einer effizient transfizierten Zelllinie (70 % Komplexdissoziation in A-10 Zellen) als auch in einer ineffizient transfizierten Zelllinie (50 % Komplexdissoziation in MDCK II Zellen). Die Dissoziation der Komplexe stellt daher kein Transfektionshindernis für DC 30<sup>®</sup>/eGFP-Komplexe 8/1 (m/m) dar. Diese Ergebnisse wurden durch die Berechnung von Kollokalisationskoeffizienten konfokaler Aufnahmen bestätigt.

## **V Rationelles Design von Lipid/DNA-Komplexen**

Die vorliegende Arbeit liefert ein vollständiges Bild der zellulären Aufnahme, Prozessierung und intrazellulären Dissoziation von Lipid/DNA-Komplexen. Als eine Barriere erfolgreicher Transfektion konnte die zelluläre Aufnahme von Lipid/DNA-Komplexen identifiziert werden. Auf Basis dieser Daten wurde eine Komplex-Zielstruktur entwickelt, die eine Präferenz für die aktiven Endozytosewege Clathrin und Caveolae und damit eine stärkere zelluläre Aufnahme erwarten lässt. Auf diese Weise konnte durch Anpassen der Partikelgröße und -ladung eine Verbesserung der Transfektion erzielt werden.

Die vorliegende Arbeit bildet darüber hinaus die Grundlage für eine Entwicklung aktiver *targeting*-Strategien. Für die Oberflächenmodifikation nanopartikulärer Systeme stehen geeignete Methoden bereits zur Verfügung (Lewrick 2008). Erste Versuche eines Lektin-*targetings* von Lipid/DNA-Komplexen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Vanessa Bunjes durchgeführt (Bunjes 2009).

## **VI Ausblick**

Die Zusammenfassung dieser Arbeit verdeutlicht die Kombination technologischer und biologischer Aufgabenstellungen. In beiden Bereichen stellen sich interessante Fragen für weitere Forschungsprojekte:

Die technologische Herausforderung zukünftiger Arbeiten liegt zunächst in der Berücksichtigung biopharmazeutischer Anforderungen. Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben lipid-basierte nanopartikuläre Gentransfersysteme undefinierter Größe, Homogenität und Ladung (Zuhorn *et al.* 2002; Rejman *et al.* 2005; Payne *et al.* 2007; Wong *et al.* 2007; Matsumoto *et al.* 2009). Der Einsatz dieser Systeme ist auf den *in vitro* Bereich beschränkt, eine spätere therapeutische Anwendung *in vivo* jedoch unmöglich. Die vorliegende Arbeit entwickelt mit der Ultraschallbehandlung der Ausgangsliposomen

eine Methode, die Größe der entstehenden Komplexe einzustellen. Die Weiterentwicklung dieser Methode ist in weiteren Arbeiten notwendig. Darüber hinaus ist die Oberflächenladung der Komplexe auf die biopharmazeutische Verträglichkeit kritisch zu prüfen.

Im Rahmen der durchgeführten Endozytoseversuche eröffnen die Untersuchungen der Transfektionsbarrieren „Zellaufnahme“ und „Zellprozessierung“ neue Anknüpfungspunkte für die technologische Optimierung der Gentransfersysteme. Eine Möglichkeit besteht in der gezielten Ansteuerung (*aktives targeting*) der aktiven Endozytosewege Clathrin und Caveolae.

Weitere technologische Fragestellungen sind bei der Aufklärung nachgeschalteter Transfektionsbarrieren wie dem Eintritt der DNA in den Zellkern zu erwarten. Die Untersuchung des nukleären DNA-Transports erfordert die Kombination quantitativer Messung und exakter intrazellulärer Lokalisierung des DNA-Signals. Die in dieser Arbeit vorgestellte CellProfiler Analyse fluoreszenzmarkierter DNA vereint beide Anforderungen und stellt damit eine potenzielle Methode zur Analyse des nukleären DNA-Transports dar. Darüber hinaus lässt sich diese Analyse sowohl auf andere fluoreszenzgefärbte Endozytosekompartimente (z.B. späte Endosomen) als auch auf die Analyse der fluoreszenzgefärbten Lipidkomponente DOPE übertragen. Die Grundlagen dafür - Fluoreszenzfärbung aller Endozytosekompartimente und Fluoreszenzfärbung der Lipidkomponente - werden mit dieser Arbeit gelegt.

## 6. Literaturverzeichnis

Aballay A, Stahl P D, Mayorga L S; *Phorbol ester promotes endocytosis by activating a factor involved in endosome fusion*; J Cell Sci 112 ( Pt 15), 2549-2557 (1999).

Akinc A, Thomas M, Klibanov A M, Langer R; *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*; J Gene Med 7, 657-663 (2005).

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P; *Molecular Biology of the cell*; Garland Science; New York (2008).

Alkatout A; *Einfluss von Phospholipiden in nanopartikulären Lipidcarriern auf die Wirkstoffabsorption durch das Darmepithel, gemessen am Caco-2 Modell*; Dissertation, Universität Freiburg (2008).

Balklava Z, Grant B D; *The regulation of endocytosis by kinases: cell biology meets genomics*; Genome Biol 6, 245 (2005).

Bartlett G R; *Phosphorus assay in column chromatography*; J Biol Chem 234, 466-468 (1959).

Benmerah A, Lamaze C; *Clathrin-coated pits: vive la difference?*; Traffic 8, 970-982 (2007).

Bolte S, Cordelieres F P; *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*; J Microsc 224, 213-232 (2006).

Bomsel M, Prydz K, Parton R G, Gruenberg J, Simons K; *Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells*; J Cell Biol 109, 3243-3258 (1989).

Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, Goepferich A; *Fluorescence resonance energy transfer: evaluation of the intracellular stability of polyplexes*; Eur J Pharm Biopharm 63, 156-165 (2006).

Breuzard G, Tertilt M, Goncalves C, Cheradame H, Geguan P, Pichon C, Midoux P; *Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging*; Nucleic Acids Res 36, e71 (2008).

Bunjes V; *Funktionalisierung liposomaler Drug Carrier Systeme mit Mistellektin I: Verkapselung und aktives Targeting in vitro*; Dissertation, Universität Freiburg (2009).

Bush W S, Ihrke G, Robinson J M, Kenworthy A K; *Antibody-specific detection of caveolin-1 in subapical compartments of MDCK cells*; Histochem Cell Biol 126, 27-34 (2006).

Bustamante C, Bryant Z, Smith S B; *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*; Nature 421, 423-427 (2003).

- Carpenter A E, Jones T R, Lamprecht M R, Clarke C, Kang I H, Friman O, Guertin D A, Chang J H, Lindquist R A, Moffat J, Golland P, Sabatini D M; *CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes*; Genome Biol 7, R100 (2006).
- Carver L A, Schnitzer J E; *Caveolae: mining little caves for new cancer targets*; Nat Rev Cancer 3, 571-581 (2003).
- Chen H H, Ho Y P, Jiang X, Mao H Q, Wang T H, Leong K W; *Quantitative comparison of intracellular unpacking kinetics of polyplexes by a model constructed from quantum dot-FRET*; Mol Ther 16, 324-332 (2008).
- Chen J W, Murphy T L, Willingham M C, Pastan I, August J T; *Identification of two lysosomal membrane glycoproteins*; J Cell Biol 101, 85-95 (1985).
- Chinnapen D J, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer W I; *Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER*; FEMS Microbiol Lett 266, 129-137 (2007).
- Cho M J, Thompson D P, Cramer C T, Vidmar T J, Scieszka J F; *The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier*; Pharm Res 6, 71-77 (1989).
- Choudhury A, Marks D L, Proctor K M, Gould G W, Pagano R E; *Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface*; Nat Cell Biol 8, 317-328 (2006).
- Clement J; *Methoden zur Charakterisierung von großtechnisch hergestellten Lipoplexen zum Gentransfer*; Dissertation, Universität Freiburg (2005).
- Clement J, Kiefer K, Kimpfler A, Garidel P, Peschka-Süss R; *Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life*; Eur J Pharm Biopharm 59, 35-43 (2005).
- Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed M R; *Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications*; Exp Cell Res 249, 1-12 (1999).
- datamonitor; *DNA/RNA therapies: Translating the genome into a \$ 1.2 bn market by 2010*; (2005).
- Douglas K L, Piccirillo C A, Tabrizian M; *Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors*; Eur J Pharm Biopharm 68, 676-687 (2008).
- Dupree P, Parton R G, Raposo G, Kurzchalia T V, Simons K; *Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells*; EMBO J 12, 1597-1605 (1993).
- Edelstein M L, Abedi M R, Wixon J; *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update*; J Gene Med 9, 833-842 (2007).
- Ewert K K, Ahmad A, Boussein N F, Evans H M, Safinya C R; *Non-viral gene delivery with cationic liposome-DNA complexes*; Methods Mol Biol 433, 159-175 (2008).

- Felgner J H, Kumar R, Sridhar C N, Wheeler C J, Tsai Y J, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner P L; *Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations*; J Biol Chem 269, 2550-2561 (1994).
- Felgner P L, Gadek T R, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, Northrop J P, Ringold G M, Danielsen M; *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*; Proc Natl Acad Sci U S A 84, 7413-7417 (1987).
- Finn J D, Wong T, Cullis P R; *Investigation of factors responsible for cell line cytoplasmic expression differences*; BMC Mol Biol 6, 11 (2005).
- Foerg C, Ziegler U, Fernandez-Carneado J, Giralt E, Merkle H P; *Differentiation restricted endocytosis of cell penetrating peptides in MDCK cells corresponds with activities of Rho-GTPases*; Pharm Res 24, 628-642 (2007).
- Fukami A, Adachi K; *A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application*; J Electron Microsc (Tokyo) 14, 112-118 (1965).
- Gagescu R, Demaurex N, Parton R G, Hunziker W, Huber L A, Gruenberg J; *The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components*; Mol Biol Cell 11, 2775-2791 (2000).
- Goncalves C, Mennesson E, Fuchs R, Gorvel J P, Midoux P, Pichon C; *Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells*; Mol Ther 10, 373-385 (2004).
- Gong Q, Huntsman C, Ma D; *Clathrin-independent internalization and recycling*; J Cell Mol Med 12, 126-144 (2008).
- Gruber H J, Hahn C D, Kada G, Riener C K, Harms G S, Ahrer W, Dax T G, Knaus H G; *Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin*; Bioconjug Chem 11, 696-704 (2000).
- Gruenberg J; *The endocytic pathway: a mosaic of domains*; Nat Rev Mol Cell Biol 2, 721-730 (2001).
- Gumbleton M, Hollins A J, Omidi Y, Campbell L, Taylor G; *Targeting caveolae for vesicular drug transport*; J Control Release 87, 139-151 (2003).
- Gustafsson J, Arvidson G, Karlsson G, Almgren M; *Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM*; Biochim Biophys Acta 1235, 305-312 (1995).
- Häfele S Y; *DNA-Aufnahme und intrazelluläres Trafficking an Primärzellen mittels lipid- und polymerbasierten, nicht-viralen Transfersystemen*; Dissertation, Universität Freiburg (2007).
- Hafez I M, Maurer N, Cullis P R; *On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids*; Gene Ther 8, 1188-1196 (2001).

- Hama S, Akita H, Ito R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Harashima H; *Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems*; Mol Ther 13, 786-794 (2006).
- Hama S, Akita H, Iida S, Mizuguchi H, Harashima H; *Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex*; Nucleic Acids Res 35, 1533-1543 (2007).
- Harder T, Kellner R, Parton R G, Gruenberg J; *Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol*; Mol Biol Cell 8, 533-545 (1997).
- Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y; *Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells*; Biomacromolecules 9, 435-443 (2008).
- Harvie P, Dutzar B, Galbraith T, Cudmore S, O'Mahony D, Anklesaria P, Paul R; *Targeting of lipid-protamine-DNA (LPD) lipopolyplexes using RGD motifs*; J Liposome Res 13, 231-247 (2003).
- Helmerich G, Koehler P; *Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers*; J Agric Food Chem 51, 6645-6651 (2003).
- Hillaireau H, Couvreur P; *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*; Cell Mol Life Sci 66, 2873-2896 (2009).
- Ho Y P, Chen H H, Leong K W, Wang T H; *Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET*; J Control Release 116, 83-89 (2006).
- Hoekstra D, Rejman J, Wasungu L, Shi F, Zuhorn I; *Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome*; Biochem Soc Trans 35, 68-71 (2007).
- Hoffmeister D, Bechthold A; *Giftpflanzen, Pflanzengifte; in Allgemeine und spezielle Pharmakologie*; Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (ed.); Urban Fischer; München (2005).
- Hofland H E, Shephard L, Sullivan S M; *Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer*; Proc Natl Acad Sci U S A 93, 7305-7309 (1996).
- Holzer M; *Proteinvermittelter Lipidtransfer zwischen Liposomen zur Herstellung asymmetrischer Modellmembranen und die Rolle der Membranlipide bei der Organisation des T-Zellrezeptors*; Dissertation, Universität Freiburg (2009).
- Holzer M, Burghardt A, Schubert R; *Quantitative high-performance thin-layer chromatography determination of common liposome components and critical parameters influencing the analysis results*; J Liposome Res (2009).
- Horvath G, Petras M, Szentesi G, Fabian A, Park J W, Vereb G, Szollosi J; *Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements*; Cytometry A 65, 148-157 (2005).

- Huebner S, Battersby B J, Grimm R, Cevc G; *Lipid-DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy*; Biophys J 76, 3158-3166 (1999).
- Hufnagel H, Hakim P, Lima A, Hollfelder F; *Fluid phase endocytosis contributes to transfection of DNA by PEI-25*; Mol Ther 17, 1411-1417 (2009).
- Huth U, Wieschollek A, Garini Y, Schubert R, Peschka-Süss R; *Fourier transformed spectral bio-imaging for studying the intracellular fate of liposomes*; Cytometry A 57, 10-21 (2004).
- Huth U S; *Zelluläre Aufnahme und intrazelluläres Schicksal von partikulären Drug Delivery Systemen*; Dissertation, Universität Freiburg (2005).
- Huth U S, Schubert R, Peschka-Süss R; *Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging*; J Control Release 110, 490-504 (2006).
- Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K; *In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine*; J Gene Med 6, 76-84 (2004).
- Ito A, Miyazoe R, Mitoma J, Akao T, Osaki T, Kunitake T; *Synthetic cationic amphiphiles for liposome-mediated DNA transfection*; Biochem Int 22, 235-241 (1990).
- Ivanov A I; *Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?*; Methods Mol Biol 440, 15-33 (2008).
- Jares-Erijman E A, Jovin T M; *FRET imaging*; Nat Biotechnol 21, 1387-1395 (2003).
- Jerala R; *Structural biology of the LPS recognition*; Int J Med Microbiol 297, 353-363 (2007).
- Joshee N, Bastola D R, Cheng P W; *Transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy: characterization of the transfection complexes and intracellular trafficking*; Hum Gene Ther 13, 1991-2004 (2002).
- Kada G; *Oriented surface immobilization of proteins on gold and mica and functional studies with atomic force microscopy (AFM) and surface plasmon resonance (SPR)*; Dissertation, Universität Linz (2001).
- Karin M, Mintz B; *Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells*; J Biol Chem 256, 3245-3252 (1981).
- Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K; *Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells*; Nat Cell Biol 3, 140-149 (2001).
- Khalil I A, Kogure K, Akita H, Harashima H; *Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery*; Pharmacol Rev 58, 32-45 (2006).

- Kiefer K; *Entwicklung einer nicht-viralen upscalebaren Formulierung zur Transfektion humaner vaskulärer Endothelzellen und glatter Muskelzellen*; Dissertation, Universität Freiburg (2003).
- Kiefer K, Clement J, Garidel P, Peschka-Süss R; *Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells*; *Pharm Res* 21, 1009-1017 (2004).
- Kilsdonk E P, Yancey P G, Stoudt G W, Bangerter F W, Johnson W J, Phillips M C, Rothblat G H; *Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins*; *J Biol Chem* 270, 17250-17256 (1995).
- Kimes B W, Brandt B L; *Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta*; *Exp Cell Res* 98, 349-366 (1976).
- Kostich M, Fire A, Fambrough D M; *Identification and molecular-genetic characterization of a LAMP/CD68-like protein from Caenorhabditis elegans*; *J Cell Sci* 113 ( Pt 14), 2595-2606 (2000).
- Lamprecht M R, Sabatini D M, Carpenter A E; *CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis*; *Biotechniques* 42, 71-75 (2007).
- Lanzetti L; *Actin in membrane trafficking*; *Curr Opin Cell Biol* 19, 453-458 (2007).
- Le P U, Nabi I R; *Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum*; *J Cell Sci* 116, 1059-1071 (2003).
- Le Roy C, Wrana J L; *Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling*; *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126 (2005).
- Lewrick F; *Aktives liposomales Targeting endokriner Tumore*; Dissertation, Universität Freiburg (2008).
- Li W, Szoka F C, Jr.; *Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery*; *Pharm Res* 24, 438-449 (2007).
- Liberali P, Ramo P, Pelkmans L; *Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis*; *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 501-523 (2008).
- Lippincott-Schwartz J, Fambrough D M; *Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein*; *J Cell Biol* 102, 1593-1605 (1986).
- Liu Y, Mounkes L C, Liggitt H D, Brown C S, Solodin I, Heath T D, Debs R J; *Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery*; *Nat Biotechnol* 15, 167-173 (1997).
- Lonez C, Lensink M F, Vandenbranden M, Ruyschaert J M; *Cationic lipids activate cellular cascades. Which receptors are involved?*; *Biochim Biophys Acta* 1790, 425-430 (2009).

- Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton R G; *Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule*; J Cell Biol 145, 1443-1459 (1999).
- Luzio J P, Pryor P R, Bright N A; *Lysosomes: fusion and function*; Nat Rev Mol Cell Biol 8, 622-632 (2007).
- Malik Z, Dishi M, Garini Y; *Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells*; Photochem Photobiol 63, 608-614 (1996).
- Mandel M, Higa A; *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*; J Mol Biol 53, 159-162 (1970).
- Matsumoto Y, Itaka K, Yamasoba T, Kataoka K; *Intranuclear fluorescence resonance energy transfer analysis of plasmid DNA decondensation from nonviral gene carriers*; J Gene Med 11, 615-623 (2009).
- Mayor S, Pagano R E; *Pathways of clathrin-independent endocytosis*; Nat Rev Mol Cell Biol 8, 603-612 (2007).
- McIntosh R, Nicastro D, Mastronarde D; *New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography*; Trends Cell Biol 15, 43-51 (2005).
- Meier O, Greber U F; *Adenovirus endocytosis*; J Gene Med 5, 451-462 (2003).
- Mercer J, Helenius A; *Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells*; Science 320, 531-535 (2008).
- Miaczynska M, Stenmark H; *Mechanisms and functions of endocytosis*; J Cell Biol 180, 7-11 (2008).
- Michihara A, Toda K, Kubo T, Fujiwara Y, Akasaki K, Tsuji H; *Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes*; Biol Pharm Bull 28, 947-951 (2005).
- Mills I G; *The interplay between clathrin-coated vesicles and cell signalling*; Semin Cell Dev Biol 18, 459-470 (2007).
- Minsky M; *Microscopy apparatus*; 3013467; United States; (1961).
- Mitra R D, Silva C M, Youvan D C; *Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein*; Gene 173, 13-17 (1996).
- Molina M D, Anchordoquy T J; *Degradation of lyophilized lipid/DNA complexes during storage: the role of lipid and reactive oxygen species*; Biochim Biophys Acta 1778, 2119-2126 (2008).
- Morsy M A, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks R J, Graham F L, Kochanek S, Bett A J, Caskey C T; *An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene*; Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7866-7871 (1998).

- Mu F T, Callaghan J M, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton R G, Campbell P L, McCluskey J, Yeo J P, Tock E P, Toh B H; *EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif*; J Biol Chem 270, 13503-13511 (1995).
- Mülhardt C; *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.*; Spektrum Akademischer Verlag (2003).
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T V, Simons K; *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*; Proc Natl Acad Sci U S A 92, 10339-10343 (1995).
- Nabel G J; *Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future*; Nat Med 10, 135-141 (2004).
- Nagy P, Vamosi G, Bodnar A, Lockett S J, Szollosi J; *Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy*; Eur Biophys J 27, 377-389 (1998).
- Nagy P, Vereb G, Damjanovich S, Matyus L, Szollosi J; *Measuring FRET in flow cytometry and microscopy*; Curr Protoc Cytom Chapter 12, Unit 12 18 (2006).
- Nichols B; *Caveosomes and endocytosis of lipid rafts*; J Cell Sci 116, 4707-4714 (2003).
- Oberle V, Bakowsky U, Zuhorn I S, Hoekstra D; *Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism*; Biophys J 79, 1447-1454 (2000).
- Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom B J, Chrastina A, Iwata K, Zinn K R, Baldwin R, Testa J E, Schnitzer J E; *Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung*; Nat Biotechnol 25, 327-337 (2007).
- Olivares E C, Hollis R P, Chalberg T W, Meuse L, Kay M A, Calos M P; *Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice*; Nat Biotechnol 20, 1124-1128 (2002).
- Olivotto M, Arcangeli A, Carla M, Wanke E; *Electric fields at the plasma membrane level: a neglected element in the mechanisms of cell signalling*; Bioessays 18, 495-504 (1996).
- Orkin S H; *Molecular genetics and potential gene therapy*; Clin Immunol Immunopathol 40, 151-156 (1986).
- Orlandi P A, Fishman P H; *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*; J Cell Biol 141, 905-915 (1998).
- Parton R G, Joggerst B, Simons K; *Regulated internalization of caveolae*; J Cell Biol 127, 1199-1215 (1994).
- Parton R G, Simons K; *The multiple faces of caveolae*; Nat Rev Mol Cell Biol 8, 185-194 (2007).

Patil S D, Rhodes D G, Burgess D J; *DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review*; Aaps J 7, E61-77 (2005).

Payne C K, Jones S A, Chen C, Zhuang X; *Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands*; Traffic 8, 389-401 (2007).

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A; *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*; Nat Cell Biol 3, 473-483 (2001).

Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M; *Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis*; Nature 436, 78-86 (2005).

Pol A, Martin S, Fernandez M A, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton R G; *Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies*; Mol Biol Cell 16, 2091-2105 (2005).

Poole B, Ohkuma S; *Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages*; J Cell Biol 90, 665-669 (1981).

Puri V, Watanabe R, Singh R D, Dominguez M, Brown J C, Wheatley C L, Marks D L, Pagano R E; *Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways*; J Cell Biol 154, 535-547 (2001).

Rakhmanova V A, Pozharski E V, MacDonald R C; *Mechanisms of lipoplex formation: dependence of the biological properties of transfection complexes on formulation procedures*; J Membr Biol 200, 35-45 (2004).

Rawat A, Vaidya B, Khatri K, Goyal A K, Gupta P N, Mahor S, Paliwal R, Rai S, Vyas S P; *Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview*; Pharmazie 62, 643-658 (2007).

Rejman J, Oberle V, Zuhorn I S, Hoekstra D; *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*; Biochem J 377, 159-169 (2004).

Rejman J, Bragonzi A, Conese M; *Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes*; Mol Ther 12, 468-474 (2005).

Rigotti A, Acton S L, Krieger M; *The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids*; J Biol Chem 270, 16221-16224 (1995).

Rodal S K, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K; *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*; Mol Biol Cell 10, 961-974 (1999).

Rodriguez-Pulido A, Ortega F, Llorca O, Aicart E, Junquera E; *A physicochemical characterization of the interaction between DC-Chol/DOPE cationic liposomes and DNA*; J Phys Chem B 112, 12555-12565 (2008).

- Ross P C, Hui S W; *Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency*; Gene Ther 6, 651-659 (1999).
- Roth T F, Porter K R; *Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L*; J Cell Biol 20, 313-332 (1964).
- Ruponen M, Arkko S, Urtti A, Reinisalo M, Ranta V P; *Intracellular DNA release and elimination correlate poorly with transgene expression after non-viral transfection*; J Control Release 136, 226-231 (2009).
- Sambrook J; *Molecular Cloning - a laboratory manual*; Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989).
- Sandvig K, van Deurs B; *Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins*; Gene Ther 12, 865-872 (2005).
- Sandvig K, Torgersen M L, Raa H A, van Deurs B; *Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity*; Histochem Cell Biol 129, 267-276 (2008).
- Scheiffele P, Verkade P, Fra A M, Virta H, Simons K, Ikonen E; *Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells*; J Cell Biol 140, 795-806 (1998).
- Scherer P E, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish H F, Lisanti M P; *Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe*; J Biol Chem 270, 16395-16401 (1995).
- Schifter C-R; *Untersuchungen zum Einfluss der Größe von Liposomen auf deren Endozytose in verschiedenen Zelllinien*; Dissertation, Universität Freiburg (2008).
- Schneider S, Süss R; *Spectral Bio-Imaging and Confocal Imaging of the Intracellular Distribution of Lipoplexes; in Liposomes*; Volkmar Weissig (ed.); Humana Press; Totowa, N.J. (2010).
- Schnitzer J E, Oh P, Pinney E, Allard J; *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*; J Cell Biol 127, 1217-1232 (1994).
- Sebestyen Z, Nagy P, Horvath G, Vamosi G, Debets R, Gratama J W, Alexander D R, Szollosi J; *Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer*; Cytometry 48, 124-135 (2002).
- Sharma D K, Brown J C, Choudhury A, Peterson T E, Holicky E, Marks D L, Simari R, Parton R G, Pagano R E; *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol*; Mol Biol Cell 15, 3114-3122 (2004).
- Sharma D K, Brown J C, Cheng Z, Holicky E L, Marks D L, Pagano R E; *The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis*; Cancer Res 65, 8233-8241 (2005).

- Siegel D P, Epand R M; *The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms*; Biophys J 73, 3089-3111 (1997).
- Singh R D, Puri V, Valiyaveetil J T, Marks D L, Bittman R, Pagano R E; *Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids*; Mol Biol Cell 14, 3254-3265 (2003).
- Smart E J, Foster D C, Ying Y S, Kamen B A, Anderson R G; *Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae*; J Cell Biol 124, 307-313 (1994).
- Spang A; *On the fate of early endosomes*; Biol Chem 390, 753-759 (2009).
- Stryer L; *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*; Annu Rev Biochem 47, 819-846 (1978).
- Sugioka Y, Suzuki M; *The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation*; Biochim Biophys Acta 1074, 19-24 (1991).
- Swanson J A; *Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages*; J Cell Sci 94 ( Pt 1), 135-142 (1989).
- Swanson J A; *Shaping cups into phagosomes and macropinosomes*; Nat Rev Mol Cell Biol 9, 639-649 (2008).
- Swanson J A, Watts C; *Macropinocytosis*; Trends Cell Biol 5, 424-428 (1995).
- Tanaka T, Legat A, Adam E, Steuve J, Gatot J S, Vandenbranden M, Ulianov L, Lonez C, Ruyschaert J M, Muraille E, Tuynder M, Goldman M, Jacquet A; *DiC14-amidine cationic liposomes stimulate myeloid dendritic cells through Toll-like receptor 4*; Eur J Immunol 38, 1351-1357 (2008).
- Tarrago-Trani M T, Storrie B; *Alternate routes for drug delivery to the cell interior: pathways to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum*; Adv Drug Deliv Rev 59, 782-797 (2007).
- Thomas C E, Ehrhardt A, Kay M A; *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*; Nat Rev Genet 4, 346-358 (2003).
- Tjelle T E, Brech A, Juvet L K, Griffiths G, Berg T; *Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation*; J Cell Sci 109 ( Pt 12), 2905-2914 (1996).
- Torchilin V P, Weissig V; *Liposomes - a practical approach; Second edition*; Oxfordgr University Press; Oxford, UK (2003).
- Torgersen M L, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K; *Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms*; J Cell Sci 114, 3737-3747 (2001).

- Touchstone J C, Alvarez J G; *Phospholipids in amniotic fluid with special reference to the lecithin/sphingomyelin ratio*; J Chromatogr 429, 359-371 (1988).
- Tron L, Szollosi J, Damjanovich S, Helliwell S H, Arndt-Jovin D J, Jovin T M; *Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis*; Biophys J 45, 939-946 (1984).
- Tuma P L, Hubbard A L; *Transcytosis: crossing cellular barriers*; Physiol Rev 83, 871-932 (2003).
- van der Aa M A, Mastrobattista E, Oosting R S, Hennink W E, Koning G A, Crommelin D J; *The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery*; Pharm Res 23, 447-459 (2006).
- van der Aa M A, Huth U S, Häfele S Y, Schubert R, Oosting R S, Mastrobattista E, Hennink W E, Peschka-Süss R, Koning G A, Crommelin D J; *Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells*; Pharm Res 24, 1590-1598 (2007).
- Vogel U, Sandvig K, van Deurs B; *Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells*; J Cell Sci 111 ( Pt 6), 825-832 (1998).
- von Bonsdorff C H, Fuller S D, Simons K; *Apical and basolateral endocytosis in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells grown on nitrocellulose filters*; EMBO J 4, 2781-2792 (1985).
- von Gersdorff K, Sanders N N, Vandenbroucke R, De Smedt S C, Wagner E, Ogris M; *The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type*; Mol Ther 14, 745-753 (2006).
- Wang L H, Rothberg K G, Anderson R G; *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*; J Cell Biol 123, 1107-1117 (1993).
- Wasungu L, Hoekstra D; *Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes*; J Control Release 116, 255-264 (2006).
- Weng A, Bachran C, Fuchs H, Krause E, Stephanowitz H, Melzig M F; *Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins--more than stimulation of endocytosis*; Chem Biol Interact 181, 424-429 (2009).
- Wiethoff C M, Gill M L, Koe G S, Koe J G, Middaugh C R; *The structural organization of cationic lipid-DNA complexes*; J Biol Chem 277, 44980-44987 (2002).
- Williams T M, Lisanti M P; *The caveolin proteins*; Genome Biol 5, 214 (2004).
- Winckler T; *The current status of gene therapy in severe immunodeficiency*; Pharm Unserer Zeit 38, 204-206 (2009).

- Wong A W, Scales S J, Reilly D E; *DNA Internalized via Caveolae Requires Microtubule-dependent, Rab7-independent Transport to the Late Endocytic Pathway for Delivery to the Nucleus*; J Biol Chem 282, 22953-22963 (2007).
- Wouters F S, Bastiaens P I, Wirtz K W, Jovin T M; *FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes*; EMBO J 17, 7179-7189 (1998).
- Xu Y, Szoka F C, Jr.; *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*; Biochemistry 35, 5616-5623 (1996).
- Xu Y, Hui S W, Frederik P, Szoka F C, Jr.; *Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes*; Biophys J 77, 341-353 (1999).
- Yamada E; *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*; J Biophys Biochem Cytol 1, 445-458 (1955).
- Yao D, Ehrlich M, Henis Y I, Leof E B; *Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit*; Mol Biol Cell 13, 4001-4012 (2002).
- Yeung T, Terebiznik M, Yu L, Silvius J, Abidi W M, Philips M, Levine T, Kapus A, Grinstein S; *Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis*; Science 313, 347-351 (2006).
- Zabner J, Fasbender A J, Moninger T, Poellinger K A, Welsh M J; *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid*; J Biol Chem 270, 18997-19007 (1995).
- Zelphati O, Nguyen C, Ferrari M, Felgner J, Tsai Y, Felgner P L; *Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery*; Gene Ther 5, 1272-1282 (1998).
- Zhang Y, Garzon-Rodriguez W, Manning M C, Anchordoquy T J; *The use of fluorescence resonance energy transfer to monitor dynamic changes of lipid-DNA interactions during lipoplex formation*; Biochim Biophys Acta 1614, 182-192 (2003).
- Zuhorn I S, Kalicharan R, Hoekstra D; *Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis*; J Biol Chem 277, 18021-18028 (2002).
- Zuhorn I S, Hoekstra D; *On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question?*; J Membr Biol 189, 167-179 (2002).
- Zuhorn I S, Bakowsky U, Polushkin E, Visser W H, Stuart M C, Engberts J B, Hoekstra D; *Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency*; Mol Ther 11, 801-810 (2005).
- Zuhorn I S, Engberts J B, Hoekstra D; *Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers*; Eur Biophys J 36, 349-362 (2007a).
- Zuhorn I S, Kalicharan D, Robillard G T, Hoekstra D; *Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery*; Mol Ther 15, 946-953 (2007b).

## **Wissenschaftlicher Werdegang**

Die folgende Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung