

# **Gentherapeutische Vektoren für die Tumorthherapie**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Sascha Maximilian Hubing**

aus Gießen, Deutschland

Marburg an der Lahn **2023**

Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Runkel

Eingereicht 30.01.2023

Tag der mündlichen Prüfung 21.03.2023

Hochschulkenziffer: 1180

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie  
der Philipps-Universität Marburg

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	- 1 -
Summary .....	- 2 -
1 Genterapie: Ein einleitender Überblick .....	- 4 -
1.1 Somatische Genterapie.....	- 10 -
1.2 In-vivo und ex-vivo.....	- 10 -
1.3 Virale Vektoren.....	- 12 -
1.4 Nicht-Virale Vektoren.....	- 14 -
1.4.1 Liposomen.....	- 15 -
1.4.2 Kationische Polymere .....	- 17 -
1.4.3 Lipopolyplexe.....	- 18 -
1.4.4 Feste Nanopartikel.....	- 20 -
2 Zielsetzung.....	- 22 -
2.1 Zielsetzung Projekt 1: Polyethylenimin-Silica-Nanopartikel .....	- 22 -
2.2 Zielsetzung Projekt 2: Biolumineszenz induzierte PDT .....	- 23 -
2.3 Zielsetzung Projekt 3: Lipopolyplexe als Vektoren für MDR1-Silencing .....	- 24 -
3 Material und allgemeine Methoden .....	- 25 -
3.1 Verwendetes Material .....	- 25 -
3.2 Allgemeine Methoden.....	- 32 -
3.2.1 Liposomenherstellung .....	- 32 -
3.2.2 Polyplexe und Lipopolyplexe.....	- 34 -
3.2.3 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	- 36 -
3.2.4 Laser-Doppler-Anemometrie .....	- 38 -
3.2.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	- 40 -
3.2.6 Zellkultivierung.....	- 41 -
3.2.7 MTT-Assay .....	- 42 -
4 Projekt 1: Polyethylenimin-Silica-Nanopartikel .....	- 44 -

4.1	Einleitung.....	- 44 -
4.1.1	Polyethylenimin .....	- 44 -
4.1.2	Silica-Nanopartikel.....	- 45 -
4.2	Methoden .....	- 47 -
4.2.1	Herstellung des Vektorsystems .....	- 47 -
4.2.2	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	- 48 -
4.2.3	Laser-Doppler-Anemometrie .....	- 48 -
4.2.4	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	- 49 -
4.2.5	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	- 49 -
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 50 -
4.2.7	Zellkultivierung.....	- 51 -
4.2.8	MTT-Assay .....	- 51 -
4.2.9	Luciferase Assay .....	- 51 -
4.3	Ergebnisse und Diskussion .....	- 53 -
4.3.1	Physikochemische Charakterisierung .....	- 53 -
4.3.2	Bildgebende Verfahren .....	- 58 -
4.3.3	Zellkultur.....	- 60 -
4.4	Tagungsbeitrag.....	- 64 -
4.5	Zusammenfassung.....	- 65 -
5	Projekt 2: Biolumineszenz induzierte PDT .....	- 66 -
5.1	Einleitung.....	- 66 -
5.1.1	Photodynamische Therapie .....	- 66 -
5.1.2	Biolumineszenz .....	- 67 -
5.1.3	Hypericin.....	- 69 -
5.2	Methoden .....	- 71 -
5.2.1	Herstellung der Liposomen .....	- 71 -
5.2.2	Herstellung der Polyplexe & Lipopolyplexe.....	- 71 -
5.2.3	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	- 72 -

5.2.4	Laser-Doppler-Anemometrie .....	- 72 -
5.2.5	Pulmonale Applikation der Lipopolyplexe .....	- 72 -
5.2.6	Zellkultivierung .....	- 74 -
5.2.7	Bestimmung der Lichtemission .....	- 74 -
5.2.8	MTT-Assay .....	- 75 -
5.3	Ergebnisse und Diskussion .....	- 76 -
5.3.1	Physikochemische Charakterisierung .....	- 76 -
5.3.2	Zellkultur .....	- 77 -
5.4	Zusammenfassung .....	- 84 -
6	Projekt 3: MDR1-Silencing mit Lipopolyplexen .....	- 85 -
6.1	Einleitung .....	- 85 -
6.1.1	RNA-Interferenz .....	- 85 -
6.1.2	MDR1-Knockdown .....	- 87 -
6.1.3	Doxorubicin .....	- 89 -
6.2	Methoden .....	- 90 -
6.2.1	Herstellung der Liposomen .....	- 90 -
6.2.2	Herstellung der Polyplexe & Lipopolyplexe .....	- 90 -
6.2.3	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) .....	- 90 -
6.2.4	Laser-Doppler-Anemometrie .....	- 90 -
6.2.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	- 91 -
6.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 91 -
6.2.7	Zellkultivierung .....	- 91 -
6.2.8	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	- 93 -
6.2.9	CAM-Assay .....	- 93 -
6.2.10	Scratch-Test .....	- 94 -
6.2.11	Transwell Migration Assay .....	- 95 -
6.2.12	Clonogenic Assay .....	- 97 -
6.2.13	MDR1 silencing und RT-qPCR .....	- 97 -

6.2.14	MTT-Assay .....	- 99 -
6.3	Ergebnisse und Diskussion .....	- 100 -
6.3.1	Physikochemische Charakterisierung .....	- 100 -
6.3.2	Bildgebende Verfahren .....	- 102 -
6.3.3	Zellkultur.....	- 103 -
6.4	Zusammenfassung.....	- 112 -
7	Anhang.....	- 113 -
7.1	Literaturverzeichnis .....	- 113 -
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	- 144 -
7.3	Tabellenverzeichnis .....	- 150 -
7.4	Erklärung.....	- 151 -

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich allgemein mit der Entwicklung von Genterapeutischen Transfektionssystemen mit dem vorrangigen Ziel die Behandlungsmöglichkeiten bei Tumorerkrankungen zu optimieren und auszubauen. Durch die Weiterentwicklung und Verknüpfung etablierter Systeme sollen neue Möglichkeiten geschaffen werden, um die Therapie onkologischer Erkrankungen zielgerichteter und effizienter zu gestalten. Die drei nachfolgend beschriebenen Projekte adressieren dieses Ziel auf unterschiedlichen Wegen.

Im 1. Projekt in Kapitel 4 werden Polyethylenimin-Silica-Nanopartikel als effiziente Genterapeutische Vektoren beschrieben. Durch die Kombination der beiden etablierten Vertreter aus der Gruppe der nicht-viralen Vektoren konnten wir eine deutliche Verbesserung des Transportsystems erreichen. Die zytotoxischen Nebenwirkungen sind im Vergleich zu den einzelnen Komponenten wesentlich geringer ausgeprägt, wenngleich die Transfektionseffizienz verglichen mit Polyplexen um rund 40 % gesteigert werden konnte. Auch die Resilienz gegenüber lagerungsbedingten Veränderungen wurde erhöht, wodurch sich wesentliche Vorteile im Hinblick auf die spätere Handhabung ergeben.

Das 2. Projekt in Kapitel 5 befasst sich mit der Tauglichkeit von Biolumineszenz zur selbstinduzierten Photodynamischen Therapie. Hierfür haben wir Lipopolyplexe verwendet, um Zellen durch Transfektion zur Biolumineszenz zu befähigen. Infolge der emittierten Strahlung soll es zur Aktivierung eines, in der Lipopolyplex-Membran eingearbeiteten, Photosensetizers kommen, der die Zerstörung der angrenzenden Tumorzellen induziert. Wir konnten die Absorption des BL-emittierten Lichts durch den eingesetzten PS nachweisen, jedoch als dessen Folge keine toxischen Effekte beobachten. Letztendlich konnten wir den Lichtschwellenwert, der für die PDT benötigt wird, nicht durch Biolumineszenz generieren.

In dem 3. Projekt in Kapitel 6 beschreiben wir Lipopolyplexe als effektive Vektoren für den MDR1-Knockdown, in dessen Folge durch die Überexpression von P-Glykoprotein vermittelte Zytostatikaresistenzen wieder zurückgebildet werden. Wir konnten für unseren Vektor eine Reduzierung der MDR1-mRNA um ca. 60 % nachweisen, in dessen Folge wir eine Sensitivitätssteigerung für 125 µg DOX / ml von keiner toxischen Wirkung hinzu einer Zellüberlebensrate von knapp 50 % beobachten konnten.

## Summary

The present work is generally concerned with the development of gene therapy transfection systems with the primary goal of optimizing and expanding the treatment options for tumor diseases. By further developing and linking established systems, new possibilities are to be created to make the therapy of oncological diseases more targeted and efficient. The three projects described below address this goal through different approaches.

In the 1st project in chapter 4 we describe polyethylenimine silica nanoparticles as efficient gene therapy vectors. By combining two established representatives from the group of non-viral vectors, we were able to achieve a significant improvement with regard to important properties. With different toxicity studies in cell culture we could prove that the cytotoxic side effects are much less pronounced compared to the individual components. For later use in practice, this optimization is of particular relevance because toxicity in particular is a major limiting factor for the use of non-viral gene therapeutics. Consequently, reduced side effects and improved compliance can be expected in future applications. Furthermore, we have demonstrated an increased transfection efficiency of about 40% compared to polyplexes. Especially this outstanding performance makes our vector an attractive candidate for gene therapy applications.

We have demonstrated the maintenance of structural integrity of our vector over several days by a multi-day series of measurements to test the resilience to agglomeration events. The tendency to form agglomerates, which we observed to a particular extent with silica-NP, could thus be prevented. In terms of subsequent manageability and storage, this conversion is an enormous gain.

The 2nd project in chapter 5 deals with the suitability of bioluminescence for self-induced photodynamic therapy. For this purpose, we transfected cells with pCMV-luc loaded lipopolyplexes to enable them for bioluminescence. The light beams emitted by the BL are expected to activate the photosensitizer hypericin embedded in the envelope of the transport system and consequently lead to apoptosis of the adjacent tissue through its toxic response.

By studying the reciprocal effects of different amounts of hypericin and D-luciferin on the light emission from a luciferase-expressing target line, we were able to draw conclusions about the activation of hypericin by cell line bioluminescence. Comparing the emitted light beams in the

absence and presence of different hypericin enrichments, we observed the absorption of a subset of the emitted light. However, the light absorption was not affected by the increase in hypericin concentration. As a result of light absorption by hypericin, we did not observe any toxic effects on the cell line used. Significant differences that we observed in MTT experiments were only due to the amount of D-luciferin used. Despite demonstrated absorption by the photosensitizer, no measurable toxic effects occurred. Consequently, the light released during the bioluminescence reaction is not sufficient to achieve efficient activation of the photosensitizer hypericin.

In the 3rd project in Chapter 6, we describe lipopolyplexes as effective vectors for MDR1 knockdown by RNA interference, as a result of which cytostatic resistance mediated by overexpression of P-glycoprotein is reversed. Using RT-qPCR, we detected a reduction of MDR1 mRNA by approximately 60%. Polyplexes achieved only half the reduction with the same siMDR1 concentration. Especially for low DOX concentrations, we were able to show a pronounced recovery of sensitivity as a consequence of MDR1 knockdown. From no toxic effect at a concentration of 125 µg DOX / ml to a cell survival rate of almost 50% with preceding MDR1 knockdown with lipopolyplexes. Especially for clinical practice, the efficacy at low concentrations is important, since dose increases are often not possible due to pronounced side effects.

Since a number of other factors are also discussed in close connection with the concentration of MDR1, which significantly influence the course and lethality of tumor disease, we investigated the effect of MDR1 knockdown on these characteristics, which include cell migration, invasion, proliferation and colonization. For all factors, we found a significant reduction in the respective trend correlating with the extent of MDR1 reduction through various in vitro experiments. These findings are generally supportive of the MDR1 knockdown therapy approach, as tumor cell spread is impaired in addition to improved efficacy of cytostatic therapy.

# 1 Gentherapie: Ein einleitender Überblick

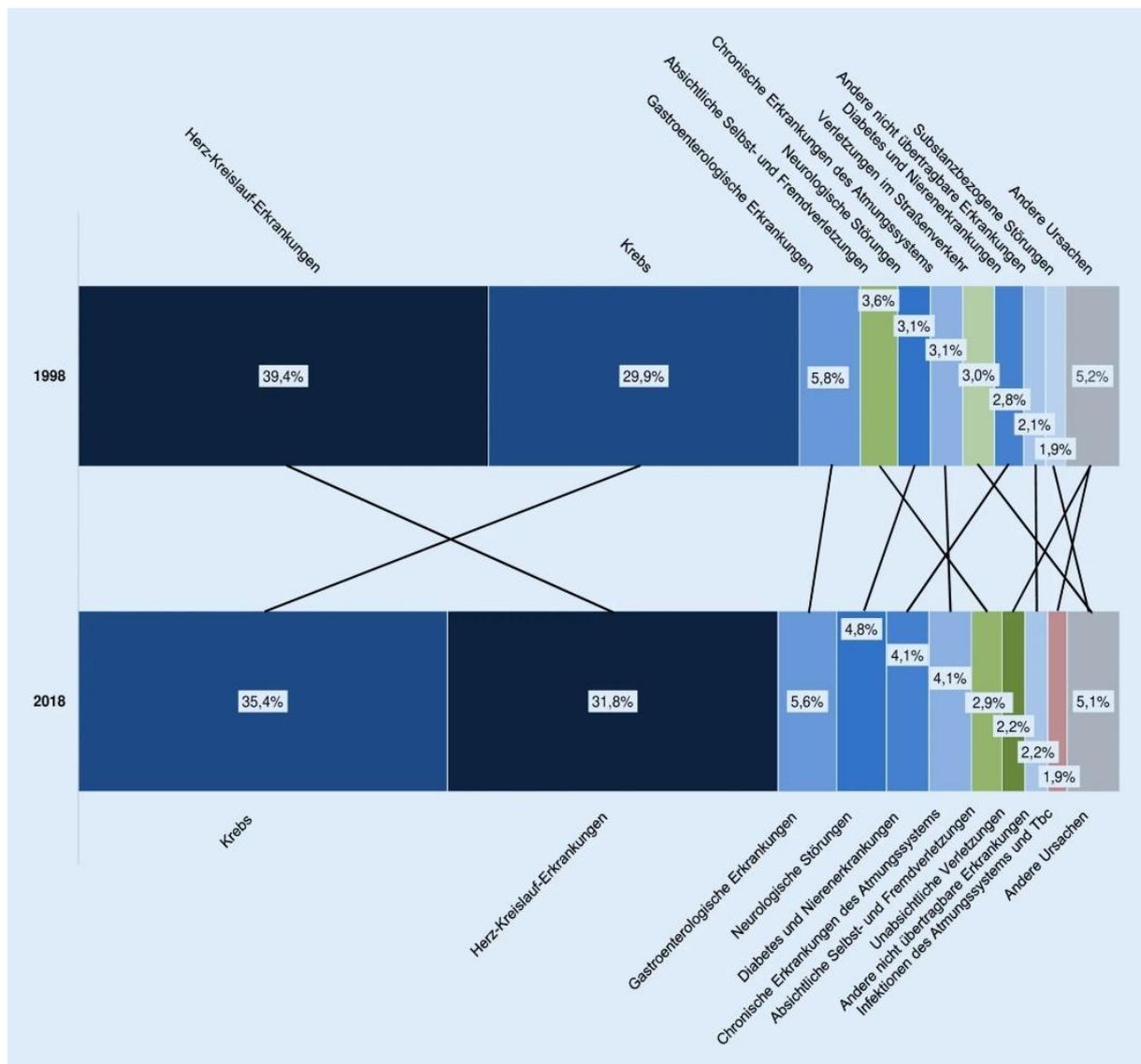
Gentherapie ist gegenwärtig nicht nur in Fachkreisen ein multilateral diskutiertes Thema: Manipulierte Lebensmittel, Designerbabys, die Genschere CRISPR/Cas und letztendlich auch die aktuelle Diskussion rund um Effektivität und Risiken der SARS-CoV-2 Impfung haben in letzter Zeit für Schlagzeilen gesorgt und formten in der Bevölkerung den eher negativ assoziierten Begriff der Gentherapie.

Definitionsgemäß versteht man unter Gentherapie das „Einbringen von Erbinformation in Körperzellen mit dem Ziel, Erkrankungen zu diagnostizieren, zu lindern oder zu heilen“. Vakzine mit rekombinanten Nukleinsäuren, wie z.B. die mRNA-basierten Impfstoffe gegen SARS-CoV-2, fallen somit nach EU-Richtlinie 2001/83/EG nicht in den Geltungsbereich der Gentherapie [1]. Wie eingangs erwähnt, assoziieren große Teile der westlichen Bevölkerung den Begriff „Gentherapie“ vor allem mit Gefahren. Eine wesentliche Rolle scheint dafür die innere Urangst vor einer genetischen Optimierung der Bevölkerung, in der kein Spielraum für Individualität und persönliche Entfaltung bleibt, zu spielen [2,3]. Der US-amerikanische Science-Fiction-Film Gattaca aus dem Jahr 1997 mahnt auf dramaturgische Weise vor den Gefahren, die in einer Welt ohne ethische und moralische Grenzen durch genetische Manipulationen denkbar wären. Aber ist Gentherapie wirklich so gefährlich und die Veränderung unserer Gene grundsätzlich schlecht?

Natürlich nicht! Durch die großen Fortschritte auf dem Forschungsgebiet der DNA-Sequenzierung ist bekannt, dass etwa acht Prozent des menschlichen Genoms von viralem Ursprung sind. Über Generationen hinweg wurde die fremd-DNA in unser Erbgut integriert und von Generation zu Generation weitergegeben. Diese genetische Veränderung war jedoch keinesfalls ein Nachteil für unsere Vorfahren oder führte zu Dysfunktion und Krankheit. Noch für uns heute spielt diese virale Komponente eine wichtige Rolle für die Funktionalität unseres Immunsystems und ist somit ein Überlebensvorteil, der sich evolutionär durchgesetzt hat [4].

Aktuell sorgt die ständig steigende Lebenserwartung und die damit einhergehende demographische Entwicklung unserer Bevölkerung für eine nachhaltige Veränderung des Krankheitsgeschehens weltweit. Erkrankungen, die vor allem im fortgeschrittenen Alter eine zunehmende Rolle spielen, nehmen überproportional zu [5]. Wirft man beispielsweise einen Blick auf die Entwicklung von onkologischen Leiden, als Platzhalter für Alterserkrankungen

allgemein, so sieht man seit Jahren steigende Zahlen der Inzidenzen (vgl. **Abbildung 1.1**). Lässt man hier vor allem die gesamtwirtschaftlichen und humanitären Konsequenzen, die eine Krebserkrankung nicht nur für den Erkrankten und dessen Umfeld, sondern für unsere gesamte Gesellschaft mit sich bringt, nicht außer Acht, wird die Dringlichkeit bei der Entwicklung adäquater und effizienter Therapiekonzepte deutlich [6].



**Abbildung 1.1:** Anteile der verlorenen Lebensjahre (CELT-basiert) in Deutschland 1998 und 2018 für die jeweils 10 bedeutendsten Todesursachen gemäß Level 2 der Global-Burden-of-Disease-(GBD)-Klassifikation. Datenquelle: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) [7].

Großes Potenzial sehen viele Experten hier auf dem Gebiet der Gentherapie. Doch die Entwicklung entsprechender Arzneimittel ist sehr langwierig und komplex. Nachdem in den 50er Jahren der Aufbau und die Struktur der DNA aufgeklärt waren, erkannte die Wissenschaft

sofort das Potenzial, das ihnen diese Entdeckung offenbart. Man träumte von der Wunderwaffe zur Behandlung von Erbkrankheiten, Krebs und genetischen Defekten [8]. Die ersten experimentellen Studien konnten aufgrund des limitierten technologischen Entwicklungsstands zur damaligen Zeit erst Jahre später umgesetzt werden. Die Herausforderung war es, das genetische Material funktionsfähig in die entsprechenden Zielzellen zu transportieren. Da es für die Souveränität unseres Organismus jedoch unerlässlich ist, fremde DNA nicht in unsere Zellen aufzunehmen und zu prozessieren, gibt es eine Vielzahl hocheffektiver Mechanismen um dieses Genmaterial abzufangen und unschädlich zu machen. Nackte DNA kann Zellmembranen nicht passieren und wird im Blutkreislauf durch intrazelluläre Enzyme abgebaut [9]. Um Nukleinsäuren in Zellen zu transportieren benötigt man daher adäquate Transportsysteme (Vektoren), die die Nukleinsäuren komplexieren und vor zirkulierenden Nukleasen schützen, sowie sicher über die Zellmembran der Zielzellen geleiten [10]. Dabei sollte der Vektor möglichst keine Immunreaktionen verursachen, er darf nicht toxisch für den Patienten sein und sollte selektiv an die Zielzellen adressierbar sein. Weiterhin sollte der Vektor keine Dissipation im Körper durch das Lymphatische System oder den Blutkreislauf verursachen [11].

Knapp ein halbes Jahrhundert nach der Grundsteinlegung waren Rosenberg und Mitarbeiter davon überzeugt, zuvor genannte Hürden überwunden zu haben und führten 1989 die erste klinische Studie auf dem Gebiet der Gentherapie durch. Sie verwendeten einen Retrovirus zur Transduktion tumorinfiltrierender Lymphozyten, die für ein Neomycin-Marker-Gen codierten [12]. In Fachkreisen blickte man erwartungsvoll auf die Ergebnisse der Studie. Ersehnte man doch einen disruptiven Durchbruch, der die Gentherapie als universelles Konzept zur Behandlung diverser schwer therapierbarer Krankheiten befähigt [13]. Retrospektiv war dieser Enthusiasmus wohl etwas schwärmerisch, berücksichtigt man die derzeit doch sehr rudimentäre Technologie in den Bereichen der Zellkultivierung und Vektorforschung. Die große Ernüchterung und öffentliche Diskreditierung folgten, als sich statt der erhofften Therapieerfolge schwere immunologische Nebenwirkungen offenbarten [14].

In den 90er Jahren wurden rund 500 Gentherapiestudien durchgeführt, jedoch ohne nennenswerte Erfolge. Der große Durchbruch blieb aus und somit auch allmählich das Interesse der Pharmazeutischen Industrie, die bis dato die Forschung mit monetären Zuwendungen und Förderungen unterstützte. So verlagerte sich die Gentherapeutische Forschung nahezu

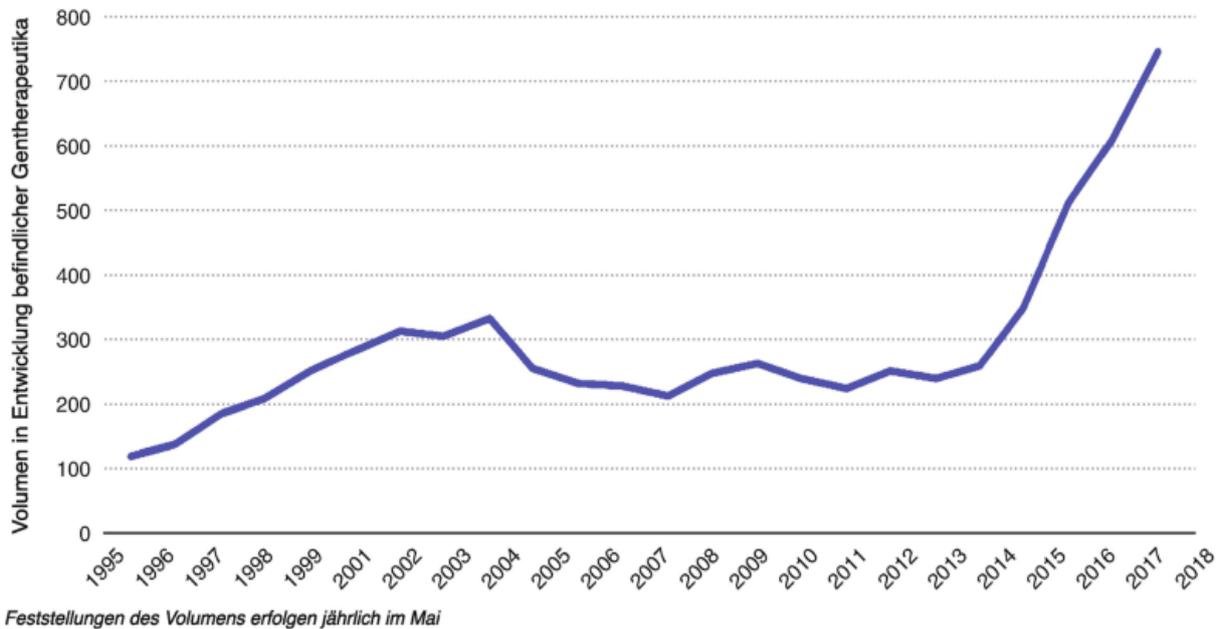
ausschließlich an die universitären Einrichtungen. Die Ausnahme machten einige wenige kleinere Biotech-Unternehmen.

Wieder aus dem Fokus verschwunden, kam es Anfang der 2000er Jahre zu ersten von der Öffentlichkeit kaum wahrgenommenen klinischen Erfolgen. Einen eindrucksvollen Beweis für die Wirksamkeit der Gentherapie zeigte die erfolgreiche Behandlung von Leukämie Patienten mit gentherapeutisch veränderten CAR-T-Zellen [15]. Diese Arbeit bildete die Grundlage der später in der EU zugelassenen Medikamente Kymriah® und Yescarta®. Hierbei werden dem Patienten durch Apherese eigene T-Zellen entnommen und ex-vivo mittels lentiviralen Vektoren transfiziert und vermehrt. Die entsprechenden DNA-Sequenzen werden in das Genom der Zielzellen integriert, sodass die genetischen Veränderungen auch nach der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden. Durch die Transfektion wird ein chimärer Antigenrezeptor („chimeric antigen receptor“, CAR) auf der Zelloberfläche präsentiert, welcher an das CD19-Antigen der B-Zellen des Immunsystems komplementär bindet. Die so modifizierten und expandierten Zellen werden dem Patienten reinfundiert. Da es bei der Anwendung relativ häufig zu schweren immunologischen Nebenwirkungen kommt, wird diese Art der Gentherapie vor allem bei schwer therapierbaren malignen hämatologischen Formen der Leukämie, wie ALL (akute lymphatische Leukämie) und NHL (Non-Hodgkin-Lymphom) angewendet [16-18].

In den darauffolgenden Jahren häufen sich die Berichte von weiteren Behandlungserfolgen. Sowohl bei angeborenen monogenen Erbkrankheiten als auch bei verschiedenen onkologischen Erkrankungen konnten Gentherapeutische Arzneimittel erfolgreich Anwendung finden [19]. Das erste in der Europäischen Union zugelassene Gentherapeutikum war Glybera® (Alipogene tiparvovec). Es wurde im Oktober 2012 für die Behandlung der äußerst seltenen Erbkrankheit Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD) zugelassen. In Deutschland leben weniger als 50 Menschen mit dieser Erkrankung, bei der es bedingt durch eine Genmutation zum Verlust eines regulatorischen Enzyms für den Abbau von Nahrungsfetten kommt. Bereits fünf Jahren nach der Zulassung hat der Hersteller uniQure Glybera® 2017 wieder vom Markt genommen. Das sehr kleine Patientenkollektiv und die enorm hohen Therapiekosten von rund 1.000.000 € pro Patient machten es wirtschaftlich nicht lukrativ [20].

Ungeachtet dieses Niederschlags steigt das Interesse der Pharmazeutischen Industrie und der universitären Einrichtungen an Gentherapeutischer Forschung seit nunmehr 10 Jahren

ununterbrochen an. **Abbildung 1.2** veranschaulicht das rasant steigende Volumen an Gentherapeutischen Arzneimitteln, die sich bis 2018 in den präklinischen Studien befanden.



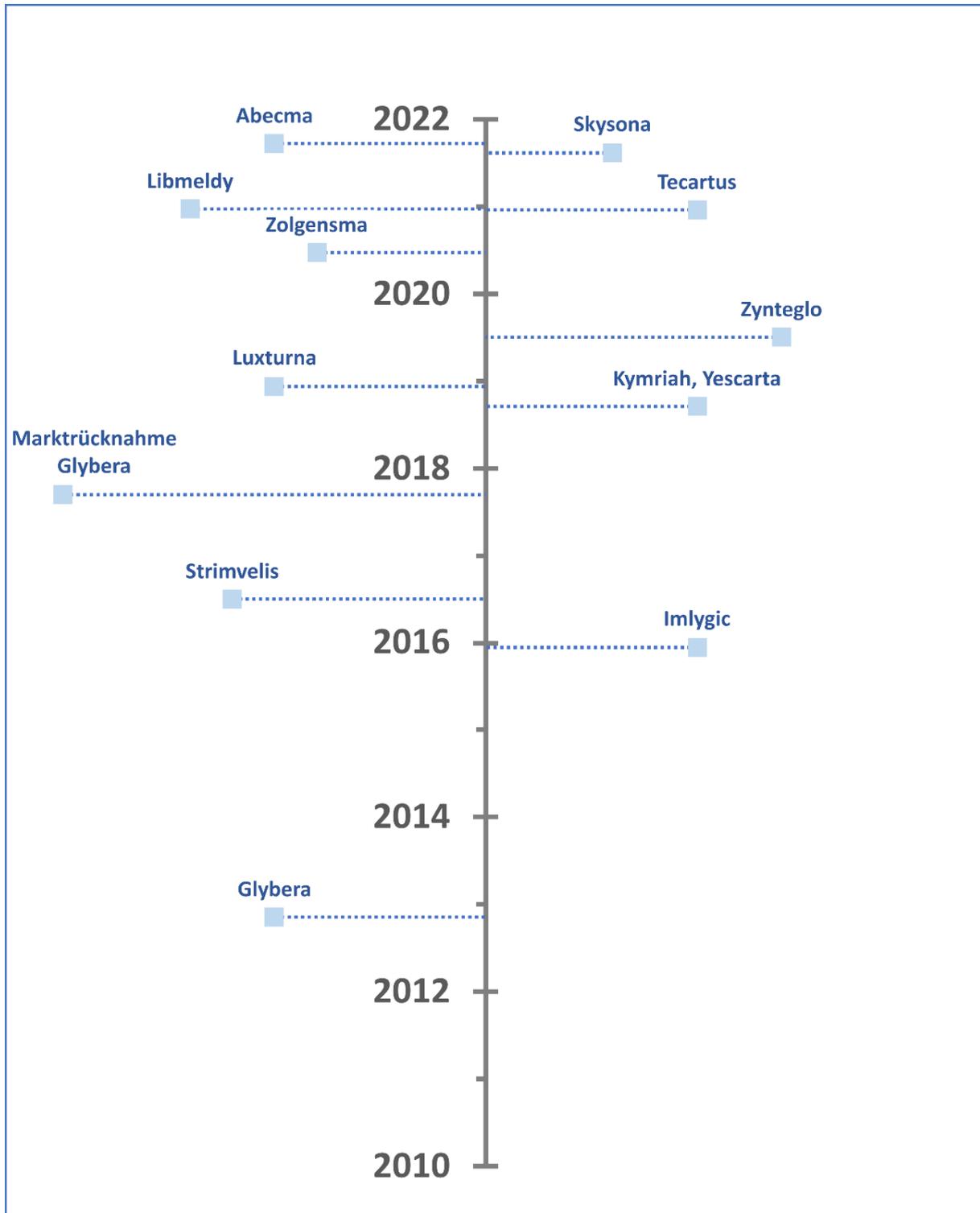
Quelle:  
Informa's Pharmaprojects®, August 2018

**Abbildung 1.2:** Volumen der Gentherapeutischen Arzneimittel, die sich in der präklinischen Vorregistrierungsphase befinden (1995–2018) [21]

In der klinischen Anwendung spielen Gentherapeutische Arzneimittel bis heute jedoch nur eine sehr untergeordnete Rolle, die nur einem sehr kleinen Patientenkollektiv zugutekommen. In **Abbildung 1.3** wird eine zeitlich eingeordnete Übersicht, der in der EU zugelassene Gentherapeutika dargestellt. Eine Akkumulation der Zulassungen, vor allem in den letzten Jahren, zeigt den zunehmenden Erfolg dieser Art von Arzneimittel. Um jedoch das enorme Potenzial auszuschöpfen, welches uns die Gentherapie bereithält, bedarf es weiterer intensiver Forschungsbemühungen. Die Therapie muss zielgerichteter, effektiver, verträglicher und vor allem wirtschaftlicher werden, um ihre adäquate Rolle in der klinischen Anwendung zu bestreiten [22].

Aufgeführt werden muss in diesem Zusammenhang jedoch, dass das Covid-19 Vakzin Comirnaty® der Hersteller BioNTech und Pfizer das weltweit umsatzstärkste Arzneimittel im Jahr 2021 war und wohl auch 2022 werden wird [23]. Aufgrund der eingangs beschriebenen Klassifizierungskriterien wird es aber nicht den Gentherapeutika zugeordnet, obgleich die der Vakzin-Entwicklung zugrunde liegende Forschung aus der Entwicklung diverser

Gentherapie übernommen ist. Es ist jedoch ein eindrucksvolles Beispiel, wie schnell sich durch veränderte Gegebenheiten ein disruptiver Umschwung im Arzneimittelmarkt beobachten lässt.



**Abbildung 1.3:** Zeitstrahl von den in der EU-Zulassungen Gentherapeutischen Arzneimittel. Berücksichtigt sind die Jahre 2010 bis 2022. Nach Angaben des Paul-Ehrlich-Institut.

## 1.1 Somatische Gentherapie

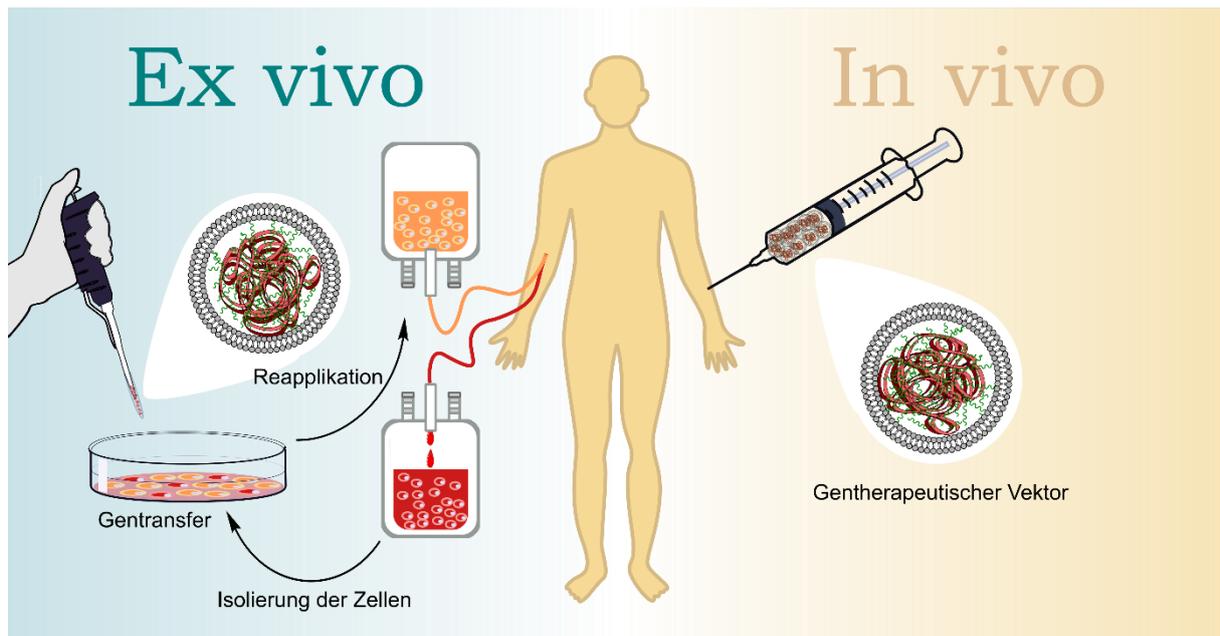
Unter somatischer Gentherapie versteht man den Transfer von therapeutischen Genen in Körperzellen, die nicht den Fortpflanzungszellen zugehörig sind. Sie steht im Gegensatz zu der Keimbahntherapie, die nur auf Fortpflanzungszellen, zu denen Spermatozoen, Eizellen und deren Vorläuferzellen gehören, ausgerichtet ist. Die Auswirkungen der somatischen Gentherapie beschränken sich dadurch ausschließlich auf den behandelten Patienten selbst, nicht aber auf dessen Nachkommen. Nur durch die Keimbahntherapie kann es zu dauerhaften Veränderungen des Genoms kommen, die vererbbar sind und somit auch Auswirkungen auf das Leben zukünftiger Generationen haben können [24-26]. Durch die nicht absehbaren Folgen für spätere Generationen ist in Deutschland ausschließlich die somatische Gentherapie erlaubt. Genetische Veränderungen von Keimbahnzellen sind aus ethischen Gründen nur an Tiermodellen möglich [27,28]. Angesichts der gesetzlichen Rahmenbedingungen ist es nicht überraschend, dass sich alle zuvor beschriebenen Forschungsbemühungen und daraus entstandenen Zulassungen Gentherapeutischer Arzneimittel auf den Bereich der somatischen Gentherapie beschränken.

Greift man den einleitenden Gedanken der veränderten Welt aller Gattaca auf, ist die Aufteilung der Gentherapie in diese beiden Unterkategorien von entkräftender Bedeutung, wirkt sich die genetisch Veränderung der somatischen Gentherapie doch nur auf den behandelten Patienten selbst und nicht auf dessen Nachkommenschaft aus [29]. Die düsteren Befürchtungen der Filmemacher können an diesem Punkt also klar entkräftet werden.

## 1.2 In-vivo und ex-vivo

Ein weiteres Unterscheidungskriterium in der Gentherapie ist die Umgebung, in der die Transfektion stattfindet. Je nachdem wird zwischen zwei technischen Verfahren unterschieden. Bei der in-vivo Therapie findet die Transfektion der Zellen im Patienten selbst statt. Die Gentherapeutischen Vektoren werden dem Patienten appliziert, dort findet dann die Transfektion der adressierten Zellen statt, die zu der gewünschten therapeutischen Wirkung führt. Die Applikation kann hierbei entweder in das Zielgewebe direkt oder über andere Applikationswege letztlich über den Blutkreislauf erfolgen. Am geläufigsten ist die Injektion in die Blutbahn, aber auch die pulmonale Applikation mit einem elektrischen Vernebler ist

möglich, stellt aber entsprechende Ansprüche an das verwendete Vektorsystem [30,31]. Generell sind die Anforderungen an die Vektoren bei der in-vivo Therapie besonders hoch, da diese hierbei in direktem Kontakt mit dem Patient stehen und Komplikationen so unmittelbare Auswirkungen für den Patienten haben. Neben der Verträglichkeit müssen vor allem die Anforderungen der jeweiligen Applikation und Stabilität bei der vorangegangenen Lagerung Berücksichtigung finden [32-35].



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Unterschiede von ex-vivo und in-vivo Gentherapie am Beispiel der Applikation von Lipopolyplexen als Gentherapeutischer Vektor.

Bei der ex-vivo Therapie erfolgt die Transfektion der Zellen unter Laborbedingungen in Kultur. Sie findet also außerhalb des menschlichen Körpers statt. Einen übersichtlichen Vergleich soll hier **Abbildung 1.4** liefern. Dazu werden dem Patienten entweder selbst (autolog) oder einem passenden Spender (allogen) die entsprechenden Zellen im Vorfeld entnommen und vervielfältigt. Die Modifikation mit dem Gentherapeutischen Vektor erfolgt dann in Zellkultur. Nach der erfolgreichen Transfektion der Zellen werden diese dem Patienten wieder reappliziert [36]. Die Anforderungen an den Vektor selbst sind bei diesen Verfahren vergleichsweise gering, da es zu keinem direkten Kontakt zwischen Vektor und Patient kommt. Außerdem ermöglicht dieses Verfahren, dass die Effektivität der Transfektion vor der Applikation überprüft werden kann oder Reinigungsschritte durchgeführt werden können. Sollte es beispielsweise zum Auftreten von Komplikationen bei der Transfektion kommen, so kann die Therapie einfach mit neuen Zellen wiederholt werden.

Voraussetzung für die ex-vivo Therapie ist, dass die Zellen, zumindest temporär, in Kultur gehalten werden können. Durch intensive Forschungsanstrengungen und kontinuierliche Verbesserungen der Nährmedien und Kulturhaltung ist das heute bei einer Vielzahl von Zelllinien möglich. Als besonders prädestiniert hervorzuheben sind hier die Hämatocyten, da sie von Natur aus außerhalb eines Zellverbands in einem Flüssigmedium leben. Aber auch einige Stammzellen aus „festen“ Geweben konnten an das Wachstum in zum Teil sehr speziellen Kulturgefäßen adaptiert werden [37].

Beispiele für in der EU zugelassene ex-vivo Gentherapeutika sind die zuvor beschriebene CAR-T Zelltherapie oder die ADA-SCID Therapie [38,39]. Weitere sollen in naher Zukunft folgen. Letztendlich bleiben jedoch mehrere Hindernisse bestehen, die gegen eine breite Anwendung der ex-vivo Gentherapie sprechen. Die Herstellung der entsprechenden Arzneimittel ist durch die hohen Anforderungen an die Produktionsstätte, den hohen Bedarf an Fachpersonal und der entsprechenden Geräteausstattung sehr kostenintensiv. Des Weiteren ist die Durchführung der Therapie selbst und die nötige Anamnese im Vorfeld sehr zeitintensiv. Jeder Patient benötigt ein individuelles, auf ihn abgestimmtes und extra produziertes Arzneimittel. Durch den hohen Aufwand, der mit der Lukrativität für die Hersteller im Ungleichgewicht steht, nimmt in Zukunft wohl vor allem die in-vivo Gentherapie einen immer dominanteren Stellenwert ein. Besonders die vielversprechenden Ansätze, die unter dem Begriff „Genom-Editing“ zusammengefasst werden, gewinnen immer mehr an Relevanz für die klinische Praxis [40].

## 1.3 Virale Vektoren

Von Natur aus ist ein Virus darauf ausgerichtet, sein genetisches Material möglichst effektiv in seine Wirtszelle einzuschleusen und dort vervielfältigen zu lassen. Ihre über Jahrtausende evolutionär optimierten Fähigkeiten als natürliche Genfähren sind der Grund, warum Viren als erste genetische Vektoren Verwendung fanden.

Um ihn therapeutisch nutzen zu können, wird dem Virus seine virale Nukleinsäure-Komponente entnommen und gegen das therapeutische Gen bzw. die therapeutische RNA ausgetauscht. Infolge werden von den transfizierten Zellen keine neuen Viren produziert, sondern die eingebrachte DNA/RNA prozessiert. Die hohe Effektivität viraler Vektoren ist in diversen klinischen Studien belegt [41-43].

Aktuell gibt es mehrere zugelassene, auf viralen Vektoren basierte Gentherapeutika in der EU [44]. Für die Gentherapeutische Forschung haben sich vor allem Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren bewährt. Je nach Anwendungsgebiet und den daraus resultierenden Anforderungen an den Vektor, wie Effizienz, Transgenexpression, Einfachheit der Produktion, Sicherheit, Toxizität und Stabilität wird zwischen den verschiedenen Virenarten entschieden [45,46]. Eine Übersicht soll hier **Tabelle 1.1** geben.

**Tabelle 1.1**

Virale Vektoren in der Gentherapie

	Adenovirus	Lentivirus	Retrovirus	AAV
Virales Genom	dsDNA	ssRNA	ssRNA	ssDNA
Beladungsmenge	7,5kb (*30 kb)	9 kb	9 kb	<5 kb
Integration in Genom	Nein	Ja	Ja	Nein **

Übersicht über die Eigenschaften von viralen Vektoren, die in der Gentherapie Verwendung finden [47].

\* 30 kb bei "entkerntem" Adenovirus.

\*\* native AAVs (Adeno-assoziierte Viren) können in das Genom integrieren.

Nachteile der viralen Vektoren sind neben der limitierten Beladungsmenge vor allem das Risiko von übermäßigen Reaktionen des Immunsystems. Viren wirken charakteristisch immunogen, was gerade für Therapien mit Mehrfachapplikation schwerwiegende Komplikationen mit sich bringen kann [48-50]. Die Immunantwort auf den Vektor kann so schwerwiegend ausfallen, dass es sogar zum Tod des Patienten kommen kann. 1998 kam es im Rahmen einer klinischen Gentherapiestudie in Folge einer solch schweren Überreaktion auf einen adenoviralen Vektor zum Tod eines Probanden [51]. Auch eine Insertionsmutagenese der Virus-DNA in das menschliche Erbgut ist ein mögliches Risiko, dass bei einer sorgsamem Kosten-Nutzen Bewertung Beachtung finden sollte [52].

## 1.4 Nicht-Virale Vektoren

Um die immunologischen Probleme, die bei der Verwendung viraler Vektoren aufgetreten sind, zu umgehen, hat sich die Forschung schon früh mit der Entwicklung nicht-viraler Trägersysteme befasst. Wesentliche Vertreter dieser Gruppe sind kationische Polymere, Lipide, Nano- und Micropartikel oder verschiedene Kombinationen untereinander. [53]. Diese alternativen Vektoren besitzen keine virale Komponente, wodurch das Risiko von Immunreaktionen deutlich verringert wird. Auch die vielfältigen Möglichkeiten der Modifikation sind ein spezifischer Vorteil. Da nicht-virale Vektoren grundsätzlich de novo synthetisiert werden, kann durch die Auswahl der entsprechenden Komponenten vielseitig Einfluss auf die späteren Eigenschaften des Vektors genommen werden. Vor allem mit Blick auf gezielte „drug targeting“ Strategien ergeben sich hier klare Vorteile, soll die Therapie doch möglichst auf eine bestimmte, „erkrankte“ Zellgruppe ausgerichtet sein. Außerdem können die Trägersysteme entsprechend der späteren Verwendung bezüglich ihrer Eigenschaften wie Beladungsmenge, Größe und Struktur hergestellt werden [54].

Die neue Entwicklung dieser Vektoren praktisch de novo und ihre Verbesserung vor allem hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz waren ein kontinuierlicher Prozess, der seine Zeit forderte. So erzielten nicht-virale Trägersysteme in ihren Anfängen weitaus niedrigere Transfektionsraten als ihre viralen Kontrahenten [55,56]. Angesichts der Jahrtausenden viraler Evolution und Optimierung ist dieser Umstand aber nicht verwunderlich. Durch das intensive globale Forschungsinteresse in den letzten zwei Dekaden folgten zahlreiche Verbesserungen und Weiterentwicklungen der nicht-viralen Trägersysteme, die die Effizienz und die Modifikationsmöglichkeiten Schritt für Schritt vorangetrieben haben. Besonders hinsichtlich der spezifischen Selektion der Zielzellen, erhöhter Stabilität und dem Schutz vor Abbau kam es zu eindrucklichen Fortschritten [57-59].

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt im Hinblick auf den erfolgreichen Übergang von Forschung in anwendbare Praxis erschließt sich aus der Möglichkeit des unkomplizierten Upscalen der Herstellungsmethode vom Labor in den großtechnischen Maßstab [60]. Letztlich ist die Wirtschaftlichkeit der Therapie für den Hersteller der entscheidende Motivationsgrund, um überhaupt die zur Erforschung notwendigen monetären Zuwendungen zur Verfügung zu stellen. Sowohl die einfachere großtechnische Herstellung als auch der wesentlich geringere

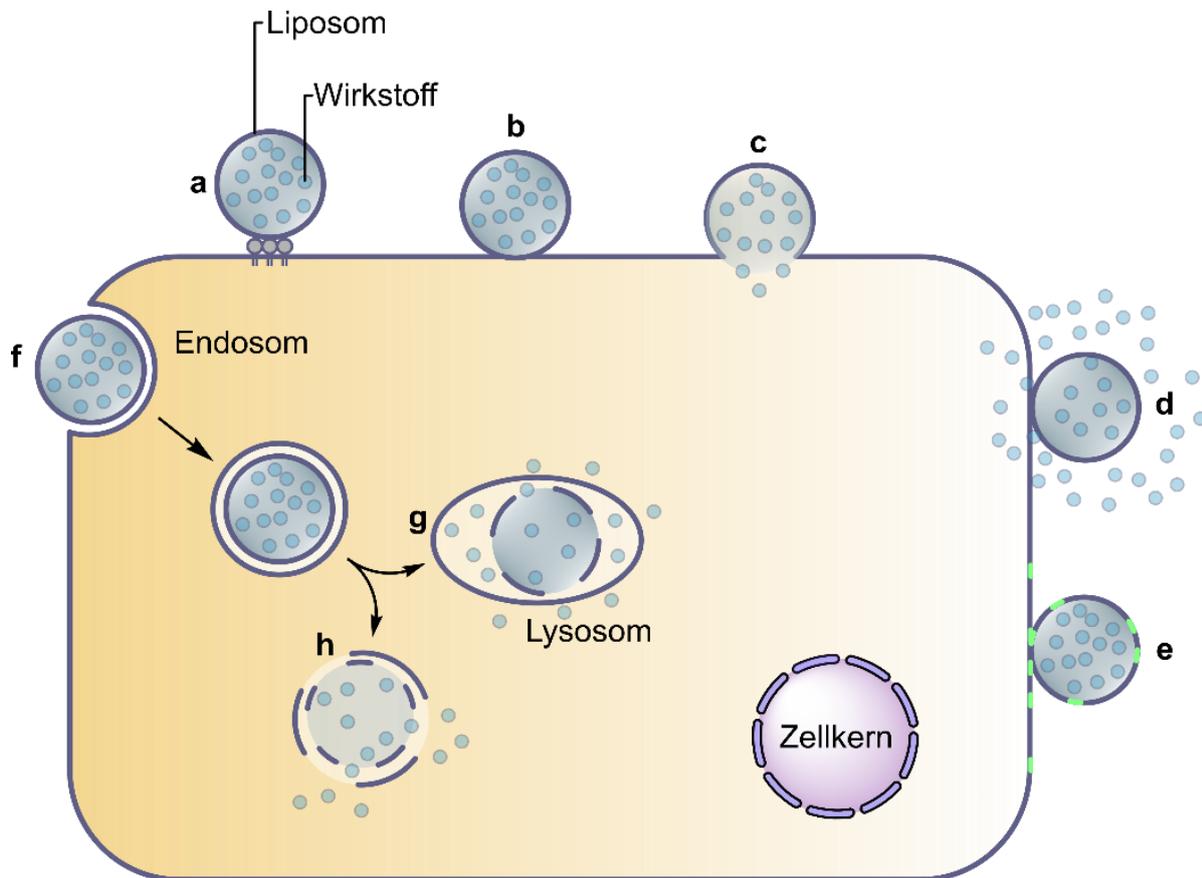
regulatorische Aufwand der für den sicheren Umgang mit viralen Vektoren betrieben werden muss, senken die Therapiekosten für nicht-virale Vektoren vergleichsweise deutlich [61].

### 1.4.1 Liposomen

Liposomen besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie als Vektoren für die Gentherapie prädestinieren. Ihre Herstellung kann mit geringem Material- und Zeitaufwand erfolgen. Sie besitzen eine hohe Biokompatibilität und können mit einer Vielzahl an Medikamenten, Nukleinsäuren und Diagnostika beladen werden [62,63]. Liposomen werden spontan durch die sphärische Anordnung von Phospholipiden in einem wässrigen Milieu gebildet. Die verwendeten Lipide charakterisieren sich durch eine hydrophile, polare Kopfgruppe an einer hydrophoben Kohlenstoffkette. Liposomen können wasserlösliche Wirkstoffe in ihrem hydrophilen Kern und wasserunlösliche Stoffel in ihrer Lipidmembran einschließen [64,65]. Besonders Nukleinsäuren können durch elektrostatische Wechselwirkung effizient in Liposomen verkapselt werden, diese Komplexe werden als Lipoplexe bezeichnet. Zu ihren Charakteristika wurde bereits eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten veröffentlicht, weshalb auf eine gute Datenlage bezüglich Einschlusseffizienz und Freisetzungsmechanismen zurückgegriffen werden kann [66].

Für die Herstellung von Lipoplexen hat sich vor allem die Verwendung von kationischen Lipiden mit einer positiv geladene Kopfgruppe bewährt. Diese können die negativ geladenen Nukleinsäuren besonders effizient komplexieren. Beispiele hierfür sind DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin), DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan) und DOTMA (1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan) [67-69] . Allerdings sorgt die kationische Ladung auch teils für eine unspezifisch Bindung an Serumproteine, wodurch es zu einem erhöhten Risiko von toxischen Nebenwirkungen bei der Anwendung am Patienten kommen kann. Daher hat sich die Verwendung von Helferlipide wie DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) [70] oder Cholesterol [71,72], Phosphatidylcholinen [73,74] oder PEGlierten Lipiden bewährt, die sich in die Doppelmembran der Liposomen einlagern [75,76]. Durch diese Modifikationen wird die Oberflächenladung der kationischen Lipide und somit auch das Interaktionspotenzial mit dem Retikuloendothelialen-Systems (RES) reduziert, wodurch es zu einer Verlängerung ihrer Halbwertszeit sowie Verringerung ihrer Toxizität kommt [77].

Eine klare Stärke von Liposomen ist die Vielzahl an Modifikationsmöglichkeiten, die durch die Struktur der Lipide ermöglicht wird. So können gezielt einzelne Prozesse, wie die Aufnahme in die Zelle oder die intrazelluläre Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden. **Abbildung 1.5** bietet eine komprimierte Übersicht über verschiedene Wege der liposomalen Wirkstofffreisetzung.

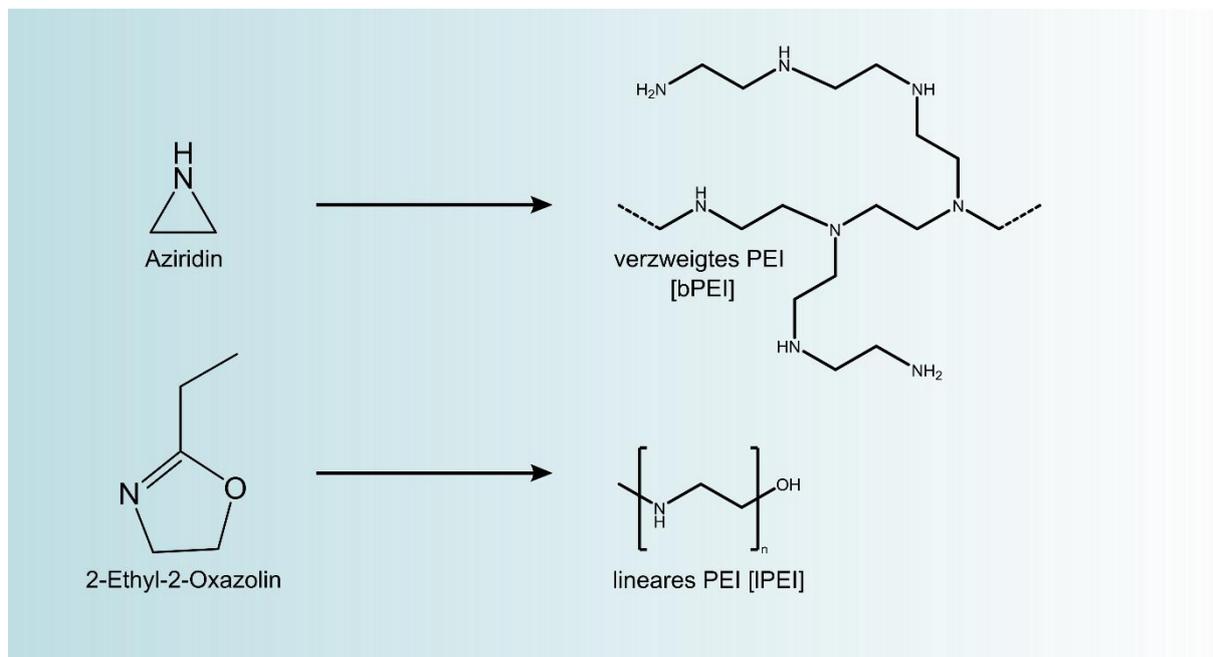


**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung von verschiedenen Wegen der liposomalen Wirkstofffreisetzung. Liposomen können spezifisch (a) oder unspezifisch (b) an der Zelloberfläche adsorbieren oder mit der Zellmembran verschmelzen (c), um anschließend ihren Inhalt in das Zytoplasma freizusetzen. (d) zeigt die Destabilisierung des adsorbierten Liposoms durch Zellmembrankomponenten, der freigesetzte Wirkstoff kann die Zellmembran anschließend durch Mikropinozytose passieren. Liposomen können direkt oder Transferprotein-vermittelt Lipidkomponente mit der Zellmembran austauschen (e) oder über spezifische oder unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (f). Das Endosom wird anschließend zum Lysosom, aus dem die Wirkstofffreisetzung erfolgt (g), oder es folgt eine Endosomen-Destabilisierung (h), in dessen Folge es zur Lyse der Membranen kommt [62].

Der große Nachteil der Lipoplexe ist ihre vergleichsweise geringe Transfektionseffizienz, die vor allem auf Defizite bei der effizienten Wirkstofffreisetzung zurückzuführen ist. Da dies als eigentliche Kernkompetenz von Genterapeutischen Vektoren verstanden wird, hat sich deren Verwendung für therapeutische Zwecke oftmals nicht durchgesetzt [78].

## 1.4.2 Kationische Polymere

Durch die Verwendung von kationischen Polymeren hat man einen Meilenstein bezüglich der Transfektionseffizienz unter den nicht-viralen Trägersystemen gesetzt. Die verwendeten Polymere besitzen ein stickstoffreiches Grundgerüst mit unterschiedlich stark ausgeprägter Verzweigung, wodurch sie bei physiologischem pH-Wert eine positive Ladung tragen. Aufgrund dieser positiven Ladung sind kationischen Polymere in der Lage, negative geladene Nucleinsäuren durch elektrostatische Wechselwirkungen zu komplexieren. Diese Komplexe nennt man Polyplexe [79-81]. Aufgrund eines positiven Ladungsüberschusses nach der Komplexierung besitzen Polyplexe die Fähigkeit, an negativ geladene Oberflächenstrukturen von Zellenmembranen zu adhären und schließlich durch Endozytose in den Intrazellularraum zu gelangen.



**Abbildung 1.6:** Synthese von bPEI und lPEI aus den jeweiligen Ausgangsstoffen Aziridin oder 2-Ethyl-2-Oxazolin.

Poly-L-Lysin (PLL) war das erste kationische Polymer, das für die DNA-Transfektion eingesetzt wurde [82]. Der wohl prominenteste und vielversprechendste Vertreter aus der Gruppe der kationischen Polymere ist aber Polyethylenimin (PEI). Strukturell unterscheidet man zwei unterschiedliche Arten von PEI. Verzweigtes PEI (bPEI) wird durch säurekatalysierte Polymerisation von Aziridinmonomeren synthetisiert, wodurch es zur zufälligen, netzartigen Verknüpfung der einzelnen Polymere kommt. Komplementär dazu entsteht lineares PEI (lPEI)

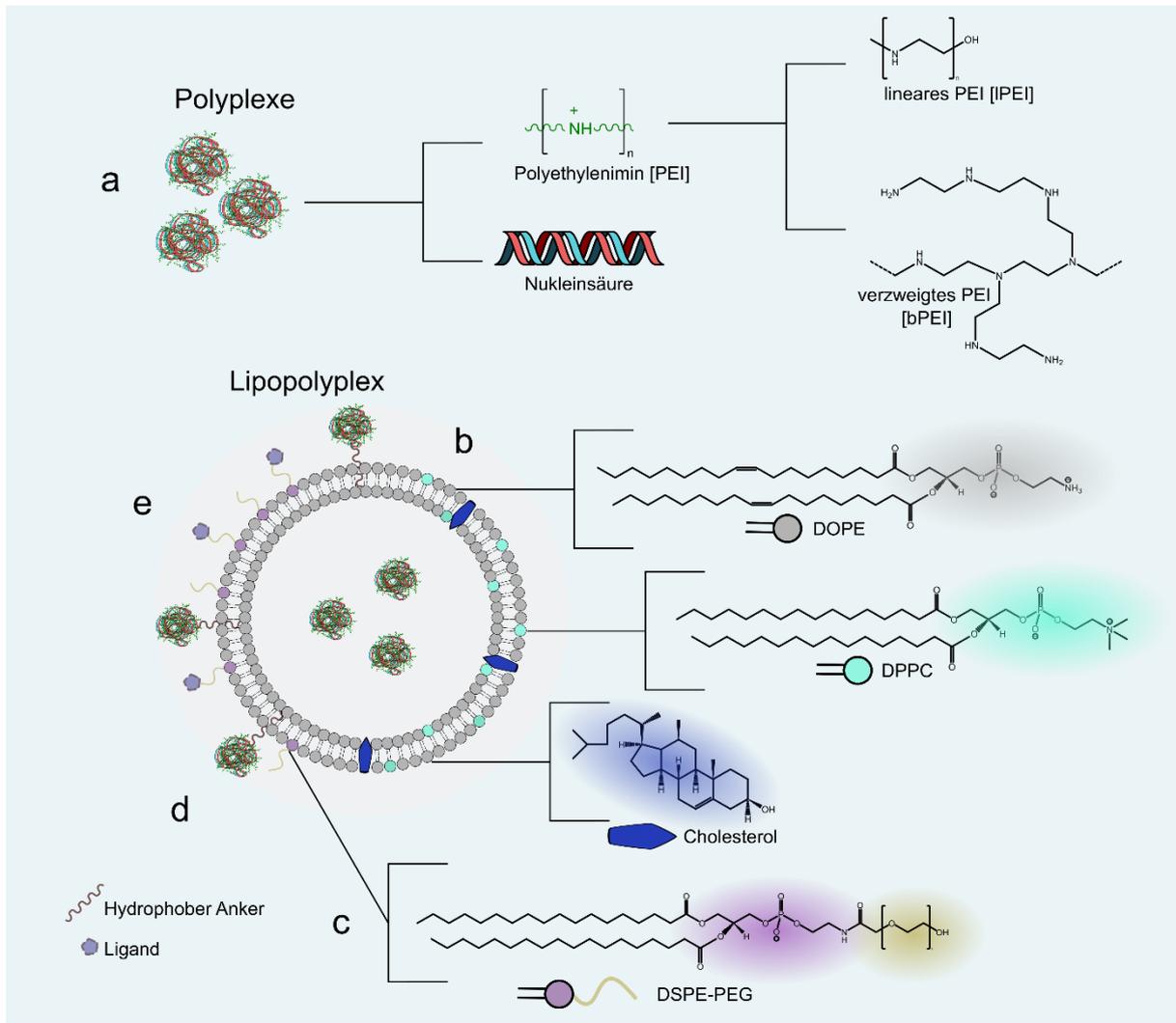
aus der Polymerisation von 2-Ethyl-2-Oxazolin Monomeren, die sich kettenförmig aneinanderreihen. Eine strukturelle Darstellung ist in **Abbildung 1.6** gegeben.

Sowohl bPEI als auch IPEI besitzen charakteristisch protonierbare Amingruppen an jeder dritten Position im Molekül, wodurch sie eine hohe kationische Ladungsdichte besitzen. Diese spielt für die Nukleinsäure-Komplexierung eine entscheidende Rolle [83-86]. Polyplexe können über Endozytose in Endosomen verpackt in die Zielzellen aufgenommen werden. Durch den nachfolgenden osmotischen Fluss in das Endosom kommt es zur Ruptur der endosomalen Membran und somit zur Freisetzung der Nukleinsäure [87,88]. Der Freisetzungsmechanismus selbst ist nicht endgültig aufgeklärt, am häufigsten wird jedoch die These des „Protonen-Schwamm-Effektes“ vertreten, um gerade die herausragende Effizienz von PEI im Vergleich zu anderen Polymeren zu erklären. Der „Protonen-Schwamm-Effekt“ postuliert, dass Protonen von vesikulären ATPasen in das Endosom gepumpt werden, in dessen Folge es zum Einstrom von Chloridionen und Wasser kommt. Dieser Einstrom führt zur osmotischen Schwellung und letztlich zur Ruptur des Endosoms, wodurch das Genmaterial freigesetzt wird [89]. Unstrittig und in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben, ist die bemerkenswerte Effizienz von PEI als Genterapeutischer Vektor [90-93]. Ein limitierender Faktor für den Einsatz von Polyplexen ist der Konflikt zwischen Transfektionseffizienz und Toxizität. Niedermolekulares PEI besitzt im Allgemeinen eine geringere Zelltoxizität. Bei der Verwendung von PEI mit einem höherem Molekulargewicht lässt sich neben der höheren Transfektionseffizienz aber auch eine gesteigerte Toxizität beobachten [94].

### 1.4.3 Lipopolyplexe

In den letzten Jahren hat sich eine neue Generation der nicht-viralen Trägersysteme in den Fokus der Forschung gedrängt. Durch die Verkapselung der zuvor beschriebenen Vektorsysteme aus kationischen Polymeren (Polyplexe) mit einer Lipiddoppelschicht erhält man Lipopolyplexe. **Abbildung 1.7** bietet eine strukturelle Übersicht. Durch die Kombination der bekannten Polyplexe mit Liposomen ist eine Fusion der positiven Eigenschaften beider Systeme gelungen. Die gute Biokompatibilität, einfache Oberflächenmodifikation, geringe Zytotoxizität und hohe zelluläre Aufnahme sind Eigenschaften, die von Seiten der Lipoplexe übernommen wurden. Die effiziente Kondensation von Nukleinsäuren, die umfangreiche intrazelluläre Freisetzung und folglich auch die hohe Transfektionseffizienz sind Eigenschaften, die den Polyplexen zuzuschreiben sind [95-97]. Zusätzlich verhindert die

Lipiddoppelschicht der Lipopolyplexe sowohl Wechselwirkung mit anionischen Bestandteilen des Blutserums und sorgt somit für eine verlängerte Stabilität nach intravenöser Applikation als auch die spontane Aggregationen untereinander, wodurch die biologische Aktivität für längere Zeiträume gewährleistet werden kann [98-100].



**Abbildung 1.7:** Strukturelle Darstellung des Aufbaus, der Beladung und der Modifikation von PEI-basierten Lipopolyplexen. **(a)** Aufbau von Polyplexen aus verzweigtem oder linearem PEI mit DNA/RNA. **(b)** Aufbau von Lipopolyplexen aus den kationischen Lipiden DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) und DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) mit Cholesterol. **(c)** Lipopolyplexe aus PEG-lierten Liposomen durch Verwendung von DSPE-PEG (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamin) konjugiert mit Polyethylenglykolketten. **(d)** Umgekehrte Lipopolyplexe, bei denen die Polyplexe kovalent an hydrophobe Anker (z. B. Triamcinolonacetonid) gebunden sind. **(e)** Lipopolyplex mit Zielliganden (z. B. Antikörper, Transferrin, Aptamere), die durch modifizierte Lipide über Polyethylenglykol (PEG) an die Oberfläche konjugiert sind.

Durch geringfügige Veränderungen der verschiedenen Herstellungsparameter wie Inkubationszeit im Ultraschallbad oder Porengröße der verwendeten Extrudermembran lässt sich der Durchmesser der Lipopolyplexe gut regulieren. Besonders zum gezielten Adressieren bestimmter Zellentypen durch Passives Drug Targeting wie es in der Krebstherapie zum Einsatz kommt, ist das ein klarer Mehrwert. Durch die Gewebeveränderung infolge einer onkologisch induzierten, expansiven Zellproliferation kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität und Retention der Vektoren im tumorösen Gewebes. Durch diese Lücken im Endothel können Nanopartikuläre Systeme, die im Größenbereich um 200 nm liegen, aus den Blutgefäßen in das erkrankte Gewebe gelangen, wohingegen der Austritt in gesundes Gewebe durch das geschlossene Endothel verhindert wird [101-104]. Darüber hinaus ermöglicht die modulare Architektur der Lipopolyplexe eine Reihe von Modifikationsmöglichkeiten an ihrer Oberfläche. Beispielsweise können Polyethylenglycol, Antikörpern und deren Fragmente, Peptiden, Proteinen, Glykoside und Aptameren angeknüpft werden, ohne die Struktur der Polyplexe im Inneren der Doppelmembran zu verändern oder die Integrität der Lipidhülle zu beeinträchtigen [105,106].

Die aufgeführten Stärken und mannigfaltigen Modifikationsmöglichkeiten machen Lipopolyplexe zu vielseitigen und effizienten Transportsystemen für den Einsatz in der onkologischen Genterapie. Nicht nur im Vergleiche mit nicht-viralen Vektoren besitzen Lipopolyplexe eine herausragende Transfektionseffizienz, die sie zum hoffnungsvollen Anwärter für zukünftige Therapiekonzepte macht [107].

#### **1.4.4 Feste Nanopartikel**

DNA an feste Nanopartikel zu binden, um sie so in die Zelle zu transportieren ist vor allem im Zusammenhang mit der ballistischen Injektion als neues Verfahren zur genterapeutischen Applikation entstanden. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass für die Herstellung der ersten Vertreter aus der Gruppe der „Nanoplexe“, Materialien mit einer hohen Dichte verwendet wurden. Vor allem metallische Nanopartikel aus Wolfram, Eisen oder Gold sind hier aufzuführen. An die Oberfläche dieser Trägermaterialien lassen sich eine Vielzahl von Molekülen, darunter auch Nukleinsäuren, adsorbieren oder binden und so in die Zelle verbringen [108-111].

Im Vergleich zu kationische Trägersystemen verhalten sich Nanoplexe weitgehend inert und allgemein unproblematisch hinsichtlich zytotoxischer Reaktionen. Außerdem besitzen sie eine ausgeprägte physikalische Stabilität, was sie beispielsweise im Vergleich zu Liposomalen Trägersystemen für bestimmte Applikationsformen prädestiniert. Auch gegenüber thermischer Belastung weisen Nanopartikel eine hohe Stabilität auf, wodurch sie sehr einfach sterilisiert werden können. Vor allem im Hinblick auf eine spätere kommerzielle Nutzung ist dieser Punkt als wesentlicher Vorteil zu verstehen [112,113].

Das große Defizit der Nanoplexe ist ihre niedrige Transfektionseffizienz. Da die damals verwendeten Metalle nicht biologisch abbaubar waren, kommt es zu einer geringeren Freisetzung der Nukleinsäuren im Zytosol [114]. Im Laufe der Jahre hat sich der Forschungsschwerpunkt in diesem Themengebiet von der ballistischen Applikation vor allem auf das endozytäre Einbringen der Trägersysteme in die zu transfizierenden Zellen verlagert. Durch verschiedene Modifikationen wurden hier vornehmlich Gold-Nanopartikel zu effektiven Vektoren weiterentwickelt und die zuvor beschriebenen Defizite bei der Nukleinsäure-Freisetzung überwunden. Durch die Kombination von Gold-NP mit Polyethylenimin wurde beispielsweise eine Steigerung der Transfektionseffizienz um das 6-8 fache im Vergleich zu den entsprechenden Polyplexen beschrieben [115,116].

Auch Silica-Nanopartikel sind vor allem aufgrund ihrer einfach zu modifizierenden Oberfläche und hohen Biokompatibilität bei der Herstellung von Nanoplexen im Fokus der Wissenschaft. Zahlreiche Arbeiten belegen die Effizienz dieser Trägersysteme und ihr Potenzial für die Gentherapie [117-121].

## 2 Zielsetzung

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von effizienten Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie. Dafür werden nachfolgend drei Projekte beschrieben, in denen wir unterschiedliche Ansätze verfolgen jeweils mit dem Ziel, eine effizientere Behandlung von onkologischen Erkrankungen zu ermöglichen. Die nachfolgende Arbeit unterteilt sich daher in mehrere Kapitel, in denen die einzelnen Projekte jeweils gesondert behandelt werden.

### 2.1 Zielsetzung Projekt 1: Polyethylenimin-Silica-Nanopartikel

Ziel des 1. Projekts, das in Kapitel 4 beschrieben wird, war die Herstellung und Charakterisierung eines Transfektionssystems auf Basis von Silica-Nanopartikeln in Kombination mit niedermolekularem Polyethylenimin. Durch die Verknüpfung dieser zwei etablierten Systeme aus der Gruppe der nicht-viralen Vektoren soll eine Optimierung im Vergleich zu Nanoplexen und Polyplexen vor allem hinsichtlich entscheidender Eigenschaften wie Transfektionseffizienz, Stabilität und Toxizität erzielt werden.

Silica-basierte Nanoplexe haben in der Vergangenheit Defizite bei dem Schutz der eingesetzten Nukleinsäuren auf dem Weg in die Zelle gezeigt, sodass diese von Nukleasen abgebaut wurden. Durch die Komplexierung mit PEI soll dieser Vorgang verhindert werden. Weiterhin streben wir durch die Verknüpfung beider Trägersysteme eine Verringerung von toxischen Nebenwirkungen an, die sich durch die Abnahme der Reaktionsintension zu den Zellen des Immunsystems ergeben soll. Beide Optimierungen sollen letztendlich zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz und damit der Wirksamkeit unseres Vektors führen. Auch in Hinblick auf die spätere Lagerungsstabilität erwarten wir durch die Komplexierung eine Verbesserung.

Um die beschriebenen Ziele zu erreichen ist die optimale Verhältnismäßigkeit der jeweiligen Bestandteile des Vektors von enormer Bedeutung. Durch die Beeinflussung unterschiedlicher Zusammensetzungen auf Charakteristika wie Größe, Toxizität und Transfektionseffizienz muss erörtert werden, welche Formulierung zu dem besten Ergebnis führt. Außerdem soll der Vektor bezüglich seiner Charakteristika mit Polyplexen als etabliertes Transfektionssystem verglichen werden um Stärken und Schwächen zu erkennen.

## 2.2 Zielsetzung Projekt 2: Biolumineszenz induzierte PDT

Das 2. Projekt, das in Kapitel 5 beschrieben wird, befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung eines Trägersystems zur selbstinduzierten PDT. Für die intrazelluläre Aktivierung des Photosensitizers sollen die Zielzellen hierfür durch Transfektion zur Biolumineszenz befähigt werden. In die liposomale Hülle des Transfektionssystems wollen wir den PS direkt einarbeiten, sodass später nur ein Trägersystem, das alle benötigten Komponenten beinhaltet, appliziert werden muss.

Durch die selbstinduzierte, intrazelluläre Aktivierung des PS wollen wir den primären limitierenden Faktor der PDT, die geringe Penetrationstiefe des Anregungslichts, umgehen. Folglich kann das Anwendungsspektrum dieser innovativen Therapieform auf schwer zugängliche und tiefer liegende Gewebe ausgeweitet werden. Für die erfolgreiche Umsetzung dieses Projekts müssen jedoch mehrere Hürden bewältigt werden, zum einen muss durch unser Vektorsystem die erfolgreiche Transfektion der Zielzellen gewährleistet werden, zum anderen muss ein zum BL-System kompatibler PS in entsprechender Menge in die Zielzellen transportiert werden und dort durch eine ausreichend hohe Lichtmenge mit passender Wellenlänge aktiviert werden, um den umliegenden Zellverbund selektiv abtöten zu können.

Um eine effiziente Transfektion der Zielzellen zu gewährleisten und einen passenden PS in die Hülle einarbeiten zu können, haben wir Lipopolyplexe als Vektoren verwendet. Diese haben wir mit pCMV-luc und den benötigten Substraten für die BL-Reaktion beladen und den PS Hypericin in die Lipiddoppelmembran der Vektorhülle eingekapselt. Durch die vielversprechenden Belege aus vorangegangenen Arbeiten, in denen die effiziente Paarung von Firefly-Luciferase und Hypericin beschrieben wurde, begründet durch die hohe Kompatibilität ihrer Emissions- und Absorptionsspektren und die Kompossibilität mit Lipopolyplexen als Vektorsystem, sehen wir großes Potenzial für unsere Formulierung.

Für die Herstellung der Lipopolyplexe benötigen wir Hypericin-Liposomen als Edukt, die wir mit Polyplexen aus pCMV-luc komplexieren. Da die Quantenausbeute der BL der kritische Faktor für den Erfolg dieser Arbeit ist, werden wir zur Minimierung von möglichen Fehlerquellen die Edukte der Luciferase-Reaktion in einer getrennten Zubereitung zu den

Zellen gegeben. In einem späteren Schritt werden auch diese durch eine entsprechende Verkapslung mit in die Lipopolyplexe verpackt.

## 2.3 Zielsetzung Projekt 3: Lipopolyplexe als Vektoren für MDR1-Silencing

Unser Ziel für das 3. Projekt in Kapitel 6 war die Entwicklung und Charakterisierung eines nicht-viralen Trägersystems aus der Gruppe der Lipopolyplexe, der mit einer MDR1-mRNA komplementären siRNA beladen werden soll, um möglichst effektiv das MDR1-Gen herunterzuregeln. Infolge des MDR1-Knockdowns erwarten wir eine Steigerung der Sensitivität gegenüber Zytostatika, die infolge der Resistenzentwicklung durch eine erhöhte Genexpressions von MDR1 verloren gegangen ist. Am Beispiel des Anthracyclin-Zytostatikums Doxorubicin sollen die Auswirkungen des MDR1-Knockdowns auf dessen Wirksamkeit überprüft werden. Auch die mögliche Beeinflussung auf andere Eigenschaften wie Zellproliferation und -metastasierung sollen überprüft werden.

Lipopolyplexe wurden bereits in der Vergangenheit in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten als hoch effektive Transportsysteme zum Verbringen von Nukleinsäuren in Zellen beschrieben. In Anlehnung daran sind sie auch für uns das Vektorsystem der Wahl, um sie nach Komplexation der entsprechenden siRNA zur RNA-Interferenz zu verwenden.

Nach der Herstellung der Lipopolyplexe sollen diese hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften sowie Transfektionseffizienz und Toxizität charakterisiert werden. Anschließend wollen wir die Effektivität des MDR1-Knockdowns durch unsere Lipopolyplexe quantifizieren, sowie dessen Auswirkungen auf verschiedene Charakteristika wie Zellmigration, -invasion und -kolonisation bestimmen. Letztlich soll die Auswirkung der Reduzierung von MDR1 auf die Sensitivität gegenüber dem Modellzytostatikum Doxorubicin bestimmt werden. Hierdurch sollen perspektivische Lösungsansätze für die in der klinischen Praxis rasant zunehmende Ausbreitung von Zytostatikaresistenzen geschaffen werden.

### 3 Material und allgemeine Methoden

#### 3.1 Verwendetes Material

In den nachfolgenden Tabellen sind alle Geräte, Materialien und Stoffe unter Nennung ihrer entsprechenden Bezugsquelle aufgelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3.1**

Verwendete Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Analysenwaage, Sartorius Secure	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 10-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multikanal Pipette Pipet-Lite XLS L8-300	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Multikanal Pipette Pipet-Lite XLS L12-300	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Mettler Toledo Seven Easy Ph Meter	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Glasrundkolben 5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasrundkolben 20 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Inkubationsschüttler, IKA KS 4000	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Kontaktthermometer	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Kryo-Elektronenmikroskop JSM 7500F	JEOL, Akishima, Japan
Pneumatischen Eierstempel	Schuett-Biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop EVO HD15	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Sputter Coater Q150R ES	Quorum Technologies Ltd, East Grinstead, Vereinigtes Königreich
Malvern Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Worcester, England
JPK Nanowizzard 3	Jpk, Berlin, Deutschland

Elektrophorese Netzgerät MP-300V	Major Science, Saratoga, Kalifornien, USA
Elektrophorese Netzgerät LKB 2197	LKB Bromma, Sollentuna, Schweden
LaboGene Scanlaf Mars 1500 Runner	Labogene, Allerød, Dänemark
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Konfokalmikroskop Zeiss LSM 700	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus CKX53	Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzlichtquelle  Olympus U-HGLGPS	Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland
CO2-Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland
FluoStar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Olympus R1 SLI Cell Counter	Olympus Europa, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Hettich UNIVERSAL 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Mischer ZX4	Velp Scientifica Srl, Usmate Velate, Italien
Aerogen Solo	Aerogen GmbH, Ratingen, Deutschland
Aerogen-USB-Steuereinheit	Aerogen GmbH, Ratingen, Deutschland
Wasserbad Köttermann 3048	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Rotationsverdampfer Heidolph Laboroto 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Rotationsverdampfer Hei-VAP Core	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Magnetrührer, IKA®RH basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Ultraschallbad Elmasonic P	Elma Schmiedbauer GmbH, Singen, Deutschland
Gelelektrophoresezubehör	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Rührfisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

---

Auflistung aller Geräte, die für die Versuchsdurchführung der Arbeit verwendet wurden

**Tabelle 3.2**

Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Einmalpipettenspitzen, 10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips® advanced-Pipettenspitzen 50 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
HPTLC-Platten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger, 76 mm x 26 mm	Knittel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polykarbonatmembranen 0,2 $\mu$ m	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Silika Wafer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sterilfilter Aufsatz 0,2 $\mu$ m	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Auflistung aller Verbrauchsmaterialien, die für die Versuchsdurchführung der Arbeit verwendet wurden

**Tabelle 3.3**

Verwendete Chemikalien und Ausgangsstoffe

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Siliciumdioxid-Nanopartikel	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Levasil® 200/40	AkzoNobel, Offenbach, Deutschland
Polyethylenimin (verzweigt) 25 kDa	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Polyethylenimin (linear) 2 kDa	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-propan	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamin	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1-[3-(Dimethylamino)-propyl]-piperazin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cholesterol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
GelRed	Biotium Inc, Kalifornien, USA
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silikonöl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTI Histofix 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPPC (1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Cholesterol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Auflistung aller Chemikalien und Substanzen, die für die Versuchsdurchführung der Arbeit verwendet wurden

### **Tabelle 3.4**

Verwendete Puffer und Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
DNA-Ladepuffer	Glycerol	3,9 ml
	SDS (10% w/v)	500 ul
	EDTA (0,5 M)	200 ul

	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol	0,025 g
	Milli-Q Wasser	10 ml
Physiologischer Puffer (pH 7,4)	HEPES	0,058 g (=0,15 M)
	Natriumchlorid	3,375 g (=0,01 M)
	Milli-Q-Wasser	100 ml
TAE-Puffer (10x)	Tris-HCl	48,4 g (=400 mM)
	Essigsäure	11,42 ml (=20 mM)
	EDTA, 0,5 M; pH 8,0	40,00 ml (=20 mM)
	Milli-Q-Wasser	1 L
Triton X-100 (0,1 % v/v)	Triton X-100	100 µl
	Milli-Q-Wasser	ad 10 ml
MTT-Reagenz (0,2 mg / ml)	MTT-Reagenz	0,2 g
	Milli-Q-Wasser	ad 100 ml
Luciferase Assay Reagenz	1M Glycyglycin pH 8,0	2 ml
	100 mM MgCl <sub>2</sub>	1 ml
	500 mM EDTA	20 µl
	Dithiothreitol (DTT)	50,8 mg
	Adenosintriphosphat (ATP)	27,8 mg
	Coenzym A Trilithiumsalz	21,3 mg
	Tricin	359 mg
	Milli-Q-Wasser	ad 100 ml
Luciferin-Mix 10mM	1M Glycyglycin pH 8,0	0,47 ml
	D-Luciferin	50 mg
	Milli-Q-Wasser	ad 15,8 ml

---

Auflistung aller Puffer und Reagenzien, die für die Versuchsdurchführung der Arbeit hergestellt oder verwendet wurden

**Tabelle 3.5**

Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Cytotoxicity Detection Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
High Capacity cDNA-Reverse- Transkriptions-Kit	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quant Studio 3 RT-PCR-Systems	Applied Biosystems, Foster City, USA
PowerUp® SYBR® Green Mastermix	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DMEM, Zellkulturmedium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum FKS Gibco	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
IMDM, Zellkulturmedium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin -EDTA für Zellkultur	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Nunc 96-Well Platte	Nunc GmbH & Co. KG., Wiesbaden, Deutschland
Nunc 12-Well Platte	Nunc GmbH & Co. KG., Wiesbaden, Deutschland
Nunc 6-Well Platte	Nunc GmbH & Co. KG., Wiesbaden, Deutschland
Transwell Einsatz	Corning, New York, USA
Befruchteten Eier	Mastkükenbrüterei Brommann, Rheda- Wiedenbruck, Deutschland
NanoShuttle-PL®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pCMV-GFP	Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland
pCMV-luc	Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland
siMDR1	Eurogentec, Seraing, Belgium
Triton X-100	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

Auflistung aller Verbrauchsmaterialien, die für die Versuche in der Zellkultur verwendet wurden

**Tabelle 3.6**

Verwendete Software

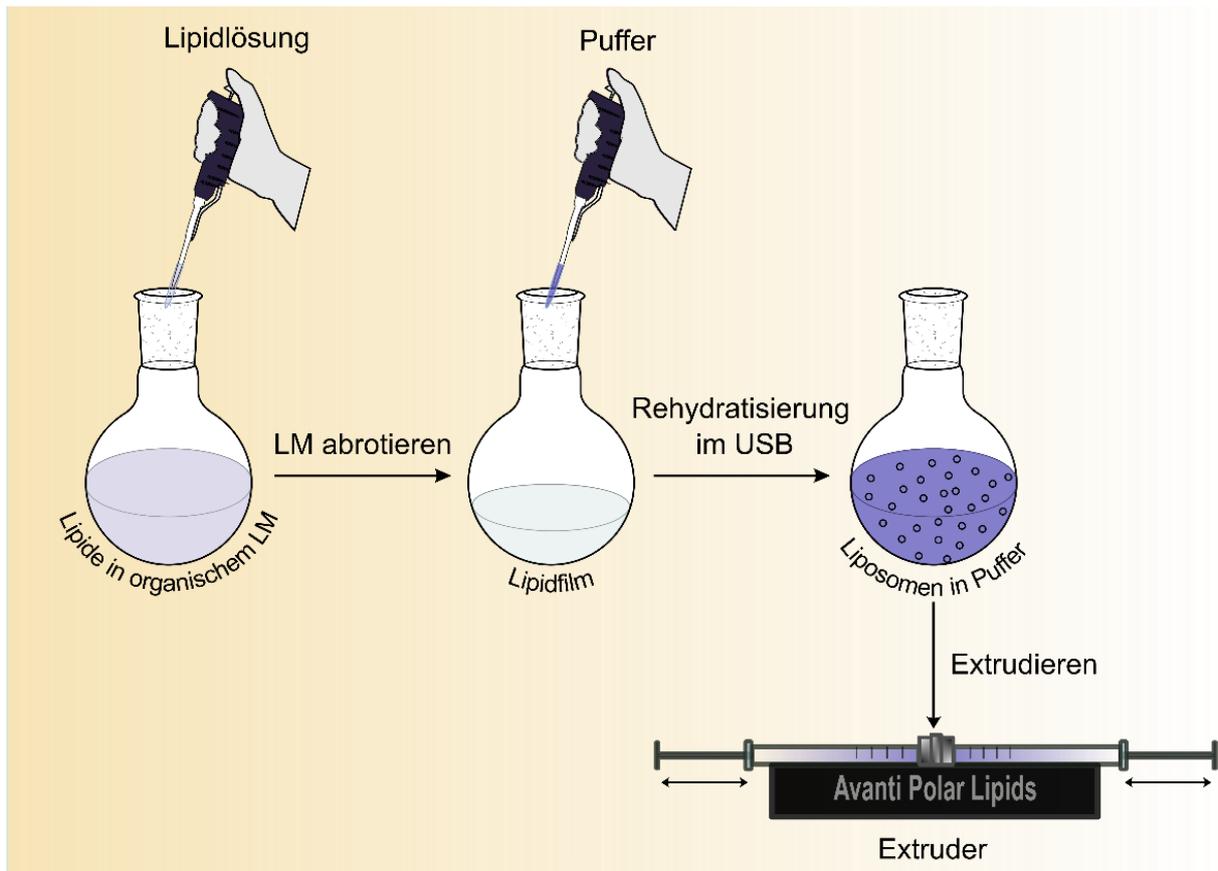
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
MS-Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
MS-Office 2019	Microsoft, Redmond, USA
ChemDraw Professional 20.1.1	Perkin Elmer, Waltham, USA
JPK Data Processing	JPK, Berlin, Deutschland
Origin Pro 9.0	Originlab, Massachusett, USA
Inkscape 1.2	Inkscape Community
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz

Auflistung der Software, die für die Auswertung und Umsetzung der folgenden Arbeit verwendet wurde

## 3.2 Allgemeine Methoden

In diesem Kapitel sind allgemeine Methoden beschrieben, die wiederholt in verschiedenen Versuchsteilen dieser Arbeit Verwendung fanden. Methoden, die nur für ein bestimmtes Kapitel relevant waren, werden gesondert in dem jeweiligen Kapitel behandelt.

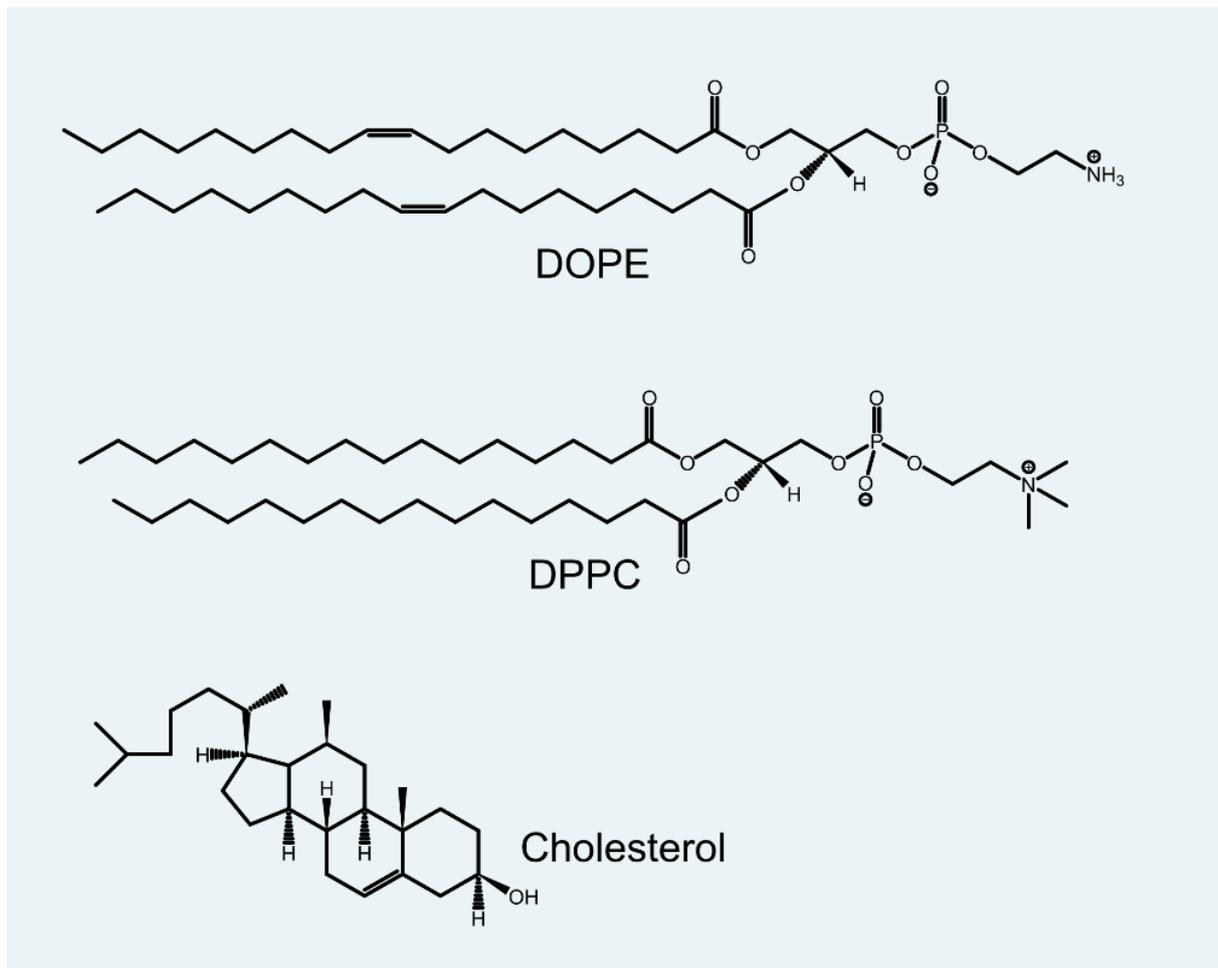
### 3.2.1 Liposomenherstellung



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Herstellung von Liposomen mit der Filmbildungsmethode und anschließender Homogenisierung mit einem Extruder.

Die verwendeten Liposomen wurden nach der Filmbildungsmethode [122] hergestellt. **Abbildung 3.1** gibt eine bildliche Übersicht der einzelnen Schritte der Herstellung. Im Vorfeld wurden Stammlösungen der verwendeten Lipide DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) und Cholesterol mit einer Konzentration von 10 mg / ml in organischem Lösungsmittel hergestellt. Die

Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Als organisches Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus einem Teil Methanol und zwei Teilen Chloroform verwendet.



**Abbildung 3.2:** Struktur der für die Liposomenherstellung verwendeten Lipide DOPE, DPPC und Cholesterol.

Zur Herstellung der Liposomen wurde 1 ml des organischen Lösungsmittels in einen 10 ml Rundkolben vorgelegt und anteilig die jeweiligen Stammlösungen der Lipide ergänzt. Dabei wurde ein Stoffmengenverhältnis von 70 / 15 / 15 (mol / mol / mol) in Mol gebraucht. Der Rundkolben wurde an einen Rotationsverdampfer angeschlossen und das organische Lösungsmittel mit Hilfe einer Vakuumpumpe mit nachfolgendem Programm aus **Tabelle 3.7**, abrotiert. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft war, wurde der entstandene Lipidfilm mit 1 ml, auf 41 °C vortemperiertem HEPES Puffer resuspendiert und durch sorgfältiges Drehen im Ultraschallbad vollständig in die wässrige Phase überführt. Anschließend wurde die entstandene Liposomensuspension zur Homogenisierung für weitere 10 min im Ultraschallbad inkubiert.

**Tabelle 3.7**

Vakuumpumpen-Programm

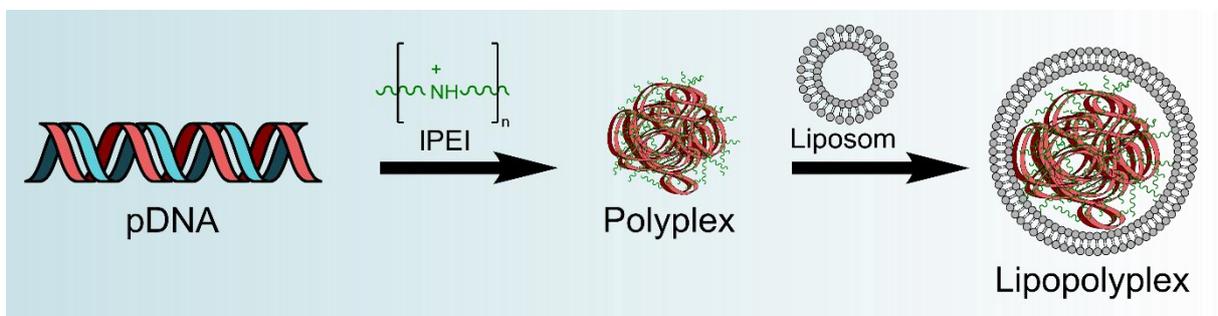
$\Delta t$	p[mbar]
00:00:00	995
00:00:30	800
00:05:00	300
00:10:00	2
00:10:00	2
00:10:00	2

Die Tabelle zeigt das mehrstufige Programm, welches an der Vakuumpumpe des Rotationsverdampfers eingestellt wurde, um das organische Lösungsmittel abzurotieren

Das Ultraschallbad wurde ebenfalls auf 41° C temperiert. Anschließend wurden die Liposomen 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm extrudiert. Um größere Aggregate abzuschneiden und ein Verstopfen der Membran zu verhindern, wurden Vorfilter verwendet. Der Extruder wurde im Vorfeld mit einer Heizplatte auf 51° C vorgeheizt, die Temperatur wurde während der Anwendung konstant gehalten. Anschließend wurden die Liposomen in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und bei 4° C bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### 3.2.2 Polyplexe und Lipopolyplexe

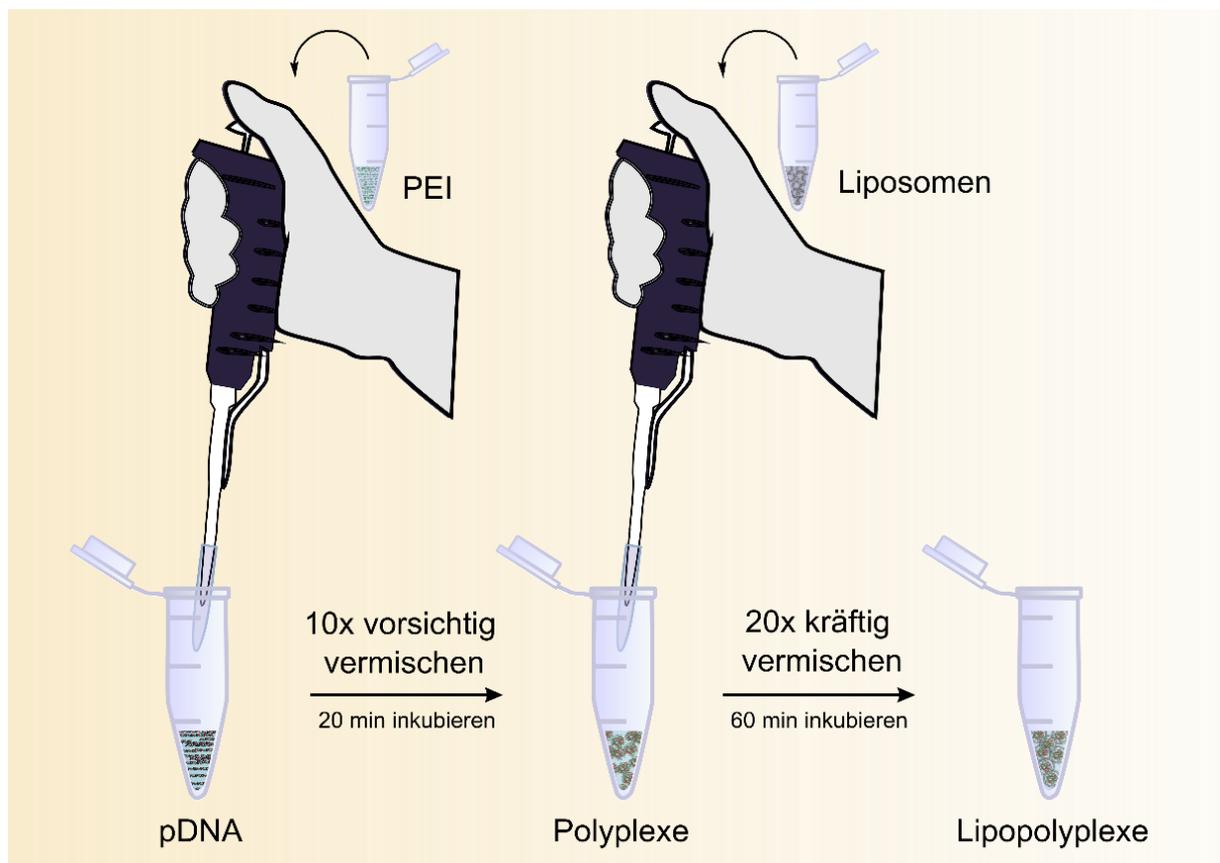
Die Ausbildung von Polyplexen beruht auf der Komplexierung infolge von elektrostatischer Anziehung zwischen PEI und DNA/RNA. **Abbildung 3.3** gibt hier eine schematische Übersicht der Komplexbildung.



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Herstellung von Polyplexen sowie Lipopolyplexen unter Verwendung von pDNA, IPEI und Liposomen

Wie durch nachfolgende Versuche und vorangegangene Arbeiten [100] beschrieben, haben wir ein N/P-Verhältnis von 10 verwendet. Das N/P-Verhältnis ist der Quotient aus der Anzahl der Amine im PEI-Gerüst und der Anzahl der Phosphatgruppen des verwendeten Plasmids.

Die Herstellung der Polyplexe erfolgte durch behutsames Vermengen der gleichen Volumina von pDNA und PEI. PEI wurde im Vorfeld mit HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg / ml verdünnt, aliquotiert, bei -20 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Direkt vor der Herstellung haben wir die entsprechenden Mengen pDNA und PEI mit sterilfiltriertem HEPES-Puffer auf gleiche Volumina eingestellt. Die PEI-Verdünnung wurde in das Gefäß der pDNA überführt und 10-mal sanft durch wiederholtes Pipettieren durchmischt. Den Polyplexen wurden 20 min bei Raumtemperatur eingeräumt, um sich entsprechend auszubilden. Im Anschluss wurde sie sterilfiltriert. Wenn sie nicht sofort für weitere Versuche verwendet wurden, erfolgte die Lagerung der Polyplexe bei 4° C im Kühlschrank. Die Herstellung erfolgte unter einer Laminar-Flow Werkbank.



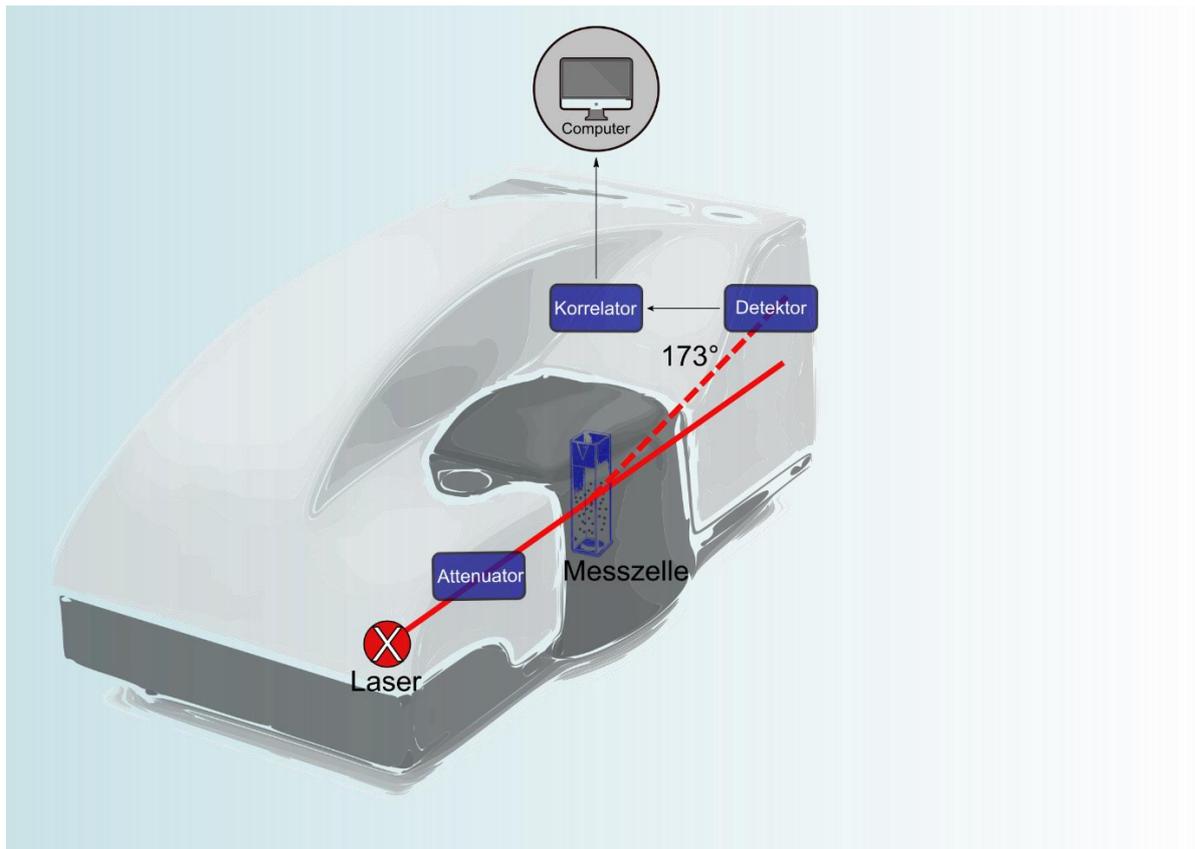
**Abbildung 3.4:** Skizze der zur Herstellung von Polyplexen und Lipopolyplexen benötigten Arbeitsschritte.

Die Lipopolyplexe wurden direkt im Anschluss aus den hergestellten Polyplexen und den in Kapitel 3.2.1 hergestellten Liposomen produziert. Hierzu wurde die entsprechende Menge der Liposomensuspension mit sterilfiltriertem HEPES-Puffer auf das gleiche Volumen wie die Polyplexe eingestellt. Anschließend wurden beide Edukte vereint und durch 20 kräftige Pipettenhübe gut durchmischt. Eine schematische Übersicht der Herstellung gibt **Abbildung 3.4**. Die Lipopolyplexe wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um ihnen die benötigte Zeit zur Komplexbildung zu gewähren. Die Lagerung erfolgte bei 4° C im Kühlschrank. Ein Massenverhältnis von Liposomen zu PEI wurde gemäß vorangegangener Arbeiten [100] von 0,39 gewählt. Die Herstellung erfolgte an einer Laminar Flow Werkbank im Reinraum.

### **3.2.3 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)**

Für die Größenbestimmung unserer nanoskaligen Transfektionssysteme und deren Zwischenstufen haben wir das Verfahren der Photonenkorrelationspektroskopie verwendet. Die Messungen wurden an einem Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern durchgeführt. Bei dieser Messmethode, die auch als Dynamische Lichtstreuung (DLS) oder Quasielektrische Lichtstreuung (QELS) bekannt ist, wird der hydrodynamische Durchmesser der in der Probe befindlichen Partikel in wässrigem Medium bestimmt. Der Aufbau des Geräts wird durch **Abbildung 3.5** beschrieben.

Kurz vor Durchführung der jeweiligen Messung wurde die Probe entsprechend verdünnt und in eine Messküvette (Typ: DTS0160) überführt. Nach einer voreingestellten Inkubationszeit von 60 sec bei 23° C startete der Messvorgang und die Probe wurde von einem HeNe-Laser (10 mW) bestrahlt. Der Laserstrahl trifft auf die, in der Messküvette befindlichen, Partikel und wird von diesen gestreut. Das von den Partikeln abgelenkte Streulicht trifft auf einen Detektor, der sich in einem Winkel von 173° zum Laser befindet. Die detektierten Signale werden durch einen nachgeschalteten Korrelator verarbeitet und anschließend an den Computer weitergeleitet. Durch die resultierende Interferenz der Lichtstreuungen der einzelnen Partikel der Probe entstehen Fluktuationen in der Streulichtintensität, die von dem Messgerät zeitlich ausgewertet werden. Anhand der Intensität der Streulichtschwankung des abgelenkten Laserlichts kann über die Stokes-Einstein Gleichung die wahrscheinliche Größe der Partikel berechnet werden.



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Zetasizer Nano ZS mit einer Übersicht der Anordnung der einzelnen Bauteile.

Grundlage dieser Messmethode ist die Diffusion der vermessenen Partikel in ihrem Medium, welche durch die Brownsche Molekularbewegung verursacht wird [123,124]. Die Diffusionsgeschwindigkeit der betrachteten Teilchen verhält sich umgekehrt proportional zu deren Größe. Je kleiner der Partikel ist, umso höher ist dessen Diffusionsgeschwindigkeit und umso höher ist auch die Geschwindigkeit der Änderung der gestreuten Lichtquanten. Beschrieben wird diese Abhängigkeit durch die Stokes-Einstein-Beziehung [125].

Stokes-Einstein-Beziehung:

$$D = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * r}$$

D = Diffusionskoeffizient

k = Boltzmann-Konstante

T = Temperatur in Kelvin

$\eta$  = Viskosität des Mediums

r = Partikelradius

Die genaue Position der Laserquelle in Relation zur Messküvette und die Intensität des Lasers über die Regulierung der Blende wurden vor jeder Messung durch das Messgerät automatisch reguliert. Die Messung einer Probe wurde als Triplikat aus drei Messdurchgängen mit jeweils mindestens 10 Einzelmessungen durchgeführt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die relative Standardabweichung der verschiedenen Partikelgrößen eines Messdurchgangs einer Probe wird durch den Polydispersitätsindex (PDI) beschrieben. Der PDI kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein Wert unter 0,2 als monodisperse Probe interpretiert werden kann und angestrebt wird.

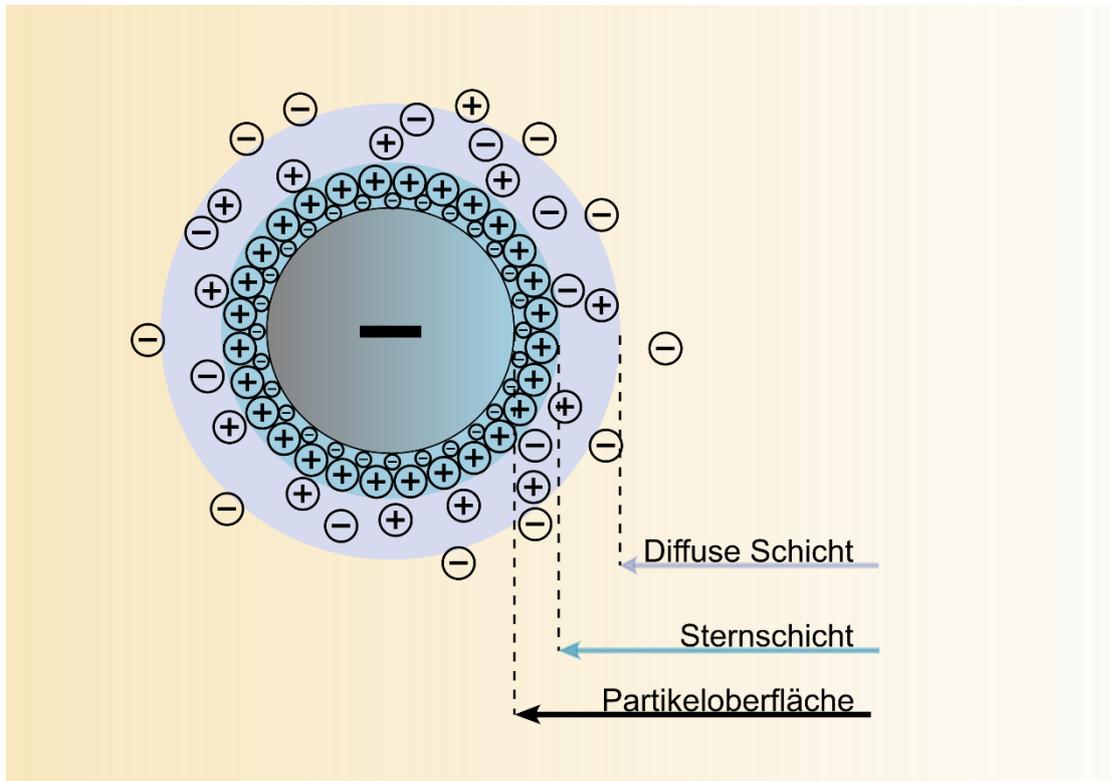
### **3.2.4 Laser-Doppler-Anemometrie**

Das Messverfahren der Laser-Doppler-Anemometrie wurde verwendet, um das Zetapotenzial unserer Proben zu bestimmen. Die Messung des Zetapotenzials gehört zu den Standardcharakterisierungstechniken bei der Beschreibung von nanopartikulären Systemen. Neben der Stabilität der Dispersion und somit auch der Integrität bei Lagerung spielt es auch eine entscheidende Rolle für die zelluläre Internalisierung von Transfektionssystemen [126,127].

Das Zetapotenzial ist eine Näherung an das direkte Oberflächenpotential eines Partikels, der sich in einem Dispersionsmedium befindet. Durch die Anlagerung gelöster Ionen aus dem Medium, bedingt durch die Anziehungstendenzen zum Ladungsausgleich und entropische Effekte, lagern sich mehrere Schichten aus Ionen und Gegenionen an die Partikeloberfläche.

Die innerste Schicht, die direkt an die Partikeloberfläche angrenzt, nennt sich Sternschicht oder Helmholtz-Doppelschicht. Sie besteht aus der inneren Helmholtzschicht, die durch die entropisch begünstigte Anlagerung von Hydroxydionen Ionen an die Partikeloberfläche entsteht und Ionen mit komplementärer Ladung zur Partikeloberfläche, die die äußere Helmholtzschicht ausbilden. Die Bindungsaffinität der Ionen zu der Oberfläche des Partikels ist in dieser Schicht stark ausgeprägt. An die Sternschicht angelagert, befindet sich die diffuse Schicht. Deren Ionen bilden eine stabile Formation aus, die Anziehungskraft nimmt jedoch mit zunehmendem Abstand zur Partikeloberfläche kontinuierlich ab. Ab einer gewissen Entfernung kommt es zur Ausbildung einer Grenzschicht, bis zu dieser die Anziehung stark genug ist, dass die Ionen bei Bewegung des gesamten Partikels gebunden bleiben und sich in die gleiche Richtung mitbewegen. Außerhalb dieser Grenze findet keine gerichtete Bewegung statt, so dass an dieser Grenze eine Scherebene entsteht. Das Potential an dieser Scherebene ist das

Zetapotenzial. Durch die Anlagerung von Ionen wird letztlich die eigentliche Ladung des Partikels maskiert, sodass er nach außen annähernd Ladungsneutral erscheint [128]. Eine Übersicht zu der Anordnung der verschiedenen Schichten gibt **Abbildung 3.6**.



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung eines Partikels und der Ionen in seinem Dispersionsmedium. An die negativ geladene Partikeloberfläche lagert sich eine Schicht Hydroxidionen an, darauf folgt eine Schicht Anionen. Gemeinsam bilden diese die **Sternschicht** aus. Darauf folgt die **diffuse Schicht** aus Anionen und Kationen.

Die Bestimmung des Zetapotenzials erfolgte indirekt nach dem Messprinzip der Laser-Doppler-Anemometrie und wurde unmittelbar nach der Größenbestimmung, ebenfalls mit dem Zetasizer Nano ZS, durchgeführt. Hierzu wurde die elektrophoretische Mobilität der Partikel nach dem Anlegen einer definierten Spannung an die zwei Elektroden der Messzelle gemessen. Je nach Ladung bewegen sich die Partikel zu den entsprechenden Elektroden, wobei Partikel mit einem höheren Potential eine höhere Geschwindigkeit aufweisen. Die Partikel durchqueren auf dem Weg zur Elektrode den Laserstrahl, wodurch es wieder zur Streuung an der Partikeloberfläche kommt. Das Streulicht wird von einem Detektor erkannt und an das Messgerät weitergeleitet, das die Fluktuation der Lichtintensität in Abhängigkeit zur Partikelgeschwindigkeit bestimmt. Mit Hilfe der Henry-Funktion bzw. Hückel- und Smoluchowski-Näherung kann im Anschluss das Zetapotenzial berechnet werden [129].

Henry-Funktion:

$$U_E = \frac{2 * \epsilon * \zeta * f(Ka)}{3 * \eta}$$

$U_E$  = Elektrophoretische Mobilität

$\epsilon$  = Dielektrische Konstante der Probe

$\zeta$  = Zetapotenzial

$f(Ka)$  = Henry Funktion

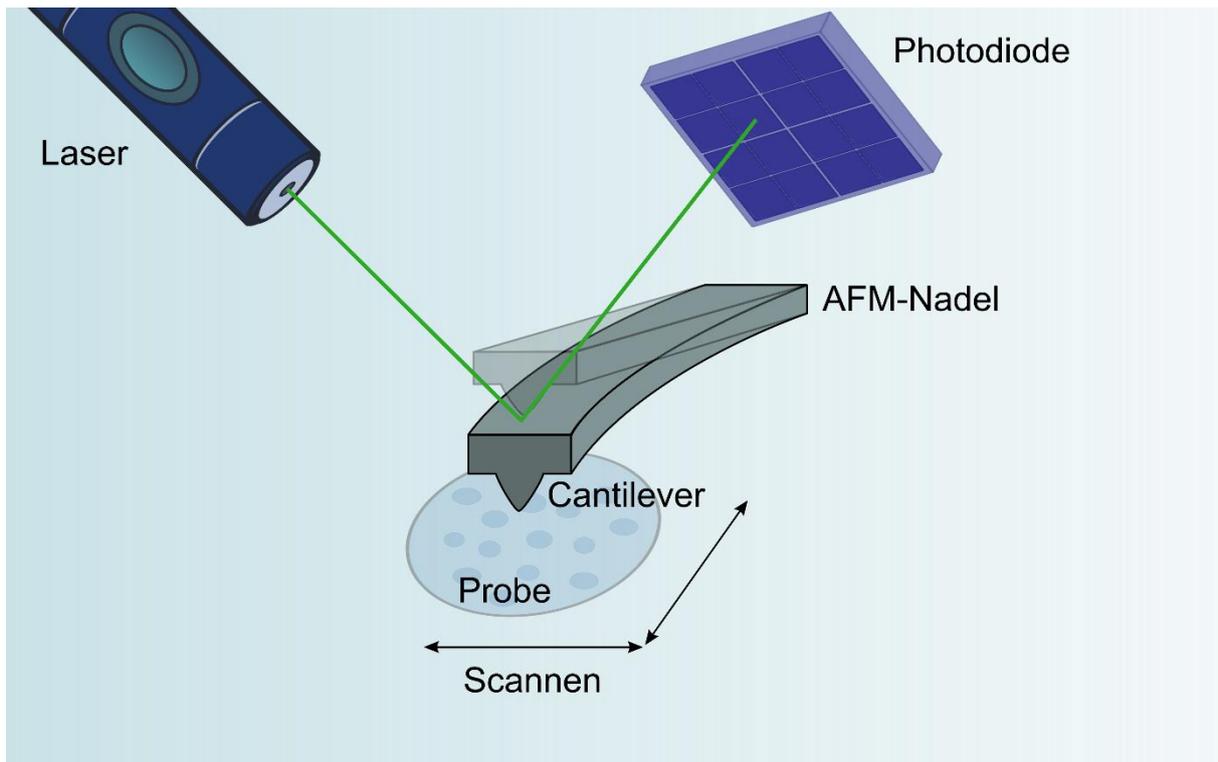
$\eta$  = dynamische Viskosität

### 3.2.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Zur detaillierten Untersuchung der Morphologie und Oberflächenstruktur unserer Trägersysteme haben wir ein Rasterkraftmikroskop oder Atomkraftmikroskop (AFM) verwendet. Die Messungen wurden an einem Nanowizzard 3 der Firma JPK Instruments in einer schallisolierten Kabine bei 23° C Raumtemperatur durchgeführt.

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Probe von einer feinen Nadel abgetastet. Der vorderste Teil, der sich an der Spitze der Nadel befindet und in direktem Kontakt mit der Probe steht, wird als Cantilever bezeichnet. Die Auswahl des passenden Cantilevers ist essenziell für eine qualitativ hochwertige Abbildung der Probe. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften ähnlich wie verschiedene Federn entsprechend ihrer Kraftkonstante, Amplitude und Frequenz. Je nach Beschaffenheit und Struktur der Probe muss ein geeigneter Cantilever ausgewählt werden [130].

Beim Abtasten der Probe können die Partikel als Höhen und Tiefen wahrgenommen werden. Infolgedessen kommt es zu unterschiedlich starker Auslenkungen der AFM-Nadel in x, y und z Richtung, wodurch die Amplitude des Cantilevers beeinflusst wird. Während der Messung strahlt ein Laser auf die Rückseite des Cantilevers, von dieser er auf eine Photodiode reflektiert wird. So kann jede durch die Höhenunterschiede der Probe ausgelöste Bewegung detektiert werden. Eine schematische Darstellung der Messung ist in **Abbildung 3.7** dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung einer Rasterkraftmikroskopiemessung. An der Spitze der AFM-Nadel befindet sich der sogenannte Cantilever. Ein Laser bestrahlt die Rückseite des Cantilevers, während dieser die Probe abtastet. Jede Auslenkung wird so durch den Laserstrahl übertragen und von einer Photodiode detektiert.

Alle Messungen wurden unter Verwendung eines AFM Cantilever HQ: NSC14/Al BS der Firma Mikromasch Europe mit einer Resonanzfrequenz von 160 kHz und einer Kraftkonstanten von 5 N/m durchgeführt. Die Scangeschwindigkeit betrug 0,5 - 1,5 Hz im „intermittent-contact“-Modus. Hierbei berührt der Cantilever die Probe nur zwischenzeitlich und hat keinen dauerhaften Kontakt zu ihr [131]. Die Proben wurden vor der Messung entsprechend verdünnt, auf einen 1 x 1 cm großen Silikonwafer aufgebracht und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die Partikel auf dem Silikonwafer ab. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einer Pipette entfernt und die Partikel bei Raumtemperatur bis zum gänzlichen Verdampfen des Lösungsmittels getrocknet. Die anhaftenden Partikel wurden analysiert. Die Bildausschnitte hatten eine Größe von 3 x 3  $\mu\text{m}$ .

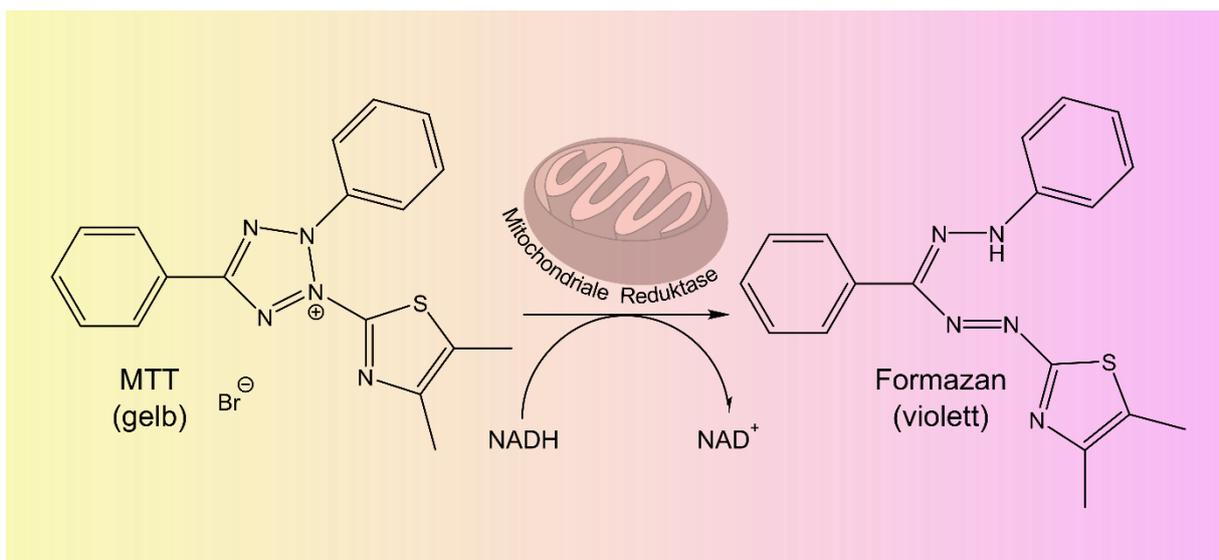
### 3.2.6 Zellkultivierung

Für die Versuche in der Zellkultur wurden die entsprechenden Zelllinien als Monolayerkultur in der Petrischale kultiviert. Diese wurden bei konstant 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator aufbewahrt. Als Nährmedium wurden DMEM oder IMEM mit 10 % fetalem Kälberserum

verwendet und regelmäßig ausgetauscht. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen auf zwei neue Petrischalen aufgeteilt. Dazu wurde das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, um sie vom Boden der Petrischale abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden mit Nährmedium aus der Petrischale gespült und in einen 15 ml Tube überführt. Dieser wurde für 5 Minuten bei 10.000 U / min zentrifugiert, um die Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das entstandene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurde ein entsprechendes Volumen entnommen und in die neuen Petrischalen überführt. Diese wurden mit ausreichend Nährmedium aufgefüllt und zur Entwicklung in den Inkubator gestellt.

### 3.2.7 MTT-Assay

Das MTT-Assay ist eine weit verbreitete Methode, um die zytotoxischen Effekte von verschiedensten Substanzen auf die verwendeten Zellen in-vitro zu bestimmen. Dafür wird die metabolische Aktivität der Zellen quantifiziert, nachdem sie der entsprechenden Testsubstanz für einen definierten Zeitraum ausgesetzt waren. Da die metabolische Aktivität grundsätzlich stark mit der Zellviabilität korreliert und mit vergleichsweise geringem Aufwand zuverlässig bestimmt werden kann, gilt der MTT-Assay als universelle Charakterisierungsmethode der Toxizität in-vitro und ist in der naturwissenschaftlichen Forschung weit Verbreitet.



**Abbildung 3.8:** Farbreaktion des gelben, wasserlöslichen MTT-Salzes zum violetten, schwer wasserlöslichen Formazan.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) ist ein gelbliches Reagenz, welches von intrazellulären mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen zum violetten Formazan umgewandelt wird. Eine strukturelle Darstellung der Reaktion ist in **Abbildung 3.8** zu sehen. Das gebildete Formazan ist wasserunlöslich und kann, nachdem es von den Zellresten abgetrennt wurde, photometrisch quantifiziert werden. Vergleicht man den Formazangehalt der Proben, die mit der getesteten Substanz behandelt wurden, mit dem Formazangehalt unbehandelter Zellen, kann die Viabilität der Probe berechnet werden [132-134].

Für den MTT-Assay wurden die Zellen mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen / Well in 96-Well-Platten in je 200  $\mu$ l Nährmedium ausgesät und für 24 h in den Inkubator gestellt. Für den Versuchstag wurde eine Zellkonfluenz von 70 % - 80 % angestrebt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100  $\mu$ l / Well der entsprechenden Probe oder Referenz aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurden 100  $\mu$ l serumfreies Medium verwendet. Als Positivkontrolle wurden 100  $\mu$ l Triton-X Lösung (1 %) verwendet. Die Zellen wurden für 4 h in den Inkubator gestellt, danach wurden die Wells mit serumhaltigem Medium auf 200  $\mu$ l aufgefüllt und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden die Platten für weitere 20 h in den Inkubator gebracht. Die Probezugabe erfolgte immer in 4-facher Ausführung. Alle Verdünnungen erfolgten mit serumfreiem Medium.

Am nächsten Tag wurde der Überstand abgesaugt und durch 200  $\mu$ l einer 0,2 mg / ml Lösung von MTT in serumfreiem Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 4 h in den Inkubator gestellt. Alle Arbeitsschritte unter Beteiligung von MTT-Reagenz wurden durch entsprechende Vorkehrungen unter Lichtausschluss durchgeführt. Nachdem den Zellen die entsprechende Zeit zur Umwandlung gewährt wurde, wurde der Überstand aus den Wells abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS-Puffer (pH-Wert 7,4) mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Die Wells wurden mit 200  $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgefüllt und für 30 min in einem Orbitalschüttler bei 200 U / min durchmischt, damit das entstandene Formazan vollständig gelöst wird. Der Überstand aus DMSO und Formazan wurde in eine neue 96-Well Platte überführt und zur Auswertung in ein FLUOstar Optima Plattenlesegerät gebracht. Die quantitative Bestimmung des Formazangehalts erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 670 nm. Die Absorption der unbehandelten Zellen der Negativkontrolle wurde für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Die Absorption der Positivkontrolle wurde als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

# 4 Projekt 1: Polyethylenimin-Silica-Nanopartikel

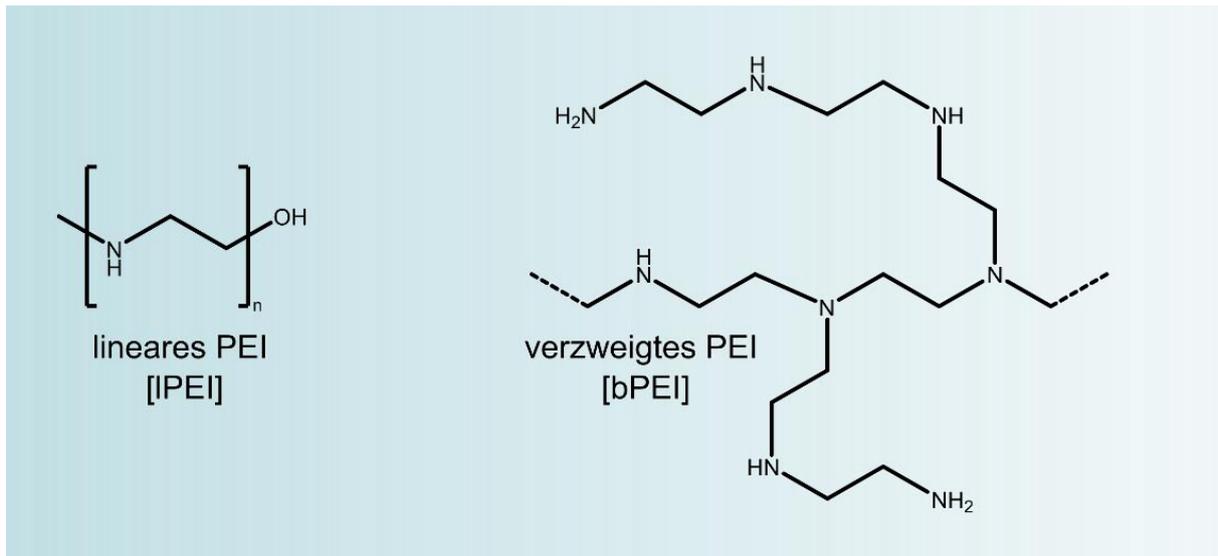
## 4.1 Einleitung

Der folgende Abschnitt beschreibt die Herstellung und Charakterisierung eines Vektorsystems, welches aus der Verknüpfung der eingangs beschriebenen Vertretern aus der Gruppe der nicht-viralen Vektoren; Kationische Polymere und Feste Nanopartikel, hervorgeht.

### 4.1.1 Polyethylenimin

Intensive Forschung und Entwicklungsarbeit an der Verbesserung nicht-viraler Vektorsysteme führte zu stetig steigender Transfektionseffizienz und sinkender Toxizität. Die Basis dieser Trägersysteme bildeten festen Nanopartikel, kationische Polymere, Dendrimere, Peptide und Lipide. Als besonders hervorzuhebender Vertreter der Gruppe der kationischen Polymere gilt Polyethylenimin (PEI). Aufgrund seiner hohen kationischen Ladungsdichte ist PEI in der Lage nicht-kovalente Komplexe mit Nukleinsäuren auszubilden. Diese sogenannten Polyplexe werden durch Endozytose in die adressierten Zellen aufgenommen, wo sie ihre gentherapeutisch aktive Ladung in das Zytosol freisetzen. Durch die Verwendung von PEI-basierten Polyplexen wurden so gute Transfektionsergebnisse erreicht, dass sie lange Zeit als Goldstandard unter den nicht-viralen Vektoren galten. Durch eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten können wir heute auf einen umfangreichen Kenntnisstand bezüglich der Polyplexe zurückgreifen [82,83,85,87-93,135,136].

PEI wird grundsätzlich in zwei unterschiedliche strukturelle Gruppen eingeteilt. Je nach Herstellungsmethode lässt sich eine verzweigte (bPEI) oder eine lineare (IPEI) Struktur synthetisieren [137,138]. In **Abbildung 4.1** sind die jeweiligen Strukturen dargestellt. Der Grad der Verzweigung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Fähigkeit Nukleinsäuren zu komplexieren. Lineares PEI zeigt eine geringere Anlage, Nukleinsäuren zu komplexieren als verzweigtes PEI. Auch die Stabilität der ausgebildeten Polyplexe ist bei der Verwendung von bPEI größer. Ungeachtet dessen konnte in mehreren in vivo Studien gerade unter der Verwendung von IPEI sehr hohe Transfektionseffizienzen beschrieben werden. Dieser Widerspruch ist wohl größtenteils auf die geringere Zytotoxizität der linearen Variante zurückzuführen [139-141].



**Abbildung 4.1:** Strukturelle Darstellung von linearem PEI (links) und verzweigtem PEI (rechts).

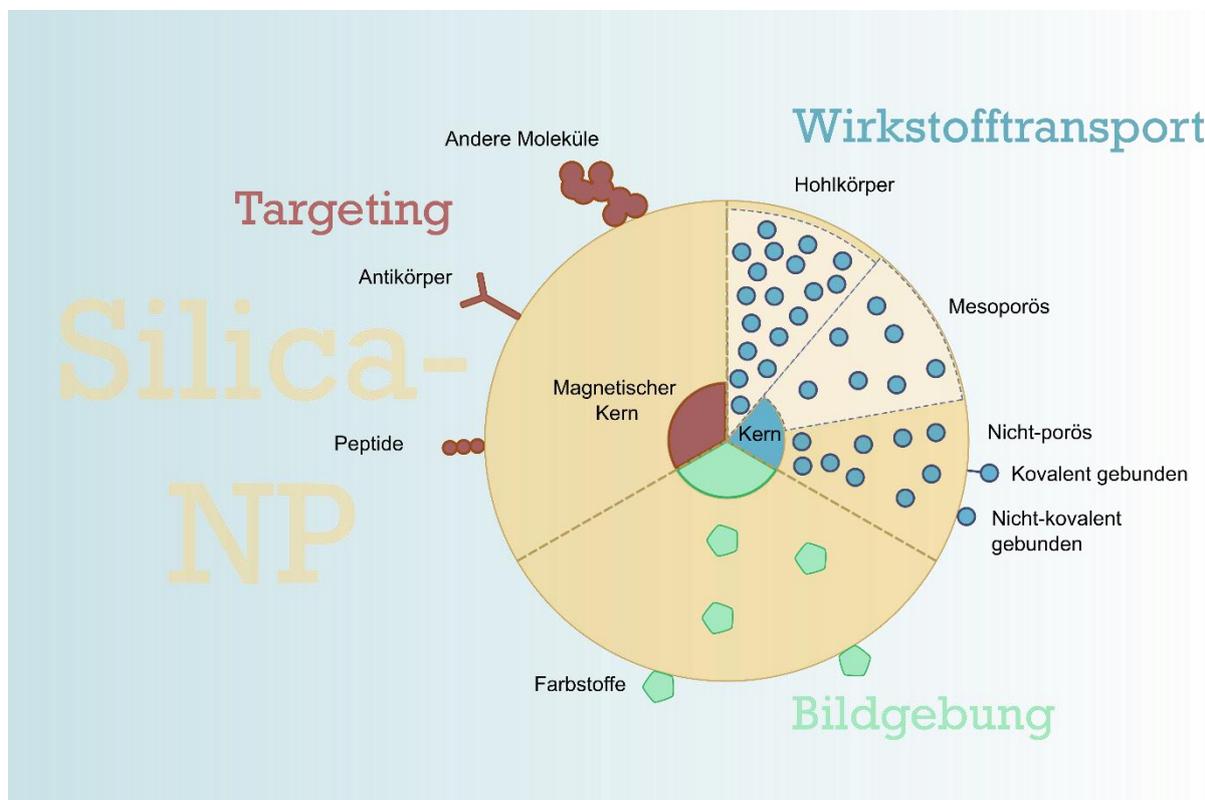
Weiterhin spielt das Molekulargewicht des verwendeten Polyethylenimin eine entscheidende Rolle. Hochmolekulares PEI zeigt *in vitro* eine deutlich gesteigerte Transfektionseffizienz, allerdings auf Kosten einer erhöhten Toxizität. Diese ist auf eine signifikant stärkere Adhärenz an Zelloberflächen zurückzuführen, die die Zellen schädigt. Als guter Kompromiss hat sich ein Bereich zwischen 5 und 25 kDa bewährt [90,94,142-144].

### 4.1.2 Silica-Nanopartikel

Unter den anorganischen Materialien, die in Vektoren Verwendung finden, sind Siliziumdioxid-basierte Trägersysteme aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften besonders vielversprechend. Siliziumdioxid, auch bekannt als Silica oder Quarz, ist ein Siliziumoxid mit der chemischen Formel SiO<sub>2</sub>. Es kommt ubiquitär in unserer Umwelt vor und ist unerlässlicher Bestandteil von verschiedenen lebenden Organismen. Auch für unserer Industrie spielt es eine wichtige Rolle. Silica-Nanopartikel sind häufiger Bestandteil von Kosmetika, Pharmazeutika, Lebensmitteln, Lacken und Farben oder Bauteilen der Autoindustrie [145,146].

Die charakteristische Oberfläche der Silica-NP ermöglicht die Adsorption von Nukleinsäuren zu gentherapeutisch aktiven Komplexen (Nanoplexe). Die Effizienz dieser Nanoplexe hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Gentherapeutische Vektoren ist schon seit über 20 Jahren bekannt [147,148]. Sie besitzen eine hohe Biokompatibilität und im Vergleich zu den zuvor beschriebenen organischen Trägersystemen eine wesentlich höhere physikalische Stabilität

gegenüber verschiedensten Beanspruchungen. Außerdem lassen sich Silica-NP auch im industriellen Maßstab kostengünstig und einfach herstellen. Durch ihre hohe Thermostabilität besteht die Möglichkeit sie zu autoklavieren. In Anbetracht der Anforderungen für die spätere Applikation, die größtenteils als Parenteralia erfolgt, ein nicht unwesentlicher Mehrwert [149-151]. In der letzten Dekade wurden verschiedene Arten von Siliziumdioxid-basierten Vektoren für unterschiedliche Anwendungen entwickelt und untersucht. Neben dem Gentransfer befasste sich die Forschung vor allem mit der biomedizinischen Bildgebung und Drug-Delivery. Durch eine Vielzahl von klinische Studien konnte die gute Verträglichkeit und Effizienz auch auf diesen Gebieten unter Beweis gestellt werden [152-156]. Durch ihre Struktur sind Silica-NP besonders zugänglich, um sie mit anderen Molekülen zu verbinden oder zu modifizieren. **Abbildung 4.2** gibt hier einen Überblick über diverse Möglichkeiten, die zum Einsatz kommen. Beispielsweise können über endständige funktionelle Gruppen Antikörper gebunden werden um die Therapie gezielt auf bestimmte Zellen auszurichten. Oder bei der Herstellung des Grundgerüst können diverse strukturelle Modifikationen vorgenommen werden, wodurch beispielsweise Einfluss auf die biologischen Abbaueigenschaften und die Wirkstofffreisetzung genommen werden kann [157,158].

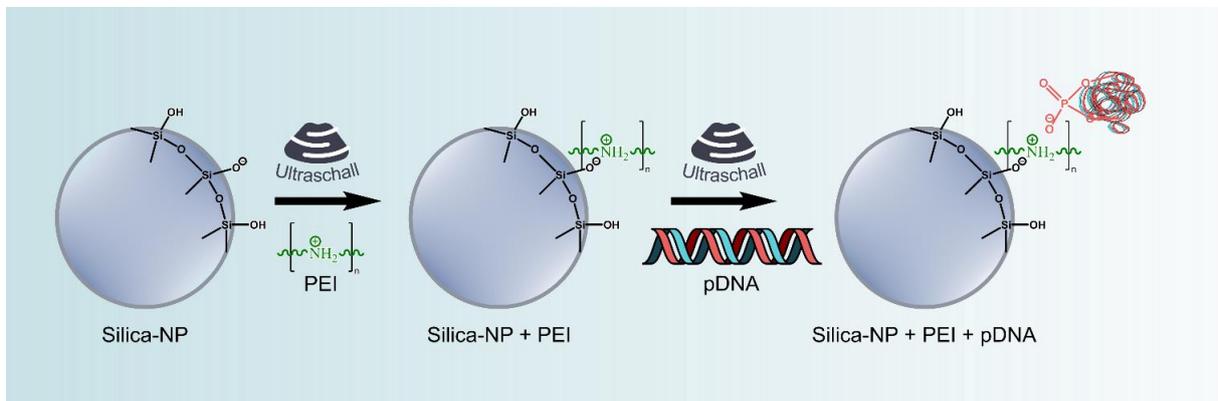


**Abbildung 4.2:** Strukturelle Darstellung eines Silica-Nanopartikels mit verschiedenen Beladungsvariationen (rechtes Drittel), Modifikationen zur Spezialisierung des Targetings (linkes Drittel) oder Verwendung für bildgebende Verfahren (unteres Drittel) [145].

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Herstellung des Vektorsystems

Als Basis für unser Trägersystem haben wir eine Silica-Nanopartikel Suspension verwendet. Aufgrund seiner terminalen OH-Gruppen besitzt Siliziumdioxid bei physiologischem pH-Wert eine negative Oberflächenladung. Im ersten Schritt haben wir diese Ladung genutzt, um die Nanopartikel mit PEI zu verknüpfen. Durch die Komplexbildung der Silica-NP mit PEI bildet sich eine positiv geladene Oberflächenstruktur aus, an die sich die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren gut anheften können. Zu Beginn haben wir als Ausgangsstoff pulverförmige Silica-NP verwendet, die wir in HEPES-Puffer suspendiert haben. Durch die Ergebnisse mehrerer Vorversuche sind wir zur Verwendung einer kommerziell erhältlichen Silica-NP-Suspension ausgewichen. Levasil® 200/40 ist eine alkalische, wässrige Dispersion aus kolloidaler Kieselsäure, die etwa 40 Gew.-% Feststoff enthält. Die Silica-Dispersion ist  $\text{Na}^+ / \text{NH}_3^+$  gepuffert und besitzt nach Herstellerangaben einen Partikeldurchmesser von ca. 17 nm (Bestimmt mit einem Rasterelektronenmikroskop von AkzoNobel).



**Abbildung 4.3:** Herstellung und Beladung unseres Transfektionssystems. Silica-NP werden mit PEI verbunden, im Anschluss wird der Komplex mit pDNA beladen. Die einzelnen Herstellungsschritte erfolgen im Ultraschallbad.

Die optimalen Herstellungsparameter und Mengenverhältnisse haben wir in Vorversuchen bestimmt und anschließend für alle weiteren Versuche verwendet. PEI wurde zu einer Stammlösung mit 1 mg / ml mit HEPES-Puffer verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C im Kühlschrank. Levasil® wurde direkt vor dem Versuch 1/20 mit HEPES-Puffer verdünnt. Beide Suspensionen wurden getrennt für 10 min. in einem Ultraschallbad (37 kHz) bei

Raumtemperatur beschallt. Anschließend haben wir die Levasil®-Suspension langsam zu der PEI-Suspension getropft. Die Vereinigung erfolgte unter fortlaufender Verwendung des Ultraschallbads. Die entstandenen Komplexe wurden anschließend für weitere 10 min im Ultraschallbad (37 kHz) belassen.

Zur Beladung des Trägersystems haben wir pCMV-luc als Modellplasmid verwendet. Dazu wurde die Plasmidlösung mit HEPES-Puffer auf das Volumen der Trägersuspension angepasst. Direkt im Anschluss an die 10 min Inkubationszeit im Ultraschallbad wurde die Plasmidlösung tropfenweise zugegeben. Nach der Vereinigung wurden den Komplexen 30 min im Ultraschallbad zur Entwicklung gewährt. Dabei wurde die Temperatur stets unter 35° C gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die beladenen Vektoren entweder für weitere Versuche im Anschluss verwendet oder bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

Als Referenz für die folgenden Versuche wurden ebenfalls Polyplexe, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, hergestellt. Die Herstellung erfolgte mit drei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen von 10, 15 und 20.

#### **4.2.2 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)**

Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, vorbereitet und vermessen. Für die Vermessung der selbst hergestellten Silica-NP-Suspension wurden die Proben direkt vor der Messung für 5 min im Ultraschallbad (37 kHz) inkubiert. Hierdurch sollten die Voraussetzungen während der Herstellung bestmöglich imitiert und entstandene Agglomerate getrennt werden.

#### **4.2.3 Laser-Doppler-Anemometrie**

Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, vorbereitet und vermessen. Für die Vermessung der selbst hergestellten Silica-NP-Suspension wurden die Proben direkt vor der Messung für 5 min im Ultraschallbad (37 kHz) inkubiert. Hierdurch sollten die Voraussetzungen während der Herstellung bestmöglich imitiert und entstandene Agglomerate getrennt werden.

## **4.2.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, vorbereitet und vermessen.

## **4.2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, mit dem sich hochauflösende Aufnahmen erstellen lassen. Bei dieser Methode wird die untersuchte Probe von einem Elektronenstrahl rasterweise beschossen. Dieser, von einer Kathode erzeugte Primärelektronenstrahl, wird durch vorgeschaltete Kondensatorlinsen sehr fein gebündelt, um präzise, zeilenweise über die Oberfläche des Objekts geführt zu werden. Auf der Probenoberfläche werden infolgedessen sekundäre Elektronen freigesetzt, die von einem internen Detektor registriert und als Signale an einen Computer übermittelt werden. Der Computer wandelt diese Signale in entsprechende Grauwertinformationen um und stellt sie synchron zur Messung auf einem Bildschirm dar. Je nach Beschaffenheit und Struktur der Probe variiert die Intensität der emittierten Elektronen des jeweiligen Rasters. Mit Hilfe elektrostatischer Linsen lässt sich dieses Raster sehr fein anlegen, wodurch sehr hohe Auflösungen erreicht werden können [159-161].

In der Probenkammer, in der die Probe auf dem Probenteller fixiert ist, wird während der Messung ein Vakuum erzeugt. So lässt sich verhindern, dass in der Luft befindliche Elektronen zu Unschärfen führen. Eine wesentliche Störungsquelle sind Aufladungseffekte, die bei der Vermessung von isolierenden Materialien durch Emissionsschwankungen der Sekundärelektronen während der Bestrahlung auftreten. Um diese Effekte zu vermeiden, werden die Proben mit einer hauchdünnen Edelmetallschicht aus beispielsweise Wolfram, Gold oder Platin überzogen (besputtert) [162,163].

Die Bilder der folgenden Arbeit wurden mit einem EVO HD15 (Carl Zeiss) mit einer Beschleunigungsspannung der Primärelektronen von 5 kV aufgenommen. Zum Einsatz kam ein Sekundärelektronendetektor. Die Proben wurden auf Silica-Wafer pipettiert und zur Trocknung staubgeschützt für etwa 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit einer ca.15 nm dünnen Goldschicht besputtert. Hierfür wurde ein Q150R ES (Quorum Technologies Ltd) mit 20 mA für 50 s verwendet.

## 4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um das optimale Verhältnis von pDNA zu unserem Vektor zu bestimmen, haben wir das Verfahren der Gelelektrophorese verwendet. Hierbei werden die zu vergleichenden Proben in nebeneinander gereichte Taschen einer Gelmatrix gegeben. Die Matrix ist komplett mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die Proben in der Geltasche, entsprechend ihrer Ladung, unterschiedlich schnell zur Kathode oder Anode an den Gelkanten. Zum einen wird die Geschwindigkeit der Moleküle durch ihre Ladung bestimmt, zum anderen wirkt die verwendete Gelmatrix wie ein Molekularsieb, sodass auch die Größe einen maßgeblichen Einfluss hat [164].

Für die Herstellung der Matrix haben wir Agarose in einer Konzentration von 1 % ergänzt mit Ethidiumbromid (0,1 µg / ml) verwendet. Agarose-Gele eignen sich aufgrund ihrer Struktur und Porengröße besonders gut für die Auftrennung von Nukleinsäuren. Ethidiumbromid wird als DNA-Maker verwendet. Es interkaliert zwischen die Basenpaare der Nukleinsäuren, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verschiebt. Bei Anregung mit UV-Licht wird die Fluoreszenz der Substanz stark erhöht und die DNA so sichtbar [165-167]. Die Agarose wurde in FSME-Puffer (pH 8,3) suspendiert und anschließend kurz in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 65° C abgekühlt war, wurde das Ethidiumbromid ergänzt, gut durchmischt und in den Gelträger mit Probekamm ausgegossen. Nach 30 min Polymerisationszeit war das Gel ausgehärtet und der Kamm zur Bildung der Probentaschen wurde entfernt. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und bis zur vollständigen Bedeckung mit FSME-Puffer übergossen.

Unser Vektor wurde, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, hergestellt und mit unterschiedlichen Mengen an pDNA komplexiert (Konz. beladene Trägersysteme: 5 µg / ml, 8 µg / ml, 10 µg / ml pDNA). Die Proben wurden mit 1 µl Ladepuffer gemischt und anschließend in die Ladetaschen im Agarosegel pipettiert. Freie pDNA diente als Kontrolle. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Thermo Hybaid Electro 4 Gelsystem (Thermo Hybaid) bei 85 V für 1 h angeschlossen. Die konstante Stromversorgung wurde durch eine LKB 2197 Netzteil (LKB Bromma) sichergestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Agarosegel vorsichtig unter einen BioDoc Analyze Ti5-Trans-Illuminator (Whatman Biometra) platziert und bei einer Wellenlänge von 312 nm analysiert. Zur Dokumentation wurde ein Bild des Gels bei beschriebener Bestrahlung gemacht.

### **4.2.7 Zellkultivierung**

Die Versuche in der Zellkultur wurden an humanen Ovarialkarzinomzellen (SK-OV-3) oder murinen Fibroblasten (L929) durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, kultiviert. 24 h vor dem jeweiligen Experiment wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,2 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well Platten ausgesät.

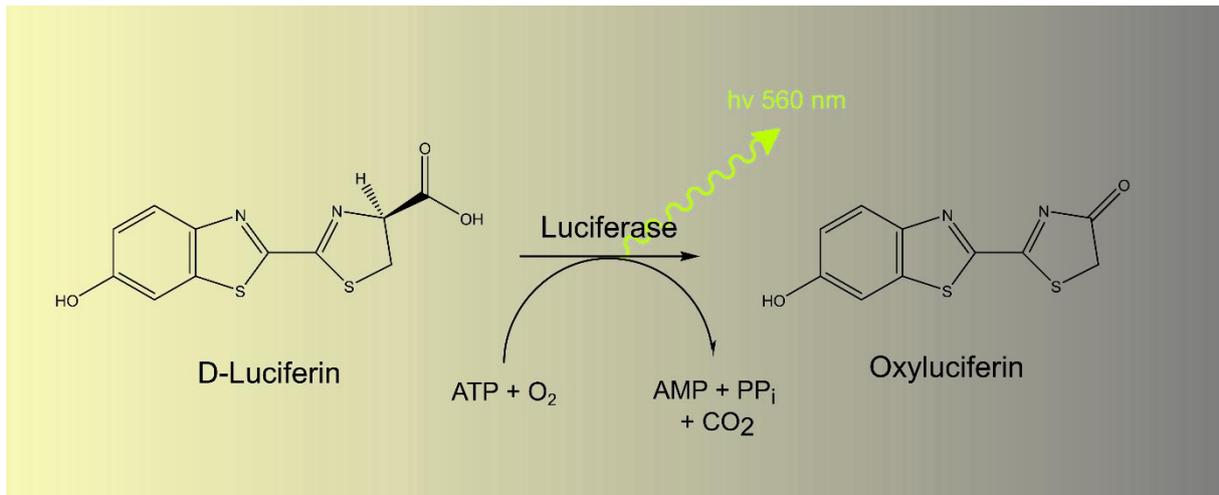
### **4.2.8 MTT-Assay**

Um die zytotoxischen Eigenschaften unserer Proben zu untersuchen, wurde der MTT-Assay, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, durchgeführt.

### **4.2.9 Luciferase Assay**

Um die Effizienz eines Vektors bestimmen zu können, bedarf es spezieller Reporter Gene, die es erlauben, den Anteil erfolgreich veränderter Zellen nach einer Gentransfektion zu quantifizieren. Hierzu werden die Vektoren mit dem entsprechenden Reporter Gen beladen und den Zellen appliziert. Wird das genetische Material erfolgreich von den adressierten Zellen aufgenommen, wird in der Regel die intrazelluläre Expression eines speziellen Enzyms veranlasst. Die Menge dieses exprimierten Enzyms verhält sich entsprechend proportional zu der Transfektionseffizienz des verwendeten Vektors und lässt sich durch die Quantifizierung seiner speziellen enzymatischen Reaktion bestimmen. Beispiele für gängige Reporter Gene sind pCMV-luc für Luciferase, lacZ-Gen für  $\beta$ -galactosidase, das Cat-Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase oder das GFP-Gen, das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert und bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert [168-172].

Für die Bewertung unserer Transfektionssysteme haben wir pCMV-luc als Reporter Gen verwendet, das für das Enzym Firefly-Luciferase codiert. Anschließend an die Transfektion mit unseren Komplexen wurden die Zellen lysiert und für die Auswertung die enzymatische Reaktion von D-Luciferin zu Oxyluciferin quantifiziert. Dafür werden den Proben die benötigten Edukte D-Luciferin und ATP im Überschuss zugegeben, sodass die Menge der entstandenen Luciferase der einzige limitierende Faktor der enzymatischen Reaktion ist.



**Abbildung 4.4:** Abbildung der Luciferase-katalysierten Decarboxylierung von D-Luciferin zu Oxyluciferin, bei der Licht mit einem Emissionsmaximum von etwa 560 nm emittiert wird.

Bei der in **Abbildung 4.4** dargestellten Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin wird Licht emittiert, welches durch Fluometrie erfasst werden kann und sich proportional zur Quantität der vorhandenen Luciferase verhält [173,174]. Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,2 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well-Platten und 200  $\mu$ l Nährmedium ausgesät und für 24 h in den Inkubator gestellt. Für den Versuchstag wurde eine Zellkonfluenz von 70 - 80 % angestrebt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100  $\mu$ l der entsprechenden Probe oder Referenz je Well aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurden 100  $\mu$ l serumfreies Medium verwendet. Die Zellen wurden für 4 h in den Inkubator gestellt, anschließend mit serumhaltigem Medium auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l aufgefüllt und vorsichtig durchmischt. Den Zellen wurde eine Transfektionszeit von insgesamt 48 h im Inkubator eingeräumt. Die Probezugabe erfolgte immer in 4-facher Ausführung. Alle Verdünnungen wurden mit serumfreiem Medium hergestellt.

Zur Auswertung wurden die Zellen erst zweimal mit PBS-Puffer (pH-Wert 7,4) mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und anschließend mit Lysepuffer für 30 min in einem Orbitalschüttler bei 200 U/min durchmischt. Das Lysat wurde in eine weiße 96-Well-Platte überführt und mit einem FLUOstar Optima Plattenlesegerät vermessen. Dieses war mit einer internen Pumpe zum Einspritzen der frisch vereinten Mischungen aus Luciferin-Mix 10mM und Luciferase Assay Reagenz, direkt vor der Messung, ausgestattet. Über das Protokoll der Software wurde eine Integrationszeit von 10 s eingestellt. Die Quantifizierung erfolgte als relative Lumineszenzeinheiten (RLU) bei einer Wellenlänge von 560 nm.

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

### 4.3.1 Physikochemische Charakterisierung

Die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung unseres Vektorsystems werden in dem nachfolgenden Kapitel ausgewertet und diskutiert. Neben der Größe und dem Zetapotenzial wurde die Lagerstabilität und die Fähigkeit pDNA zu komplexieren, sowie die dadurch vorgegebenen Verhältnismäßigkeiten der einzelnen Komponenten bestimmt.

#### 4.3.1.1 Größe und Zetapotenzial

Durch die Veränderungen von Größe und Zetapotenzial der Silica-Nanopartikeln nach der Verknüpfung mit PEI und der Beladung mit pDNA lassen sich Erkenntnisse über die Struktur der jeweiligen Partikel gewinnen. Wie die Messergebnisse aus **Tabelle 4.1** veranschaulichen, nimmt die Größe der Partikel nach jedem Bindungsschritt zu. Aufgrund der Größenzunahme und der begleitenden Erhöhung des Zetapotenzials infolge der Anlagerung des positiv geladenen PEI an die negativ geladenen Silicaoberfläche ist von einer erfolgreichen und beständigen Komplexierung auszugehen. Im nächsten Bindungsschritt kann infolge der Anlagerung der negativ geladenen pDNA erwartungsgemäß eine Vergrößerung der Komplexe beobachtet werden. Begleitet wird diese von einer geringen Erniedrigung des Zetapotenzials durch ausgleichende Tendenzen der Nukleinsäure.

Unsere beladenen Vektoren haben eine Größe von etwa 110 nm und eignen sich daher die adressierten Gewebe nach der Theorie des passiven Drug Targeting zu erreichen. Nanopartikuläre Gentherapeutika in einem Größenbereich von typischerweise 100 bis 200 nm profitieren in besonderer Weise von dem EPR-Effekt (Enhanced Permeability and Retention), wodurch besonders hohe Wirkstoffkonzentrationen in Tumorzellen erzielt werden [175].

Die deutlich von den Herstellerangaben (5-15 nm, bestimmt durch Transmissionselektronenmikroskopie) abweichenden Messergebnisse von pulverförmigem SiO<sub>2</sub>-NP in HEPES-Puffer deuten auf deren stark ausgeprägte Neigung zur Bildung von Agglomeraten hin. Dieses Phänomen wurde auch in vorangegangene Arbeiten beschrieben [176]. Auch die daraus hergestellten Komplexe sind im Vergleich zu den unter der Verwendung von Levasil® hergestellten Komplexen deutlich größer (vgl. **Tabelle 4.1**).

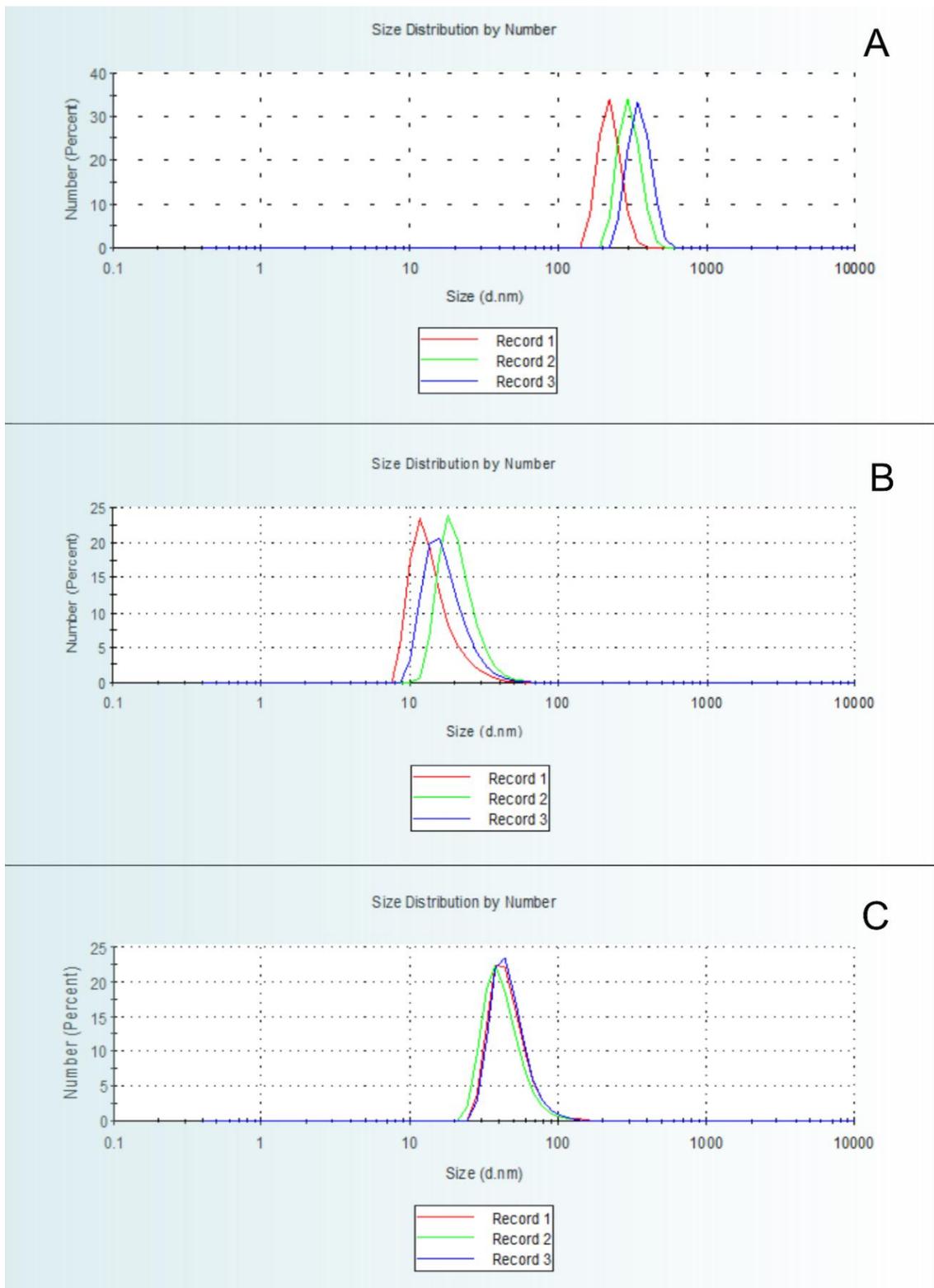
**Tabelle 4.1**

Messergebnisse der Photonenkorrelationsspektroskopie und Laser-Doppler-Anemometrie

<b>Formulierung</b>	<b>Größe ± S.D. [d.nm]</b>	<b>PDI ± S.D.</b>	<b>Zeta potential ±S.D. [mV]</b>
SiO <sub>2</sub> -NP	171.9 ±17.1	0.254 ±0.092	-25.8 ± 0.36
SiO <sub>2</sub> +PEI	229.5 ±28.8	0.379 ±0.050	28.4 ± 0.97
SiO <sub>2</sub> +PEI +pDNA	271.5 ±7.61	0.341 ±0.029	25.2 ± 0.25
Levasil®	45.9 ±0.8	0.159 ±0.013	-12.8 ± 0.15
Levasil®+PEI	85.45 ±0.2	0.168 ±0.008	30.9 ± 0.35
Levasil®+PEI+pDNA	109.2 ±0.6	0.144 ±0.009	28.4 ± 1.05
Polyplexe	102.7 ±2.3	0.353 ±0.027	6.60 ± 2.38

Alle Messgrößen werden als Z-Average dargestellt, welcher aus der Partikelgrößenverteilung der Intensität abgeleitet ist. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 3 Messvorgängen dargestellt.

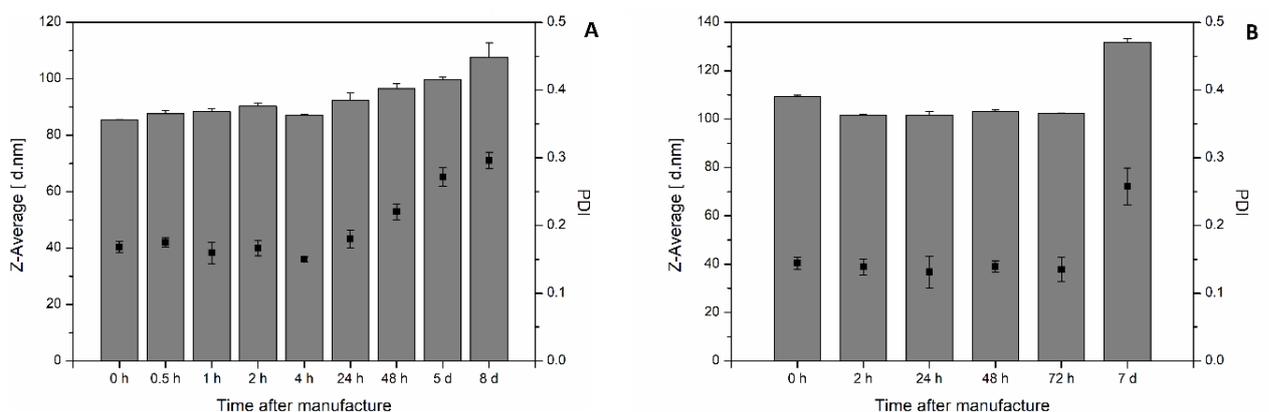
Aber auch bei der Größenbestimmung von Levasil® 200/40 zeigen sich deutliche Differenzen zwischen den von uns gemessenen Werten aus **Tabelle 4.1** (ca. 46 nm) und den Herstellerangaben (ca. 17 nm, bestimmt durch Rasterelektronenmikroskopie). Dies könnte auch bei Levasil® auf eine gewisse, wenn auch wesentlich geringere, Tendenz zur Bildung von Agglomeraten hinweisen. Zum anderen ist bei der Dynamischen Lichtstreuung oft mit einer vergrößerten Darstellung der Partikel zu rechnen, da es durch die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Anlagerung von Ionen an die Partikeloberfläche kommt. Umso stärker die eigentliche Oberflächenladung der Partikel ist, umso mehr Ionen können angelagert werden und umso größer ist der hydrodynamische Partikeldurchmesser. Auch ein gewisser Toleranzspielraum, vor allem bei der Vermessung sehr kleiner polydisperser Proben, sollte für die Interpretation der Messergebnisse berücksichtigt werden, da schon wenige größere Strukturen zu starken Abweichungen führen können [177,178].



**Abbildung 4.5:** Graphische Darstellung der Messergebnisse eines Zetasizer Nano. Die Partikelgrößenverteilung ist als Anzahl gewählt. A zeigt die Auswertung der Vermessung von selbst suspendierten SiO<sub>2</sub>-NP. B zeigt die Auswertung der Vermessung von Levasil® 200/40. C zeigt die Auswertung der Vermessung von Levasil®-PEI-Komplexe. Rot, grün und blau stellen die Graphen der drei aufeinander folgenden Einzelmessungen eines Messdurchlaufs dar.

Um die Agglomerationsvorgänge detaillierter zu betrachten, haben wir die graphische Darstellung der Messergebnisse nach deren Anzahl (Number) umgestellt und die drei jeweiligen Einzelmessungen eines Messdurchlaufs differenziert betrachtet. Wie in **Abbildung 4.5** zu erkennen ist, kommt es bei der selbst hergestellte Silica-NP-Suspension sogar in dem kurzen Zeitintervall zwischen den Einzelmessungen des Messdurchlaufs zu einer deutlichen Zunahme des Durchmessers. Bei der Vermessung der Levasil®-Suspension ist diese Tendenz wesentlich geringer ausgeprägt. Falls nicht anders beschrieben, wurden daher für die nachfolgenden Versuche Levasil® als Ausgangssubstanz für die Herstellung unseres Trägersystems verwendet.

Nach der Komplexbildung mit PEI lassen sich keine Veränderungen zwischen den drei Einzelmessungen mehr erkennen. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Bindung an PEI die Abstoßungseffekte der einzelnen SiO<sub>2</sub>-NP durch die veränderte Oberflächenladung und -struktur deutlich begünstigt, sodass mit einer wesentlichen Verbesserung hinsichtlich der späteren Lagerungsstabilität zu rechnen ist. Eine Zusammenlagerung während der Lagerung der beladenen Trägersysteme würde einen erheblichen bis vollständigen Verlust der Wirksamkeit der späteren Therapie mit sich bringen. Um die These der besseren Lagerungsstabilität zu überprüfen, haben wir die Partikelgröße unserer Vektoren vor als auch nach der Komplexbildung mit pDNA über einen Zeitintervall von mehreren Tagen wiederholt bestimmt. Wie durch **Abbildung 4.6** verdeutlicht wird, können sowohl die unbeladenen als auch die mit pDNA beladenen Vektoren problemlos über einen Zeitraum von mindestens einer Woche bei 4° C gelagert werden.

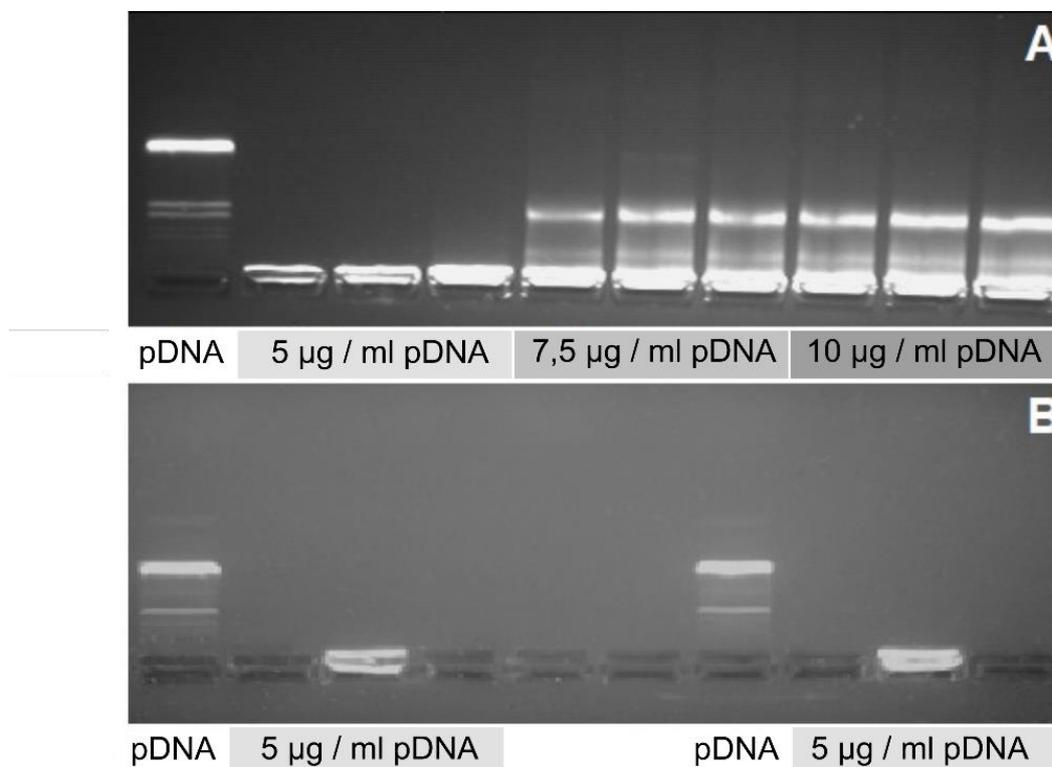


**Abbildung 4.6:** Graphische Auswertung der Messergebnisse des hydrodynamischen Durchmessers bei Lagerung über einen längeren Zeitintervall bei 4° C. Grafik A zeigt den unbeladenen Vektor aus Levasil® und PEI. Grafik B zeigt den gleichen Vektor, der im Anschluss an die Herstellung mit pDNA beladen wurde. Alle Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 3 Messvorgängen dargestellt.

### 4.3.1.2 Gelelektrophorese

Durch die elektrophoretische Abtrennung der ungebundenen DNA von unseren Komplexen erhalten wir Erkenntnisse hinsichtlich der maximal möglichen Beladungsmenge und damit auch über die Stöchiometrie der Komplexierung und dem optimalen N/P-Verhältnis. Das N/P-Verhältnis ist eine sehr wichtige Kerngröße für die Herstellung unseres Trägersystems mit Einfluss auf Transfektionseffizienz und Toxizität der gebildeten Komplexe [179].

Die nach der Komplexierung mit dem Vektor noch überschüssige DNA wird nicht mehr an das Trägersystem gebunden, sondern bewegt sich frei im Puffer. **Abbildung 4.7** zeigt die Abtrennung der freien pDNA im elektrischen Feld. Ist sie fest an den Vektor gebunden, wird die Mobilmachung verhindert und die DNA-Bande verlässt die Ladetasche nicht. Ist in der Probe freie DNA enthalten, ist diese als laufende Bande in der Matrix, parallel zur freien pDNA, zu erkennen [94]. **Abbildung 4.7** ist zu entnehmen, dass bis zu einer Konzentration von 5 µg / ml die gesamte pDNA fest an unseren Vektor gebunden werden kann. Ab einer Beladungsmenge von 7,5 µg / ml bleibt freie DNA im Überschuss vorhanden.



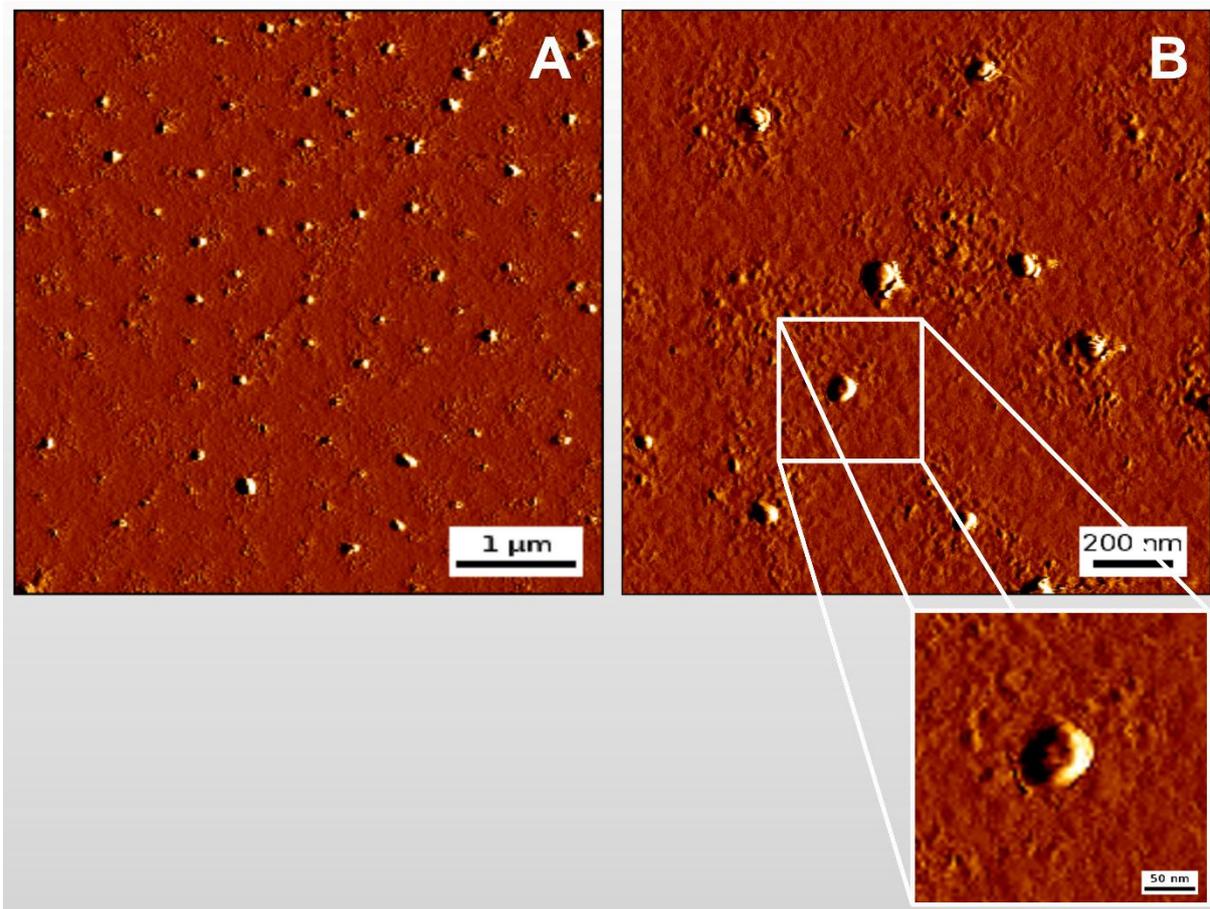
**Abbildung 4.7:** Aufnahme der Gelelektrophoresematrix mit Detektion der DNA durch Ethidiumbromid. A zeigt den Vergleich von ungebundener pDNA zu beladenen Silica-PEI-Vektoren auf 5 µg / ml, 7,5 µg / ml, 10 µg / ml Endkonzentration. B ist ein Kontrollversuch mit der optimalen Beladungsmenge an pDNA.

Folglich ist die maximale Beladungsmenge überschritten. Die maximale Beladungsmenge, die für weitere Versuche verwendet wurde, liegt bei  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Dies entspricht einem N/P-Verhältnis bezogen auf die eingesetzte PEI-Konzentration von etwa 10.

## 4.3.2 Bildgebende Verfahren

### 4.3.2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die Levasil®-PEI-Suspension wurden zur Vorbereitung auf die Vermessung mit Milli-Q Wasser auf eine Konzentration von  $0,1 \text{ mg} / \text{ml}$  verdünnt und wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben vorbereitet und vermessen.

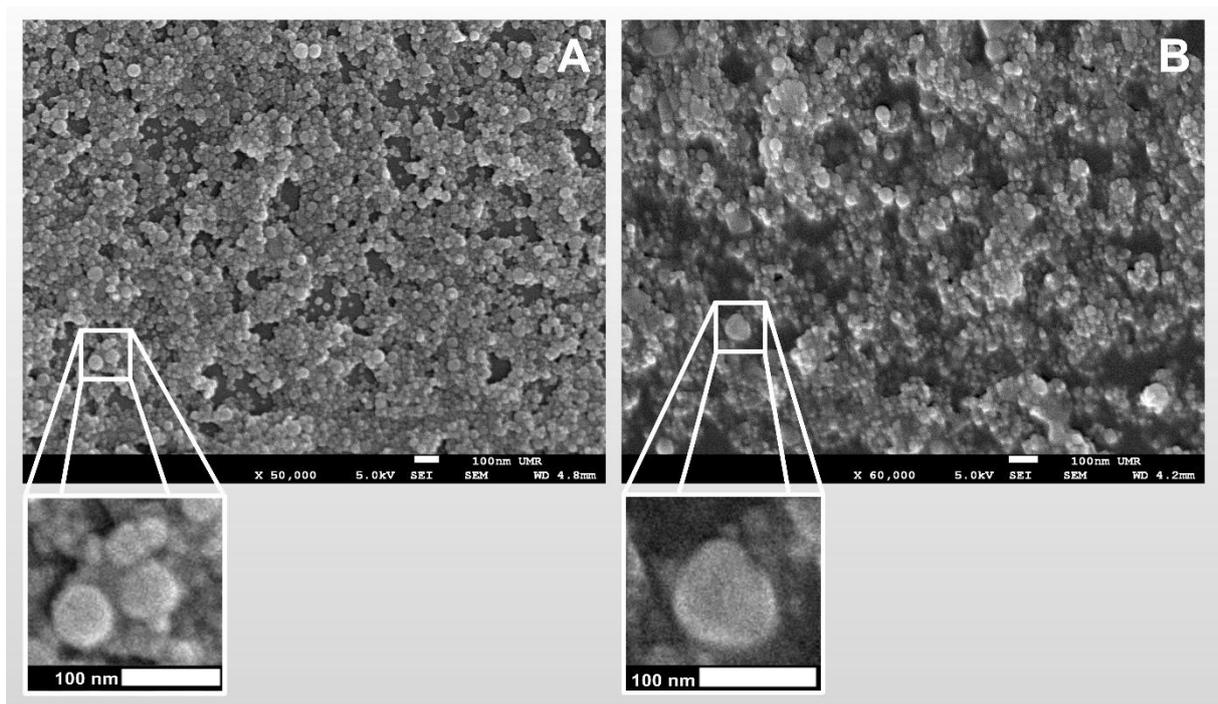


**Abbildung 4.8:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Levasil®-PEI-Komplexen im „intermittent contact“-Modus mit 0.5 bis 1.5 Hz. Für die Messungen wurde ein Cantilever NSC 14/AIBs mit pyramidaler  $\text{Si}_3\text{N}_4$  Spitze verwendet. Die Kraftkonstante betrug  $5 \text{ N/m}$ , die Resonanzfrequenz  $160 \text{ kHz}$ . Bild A und B zeigen Aufnahmen von verschiedenen Konzentrationen derselben Probe.

In **Abbildung 4.8** ist zu sehen, dass unser Vektor kugelförmige, kompakte Strukturen ausbildet. Verglichen mit den Messergebnissen der Photonenkorrelationsspektroskopie sind die Komplexe etwas kleiner dargestellt. Eine Begründung für die Unterschiede haben wir bereits in Kapitel 4.3.1.1 behandelt.

#### 4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Wie schon bei der Darstellung mit dem Rasterkraftmikroskop beobachtet, sind auch in **Abbildung 4.9** die Levasil®-PEI-Komplexe vor als auch nach der Beladung mit DNA als sphärische Strukturen zu erkennen. Durch die Komplexierung der DNA nimmt der Durchmesser der Komplexe, entsprechend unseren Erwartungen und in Übereinstimmung mit vorherigen Messergebnissen, zu. Die Bereits in Kapitel 4.3.2.1 beobachtete Differenz zwischen dem Partikeldurchmesser, der mit PCS bestimmt wurde und dem Partikeldurchmesser, der durch die bildgebenden Verfahren dargestellt wird, können wir auch hier wieder beobachten.

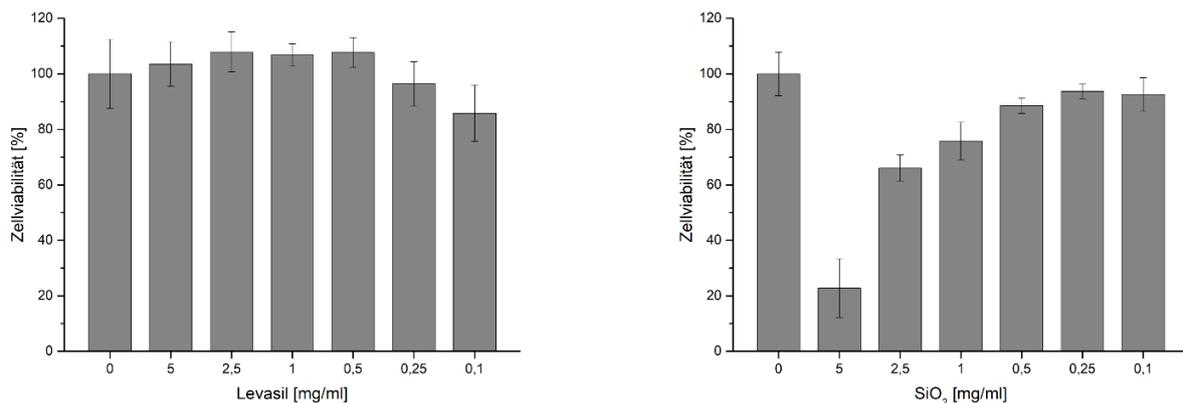


**Abbildung 4.9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Levasil®-PEI-Komplexen (A) und Levasil®-PEI-DNA-Komplexen (B). Der weiße Maßstab in der unteren, rechten Ecke stellt 100 nm dar.

## 4.3.3 Zellkultur

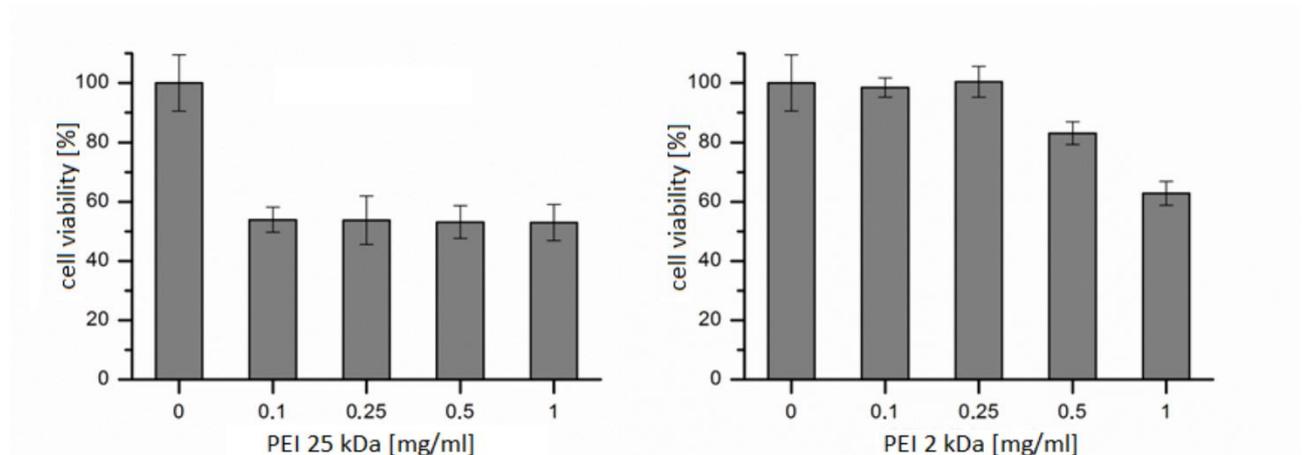
### 4.3.3.1 Toxizität

Unter Verwendung des MTT-Assays haben wir das zytotoxische Potenzial bestimmt, welches von den von uns verwendeten Ausgangssubstanzen unseres Trägersystems sowie dem Trägersystem selbst ausgeht. Die Auswertung der Ergebnisse von dem in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Versuch wird in **Abbildung 4.10** graphisch dargestellt. Aus den Ergebnissen lässt sich die Erkenntnis ziehen, dass ebenfalls, wie aus der Vermessung mit der Photonenkorrelationsspektroskopie in Kapitel 4.3.1.1 hervorgeht, die kommerziell erhältliche Levasil®-Suspension der manuell hergestellten SiO<sub>2</sub>-NP-Suspension, auch hinsichtlich ihrer Toxizität klar überlegen ist. Selbst in hohen Konzentrationen von 5 mg / ml ist keine signifikante Veränderung der Zellsterblichkeit im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar. Die Unterschiede in der Ausprägung der zytotoxischen Eigenschaften der zwei verschiedenen Silica-NP Formulierungen sind mit der unterschiedlich stark ausgeprägten Tendenz zur Ausbildung von Agglomeraten zu erklären. Durch die Zusammenlagerung werden zelltoxischen Tendenzen der Nanopartikel verstärkt [180]. Die vorliegenden Ergebnisse haben uns in dem Vorhaben bestärkt, für weitere Versuche Levasil® als Ausgangssubstanz zu verwenden.



**Abbildung 4.10:** Auswertung des MTT-Assay an L929 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Levasil® (links) oder einer manuell hergestellten Silica-NP-Suspension (rechts). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

Auch zwei für die Herstellung unseres Vektors in Frage kommende Polyethylenimine wurden auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin überprüft. **Abbildung 4.11** vergleicht die Toxizität von PEI mit einem höheren Molekulargewicht (25 kDa) mit niedermolekularem PEI (2 kDa). Wie bereits verschiedene Arbeiten zu diesem Thema vermuten ließen, können wir in der Auswertung in **Abbildung 4.11** eine höhere Toxizität bei PEI mit einem höheren Molekulargewicht beobachten [143,144].



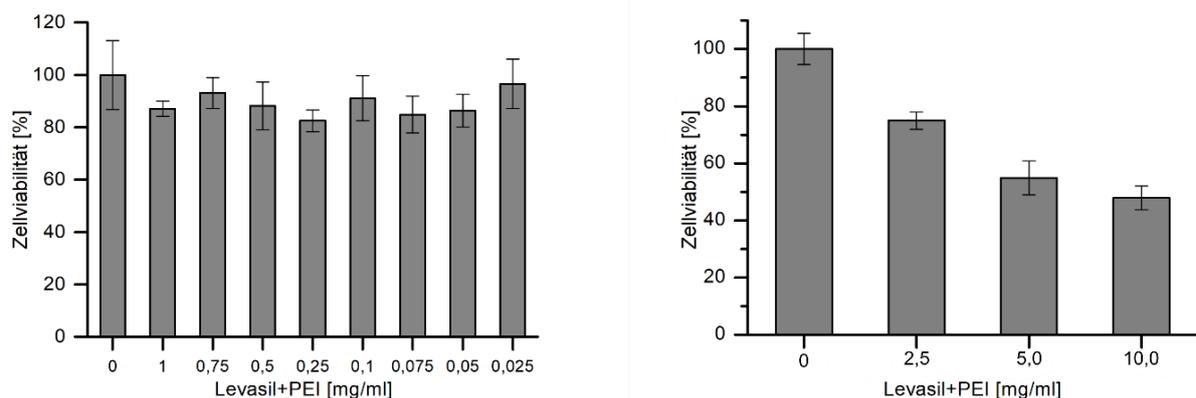
**Abbildung 4.11:** Auswertung des MTT-Assay an L929 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PEI mit 25 kDa (links) oder 2 kDa (rechts). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

Da begleitend mit der höheren Toxizität des 25 kDa PEI auch eine höhere Transfektionseffizienz einhergeht, haben wir für die Herstellung unserer Vektoren das höher molekulare PEI verwendet. Nach unserer These rechnen wir durch die Bindung an die Silica-NP mit einer Reduktion der toxischen Eigenschaften, wodurch wir trotz höherer Transfektionseffizienz keine toxischen Nebenwirkungen erwarten.

Diese These wird durch die Auswertung der Toxizitätsuntersuchungen in **Abbildung 4.12** bestätigt. Durch Bindung an die Silica-NP verringert sich die Toxizität im Vergleich mit dem freien PEI deutlich. Selbst mit einer Konzentration von 1 mg / ml (entspricht etwa 0,6 mg PEI) kann keine signifikante Veränderung auf die Viabilität der Zellen beobachtet werden. Die äquivalente Menge an ungebundenem PEI zeigt jedoch eine Reduktion um ca. 50 %. Dieser toxische Effekt von freiem PEI ist dessen positive Ladung geschuldet. Durch die Bindung an

die Silica-NP wird die Ladung des gesamten Komplex erniedrigt und folglich auch das zytotoxische Potenzial [181,182].

Um eine bessere Übersicht über den toxischen Bereich unseres Vektors zu bekommen, haben wir einen zweiten Versuch mit einer deutlich erhöhten Konzentration (2,5, 5,0, 10,0 mg / ml) durchgeführt. In der Auswertung im rechten Teil der **Abbildung 4.12** können wir für den wesentlich höheren Konzentrationsbereich unserer Vektoren eine Abnahme der Zellviabilität beobachten. Zusammengefasst erhöht sich die LD50 Konzentration von freiem PEI zu komplexierten PEI etwa um den Faktor 50 (vgl. **Abbildung 4.12**, rechte Hälfte und linke Hälfte). Diese Veränderung zeigt eine enorme Optimierung, die wir durch die Kombination dieser beiden Systeme erreichen konnten. Mit Blick auf eine zukünftige Verwendung als Arzneimittel bedeutet dies eine wesentlich höhere Effizienz durch eine erweiterte therapeutische Breite.

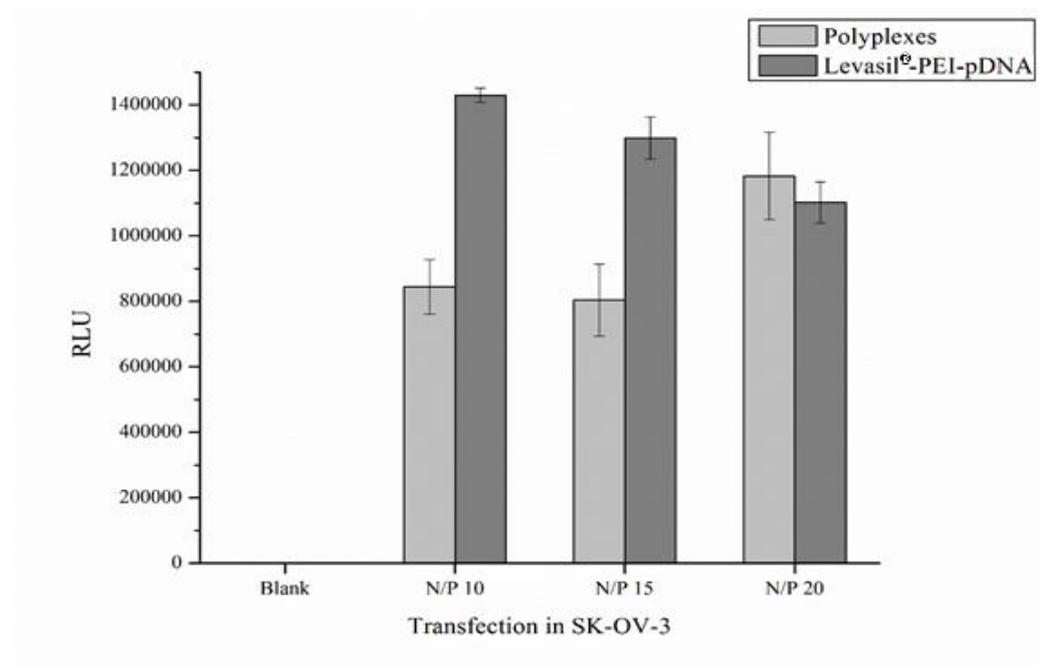


**Abbildung 4.12:** Auswertung des MTT-Assay an L949 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen unseres Vektors aus Levasil® und PEI (25 kDa). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

#### 4.3.3.2 Transfektionseffizienz

Für die Bewertung der Transfektionseffizienz unter Verwendung verschiedener Verhältnisse von unserem Vektor und pDNA haben wir zum einen das optimale N/P-Verhältnis für die Herstellung und zum anderen die finale Effektivität unseres Vektors bestimmen können. Dazu wurden die entsprechenden Komplexe wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben hergestellt und mit pCMV-luc-Plasmid beladen. Die Beladungsmenge an Plasmid wurde entsprechend einem N/P-

Verhältnis von 10, 15 oder 20 vorgenommen. Als Referenz dienten Polyplexe, die wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, hergestellt wurden mit äquivalenten N/P-Verhältnissen und Plasmidmengen. Wie durch die Auswertung der Gelelektrophorese in Kapitel 4.3.1.2 bekannt ist, kommt es bei der Komplexierung unseres Vektors mit DNA in einem niedrigerem N/P-Verhältnis als 10 zum Überleben von ungebundener pDNA. Daher wurde ein N/P-Verhältnis von 10 als untere Grenze für die Versuche gesetzt.



**Abbildung 4.13:** Transfektionseffizienz unseres Vektors komplexiert mit pCMV-luc an SK-OV-3 Zellen in drei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen. Polyplexe mit demselben N/P-Verhältnis dienten als Referenz.

Durch die Ergebnisse in **Abbildung 4.13** wird dargestellt, dass für unser Trägersystem die höchste Transfektionseffizienz bei einem N/P-Verhältnis von 10 vorliegt. Damit konnte die höchste Transfektionseffizienz bei dem niedrigsten untersuchten Verhältnis beobachtet werden. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Polyplexen, bei welchen ein höheres N/P-Verhältnis mit einer höheren Transfektionseffizienz einhergeht. Bei Polyplexen führen typischerweise hohe N/P-Verhältnisse zu höheren Transfektionsraten, da durch den höheren Anteil an freien kationischen Polymeren die intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäuren verbessert wird [183,184]. Allerdings gilt dieser Überschuss an freiem kationischem Polymer auch als Hauptursache für systemische Toxizität, die durch DNA-Polyplexe bei hohen N/P-Verhältnissen hervorgerufen wird [185]. Durch die Komplexierung

von PEI mit den SiO<sub>2</sub>-NP scheint dieser Überschuss an kationischem Polymer keine Auswirkungen mehr zu haben. Die vergleichsweise hohe Transfektionsraten unseres Vektors lassen auf die Vermutung schließen, dass die intrazelluläre Freisetzung der pDNA unseres Vektors grundsätzlich so hoch ist, dass keine signifikante Steigerung durch erhöhte PEI-Konzentrationen mehr erreicht werden kann.

Allgemein konnten wir, ungeachtet des N/P-Verhältnis, für unser Vektorsystem eine höhere Transfektionseffizienz verglichen mit Polyplexen beobachten. Für die verwendete Formulierung haben wir eine Steigerung um 43 % nachgewiesen. Gerade die hohe Effizienz unter der Verwendung von niedrigeren PEI-Konzentrationen in unserem Vektor sind eine positive Erkenntnis, da sie auf eine bessere spätere Verträglichkeit infolge der fehlenden freien Polymere hinweist.

## 4.4 Tagungsbeitrag

Sascha M. Hubing, Shashank R. Pinnapireddy, Jan Schulze, Patrik Schlote, Udo Bakowsky

**Polyethylenimine-silica-nanoparticles as efficient vector for gene delivery**

Controlled Release Society (CRS), 20. -21. February 2020, Munich, Germany (Poster)

## 4.5 Zusammenfassung

Ziel des Projekts war es, eine neuartige Formulierung herzustellen und zu charakterisieren, die aus der Komplexierung von Silica-Nanopartikeln und Polyethylenimin entsteht. Die Vektoren sollten in einem Größenbereich liegen, der eine effektive zelluläre Internalisierung ermöglicht. Außerdem sollten die Transfektionseffizienz und Toxizität im Vergleich mit Polyplexen und Nanoplexen überlegen sein.

Mit Hilfe der physikochemischen Charakterisierungsmethoden konnten wir sowohl die erfolgreiche Komplexbildung nachweisen als auch erste Rückschlüsse hinsichtlich des optimalen stöchiometrischen Verhältnisses der Zusammensetzung gewinnen. Sowohl durch die Bestimmung von Größe und Zetapotenzial nach den einzelnen Bindungsschritten als auch durch die bildgebenden Verfahren konnten wir die Komplexierung von unserem Trägersystem belegen. Durch die mehrtägig angelegte Messreihe zur Überprüfung der Resilienz gegenüber Agglomerationsvorgängen haben wir die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität unseres Vektors über mehrere Tage nachgewiesen. Die Neigung zur Bildung von Agglomeraten, die wir bei Silica-NP in besonderem Maße beobachtet haben, konnte somit verhindert werden. Hinsichtlich der späteren Handhabbarkeit und Lagerung ist diese Wandlung ein enormer Zugewinn.

Die entscheidende Kenngröße zum Vergleich von Gentherapeutischen Vektoren ist die Transfektionseffizienz, die entscheidend von der Toxizität beeinflusst wird. Durch die verschiedenen Toxizitätsstudien in der Zellkultur konnten wir die gute Verträglichkeit unseres Vektors nachweisen. Besonders im Vergleich zu freiem PEI konnte hier eine deutliche Reduktion der Zytotoxizität durch die Verknüpfung mit Silica-NP erreicht werden. Für die Verwendung als Arzneimittel ist diese Beobachtung von besonderer Relevanz, weil gerade die Toxizität ein limitierender Faktor für den Einsatz nicht-viraler Gentherapeutika bedeutet. Folglich ist bei einer zukünftigen Anwendung mit reduzierten Nebenwirkungen und einer verbesserten Compliance zu rechnen, woraus ein erheblicher Mehrwert entsteht. Durch das Luciferase-Assay konnten wir eine signifikante Erhöhung der Transfektionseffizienz im Vergleich mit Polyplexen nachgewiesen. Speziell bei einem niedrigen N/P-Verhältnis konnten wir eine Verdopplung der Transfektionsrate beobachten. Besonders diese herausragende Performance macht unseren Vektor zu einem attraktiven Kandidaten für den gentherapeutischen Einsatz.

## **5 Projekt 2: Biolumineszenz induzierte PDT**

### **5.1 Einleitung**

Der nachfolgende Abschnitt befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung eines Biolumineszenz induzierten PDT-Systems. Das für die Aktivierung des Photosensetizers benötigte Licht soll dabei von den Zielzellen selbst erzeugt werden. Diese Fähigkeit wird den Zellen durch Transfektion mit Lipopolyplexen übertragen. Ein geeigneter Photosensitizer wird in der Lipidhülle der Lipopolyplexe eingeschlossen, um ihn parallel mit an den Wirkort zu transportieren.

#### **5.1.1 Photodynamische Therapie**

Die Anfänge der Photodynamischen Therapie (PDT) gehen auf das Jahr 1900 zurück. Der Medizinstudent Oscar Raab machte im Kontext seiner Arbeit eine wegweisende Entdeckung: Einige Mikroorganismen, die in Gegenwart bestimmter Farbstoffen aufbewahrt wurden, verstarben nach längerer Verweildauer im Tageslicht [186]. Die Verknüpfung der Anregung eines Photosensitizers durch Licht mit der anschließenden toxischen Reaktion legte den Grundstein für die PDT, die sich im folgenden Jahrhundert zu einem vielversprechenden und hochselektivem Therapiekonzept zur Behandlung schwer therapierbarer Erkrankungen wie beispielsweise Krebs entwickeln sollte [187].

Die PDT ist eine nicht-invasive Therapieform. Sie basiert auf der lokalen oder systemischen Applikation einer lichtempfindlichen Verbindung, des sogenannten Photosensitizers (PS). Dieser soll sich in dem zu therapierenden Gewebe akkumulieren und wird dort durch eine Lichtquelle aktiviert. Dies geschieht durch Absorption von Licht einer spezifischen Wellenlänge, wodurch der PS über die Zwischenstufe eines angeregten Singulett-Zustands in einen stabileren angeregten Triplett-Zustand verbracht wird. In Gegenwart von Sauerstoff kommt es folglich zu einer photochemischen Reaktion, durch die es zur Bildung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise Singulett-Sauerstoff, kommt. Diese reaktiven Spezies haben ausgeprägte toxische Effekte auf die Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Der Wirkradius bezieht sich allerdings nur auf Zellen in direkter Nachbarschaft des aktivierten Photosensitizers und ermöglichen so eine sehr selektive und zielgerichtete Therapie des adressierten Gewebes [188-190].

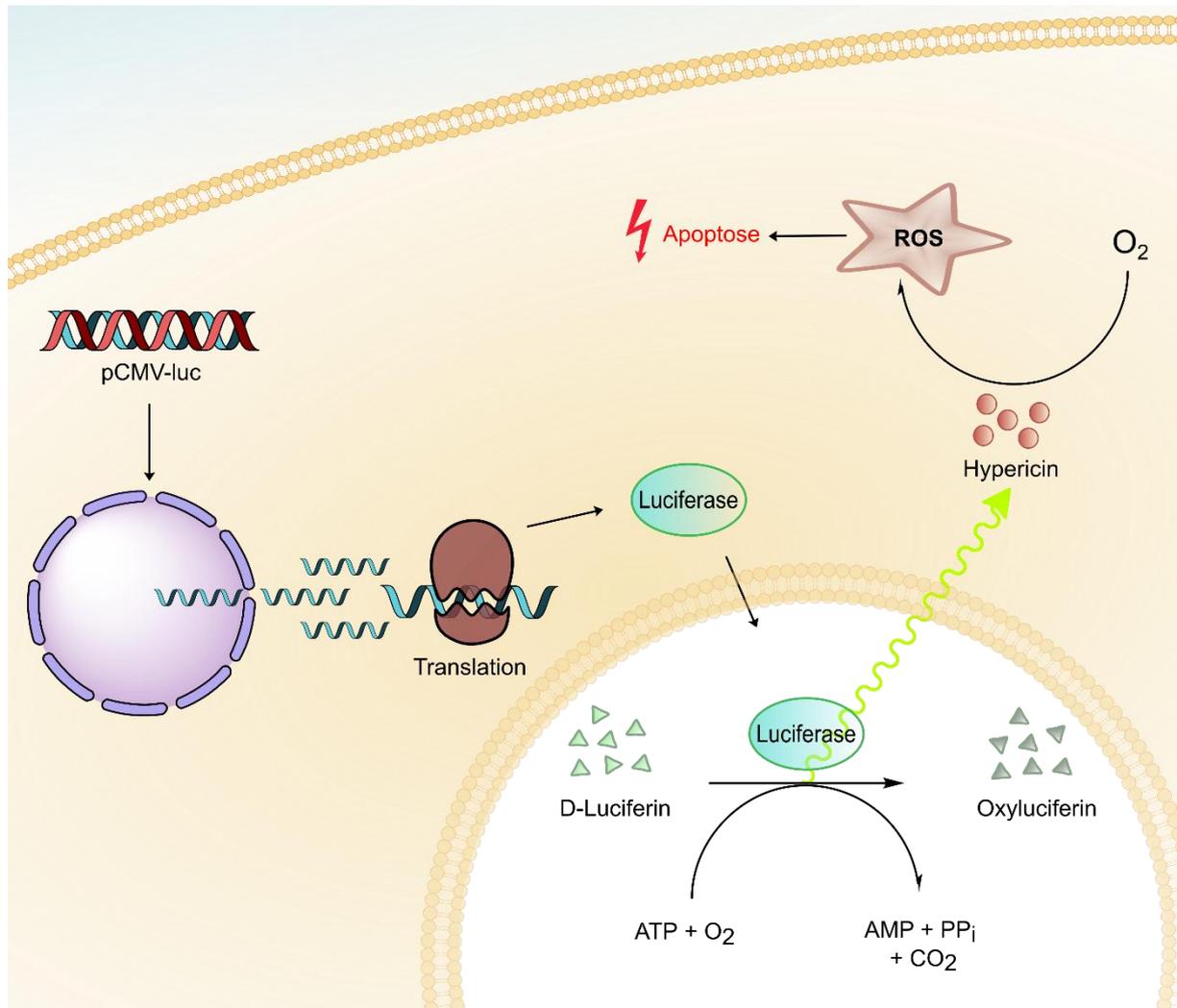
Die Herausforderungen einer effektiven PDT sind neben der passenden Auswahl des Photosensitizers, der allgemein keine toxischen Nebenwirkungen verursachen und selektiv pathogenes Gewebe zerstören sollte, die Lichtquelle mit der entsprechenden Anregungswellenlänge nah genug zum Wirkort zu bringen, sowie eine gute Versorgung des adressierten Gewebes mit Sauerstoff zu gewährleisten [191,192].

In den letzten Jahren konnte vor allem durch die Kombination von Photosensitizern mit nanoskaligen Wirkstoffträgern signifikante Verbesserungen der PDT erreicht werden. Therapieeffizienz und Selektivität wurden gesteigert, Nebenwirkungen konnten gleichzeitig reduziert werden [193-195]. Vor allem die Verpackung der Photosensitizer in liposomale Formulierungen wurde in mehreren Studien als besonders vielversprechende Methode beschrieben und lässt uns erwartungsvoll in die Zukunft blicken [196-198].

### **5.1.2 Biolumineszenz**

Biolumineszenz (BL) ist eine biochemische Reaktion, die es Lebewesen ermöglicht, autark Licht zu erzeugen. Das wohl bekannteste Vorkommen von BL ist die Lichtemission von Glühwürmchen. Sie wird durch das Enzym Luciferase ermöglicht. Dieses katalysiert die ATP-abhängig Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Licht emittiert wird [199-201].

In jüngerer Zeit ist die BL vor allem im Zusammenhang mit "selbstleuchtenden PDT-Systemen" in den Fokus der Forschung getreten. Die Idee, die Anregung des Photosensitizers nicht durch eine externe Lichtquelle durchzuführen, sondern die Zelle selbst mit dem entsprechenden Gen zur Lichterzeugung zu befähigen, würde das Anwendungsgebiet der PDT deutlich erweitern. Die Aktivierung des Photosensitizers ist bis dato nämlich ein wesentlicher limitierender Faktor, der die Anwendbarkeit dieser innovativen Therapieform bisweilen auf gut zugängliche Gewebe beschränkt. Tiefer liegende Gewebe und Organe können aufgrund der geringen Penetrationstiefe des Anregungslichts nicht adäquat therapiert werden [202]. Eine schematische Übersicht über den Ablauf der PS-Aktivierung durch BL gibt die folgende **Abbildung 5.1**.

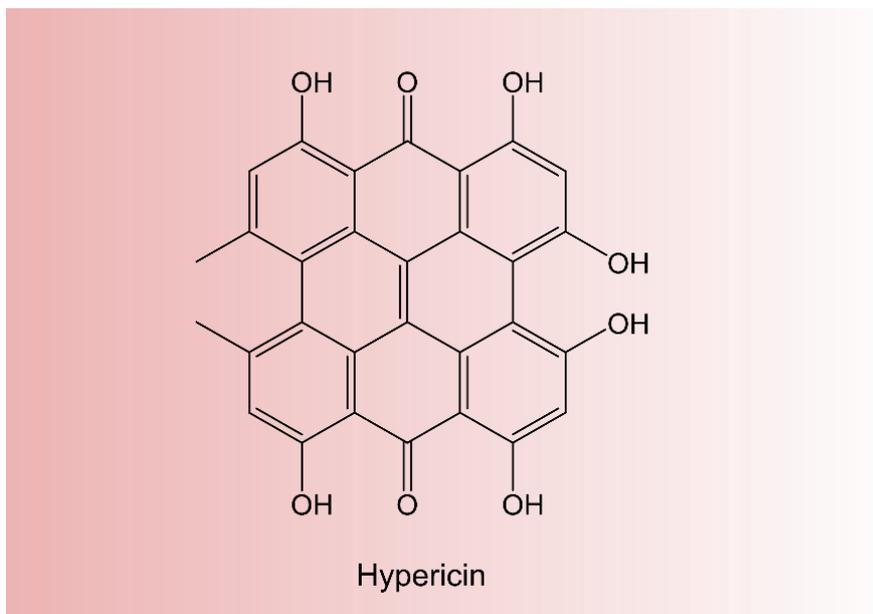


**Abbildung 5.1:** Vereinfachte Darstellung der Biolumineszenz induzierten PDT. Nach Transfektion mit pCMV-luc bildet die Zelle Luciferase. Diese wird in Peroxisomen transportiert, wo sie die Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches von dem Photosensetizer Hypericin absorbiert wird. Folglich kommt es zur Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zur Apoptose der Zelle führen.

Doch für die Aktivierung des Photosensetizers durch Biolumineszenz sind einige Hürden zu nehmen. Das Absorptionsprofil des PS muss sehr eng mit dem Emissionsprofil des BL-Systems übereinstimmen und es muss eine hohe Quantenausbeute an Licht emittiert werden, um eine effiziente Aktivierung des PS zu erzielen. Um dies zu gewährleisten, müssen die Edukte der BL-Reaktion, das entsprechende Enzym, sowie der PS in demselben Zellkompartiment bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und in entsprechender Konzentration vorhanden sein [203-205]. Verschiedene Studien, die sich in diesem Zusammenhang mit Luciferase-Systemen beschäftigt haben, konnten in den letzten Jahren von vielversprechenden Beobachtungen berichten [206-208].

### 5.1.3 Hypericin

Hypericin ist ein natürlich vorkommendes Anthrachinon-Derivat, welches in bestimmten Pflanzenarten der Gattung *Hypericum* vorkommt und durch seine rötliche Färbung wesentlicher Bestandteil deren Farbgebung ist. Durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 595 nm kommt es zu einer Photodynamischen Reaktion und der Bildung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoffspezies [209-211].



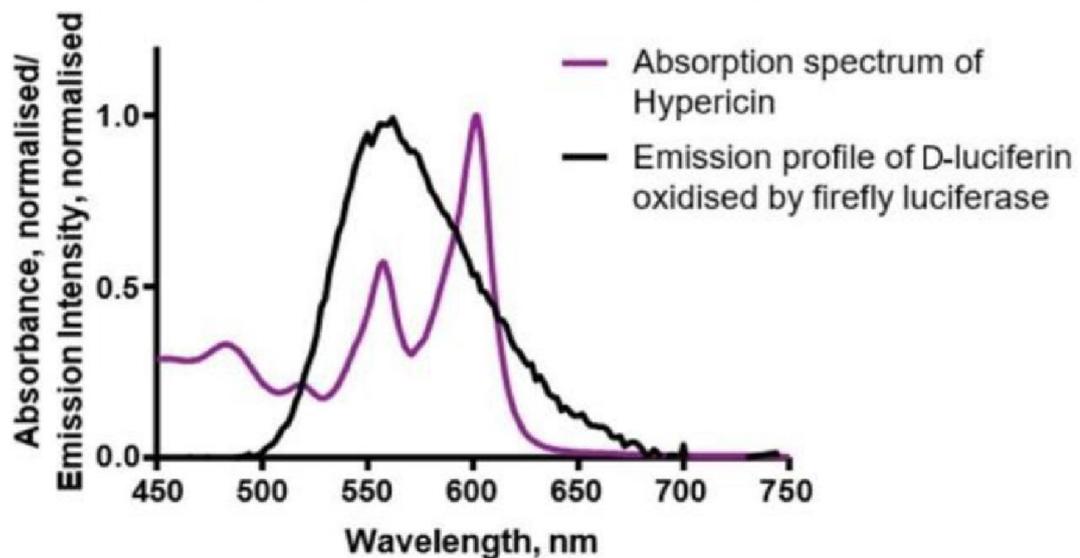
**Abbildung 5.2:** Strukturformel von Hypericin

In den letzten Jahren wurden viele Arbeiten rund um den therapeutischen Einsatz von Hypericin in der PDT veröffentlicht. Vor allem die Behandlung von onkologischen Erkrankungen stand hierbei im Vordergrund. Aber auch die Toxizität gegenüber bestimmten Viren, insbesondere der umhüllten Viren, zu denen das Humane Immunschwächevirus (HIV) gehört, wurde nachgewiesen [212-214]. Da Hypericin generell eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit besitzt, bietet sich zur besseren Aufnahme und Anreicherung im Gewebe die liposomale Verkapselung an. Durch diesen Verpackungsschritt kann die Effizienz der PDT deutlich erhöht werden [215,216].

Damit der Photosensitizer durch Biolumineszenz aktiviert werden kann, ist eine möglichst große Übereinstimmung deren Absorptions- und Emissionsspektrum erforderlich. Die Verwendung von Firefly-Luciferase mit Hypericin wurde in der Vergangenheit bereits als

effiziente Paarung beschrieben [217,218]. Wie in **Abbildung 5.3** zu erkennen ist, liegt die maximale Biolumineszenz der Glühwürmchen-Luciferase in dem Bereich um 560 nm. Auch Hypericin besitzt bei dieser Wellenlänge einen sekundären Absorptionspeak.

**Absorption Spectrum of Hypericin and Emission Profile of D-Luciferin Oxidised by Firefly Luciferase**



**Abbildung 5.3** [217]: Absorptionsspektrum von Hypericin über dem Emissionsspektrum von D-Luciferin.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Herstellung der Liposomen

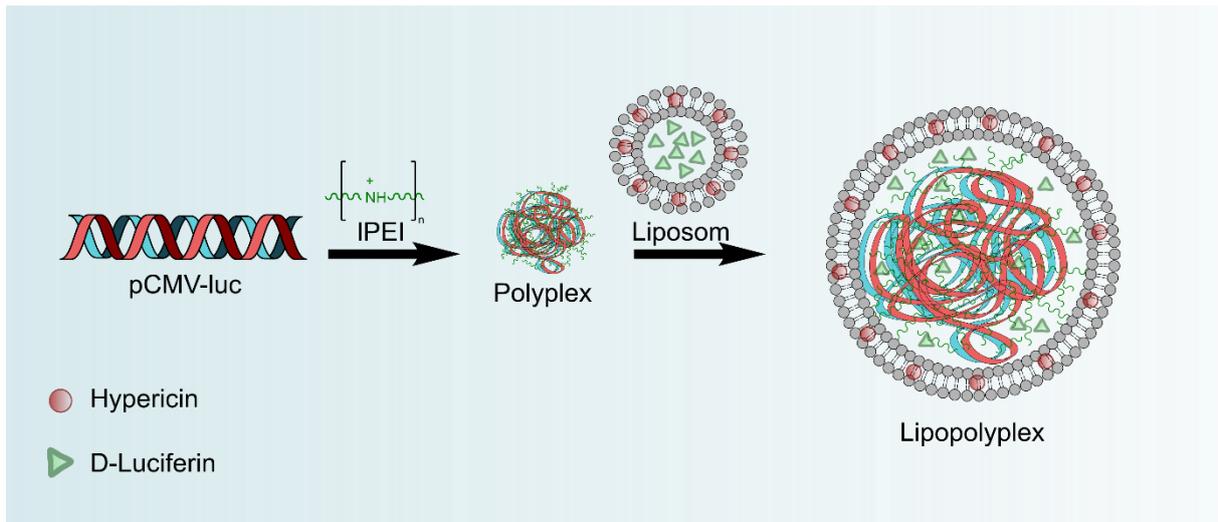
Die Herstellung der Liposomen erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Als Lipide wurden DPPC, DOPE und Cholesterol in einem Stoffmengenverhältnis von 70 / 15 / 15 (mol / mol / mol) verwendet.

Für die Herstellung der Hypericin-Liposomen wurde vorab eine Hypericin-Stammlösung hergestellt. Hierfür wurden Hypericin zu 1 mg / ml in Methanol gelöst und bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Bei der Vereinigung der Lipid-Stammlösungen haben wir die entsprechende Menge der Hypericin-Stammlösung beigefügt, bevor das Lösungsmittel abrotiert wurde.

Die Herstellung der D-Luciferin-Liposomen erfolgte unter Verwendung einer 10 mM Luciferin-Stammlösung (vgl. Luciferin-Mix 10mM aus **Tabelle 3.4**). Diese wurde entsprechend der angestrebten Konzentration mit Hepes-Puffer verdünnt und zum Rehydrieren des Lipidfilms verwendet. Die ausgeführten Arbeitsschritte und anschließende Lagerung erfolgten unter Lichtausschluss.

### 5.2.2 Herstellung der Polyplexe & Lipopolyplexe

Die Herstellung der Polyplexe und Lipopolyplexe erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Für die Herstellung der Polyplexe haben wir pCMV-luc als Plasmid verwendet. Für die Herstellung der Lipopolyplexe wurden die gebildeten Polyplexe mit den Liposomen aus Kapitel 5.2.1 komplexiert. Zur besseren Interpretation der Rolle der einzelnen Komponenten haben wir die nachfolgenden Versuche unter Verwendung mehrere eigenständiger Darreichungsformen durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Herstellung des angestrebten Endprodukts gibt **Abbildung 5.4**.



**Abbildung 5.4:** Schematische Darstellung der Herstellung von Lipopolyplexen. Als Ziel dieser Arbeit soll ein System entstehen, dass sowohl alle Edukte der BL-Reaktion, als auch das entsprechende Gen, sowie den PS in die Zielzelle transportieren kann.

### 5.2.3 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Die Vermessung und Vorbereitung der Proben erfolgten wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

### 5.2.4 Laser-Doppler-Anemometrie

Die Vermessung und Vorbereitung der Proben erfolgten wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

### 5.2.5 Pulmonale Applikation der Lipopolyplexe

Generell ermöglicht die pulmonale Applikation von Gentherapeutika eine lokale und selektive Therapie von schwerwiegenden Erkrankungen wie Mukoviszidose, COPD, Asthma oder Lungenkarzinomen [219,220]. Neben der hohen Compliance, die diese nicht-invasive Applikationsform mit sich bringt und die vor allem bei wiederholter Arzneimittelgabe ein wichtiger Faktor für den Erfolg der Therapie ist, können klassische Neben- und Wechselwirkungen die eine intravenöse Applikation mit sich bringt, wie beispielsweise durch die Bindung an Plasmaproteine hervorgerufen, weitgehend vermieden werden [221].

Für die pulmonale Applikation wurden bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Inhalatoren entwickelt, die im Handel erhältlich sind. Mit Hilfe dieser Inhalatoren können in einer Trägerflüssigkeit befindliche Arzneimittel durch Druckluft oder Ultraschall zu kleinen Aerosoltröpfchen vernebelt werden. Für diese Aerosole wird klassischerweise ein Durchmesser

von 0,5 – 5,0  $\mu\text{m}$  angestrebt, damit sie mit der Atemluft zu den Alveolen gelangen und dort aufgenommen werden können. Aufgrund einer möglichen Beeinflussung der Größe unserer Lipopolyplexe infolge des Vernebelungsprozesses sollte spezifisch darauf geachtet werden, ob und in welchem Umfang solche Effekte bei dem verwendeten Inhalator auftreten [222].

Wir haben uns für die Verwendung des Aerogen® Solo Verneblers (Aerogen GmbH) entschieden. Vorangegangene Arbeiten beschreiben derartige Vernebler als besonders effizient hinsichtlich der Ausbeute des eingesetzten Arzneimittels, sowie der erzielten Deposition in der Lunge [223,224]. Verantwortlich hierfür ist vor allem die Gleichförmigkeit der entstehenden Aerosoltröpfchen, die durch eine vibrierende Membran vom Gerät erzeugt werden [225]. Gerade für Gentherapeutische Arzneimittel haben diese Faktoren aufgrund der hohen Therapiekosten einen ausgeprägten Stellenwert.



**Abbildung 5.5:** Foto des verwendeten Aerogen® Solo Inhalators. Rechts in Verbindung mit einer modifizierten Combitips® advanced 50 ml-Pipettenspitze zur gerichteten Verneblung der Proben.

Um die vernebelten Aerosoltröpfchen zur Charakterisierung wieder aufzufangen oder sie für zukünftige Versuche direkt auf Zellen leiten zu können, haben wir eine 50 ml Combitips® advanced Pipettenspitze (Eppendorf) so modifiziert, dass das ausgestoßene Aerosol gerichtet aufgefangen werden kann. Die hintere Öffnung der Pipettenspitze, die normalerweise von einem Deckel mit Adapter zum Aufstecken auf die Pipette verschlossen wird, kann passgenau auf eine 6-Well Zellkulturplatte aufgesetzt werden und verschließt diese bündig. Zur

Veranschaulichung ist in **Abbildung 5.5** der verwendete Aerogen® Solo alleine, sowie in Kombination mit der modifizierten Pipettenspitze, abgebildet.

Um die Resilienz unserer Lipopolyplexe gegenüber der mechanischen Krafteinwirkung während des Verneblungsprozesses zu überprüfen, haben wir 150 µl unserer Probe mit HEPES-Puffer 10 mM auf 300 µl verdünnt und in das Reservoir des Aerogen® Solos überführt. Durch die Erhöhung des eingesetzten Volumens wird die Membran des Verneblers besser benetzt, was sich positiv auf die Aerosolbildung auswirkt. Anschließend haben wir den Vernebler in den modifizierten Pipettenaufsatz eingesetzt und über der Öffnung einer 6-Well Zellkulturplatte platziert. Die Netzeinheit wurde angeschlossen und der Verneblungsprozess gestartet. Nach 60 s war das Arzneimittel-Reservoir aufgebraucht und wurde erneut mit 200 µl HEPES-Puffer zum Nachspülen befüllt. Nach weiteren 60 s wurde das Gerät abgeschaltet und dem Aerosol eine Ruhezeit von 120 s zur Abscheidung gewährt. Die aufgefangene Probe wurde wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben vermessen und ausgewertet.

## 5.2.6 Zellkultivierung

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche in der Zellkultur haben wir humane Zervixkarzinomzellen verwendet, die Luciferase exprimieren (HeLa-LG). Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, kultiviert. 24 h vor dem jeweiligen Experiment wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well Platten ausgesät.

## 5.2.7 Bestimmung der Lichtemission

Wie in Kapitel 4.2.9 ausführlich beschrieben, wird bei der Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin Licht mit einem Emissionsmaximum um 560 nm emittiert. Wie in **Abbildung 5.3** dargestellt ist, besitzt Hypericin bei dieser Wellenlänge ein komplementäres, sekundäres Absorptionsmaximum. Durch dieses Experiment wollen wir den wechselseitigen Bezug von unterschiedlichen Konzentrationen von Hypericin und D-Luciferin auf die Quantität der freigesetzten Lichtstrahlen an einer Luciferase exprimierenden Zelllinie untersuchen.

Für den Versuch haben wir HeLa-LG Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well-Platten mit 200 µl Nährmedium ausgesät und für 24 h zu einer Zellkonfluenz von 70 – 80 % anwachsen lassen. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 200 µl der entsprechenden Probe oder Referenz je Well aufgefüllt. Als Proben haben wir

Verdünnungen von Hypericin und D-Luciferin in HEPES-Puffer oder deren entsprechende liposomale Zubereitungen nach Kapitel 5.2.1 verwendet. Als Negativkontrolle wurden 200 µl serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Die Probezugabe erfolgte immer in 4-facher Ausführung. Anschließend wurden diese zurück in den Inkubator gestellt.

Nach einem Zeitintervall von 0 h / 3,5 h / 4,5 h / 5,5 h und 24 h haben wir die jeweilige Emission bei einer Wellenlänge von 560 nm mit dem FLUOstar Optima Plattenlesegerät vermessen. Die Auswertung erfolgte als relative Lumineszenzeinheiten (RLU). Zur Überprüfung von statistisch signifikanten Unterschieden wurde ein zweiseitiger Students t-Test durchgeführt, wobei ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurde. Weiterhin wurde in [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$  unterschieden.

### **5.2.8 MTT-Assay**

Mit dem MTT-Assay haben wir ermittelt, ob die von der Luciferase-Reaktion emittierten Lichtstrahlen ausreichen, um eine adäquate phototoxische Reaktion, induziert durch die Anregung von Hypericin, zu verursachen. Hierzu haben wir den Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von Hypericin und D-Luciferin auf die Zellüberlebensrate an einer Luciferase exprimierenden Zelllinie untersucht.

Für den Versuch wurden HeLa-LG Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well-Platten ausgesät und mit 200 µl Nährmedium bedeckt. Nach einer Wachstumsphase von 24 h im Inkubator haben wir die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und 200 µl der entsprechenden Probe oder Referenz je Well ergänzt. Als Probe wurden Verdünnungen von Hypericin und D-Luciferin in HEPES-Puffer oder deren entsprechende liposomale Zubereitungen nach Kapitel 5.2.1 verwendet. Nach der Probenzugabe wurden die Zellen für 24 h in den Inkubator gestellt. Die weitere Durchführung sowie Auswertung des Versuchs erfolgten in gleicher Weise wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem zweiseitigen Students t-Test. Ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Weiterführend haben wir in [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$  unterschieden.

## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

### 5.3.1 Physikochemische Charakterisierung

In dem nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung der verwendeten Liposomen und Lipopolyplexe ausgewertet und diskutiert. Dabei wurden sowohl die Größe als auch das Zetapotenzial als maßgebliche Faktoren für eine effiziente zelluläre Aufnahme und als wichtige Charakterisierungsmerkmale für die Beschreibung nanoskaliger Transportsysteme ausgewertet [226,227].

**Tabelle 5.1**

Messergebnisse der Photonenkorrelationsspektroskopie und Laser-Doppler-Anemometrie

Formulierung	Größe $\pm$ S.D. [d.nm]	PDI $\pm$ S.D.	Zetapotenzial $\pm$ S.D. [mV]
Liposomen (DOPE:DPPC:Cholesterol)	164.3 $\pm$ 4.1	0.196 $\pm$ 0.031	-20.73 $\pm$ 0.31
Liposomen (Hypericin) (DOPE:DPPC:Cholesterol)	152.0 $\pm$ 2.6	0.170 $\pm$ 0.030	-23.57 $\pm$ 0.32
Liposomen (D-Luciferin) (DOPE:DPPC:Cholesterol)	154.4 $\pm$ 0.7	0.156 $\pm$ 0.004	-17.47 $\pm$ 4.40
Lipopolyplexe (pCMV-luc) Vor Verneblung	166.0 $\pm$ 2.4	0.424 $\pm$ 0.008	-43.20 $\pm$ 0.70
Lipopolyplexe (pCMV-luc) Nach Verneblung	113.5 $\pm$ 2.3	0.242 $\pm$ 0.018	-25.10 $\pm$ 0.92

Alle Messgrößen werden als Z-Average dargestellt, welcher aus der Partikelgrößenverteilung der Intensität abgeleitet ist. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 3 Messvorgängen dargestellt

In **Tabelle 5.1** sind die Messergebnisse der verwendeten Liposomen und Lipopolyplexe mit der Photonenkorrelationsspektroskopie dargestellt. Alle Größen liegen in einem Bereich von 110 – 170 nm und sind damit geeignet für den gentherapeutischen Einsatz. Für ähnliche Trägersysteme in diesem Größenbereich wurde bereits in der Vergangenheit eine effektive Zellaufnahme nachgewiesen [83,228-230]. Das Zetapotenzial der Liposomen ist durch Verwendung der negativen Lipide als Bestandteil negativ [68], dass der Polyplexe aufgrund der Verwendung kationischer Polymere positiv [79]. Nach der Umhüllung der Polyplexe mit der liposomalen Doppelmembran wird die Oberflächenladung der Lipopolyplexe von den

negativen Lipiden dominiert, weshalb auch hier erwartungsgemäß ein negatives Zetapotenzial gemessen wurde [99]. Sowohl Größe als auch Zetapotenzial der Liposomen wurden durch die Beladung mit Hypericin oder Luciferin nicht wesentlich verändert, weshalb auch hier mit einer effizienten Aufnahme in die Zelle gerechnet werden kann. Zusammengefasst kann durch die vorliegenden Ergebnisse auf funktionelle und intakte Liposomen sowie eine erfolgreiche Komplexbildung im Falle der Lipopolyplexe geschlossen werden.

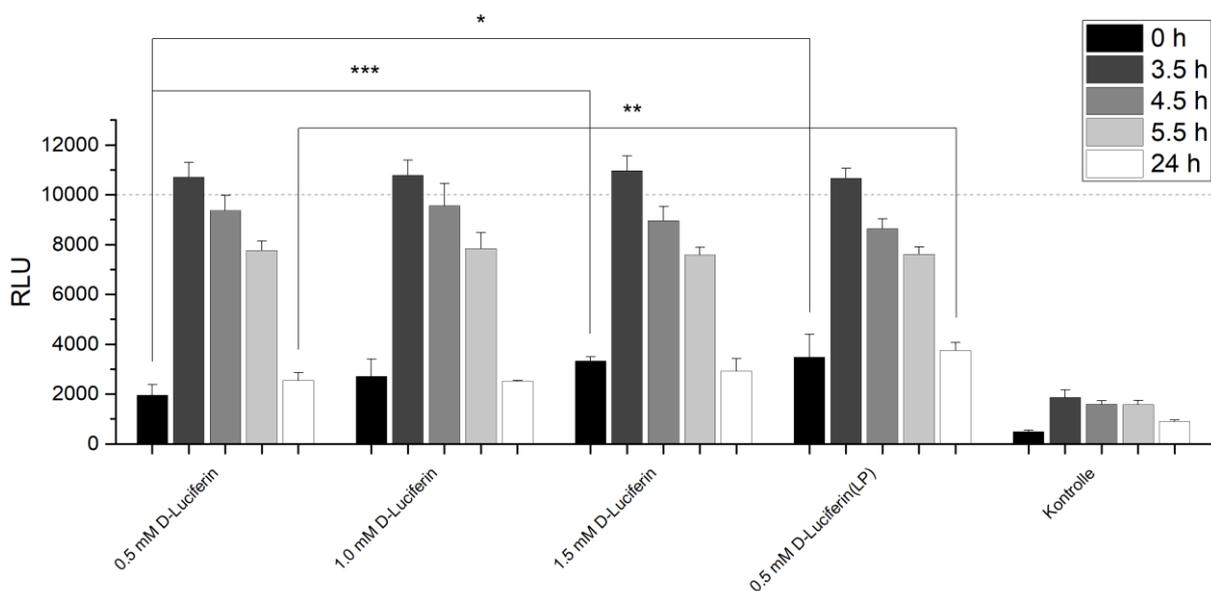
Die Abweichungen bei der Bestimmung von Durchmesser und Zetapotenzial vor und nach der Vernebelung mit dem Aerogen® Solo deuten auf eine Umstrukturierung der liposomalen Umhüllung der Lipopolyplexe durch die Krafteinwirkung während des Verneblungsprozesses hin. Infolge der hochfrequenten Vibrationen der Palladium-Membran, die ursächlich für den effektiven Verneblungsprozess des Aerogen® Solo ist, lagert sich die Lipidhülle enger um die Polyplexe an. Dass die Größe von Liposomen durch die Krafteinwirkung im Ultraschallbad verringert werden kann, ist bereits umfänglich bekannt [231,232] und kann in Analogie hierzu bei dem Verneblungsprozess ebenfalls beobachtet werden. Eine Abtrennung von größeren Komplexen durch die Aerogen®-Membran kann aufgrund der Porengröße ausgeschlossen werden. Infolge des verringerten Durchmessers steigt auch das Zetapotenzial, da sich die vorhandenen Lipide besser verteilen können. Die Integrität der Lipopolyplexe wird letztendlich durch den Verneblungsprozess aber nicht beeinträchtigt. Durch den verringerten PDI können wir auf eine Homogenisierung hinsichtlich der Größe schließen, wodurch gleichzeitig eine Zerspaltung durch die mechanische Krafteinwirkung ausgeschlossen werden kann. Als Applikationsform ist die Vernebelung mit dem Aerogen® Solo voraussichtlich für unsere Lipopolyplexe geeignet.

## **5.3.2 Zellkultur**

### **5.3.2.1 Bestimmung der Lichtemission**

Der Schlüsselfaktor für den Erfolg der Biolumineszenz induzierten PDT ist die effiziente Aktivierung des Photosensitizers. Um festzustellen welche Lichtmenge durch die Luciferase-Reaktion emittiert wird, inwieweit wir diese Menge beeinflussen können und ob bei Anwesenheit von Hypericin eine Verringerung dieser Menge durch Absorption zu beobachtet ist, haben wir mit nachfolgendem Experiment untersucht.

Da extern zugeführtes D-Luciferin als limitierender Faktor bei der Luciferasereaktion gilt, welches sowohl die Zytoplasmamembran als auch die Membran des Peroxisoms überwinden muss bevor es von der zellulär gebildeten Luciferase umgesetzt werden kann [233], haben wir eingangs den Einfluss der zugeführten Menge an D-Luciferin auf die Intensität der emittierten Strahlung bestimmt. Hierfür wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,5 mM / 1,0 mM / 1,5 mM) des Reaktionsedukts, sowie liposomales D-Luciferin (0,5 mM / 1,0 mM) hinsichtlich der detektierten RLU in unterschiedlichen zeitlichen Abständen zu der Zugabe auf die Zellen, verglichen.

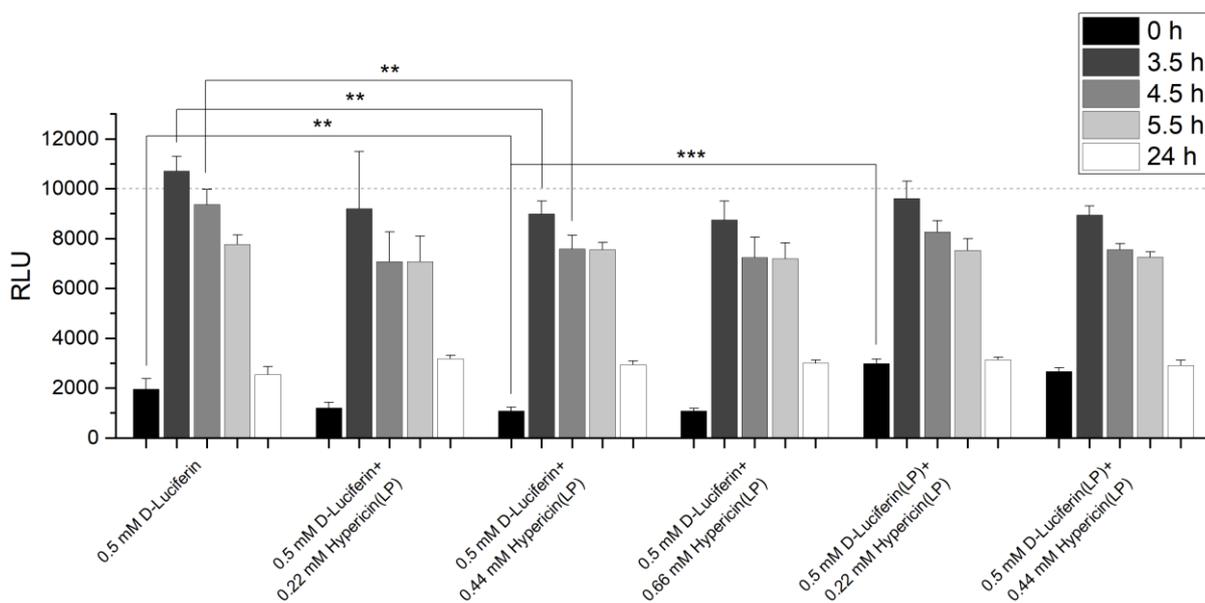


**Abbildung 5.6:** Auswertung der Quantifizierung des emittierten Lichts mit einer Wellenlänge von 560 nm, dargestellt als RLU (relative Lichteinheiten) nach Zugabe unterschiedlicher Zubereitungen von D-Luciferin. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium verwendet. Die Messung der Emission erfolgte im Abstand von 0 h / 3,5 h / 4,5 h / 5,5 h und 24 h nach der Probezugabe. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

Die Auswertung des Versuchs in **Abbildung 5.6** zeigt, dass für die drei unterschiedlichen Konzentrationen an D-Luciferin, mit Ausnahme der ersten Messung für die Konzentration 1,5 mM, keine erkennbaren Veränderungen der freigesetzten Lichteinheiten zu beobachten sind. Eine Konzentration von 0,5 mM D-Luciferin kann daher als ausreichend betrachtet werden, da für die erfolgreiche Aktivierung von Hypericin die Gesamtmenge an Licht entscheidend ist [234]. Durch eine Konzentrationssteigerung kann weder die maximale Menge der RLU nach 3,5 h, noch eine Verlängerung der Emission erreicht werden. Auch durch die liposomale Verpackung von D-Luciferin kann das RLU-Maximum nicht erhöht werden. Jedoch

ist direkt nach der Probezugabe zum Zeitpunkt 0 h eine etwas erhöhte Lichtemission zu beobachten. Wir gehen von einer anfänglich schnelleren Überwindung der peroxisomalen Membran aus. Auf eine effizientere Aktivierung des Photosensetizers durch die liposomale Zubereitung deuten die marginalen Veränderungen jedoch nicht hin.

Im nächsten Schritt haben wir zusätzlich zu D-Luciferin noch unterschiedliche Mengen an liposomalem Hypericin auf die Zellen gegeben. Die Vermessung erfolgte nach den gleichen Zeitintervallen wie zuvor, die Auswertung ist in **Abbildung 5.7** dargestellt.



**Abbildung 5.7:** Auswertung der Quantifizierung des emittierten Lichts mit einer Wellenlänge von 560 nm, dargestellt als RLU (relative Lichteinheiten) nach Zugabe unterschiedlicher Zubereitungen von D-Luciferin und Hypericin. Die Messung der Emission erfolgte im Abstand von 0 h / 3,5 h / 4,5 h / 5,5 h und 24 h nach der Probezugabe. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

Durch die Zugabe von Hypericin ist im Vergleich zu der Probe ohne Hypericin eine signifikante Abnahme der detektierten Lichteinheiten bei den ersten drei Messintervallen zu beobachten. Dieser Unterschied ist durch die Absorption der entsprechenden Differenz zur Probe ohne Hypericin zu erklären. Da die Strahlung ungerichtet ist und nur der Teil absorbiert wird, der auf die Hypericin-Moleküle trifft, konnte grundsätzlich nur mit einer marginalen Minderung der Strahlungsintensität gerechnet werden. Infolge einer Erhöhung der Hypericinkonzentration, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einhergeht, dass ein emittierter Lichtstrahl auf ein Hypericin-Molekül trifft, haben wir daher mit einer weiteren Verringerung der detektierten

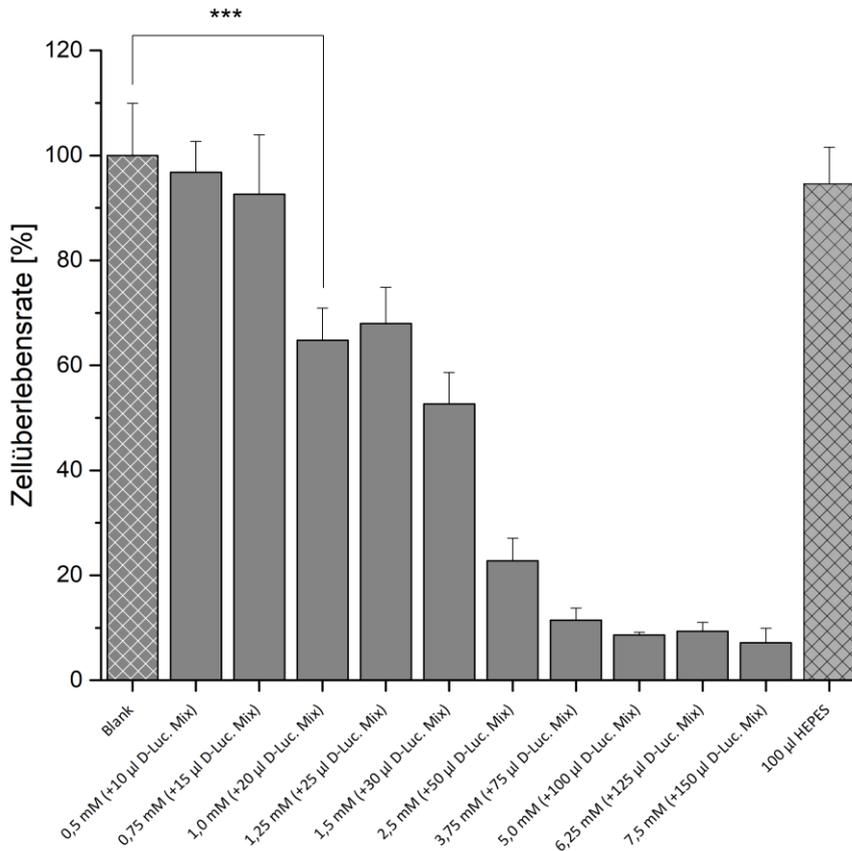
RLU oder einer Verlängerung der Absorption gerechnet. Diese Reduktion können wir in **Abbildung 5.7** nicht beobachten, weshalb wir von schnellen Verteilungsvorgängen im Zytosol ausgehen, durch die die eingesetzte Konzentrationserhöhung an Hypericin zu marginal ist als dass sie ins Gewicht fällt.

Durch die Verwendung von liposomalem D-Luciferin können wir **Abbildung 5.7** trotz der Hypericin Gabe eine gesteigerte Lichtemission bei der ersten Messung (0 h) entnehmen. Auch bei den folgenden Messungen kann eine Erhöhung der RLU beobachtet werden, die sich ab der Messung 5,5 h wieder an die Messwerte des freien D-Luciferin angeglichen hat. Wir vermuten Verzögerungsvorgänge bei der Freisetzung aus der liposomalen Zubereitung, die zu dieser Verschiebung der Absorptionszeiträume führt. Bei den Hypericin-Liposomen ist eine solche Verzögerung parallel nicht zu beobachten, da direkt im Anschluss an die Probezugabe die RLU signifikant sinkt. Diese Beobachtung spricht seinerseits ebenfalls für eine Aktivierung des Hypericin infolge von Lichtabsorption, wodurch es zur Ruptur der Liposomen kommt und damit zur vollständigen Freisetzung des Hypericins. Dafür spricht auch die zeitlich auf die ersten drei Messungen beschränkte Absenkung der RLU-Detektion.

Zusammengefasst konnte in Anwesenheit von Hypericin eine Absorption des emittierten Lichts beobachtet werden, die sich aber nicht proportional zu der eingesetzten Hypericinkonzentration verhält, sondern von ihr weitgehend unberührt bleibt. Durch die liposomale Zubereitung von D-Luciferin konnte eine Veränderung hinsichtlich der Lichtabsorption beobachtet werden, ob diese jedoch zu einer effizienteren Aktivierung des Photosensitizers führt und ob die beobachtete Absorption auch eine signifikante zytotoxische Reaktion induziert, muss durch nachfolgende toxikologische Untersuchungen aufgeklärt werden.

### 5.3.2.2 Toxizität

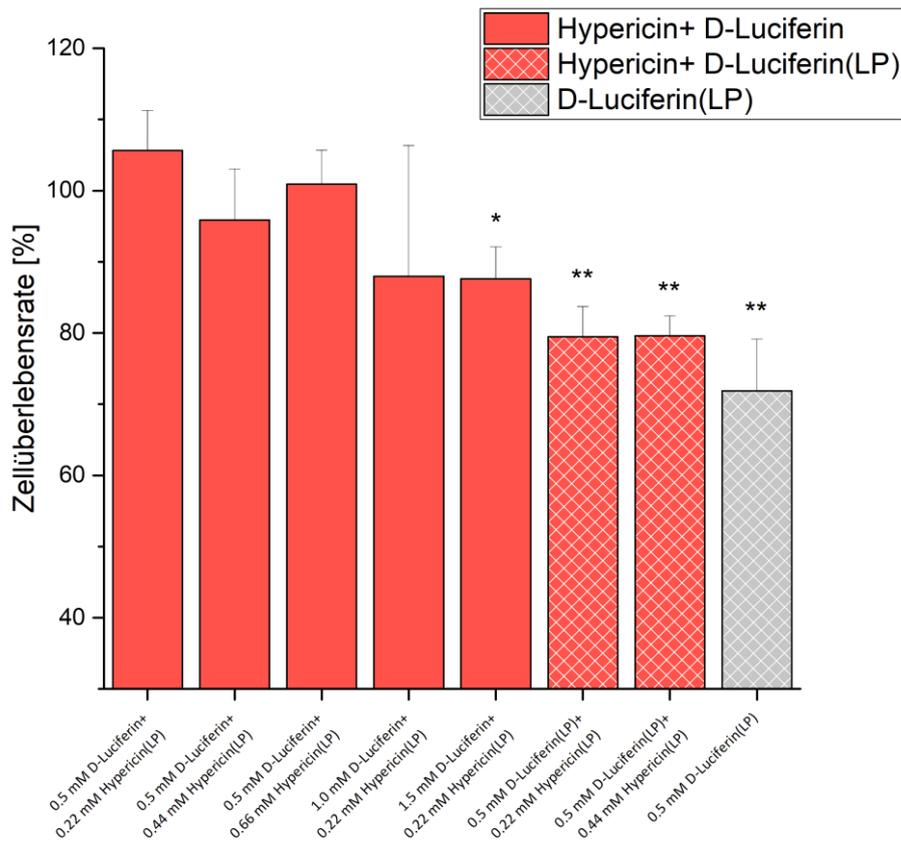
Um systemische Fehler durch die Überlagerung von toxischen Effekten, die durch das Reaktionsedukt selbst hervorgerufen werden können, zu vermeiden, haben wir eingangs die Toxizität von D-Luciferin an der von uns verwendeten Zelllinie untersucht. Die Auswertung in **Abbildung 5.8** zeigt für eine D-Luciferin-Konzentration ab 1,0 mM eine signifikante Erniedrigung der Zellüberlebensrate. Für weitere Versuche haben wir daher eine Konzentration von 0,5 mM verwendet.



**Abbildung 5.8:** Auswertung des MTT-Assays an SK-OV-3 Zellen zur Überprüfung der Toxizität von D-Luciferin. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

Um festzustellen, ob durch die in Kapitel 5.3.2.1 beobachtete Lichtabsorption von Hypericin auch zu der gewünschten zytotoxischen Reaktion führt, haben wir die Zellüberlebensrate mit einem MTT-Test bestimmt. Dafür haben wir in Analogie zu vorherigen Versuchen unterschiedliche Mengen an Hypericin und D-Luciferin (frei oder als liposomale Darreichung) zu den Zellen gegeben und die Auswirkung auf deren Viabilität untersucht.

Die Auswertung in **Abbildung 5.9** zeigt für die Verwendung von freiem D-Luciferin erst ab einer Konzentration von 1,5 mM eine signifikante Erniedrigung der Zellüberlebensrate. Unter Einbezug der Erkenntnisse aus **Abbildung 5.8** ist dieser Effekt aber nicht Folge der PDT, sondern der Toxizität von D-Luciferin zuzuschreiben. Für die Verwendung von liposomalem D-Luciferin konnte für alle Proben eine signifikante Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall zeigt der Vergleich mit der Probe ohne Hypericin aber, dass der toxische Effekt auch hier auf die D-Luciferin Darreichung zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.9:** Auswertung des MTT-Assays an HeLa-LG Zellen zur Überprüfung der phototoxischen Wirksamkeit von Hypericin. Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

In Anbetracht der Erkenntnisse aus den vorherigen Versuchen, dass eine Aufnahme des emittierten Lichts durch Hypericin erfolgt, ist das Ausbleiben der nachgeschalteten toxischen Reaktion auf eine nicht ausreichende Aktivierung von Hypericin durch die vorhandene Biolumineszenz zurückzuführen, also der Lichtschwellenwert des PS durch die Biolumineszenz nicht erreicht wird. Ableitend unterstreichen unsere Ergebnisse die Schlussfolgerungen vorangegangener Arbeiten, die übereinstimmend zu dem Schluss gekommen sind, dass die fLuc-Biolumineszenz nicht genügend Photonen generiert, um eine adäquate phototoxische Reaktion von Rose Bengal oder Hypericin zu induzieren [235,236].

In der Literatur werden Lichtemissionwerte von 2,8 – 2300 Photonen / s / Zelle für Luciferase exprimierende Zelllinien aufgeführt, wobei die bedeutende Mehrheit im unteren dreistelligen Bereich liegt. Für HeLa-luc Zellen wurde eine Biolumineszenz von 170 Photonen / s / Zelle

dokumentiert [235,237,238]. Nach Einsteins photoelektrischem Effekt ergibt sich folglich eine Energie von rund  $3,5 \cdot 10^{-19}$  J / Photon oder rund  $6 \cdot 10^{-17}$  J / Zelle.

Albert Einsteins photoelektrische Effekt:

$$E = \frac{h * c}{\lambda}$$

E = Energie

h = Plancksche Konstante ( $6,63 \cdot 10^{-34}$  J s)

c = Lichtgeschwindigkeit ( $3 \cdot 10^8$  m / s)

$\lambda$  = Wellenlänge (0,560  $\mu$ m)

Für unseren Versuch mit einer Zelldichte von rund  $6 \cdot 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  ergeben sich daraus  $3,6 \cdot 10^{-11}$  J /  $\text{cm}^2$ . Selbst wenn man von einem viel zu hohen Emissionsintervall von 24 h ausgeht, so ergeben sich lediglich  $3,1 \cdot 10^{-6}$  J /  $\text{cm}^2$ . Verglichen mit der typischerweise eingesetzten Energie von über 1 J /  $\text{cm}^2$ , wie sie bei der Verwendung von externen Bestrahlungsquellen zur Aktivierung der PDT Verwendung finden, ergibt sich eine enorme Differenz [239,240]. Das gerade einige neuere Publikationen in Widerspruch zu unseren Ergebnissen, die Biolumineszenz induzierte Aktivierung von Hypericin als effektive zytotoxische Therapie beschreiben [241,242], können wir nur auf die unzureichende Berücksichtigung der toxischen Effekte von D-Luciferin im jeweiligen Versuchsaufbau zurückführen.

## 5.4 Zusammenfassung

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung und Charakterisierung eines einzelnen Trägersystems zur Biolumineszenz induzierten PDT. Hierfür sollten Lipopolyplexe mit pCMV-luc beladen werden, um die adressierten Zellen durch Transfektion zur Biolumineszenz zu befähigen. Die dadurch emittierten Lichtstrahlen sollen den in der Hülle des Transportsystems eingebetteten Photosensitizer Hypericin aktivieren und folglich durch dessen toxische Reaktion zur Apoptose des adressierten Gewebes führen.

Die Bestimmung von Größe und Zetapotenzial der Lipopolyplexe als auch der als Vorstufe verwendeten Liposomen, die mit Hypericin oder Luciferin beladen wurden, lässt auf funktionelle und intakte Lipopolyplexe und Liposomen schließen. Der Vergleich von Lipopolyplexen vor und nach Verneblung mit einem Aerogen® Solo zeigt die Resilienz unseres Vektorsystems gegenüber der mechanischen Beanspruchung, die bei der Aerosolbildung auf diese einwirkt.

Durch die Untersuchung der wechselseitigen Beeinflussung von unterschiedlichen Mengen an Hypericin und D-Luciferin auf die Lichtemission einer Luciferase exprimierenden Ziellinie konnten wir Rückschlüsse auf die Aktivierung von Hypericin durch die Biolumineszenz der Ziellinie gewinnen. Bei dem Vergleich der emittierten Lichtstrahlen in Abwesenheit und Anwesenheit von unterschiedlichen Hypericin-Darreichungen konnten wir die Absorption einer Teilmenge des emittierten Lichts beobachten. Die Lichtabsorption wurde durch die Erhöhung der Hypericinkonzentration jedoch nicht beeinflusst.

Als Folge der Lichtabsorption durch Hypericin konnten wir jedoch keine toxischen Effekte auf die verwendete Ziellinie feststellen. Signifikante Unterschiede, die wir bei MTT-Versuchen beobachten konnten, waren lediglich auf die eingesetzte Menge an D-Luciferin zurückzuführen. Trotz nachgewiesener Absorption durch den Photosensitizer kommt es zu keinen messbaren toxischen Effekten. Das bei der Biolumineszenz-Reaktion freigesetzte Licht reicht folglich nicht aus, um eine effiziente Aktivierung des Photosensitizers Hypericin zu erreichen.

## 6 Projekt 3: MDR1-Silencing mit Lipopolyplexen

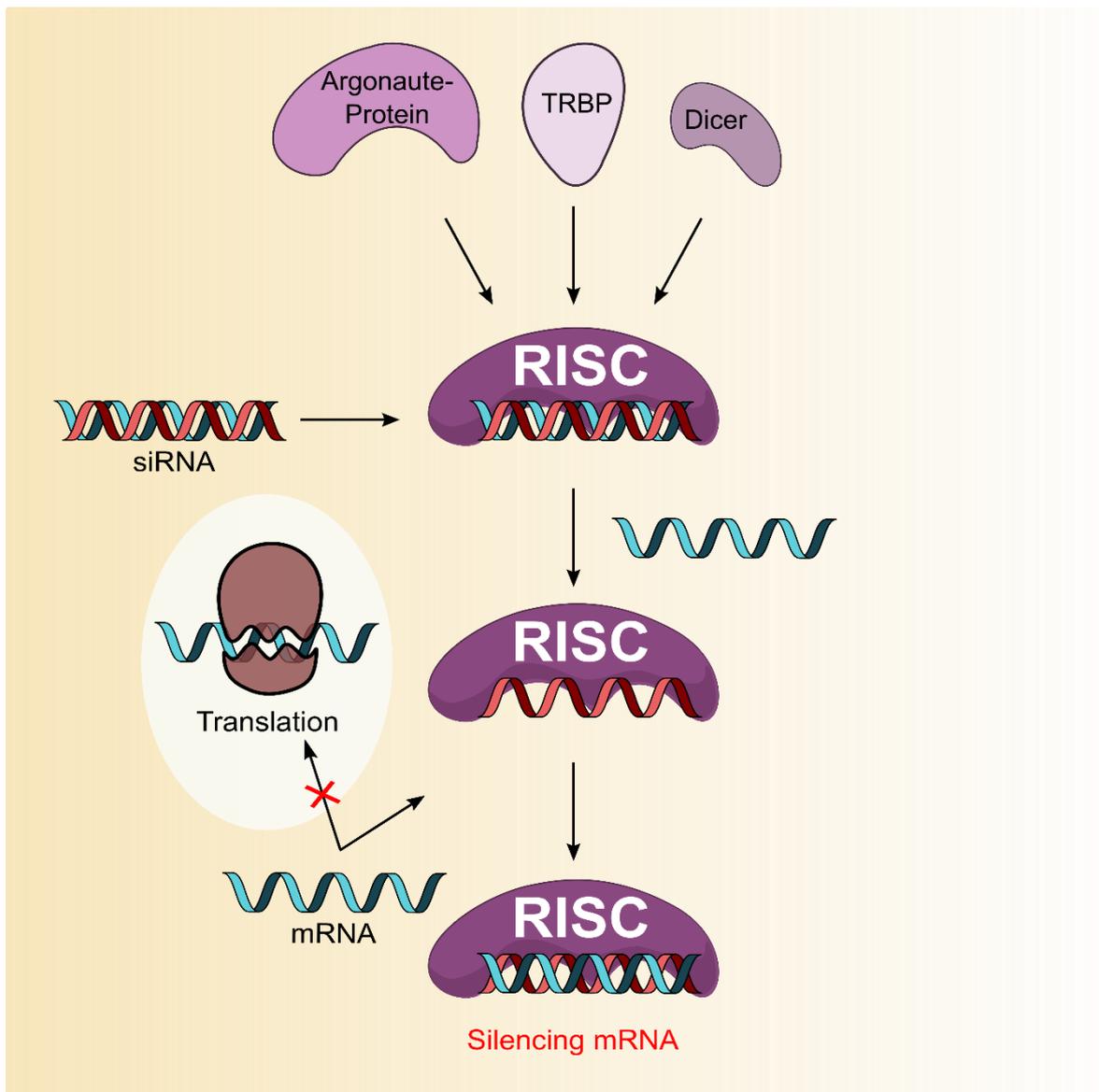
### 6.1 Einleitung

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Lipopolyplexen, die für den Knockdown von MDR1 eingesetzt werden sollen, um so resistente Tumorzellen wieder sensibler gegenüber gängigen Zytostatika zu machen.

#### 6.1.1 RNA-Interferenz

Ein relativ junges Themenfeld der Gentherapie beschäftigt sich mit dem gezielten Einsatz von zellregulatorischen Prozessen, die auf RNA-Interferenz (RNAi) beruhen. Hierbei sorgen kurze, einzel- oder doppelsträngige RNA Moleküle aus 20-25 Basenpaaren, so genannte “small interfering RNAs” (siRNA), durch selektive Blockade oder Spaltung von mRNA-Molekülen zum zielgerichteten „Knockdown“ spezifischer Gene. Das Wirkprinzip beruht auf der komplementären Paarung der siRNA mit der adressierten mRNA und verhindert folglich die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene [243,244].

Nachdem die siRNA über einen endogenen Mechanismus in die adressierten Zellen eingeschleust wurde, bildet sie mit Argonaute-Protein, Dicer und TRBP (transactivation response element RNA-binding protein) den RISC-Komplex (effector RNA-induced silencing complex) aus. Dieser wird durch Elimination des codogenen Strangs der siRNA aktiviert und kann mit Hilfe des gebundenen Antisense-Strangs die komplementäre mRNA binden. Die gebundene mRNA wird von der Dicer-Einheit des RISC-Komplexes gespalten, eine Translation kann folglich nicht mehr stattfinden [245-247]. Eine übersichtliche Darstellung soll **Abbildung 6.1** geben. Sobald der noch gebundene Teil der mRNA durch zelluläre Nukleasen abgebaut ist, kann der RISC-Komplex recycelt werden und erneut komplementäre mRNA binden. Durch diesen spezifischen Wirkmechanismus, bei dem die therapeutisch aktive siRNA individuell an die adressierte mRNA angepasst ist, sind RNAi basierte Arzneimittel in der Lage eine selektive und nebenwirkungsarme Therapie verschiedener Krankheiten zu ermöglichen. Besonders zur Vereitelung von Resistenzentwicklungen während einer onkologischen Therapie gibt es vielversprechende Ansätze [248].



**Abbildung 6.1:** Bildung des siRNA-induzierten Silencing-Komplexes (RISC) der doppelsträngigen siRNA mit Argonaute-Protein, Transactivation-Response-Binding-Protein (TRBP) und Dicer. Darauf folgt die Aktivierung des RISC durch asymmetrische Abwicklung des codogenen siRNA-Strangs. Durch den aktivierten RISC kommt es zur komplementären Bindung der adressierten mRNA, wodurch deren Translation verhindert wird.

Da bei der Applikation von „unverpackter“ siRNA sofort verschiedene Abwehrmechanismen in Gang gesetzt werden, ist eine entsprechende Verpackung durch nanoskalige Trägersysteme für einen therapeutischen Einsatz unerlässlich. Zum einen kommt es zu einer Reihe von Nebenwirkungen, die auf das immunogene Potenzial der siRNA zurückzuführen sind, zum anderen sorgen schlechte Stabilität, Abbau durch RNasen, schnelle renale Clearance, Schwierigkeiten beim Überwinden von Zellmembranen und schlechte endosomale Flucht für eine geringe Effektivität. In der Vergangenheit wurden bereits einige nanoskalige

Formulierungen entwickelt, mit deren Hilfe diese Hindernisse erfolgreich überwunden werden konnten [249,250].

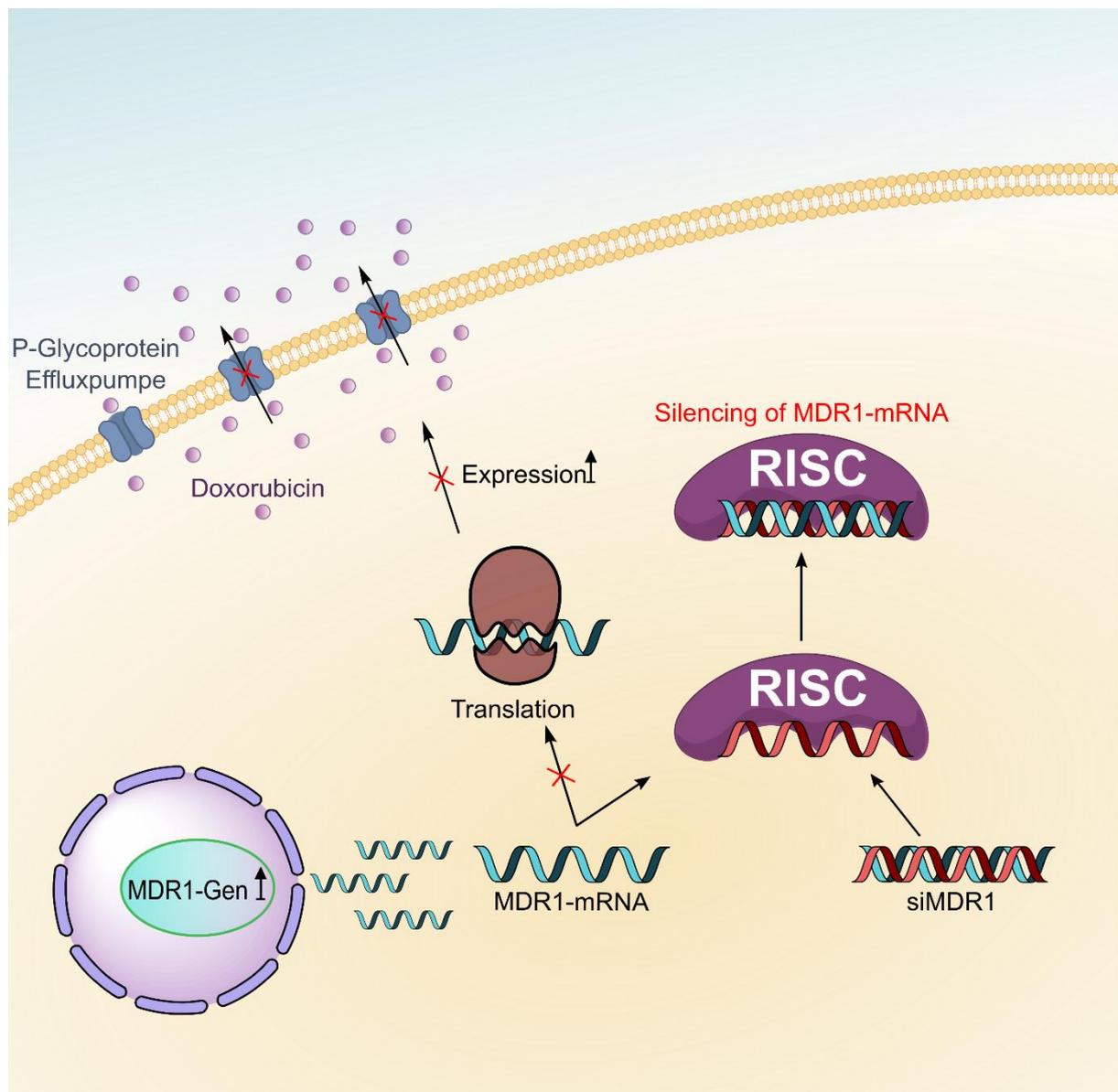
Kürzlich haben zwei Arzneimittel, die auf dem Wirkmechanismus der RNA-Interferenz beruhen, von der Food and Drug Administration (FDA) eine Zulassung erhalten. In beiden Fällen ist der Konzern Alnylam, 2018 für ein Medikament zur Behandlung von hereditärer ATTR-Amyloidose [251,252], und 2020 für ein Medikament zur Behandlung der akuten intermittierenden Porphyrie (AIP) der Zulassungsinhaber [253]. Darüber hinaus haben Alnylam und Vir Biotechnology kürzlich die Arbeit an einem RNAi basiertem Medikament für die Behandlung von SARS-CoV-2 bekannt gegeben [254]. Einige aussichtsreiche RNAi-Arzneimittel mehr befinden sich aktuell in der klinischen Erprobung. Aufgrund der derzeit intensiven Forschungsbemühungen wird in den nächsten Jahren mit einigen signifikanten Durchbrüchen und neuen Therapieoptionen aus diesem Gebiet gerechnet. Im Fokus stehen neben den genannten Krankheiten vor allem AIDS, Krebs, Lebererkrankungen und genetische Defekte [255].

### **6.1.2 MDR1-Knockdown**

Die Herunterregelung bzw. das Ausschalten des Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1) - Gens hat sich in den letzten Jahren zu einem vielversprechenden therapeutischen Konzept entwickelt. Gerade für die Tumorthherapie spielt die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen gegen unterschiedliche Chemotherapeutika eine tragende Rolle. Ein weit verbreiteter und effektiver Resistenzmechanismus der Tumorzellen wird durch die Überexpression von P-Glykoprotein (P-GP) erreicht. [256].

„Multi drug resistance“ ist ein Phänomen, bei dem es zur Ausbildung einer Kreuzresistenz gegen eine ganze Reihe von Arzneimitteln ungeachtet deren Strukturen und Wirkmechanismen kommt [257]. Diese unspezifische Resistenzentwicklung wird durch den gesteigerten Einbau von P-GP in die Zellmembran der Tumorzellen vermittelt. P-Glykoprotein ist eine unspezifische Effluxpumpe, die unter ATP-Verbrauch Substrate über die Zellmembran aus der Zelle transportiert. Aufgrund dessen Überexpression können Zytostatika aus der Tumorzelle verbracht werden, wodurch die onkologische Wirksamkeit stark abnimmt bis hin zur kompletten Resistenz [258,259]. Wie in **Abbildung 6.2** am Beispiel des Zytostatikums Doxorubicin dargestellt ist, wird die Überexpression von P-GP durch die Hochregulierung des MDR1-Gens gesteuert. Um die Sensitivität gegen die Chemotherapie wieder zurückzuerlangen

und die therapeutisch notwendige Dosis so weit wie möglich zu reduzieren, wird daher versucht, sequenzspezifisch die Expression von MDR1-mRNA zu senken. [260,261].



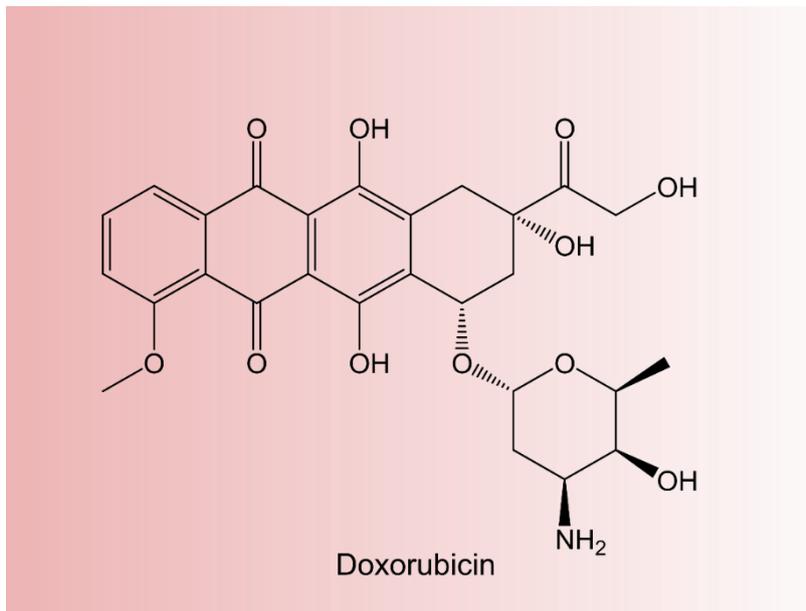
**Abbildung 6.2:** Mechanismus der Hemmung von MDR1 durch RNA-Interferenz am Beispiel von Doxorubicin. Durch die Bindung der MDR1-mRNA durch den RISC wird die Translation zu P-Glykoprotein verhindert, wodurch der aktive Transport von Doxorubicin aus der Zelle reduziert wird und die Konzentration an intrazellulärem Doxorubicin wieder ansteigt.

Die erhöhte Expression von P-Glykoprotein sorgt aber nicht nur für den gesteigerten Efflux von Zytostatika. Auch eine proliferationsfördernde Beteiligung bei der Metastasierung, sowie protektive Effekte gegenüber Caspase vermittelter Apoptose, konnten bei Tumorzellen beobachtet werden [262,263]. Nachdem man in den letzten Jahren eine erhöhte Expression von MDR1 bei verschiedenen Tumorarten nachweisen konnte, die symptomatisch von einer

verringerten Zytotoxizität von diversen Zytostatika begleitet wurde [264-266], ist die gesamtheitliche Bedeutung des MDR1-Überexpression noch weitgehend unbekannt. Auch die Auswirkungen des MDR1-Knockdowns mit dem Ergebnis, dass erworbene Resistenzen reduziert und die behandelten Tumorzellen ihre Sensitivität gegenüber Zytostatika wieder zurückerwerben konnten, wurde bereits durch mehrere Studien belegt [267-270].

### 6.1.3 Doxorubicin

Doxorubicin (DOX) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline. Diese, aus *Streptomyces*-Arten isolierten Antibiotika, werden zur Therapie verschiedener Krebsarten eingesetzt. Doxorubicin spielt insbesondere bei der Behandlung von Mammakarzinomen eine wesentliche Rolle [271,272]. Auch in der onkologischen Forschung zählt Doxorubicin zu den am meisten verwendeten Chemotherapeutika. Die gute Datenlage und seine physikalisch-chemischen Eigenschaften machen es gerade für Arbeiten, die sich mit der liposomalen Applikation befassen, geeignet [273].



**Abbildung 6.3:** Strukturformel von Doxorubicin mit dem klassetypischen Anthrachinon-Grundgerüst.

Vor allem durch liposomale Formulierungen konnte eine Reduzierung von toxischen Nebenwirkungen und eine verbesserte antitumorale Aktivität erreicht werden. Das erste liposomal verkapselte Zytostatikum, das die klinische Zulassung erhielt, war Doxorubicin HCl

[274]. Stand heute gibt es mehrere Formulierungen, die es bis zur Marktreife geschafft haben [275,276].

Leider spielt die zunehmende Resistenzentwicklung, die bevorzugt auf die Überexpression des Effluxtransporters P-GP zurückzuführen ist, eine immer größere Rolle und limitiert den Einsatz von DOX in der klinischen Praxis. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, wird verstärkt der Ansatz, therapiebegleitend die Expression von P-GP zu reduzieren verfolgt, um die Sensitivität gegenüber der DOX wieder zurückzuerlangen [277]. Die Dosis ist aufgrund der geringen therapeutischen Breiten von DOX ein begrenzender Faktor, da ansonsten verschiedene Organe des Körpers, vorzugsweise das Herz, irreparabel geschädigt werden können. Die Kardiotoxizität ist eine charakteristische Nebenwirkung von Doxorubicin [278].

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Herstellung der Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolge, wie in Kapitel 3.2.1 aus DPPC, DOPE und Cholesterol in einem Stoffmengenverhältnis von 70 / 15 / 15.

### 6.2.2 Herstellung der Polyplexe & Lipopolyplexe

Die Herstellung der Polyplexe und Lipopolyplexe erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Für die Herstellung der Polyplexe haben wir pCMV-GFP, eine komplementäre siRNA zu MDR1-mRNA (si-MDR1) oder eine unspezifische nicht kodierende siRNA als Kontrolle verwendet. Bei Verwendung der siRNA wurden alle Verdünnungen mit RNase freiem Wasser durchgeführt.

### 6.2.3 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, vorbereitet und vermessen.

### 6.2.4 Laser-Doppler-Anemometrie

Die Proben wurden wie in Kapitel 3.2.4 vorbereitet und vermessen.

## **6.2.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Die Proben wurden wie in Kapitel 3.2.5 vorbereitet und vermessen.

## **6.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Um die vollständige Bindung von unserem Trägersystem mit der verwendeten siRNA zu überprüfen, haben wir eventuell vorhandene freie RNA elektrophoretisch nach der Ausbildung der Lipopolyplexe abgetrennt.

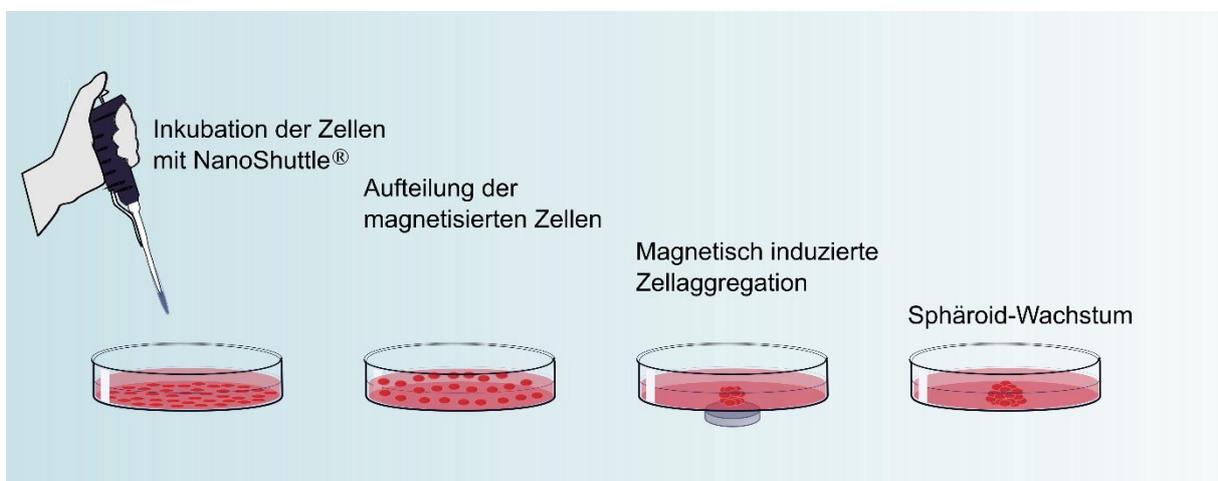
Für die Herstellung der Matrix haben wir Agarose in einer Konzentration von 1 % mit Ethidiumbromid (0,1 µg / ml) verwendet. Die Agarose wurde dafür in FSME-Puffer (pH 8,3) suspendiert und anschließend kurz in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Agaroselösung auf 65° C abgekühlt war, haben wir die entsprechende Menge Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung gut durchmischt. Anschließend wurde die Lösung in den Gelträger mit enthaltenem Probekamm ausgegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min war das Gel ausgehärtet und der Kamm wurde entfernt. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und bis zur vollständigen Bedeckung mit FSME-Puffer übergossen.

Die Polyplexe und Lipopolyplexe wurden, wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben, hergestellt. Für die Polyplexe wurde siMDR1-RNA verwendet. Bevor die Proben in die Ladetaschen pipettiert wurden, wurden sie mit 1 µl Ladepuffer vermischt. Freie siMDR1-RNA diente als Kontrolle und wurde in gleicher Weise wie die Probe behandelt. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Thermo Hybaid Electro 4 Gelsystem (Thermo Hybaid) bei 85 V für 1 h angeschlossen. Die konstante Stromversorgung wurde durch eine LKB 2197 von LKB (LKB Bromma) sichergestellt. Für die Auswertung wurde das Agarosegel behutsam unter einen BioDoc Analyze Ti5-Trans-Illuminator (Whatman Biometra) überführt und bei einer Wellenlänge von 312 nm analysiert.

## **6.2.7 Zellkultivierung**

Für die Versuche in der Zellkultur wurden humanen Ovarialkarzinomzellen (SK-OV-3) und humane kolorektale Adenokarzinomzellen (Caco-2) verwendet. Die Zelllinien wurden, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, kultiviert. 24 h vor dem jeweiligen Experiment wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,2 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Well Platten,  $9 \times 10^4$  Zellen / Well in 12-Well Platten oder  $1,0 \times 10^6$  Zellen / Well in 6-Well Platten ausgesät.

Da es bei der Kultivierung von Zellen als Monolayer (2D) einige relevante Unterschiede im Vergleich zum Heranwachsen im natürlichen Zellverbund gibt, haben wir neben der gewöhnlichen Kultivierung auch 3D-Tumorsphäroiden aus Caco-2 Zellen herangezüchtet und verwendet. Aktuelle Erkenntnisse sprechen der Mikroumgebung der Tumore eine immer relevantere Rolle für ihr Wachstum und ihre Ausbreitung zu. Erst durch die Ausbildung von Zellverbänden werden wichtige Faktoren für die Tumorforschung entsprechend nachgeahmt. Gerade durch die natürliche Vaskularisation und die Ausbildung einer extrazellulären Matrix können verschiedene Diffusions- und Proliferationsvorgänge durch Tumorsphäroiden wesentlich realistischer dargestellt werden [279].



**Abbildung 6.4:** Schematische Abbildung der Herstellung von 3D-Tumor-Sphäroiden durch elektromagnetischer Levitation nach vorangegangener Magnetisierung der Zellen mit NanoShuttle-PL®.

Die Herstellung der Sphäroide erfolgte durch elektromagnetische Levitation. **Abbildung 6.4** gibt eine bildliche Übersicht über die dafür nötigen Schritte. Hierbei werden die Zellen mit biokompatiblen magnetischen Nanopartikeln (NanoShuttle-PL® der Firma Greiner Bio-One GmbH) magnetisiert. NanoShuttles-PL® sind Gold-Nanopartikel, die mit Eisenoxid und Poly-L-Lysin modifiziert sind. Das Biopolymer sorgt für die elektrostatische Bindung an die Zelloberflächen und Vernetzung mit den Nanopartikeln [280]. Durch Anlegen eines Magnetfeldes werden die magnetisierten Zellen zur Aggregation und Ausbildung einer extrazellulären Matrix angeregt, die die Zellen auch nach der Entfernung des Magnetfeldes zusammenhält. Die so entstandenen Tumorsphäroiden können simultan zu Zell-Monolayern mit den entsprechenden Assays untersucht werden [281].

## 6.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz möglichst niederschwellig und unkompliziert zu bestimmen, haben wir uns für die visuelle Auswertung von grün fluoreszierendem Protein (GFP) entschieden. Die Versuche wurden an SK-OV-3 Monolayer-Zellen und Caco-2 3D-Spheroiden jeweils in 12-Well Platten durchgeführt.

GFP ist ein Protein, das schon Mitte des letzten Jahrhunderts in einer Medusenart entdeckt wurde und heute einen enormen Stellenwert als universeller genetischer Fluoreszenzmarker in der naturwissenschaftlichen Forschung hat. Die Entdeckung war von solcher Wichtigkeit, dass sie 2008 mit dem Nobelpreis in Chemie belohnt wurde [282]. Wird eine Zelle erfolgreich mit einem GFP-Reporter gen transfiziert, kommt es entsprechend zur Translation von GFP. Durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm kann das Protein durch seine charakteristische grüne Fluoreszenz quantifiziert werden. Die Auswertung kann so an lebendigen Zellen vorgenommen werden [283,284].

Für die Bewertung der Transfektionseffizienz haben wir Lipopolyplexe gemäß Kapitel 6.2.2 mit pCMV-GFP hergestellt und mit Zellkultur-Medium auf eine Konzentration von 5 µg Plasmid / ml verdünnt. Das alte Nährmedium der Zellen wurde durch 200 µl der verdünnten Probe ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Inkubator wurden weitere 800 µl Medium je Well zu den Zellen hinzugegeben. Die Platten wurden für weitere 44 Stunden in den Inkubator zurückgestellt. Nach Ablauf dieser Zeit haben wir die Zellen mit gekühltem PBS-Puffer, ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , gewaschen und unter dem Mikroskop (CKX-53 Olympus) betrachtet. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, für die Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektionsfilter mit einer Wellenlänge von 530-550 nm verwendet. Die Quantität der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Menge an GFP und somit auch mit der Effizienz unseres Vektors.

## 6.2.9 CAM-Assay

Die chorioallantoische Membran (CAM) ist eine mesodermale Membran im Hühnerei, die aus der Verschmelzung von Allantois und Chorion hervorgeht. Durch Öffnung der Eierschale ist sie gut zugänglich und kann, ohne mit der Vitalität des Embryos im Widerspruch zu stehen, über mehrere Tage experimentell genutzt werden [285]. Die CAM wird durch ein stark ausgebildetes Gefäßnetz versorgt und gehört zu den schnell wachsenden Geweben. Dadurch

lassen sich die Folgen, die durch gezielte Manipulationen (durch Arzneimittel oder andere Therapien) hervorgerufen werden, kurzfristig beobachten [286]. Da das Kükenembryo von Natur aus immundefizitär ist, lassen sich verschiedene Gewebe oder Zellen auf der CAM ansiedeln. Beispielsweise können Tumorzellen übertragen werden, um so ihr Verhalten hinsichtlich wichtiger Charakteristika, wie Wachstum, Invasion, Angiogenese und Expansion zu beobachten [287]. Für die Forschung sind die Erkenntnisse, die aus den CAM-Modellen abgeleitet werden von großer Bedeutung, da sie den realen Bedingungen sehr nahe stehen, aber keine langen Verwaltungsverfahren wie für die Genehmigung von Tierversuchen nötig sind. So können relativ kostengünstig, einfach und schnell pharmakologische Proben und neue Therapieansätze untersucht werden [288].

Nach Erhalt der befruchteten Eier am Eientwicklungstag (EDD) 0, wurden diese desinfiziert und in einem temperierten Inkubator mit automatischem Rotor zur weiteren Bebrütung platziert. Der Rotationsintervall wurde auf 4 h eingestellt. Die Temperatur wurde bei 37° C und die relative Luftfeuchtigkeit bei konstant 60 % gehalten. Nach 72 h, am EDD 3, wurde die Eierschale mit einem pneumatischen Eierstempel geöffnet, um die CAM freizulegen. Die Öffnung hatte einen Durchmesser von 3 cm und wurde sofort mit einer kleinen Petrischale geschützt. Anschließend wurde das Ei zur weiteren Entwicklung in den Inkubator zurückgelegt. Am EDD 11 wurde das Ei unter ein Stereomikroskop (Stemi 2000-C) platziert und unsere pCMV-GFP-Lipopolyplexe mit einer Glaskanüle in das Mesoderm der CAM injiziert. Nach einer Transfektionszeit von 48 h haben wir ein Quadrat von 1 x 1 cm Seitenlänge aus der CAM getrennt, mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und auf einem Objektträger fixiert. Die Expression von GFP wurde mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 700) optisch ausgewertet und dokumentiert.

## **6.2.10 Scratch-Test**

Bei onkologischen Erkrankungen sind Migration, Invasivität und metastasierendes Potenzial der Tumorzellen Schlüsselfaktoren, die die klinische Prognose der Patienten entscheidend beeinflussen. Der Scratch-Test ist eine in vitro Methode, bei der genau diese Eigenschaften analysiert werden [289]. Dazu werden die Zellen bis zur Konfluenz in einer Petrischale gezüchtet. Anschließend wird mit einem sterilen Instrument eine gleichmäßige Kerbe in den Zellteppich gekratzt und dieser über einen längeren Zeitraum beobachtet. Durch die mechanische Verletzung werden die Zellen in direkter Nachbarschaft zur Zellkante zur Migration und Proliferation angeregt, um so die modellierte Wunde zu schließen. Je nach

Ausprägung der eingangs erwähnten Charakteristika dauert dieser Prozess länger oder kürzer [290].

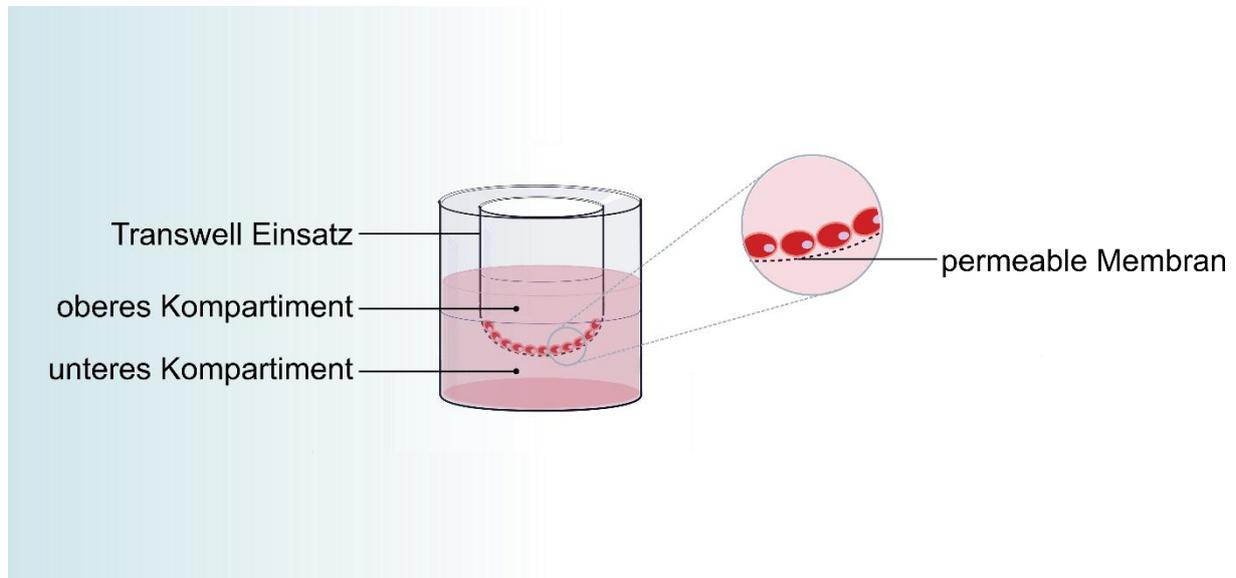
Zur Untersuchung, inwiefern die beschriebenen Eigenschaften von dem MDR1-Knockdown beeinflusst werden, haben wir nachfolgenden Scratch-Test durchgeführt. Zur Vorbereitung haben wir SK-OV-3-Zellen mit einer Dichte von 50.000 Zellen / Well in 12-Well Platten ausgesät und für 24 h in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde das Nährmedium abgesaugt und 500 µl unserer, mit serumfreiem Medium verdünnten Proben, auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h haben wir die Wells mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml mit einer finalen siRNA-Konzentration von 36 nM aufgefüllt. Die Zellen wurden für weitere 44 h in dem Inkubator platziert. Als Proben wurden Polyplexe und Lipopolyplexe mit si-MDR1 getestet. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit nicht kodierender siRNA. Nach insgesamt 48 h Transfektionszeit wurden die Zellen trypsinisiert, mit Nährmedium gewaschen und erneut mit einer Dichte von 50.000 Zellen / Well in 12-Well Platten ausgesät und für 24 h in dem Inkubator platziert. Nach dieser Zeit wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein gleichförmiger Kratzer durch die Mitte des Wells gezogen und die abgelösten Zellbestandteile durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Im Anschluss haben wir die Wells mit Nährmedium (mit 10 % FKS) aufgefüllt. Die Progression der Zellmigration wurde durch Photographien unter dem Mikroskop (CKX-53 Olympus) nach entsprechenden Zeitintervallen (0 h, 4 h, 8 h, 20 h, 24 h, 30 h) dokumentiert.

### **6.2.11 Transwell Migration Assay**

Wie bereits erwähnt, sind Migration, Invasivität und metastasierendes Potenzial Schlüsselfaktoren für die effektive Bekämpfung von Tumorzellen. Aus dem gestiegenen Interesse an der Weiterentwicklung quantitativer in-vitro Invasionsassays ist das Transwell-Migration Assay entstanden. Basierend auf dem ursprünglichen Boyden-Assay-System [291], ist es mittlerweile das am häufigsten verwendete Assay zur Bestimmung der eingangs erwähnten Faktoren.

Heute ermöglichen kommerziell erhältliche Kunststoffeinsätze für Multi-Well-Platten standardisierte und gut replizierbare Versuche [292]. Eine bessere Übersicht soll durch die visuelle Darstellung durch **Abbildung 6.5** gegeben werden. Die Einsätze besitzen eine zelldurchlässige Membran, mit deren Hilfe sie nach Platzierung in die Well-Platte ein Zweikammersystem erzeugen. Die eingesetzten Zellen werden in dem oberen Kompartiment,

auf der permeablen Membran, angesiedelt. Nach einem entsprechenden Zeitintervall werden die Zellen im unteren Kompartiment quantifiziert, die die Membran durchquert haben.



**Abbildung 6.5:** Schematische Übersicht die Verwendung des Transwell Einsatzes in einer 6-Well Platte für die Durchführung des Migration Assays.

Für den Versuch haben wir Caco-2 Zellen mit einer Aussaatdichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen / Well in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht in den Inkubator gestellt. Nach 24 h wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 500  $\mu\text{l}$ , mit serumfreiem Medium verdünnter Probe ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden die Wells mit Nährmedium auf 3 ml aufgefüllt, sodass eine finale siRNA-Konzentration von 36 nM erreicht wurde. Die Zellen wurden für weitere 44 h in den Inkubator platziert. Als Proben wurden Polyplexe und Lipopolyplexe mit si-MDR1 getestet. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit nicht kodierender siRNA. Nachdem eine Transfektionszeit von insgesamt 48 h abgelaufen war, haben wir die Zellen trypsinisiert, um sie vom Boden der Petrischale abzulösen. Anschließend wurden sie zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit serumfreiem Medium auf  $1,25 \times 10^6$  Zellen /  $\mu\text{l}$  resuspendiert. 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in das obere Kompartiment des Transwell Einsatzes (8  $\mu\text{m}$  Porengröße, PET-Membran) überführt. Das untere Kompartiment wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Nährmedium (mit 10 % FKS) befüllt und die Platte anschließend für 48 h im Inkubator gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das Medium und die nicht migrierten Zellen aus dem oberen Kompartiment entfernt. Die migrierten Zellen in dem unteren Kompartiment wurden mit 70 % Ethanol fixiert und mit

Kristallviolett- Lösung (0,1 %) angefärbt. Zur Auswertung haben wir die gefärbten Zellen unter einem Mikroskop (CKX-53 Olympus) fotografiert.

### **6.2.12 Clonogenic Assay**

Der „Clonogenic Assay“ oder „Colony Formation Assay“ ist eine in-vitro Charakterisierungsmethode, um das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Zellen zu untersuchen. Dazu wird eine stark verdünnte Zellsuspension auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien (min. 50 Zellen) überprüft [293]. Durch vorherige Behandlung der Zellen mit beispielsweise Zytostatika können so Veränderungen, die die oben genannten Charakteristika betreffen, erkannt werden. Nach der Aussaat wird den Zellen üblicherweise ein Wachstumszeitraum von 14 Tage gewährt, nach dem die Anzahl der ausgebildeten Kolonien ausgezählt wird [294].

Für den Versuch haben wir Caco-2 Zellen mit einer Aussaatdichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen / Well in 6-Well Platten ausgesät und für 24 h in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde das Nährmedium abgesaugt und 500  $\mu$ l unserer Probe, die zuvor mit serumfreiem Medium verdünnt wurde, auf die Zellen pipettiert. Nach 4 h Inkubationszeit haben wir die Wells auf ein Gesamtvolumen von 3 ml mit Nährmedium aufgefüllt und für weitere 44 h in den Inkubator zurückgestellt. Die siRNA-Konzentration der Proben betrug 36 nM im Well. Als Proben wurden Polyplexe und Lipopolyplexe mit si-MDR1 getestet. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit nicht kodierender siRNA. Nach Ablauf der 48 h Transfektionszeit haben wir die Zellen trypsinisiert, mit PBS-Puffer gewaschen und ausgezählt. Danach erfolgte die Aussaat in eine 6-Well-Platte mit einer Dichte von 1000 Zellen / Well. Die Zellen wurden für 14 Tage zum Wachsen in den Inkubator gestellt, anschließend mit Ethanol 70 % fixiert und mit 0,1 % Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die gewachsenen Zellkolonien konnten so sichtbar gemacht werden. Die Auswertung erfolgte manuell durch Zählung der Kolonien aus mehr als 50 Zellen.

### **6.2.13 MDR1 silencing und RT-qPCR**

“Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion” ist ein Verfahren, mit dem bestimmte Gen-Sequenzen in-vitro vervielfältigt und quantifiziert werden können. Im Wesentlichen besteht es aus drei Teilschritten; Der Umwandlung von RNA in cDNA durch Reverse Transkriptasen, der Amplifikation der cDNA mittels PCR und dem Nachweis und der Quantifizierung der Amplifikationsprodukte in Echtzeit [295]. In der letzten Dekade hat sich

RT-qPCR zum Goldstandard der Genexpressionsanalyse entwickelt. Es ist eine schnelle und aufwendungsschwache Methode, die auf der traditionellen RT-PCR basiert und mit der Fluoreszenzresonanz-Energieübertragung (FRET) unter Verwendung fluorogener Primer erweitert wurde [296]. FRET ermöglicht die Quantifizierung der entsprechenden DNA-Menge durch Fluoreszenz-Messungen. Dabei korreliert die Intensität der Fluoreszenz mit der Menge der zuvor gebildeten Amplifikationsprodukte [297].

Um die Effizienz des MDR1-Knockdowns in den behandelten Zellen zu überprüfen, haben wir die Menge der MDR1-mRNA mittels RT-qPCR nach Transfektion mit unserem Vektor bestimmt. Zu diesem Zweck wurden SK-OV-3 Zellen mit einer Aussaatdichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen / Well in 6-Well Platten ausgesät und in den Inkubator gestellt. Nach 24 h haben wir das alte Nährmedium durch 500  $\mu$ l unserer Probe ersetzt und die Zellen wurden zurück in den Inkubator gestellt. Nach 4 h wurden die Wells mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt und für weitere 44 h in dem Inkubator platziert. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit serumfreiem Medium, die siRNA-Konzentration der Proben betrug 36 nM. Als Proben wurden Polyplexe und Lipopolyplexe mit si-MDR1 verwendet. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit nicht kodierender siRNA. Nach Ablauf der Transfektionszeit von 48 h wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, mit Trypsin aus der Petrischale abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut mit PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Anschließend folgte die Isolation und Quantifizierung der RNA mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Aus der isolierten RNA wurde unter Verwendung eines High Capacity cDNA-Reverse-Transkriptions-Kit (Thermo Fischer Scientific) gemäß den Herstelleranweisungen die entsprechende cDNA synthetisiert. Hierzu wurden 20  $\mu$ l der aus den benötigten Edukten hergestellten Mischung in einem Thermocycler in **Tabelle 6.1** dargestelltes Programm mit verschiedenen Temperaturstufen unterzogen.

Anschließend wurde die quantitative Echtzeit-PCR unter Verwendung eines Quant Studio 3 RT-PCR-Systems (Applied Biosystems) und PowerUp® SYBR® Green Mastermix (Thermo Fischer Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 10  $\mu$ l Reaktionsgemisch mit 15 ng cDNA und 0,4  $\mu$ l einer Lösung der spezifischen Primer (10 mM) verwendet. Als Referenz wurde GAPDH (House Keeper Gene) bestimmt. Um die relative mRNA-Expression zu bestimmen, wurde der Ct-Wert herangezogen. Die Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte mit einem zweiseitigen Students t-Test, wobei

ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurde. Weiterhin wurde in [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$  unterschieden.

**Tabelle 6.1**

Thermocycler Programm

$\Delta t$	Temperatur [°C]
00:10:00	25
02:00:00	37
00:05:00	85
--:--:--	4

Die übergeordnete Tabelle zeigt das mehrstufige Programm, welches für die cDNA-Synthese verwendet wurde

### 6.2.14 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay haben wir die Sensitivität von SK-OV-3 Zellen gegenüber Doxorubicin bestimmt. Die Vorbereitung der Zellen und Durchführung des Versuchs wurde, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, durchgeführt. Nachdem die Zellen eine Ruhezeit von 24 h hatten, wurde das Medium entfernt und die Wells mit jeweils 100  $\mu$ l Probe aufgefüllt. Als Probe haben wir Lipopolyplexe mit siMDR1 oder zum Vergleich Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Inkubator wurde 100  $\mu$ l Nährmedium je Well ergänzt und den Zellen weitere 44 h Transfektionszeit eingeräumt. Die siMDR1-Konzentration betrug 36 nM. Nach Ablauf der Transfektionszeit von insgesamt 48 h haben wir den Überstand abgesaugt und eine Verdünnung von freiem Doxorubicin oder liposomalem Doxorubicin mit einer Endkonzentration von 125  $\mu$ g DOX / ml und 250  $\mu$ g DOX / ml auf Zellen pipettiert. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium, als Positivkontrolle Triton-X Lösung (1 %) verwendet. Die Zellen wurden für 4 h in den Inkubator gestellt, anschließend wurde die Auswertung gemäß Kapitel 3.2.7 durchgeführt. Zur Überprüfung von statistisch signifikanten Unterschieden wurde ein zweiseitiger Students t-Test durchgeführt, wobei ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurde. Weiterhin wurde in [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$  unterschieden.

## 6.3 Ergebnisse und Diskussion

### 6.3.1 Physikochemische Charakterisierung

Die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung unseres Vektorsystems werden in dem nachfolgenden Kapitel ausgewertet und diskutiert. Neben der Größe und dem Zetapotenzial wurde die vollständige und feste Bindung der Nukleinsäure überprüft.

#### 6.3.1.1 Größe und Zetapotenzial

Durch die Auswertung von Größe und Zetapotenzial lassen sich erste Rückschlüsse auf die erfolgreiche Komplexierung der Edukte ziehen, sowie wichtige Erkenntnisse über die Struktur der jeweiligen Partikel gewinnen. Da die Größe der späteren Lipopolyplexe maßgeblich durch die Größe der verwendeten Liposomen bestimmt wird, sollten diese etwas mit dem angestrebten Größenbereich der späteren Lipopolyplexe übereinstimmen. Für nanopartikuläre Genterapeutika wird typischerweise ein Durchmesser von 100 bis 200 nm angestrebt. Vektoren mit dieser Größe sind in besonderer Weise für passives „drug targeting“ geeignet, da sie sich durch den EPR-Effekt (Enhanced Permeability and Retention) besonders gut im Tumorgewebe anreichern [175]. Wie den Messergebnissen aus **Tabelle 6.2** entnommen werden kann, befinden sich sowohl unsere Liposomen als auch die daraus gebildeten Lipopolyplexe in dem angestrebten Größenbereich.

**Tabelle 6.2**

Messergebnisse der Photonenkorrelationsspektroskopie und Laser-Doppler-Anemometrie

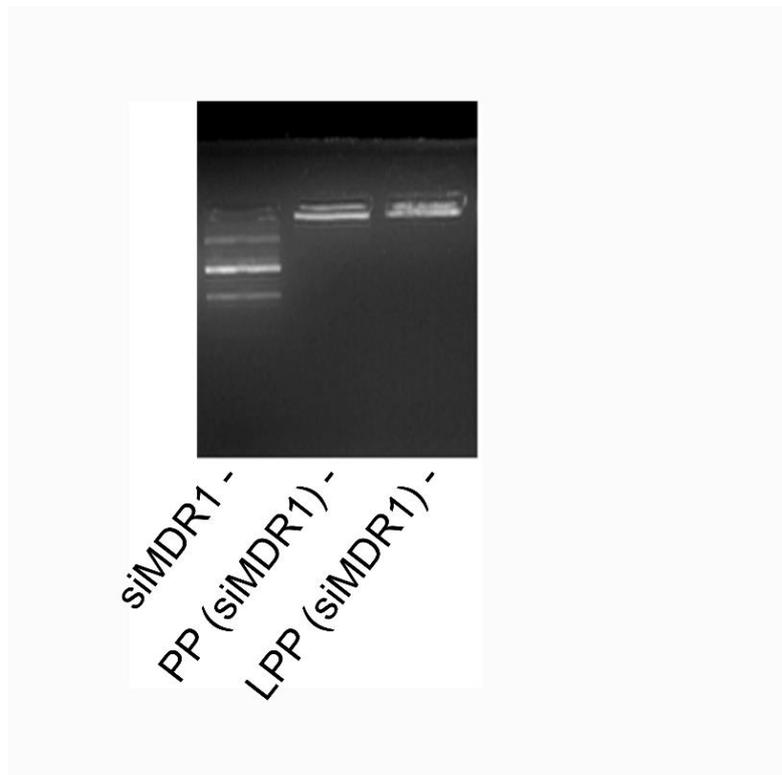
<b>Formulierung</b>	<b>Größe <math>\pm</math> S.D. [d.nm]</b>	<b>PDI <math>\pm</math> S.D.</b>	<b>Zetapotenzial <math>\pm</math>S.D. [mV]</b>
<u>Liposomen</u> (DOPE:DPPE:Cholesterol)	141.1 $\pm$ 3.5	0.270 $\pm$ 0.018	-23.67 $\pm$ 2.12
<u>Polyplexe</u> (siMDR1)	96.4 $\pm$ 6.7	0.323 $\pm$ 0.047	22.60 $\pm$ 6.91
<u>Lipopolyplexe</u> (siMDR1)	145.5 $\pm$ 4.0	0.363 $\pm$ 0.030	10.27 $\pm$ 5.55

Alle Messgrößen werden als Z-Average dargestellt, welcher aus der Partikelgrößenverteilung der Intensität abgeleitet ist. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 3 Messvorgängen dargestellt

Das Zetapotenzial der vermessenen Liposomen ist durch die Verwendung der negativ geladenen Lipide, wie erwartet [68], im deutlich negativen Bereich. Wohingegen das Zetapotenzial der Polyplexe, wie erwartet [79], durch die Verwendung der kationischen Polymere im deutlich positiven Bereich liegt. Durch die Umhüllung der Polyplexe mit der liposomalen Doppelmembran wird das Zetapotenzial der Lipopolyplexe deutlich abgesenkt. Auch diese Veränderung haben wir so erwartet [99] und lässt auf eine erfolgreiche Komplexbildung schließen.

### 6.3.1.2 Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese haben wir überprüft, ob die eingesetzte siRNA vollständig in den Polyplexen gebunden werden konnte, oder ob nach der Komplexbildung noch überschüssige RNA in der Probe (Polyplexe) vorhanden ist oder wieder aus der Probe (Lipopolyplexe) freigegeben wird. Wäre dies der Fall, würde die überschüssige RNA parallel zur freien siRNA im elektrischen Feld wandern und wäre als paralleler Balken bei der Auswertung sichtbar. In **Abbildung 6.6** ist keine solche Bande zu erkennen. Daraus ist abzuleiten, dass die eingesetzte siRNA vollständig von der eingesetzten Menge PEI komplexiert werden konnte und sich keine frei RNA in der Probe befindet oder wieder aus den Komplexen herausgelöst wird [94].

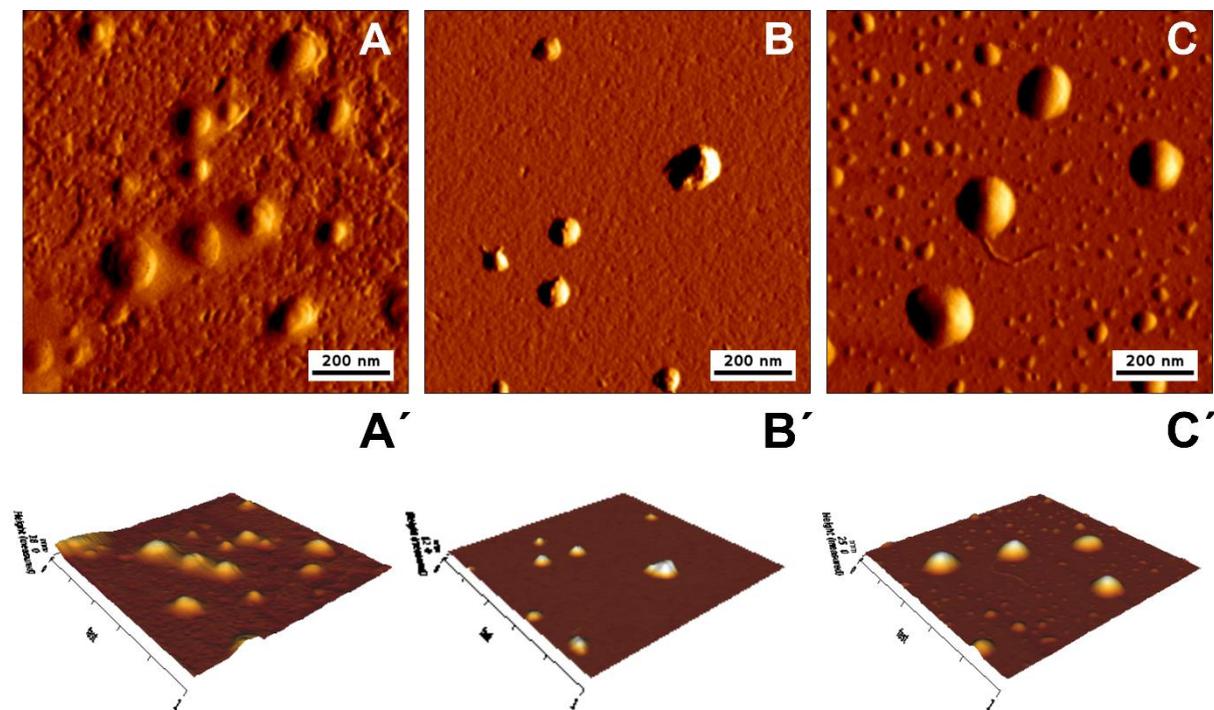


**Abbildung 6.6:** Aufnahme der Gelelektrophoresematrix mit Detektion der DNA durch Ethidiumbromid. Als Proben wurden von links siMDR1, Polyplexe mit siMDR1 und Lipopolyplexe mit siMDR1 aufgetragen.

## 6.3.2 Bildgebende Verfahren

### 6.3.2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die nachfolgende **Abbildung 6.7** zeigt rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Edukte (A und B) unseres Vektorsystems sowie der daraus gebildeten Lipopolyplexe (C). Alle drei Abbildungen zeigen die betrachteten Proben als kugelförmige, kompakte Strukturen. Der durch vorherige Messverfahren bestimmte Durchmesser der Proben befindet sich im Einklang mit den dargestellten Größenverhältnissen.

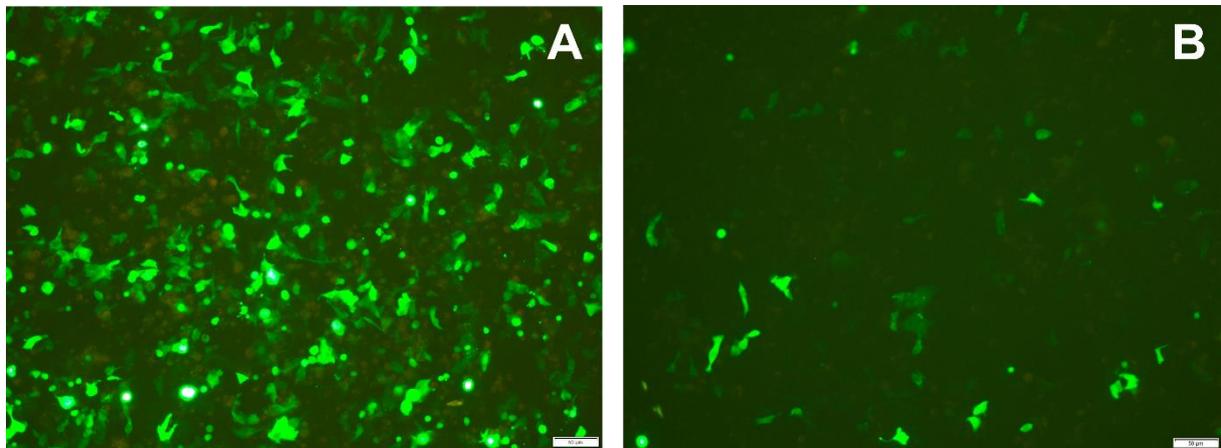


**Abbildung 6.7:** Darstellung von Liposomen (A, A'), Polyplexen (B, B') und Lipopolyplexen (C, C') mit dem Rasterkraftmikroskop im „intermittent contact“-Modus mit 0.5 bis 1.5 Hz. Für die Messungen wurde ein Cantilever NSC 14/AIBs mit pyramidalen Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Spitze verwendet. Die Kraftkonstante betrug 5 N/m, die Resonanzfrequenz 160 kHz.

## 6.3.3 Zellkultur

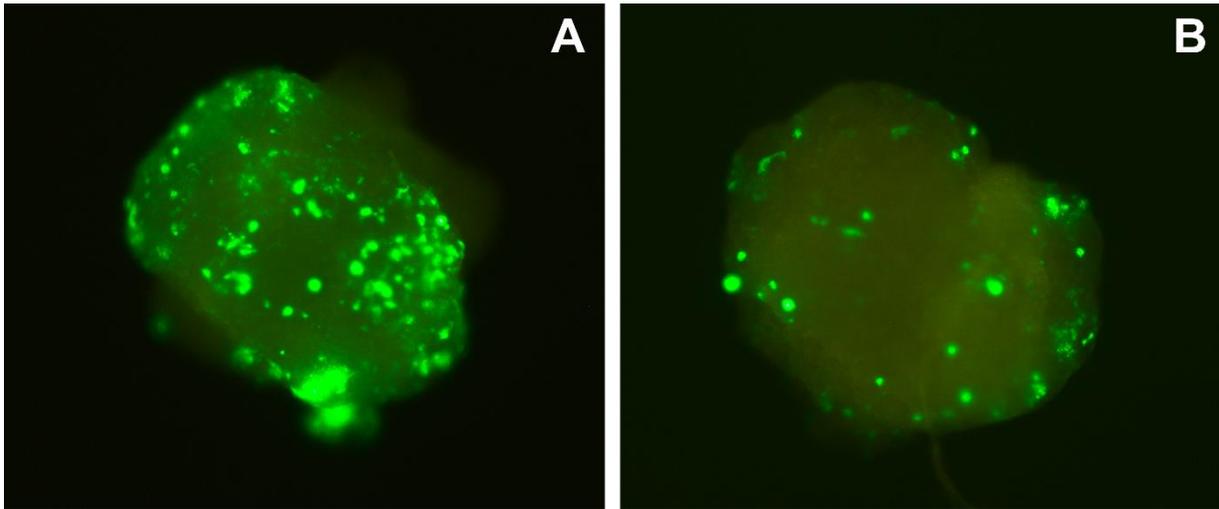
### 6.3.3.1 Transfektionseffizienz

Für die Überprüfung der allgemeinen Transfektionseffizienz der verwendeten Lipopolyplexe haben wir die Effizienz der Übertragung von pCMV-GFP als Modell-Plasmid bestimmt. Die Auswertung konnte so niederschwellig und schnell, nach optischer Anregung der transfizierten Zellen, durchgeführt werden. Sie erfolgte durch visuellen Vergleich der Fluoreszenzsignale, wobei keine exogenen Substrate und Cofaktoren benötigt wurden. Die Überprüfung der GFP-Expression kann somit an den lebenden Zellen erfolgen [298]. Eine ausführliche Quantifizierung wurde im späteren Kapitel 6.3.3.4 unter Verwendung des eigentlichen Ziel-Plasmids vorgenommen. Um die Transfektionseffizienz möglichst vielseitig und mit engem Bezug zu den natürlichen Wachstumsbedingungen der Zellen zu überprüfen, haben wir die Experimente zusätzlich zu konventionell kultivierten SK-OV-3 Zellen, an Caco-2 Zellen als 3D-Spheroïden und am CAM-Modell durchgeführt. Als Referenz zu den verwendeten Lipopolyplexen haben wir Polyplexe mit der äquivalenten Menge an siRNA verwendet.



**Abbildung 6.8:** Aufnahme von SK-OV-3 Zellen nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Lichtmikroskop (CKX-53 Olympus) mit Fluoreszenzdetektionsfilter. Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug 1 µg / ml.

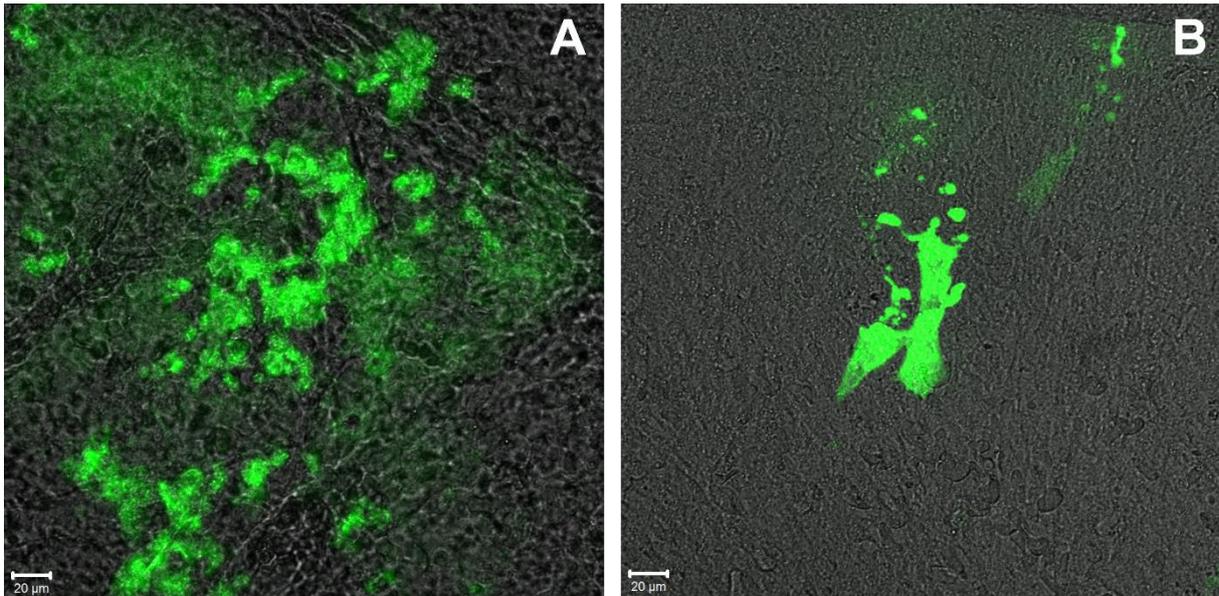
Sowohl **Abbildung 6.8** als auch **Abbildung 6.9** veranschaulichen, dass es unter der Verwendung von Lipopolyplexen zu einem vielfach erhöhten Vorkommen von fluoreszierenden Zellen kommt. Daraus ergibt sich, dass die Transfektion mit Lipopolyplexen deutlich effizienter ist als die Transfektion mit Polyplexen.



**Abbildung 6.9:** Aufnahme von 3D-Tumorsphäroiden aus Caco-2 Zellen nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Mikroskop (CKX-53 Olympus) mit Fluoreszenzdetektionsfilter. Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

Diese Beobachtungen bestätigen zum einen allgemeine Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten [53,101,107], zum anderen die Effizienz speziell unseres Transportsystems und bildet daher eine erste positive Resonanz im Hinblick auf eine spätere Verwendung in der onkologischen Therapie.

Durch die Kultivierung von Zellen als 3D-Tumorsphäroiden wird diesen eine besonders natürliche Umgebung zur Entwicklung geboten. Im ursprünglichen Zellverbund gibt es eine Vielzahl von komplexen Prozessen und Strukturen, die sich erst durch die Interaktionen untereinander ergeben und ausbilden [299]. Zellen im Verbund stehen in-vivo einer ganz anderen Mikroumgebung gegenüber als typisch kultivierte Zellen, die als Monolayer in der Petrischale plattiert sind. Bereits mehrere Jahrzehnte ist bekannt, dass Zelllinien vollkommen unterschiedliche Morphologie- und Wachstumseigenschaften aufweisen, wenn sie im Zellverbund gezüchtet werden [300,301]. Vor allem durch große Verschiedenheiten hinsichtlich der Vaskularisation ergeben sich strukturelle Unterschiede, die vor allem Diffusions- und Verteilungsvorgänge betreffen. Auch durch die Ausbildung einer extrazellulären Matrix im Zellverbund ergeben sich wesentliche Verschiedenheiten, die die Ergebnisse von Experimenten wesentlich beeinflussen können [279]. Daher bieten, für eine gesamtheitliche und umfassende Bewertung, die Daten aus 3D-Zellkulturmodellen einen wichtigen Mehrwert.

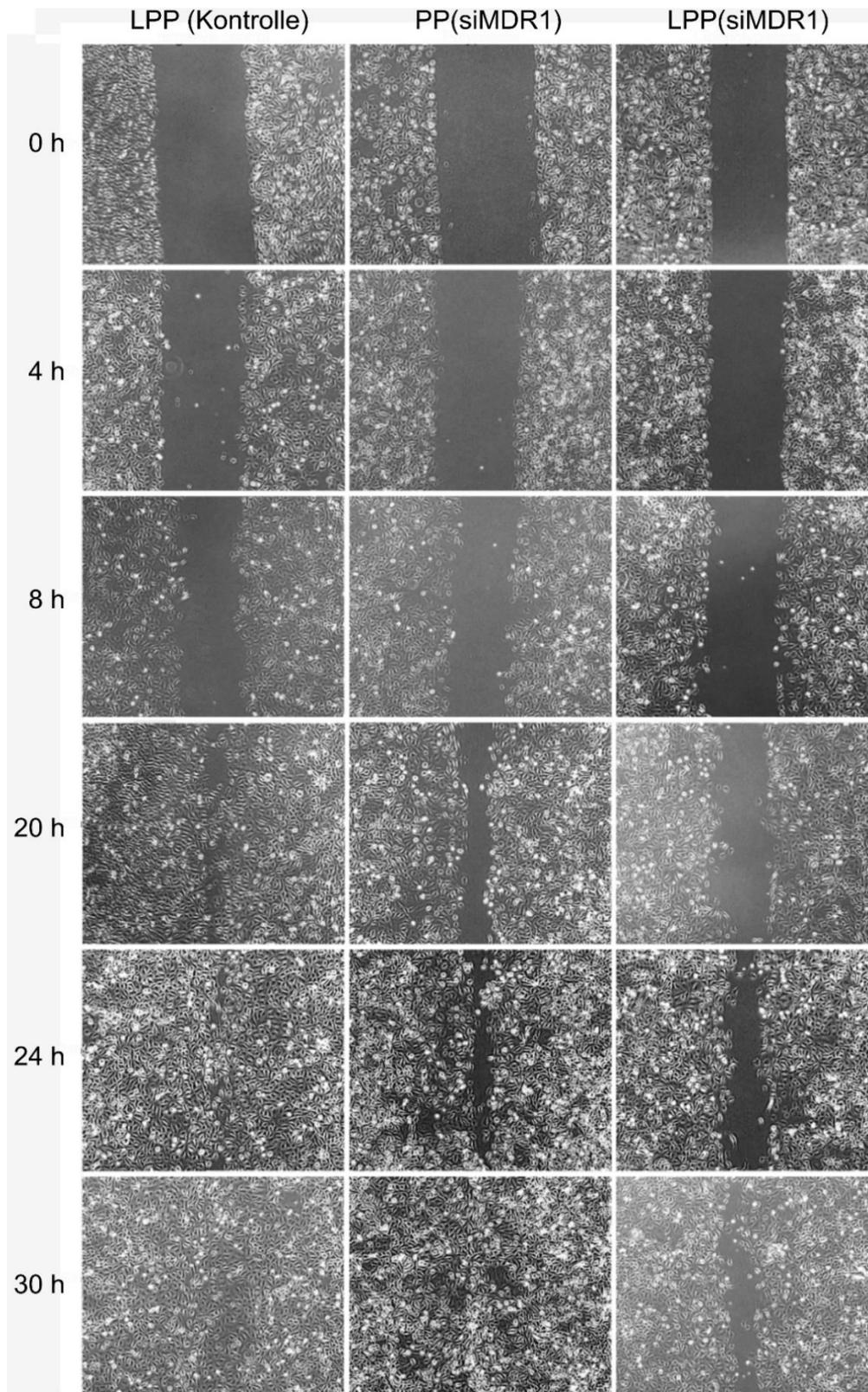


**Abbildung 6.10:** Aufnahme der CAM nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 700). Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug 1 µg / ml.

Auch Erkenntnisse, die aus dem CAM-Modell abgeleitet werden, sind von besonderer Relevanz, da die CAM einen intakten Zellverbund in seiner natürlichen Umgebung darstellt. Somit können auch hier Faktoren Berücksichtigung finden, die bei der klassischen Zellkultur nicht zum Tragen kommen [288]. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Transfektionsversuchen ist auch in **Abbildung 6.10** eine ausgeprägtere Fluoreszenz nach der Inkubation mit Lipopolyplexen zu beobachten.

### 6.3.3.2 Zellmigration und -invasion

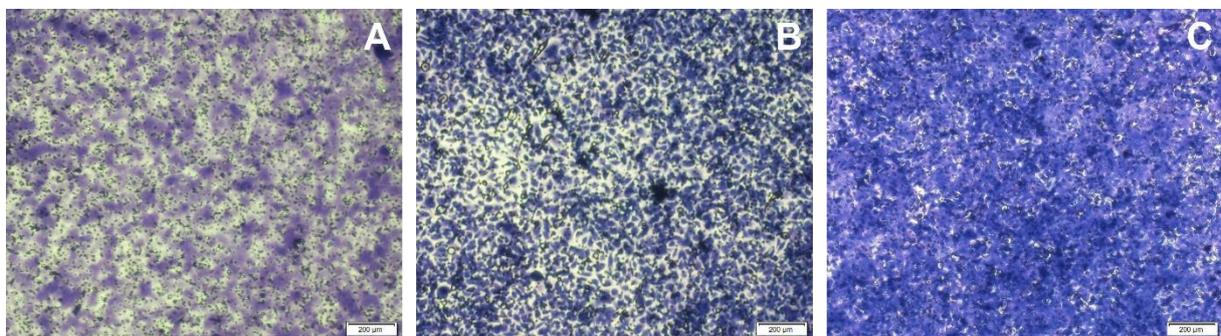
Die durch MDR1-Knockdown vermittelte Downregulation der P-Glykoprotein Expression hat neben der Verringerung des Zytostatika-Efflux auch eine Reihe weiterer Auswirkungen auf zellulärer Ebene. P-GP ist ein unspezifischer Transporter, der eine Vielzahl von Molekülen mit divergierenden chemischen Strukturen aus der Zelle transportiert [302]. Dessen Überexpression hat wesentlich differenziertere Auswirkungen als nur auf die Resistenzentwicklung gängiger Chemotherapeutika. Arbeiten aus der Vergangenheit lassen einen entscheidenden Einfluss auf Prozesse der Tumorprogression vermuten [262,303]. Insbesondere wurde ein gesteigertes Migrations- und Invasionsverhalten der betroffenen Zellen beobachtet [263,304]. Migration und Invasion sind initiale Prozesse, die die Tumormetastasierung vorantreiben und damit an der Hauptursache für krebsassoziierte Todesfälle beteiligt sind.



**Abbildung 6.11:** Mikroskopische Aufnahmen (CKX-53 Olympus) von SK-OV-3 Zellen. In die konfluente Zellschicht wurde zum Zeitpunkt 0 h eine Kerbe gekratzt. Vorgegangen wurden die Zellen mit siMDR1 durch Lipopolyplexen oder Polyplexe transfiziert (siRNA-Konzentration 36 nM). Als Kontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA.

Es ist daher von entscheidender Bedeutung, diese Prozesse zu verstehen, zu erkennen und gezielt beeinflussen zu können [305]. Um die Auswirkungen des MDR1-Knockdowns auf das Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen zu überprüfen, haben wir einen Scratch-Test an SK-OV-3 Zellen durchgeführt. Durch diesen Versuch haben wir die Geschwindigkeit des „Wundverschlusses“ nach einer mechanischen Verletzung analysiert. Dafür wurden Schnappschüsse mit einem regulären inversen Mikroskop nach verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen [306]. Aus den Ergebnissen in **Abbildung 6.11** geht hervor, dass die Geschwindigkeit, mit der sich die mechanisch induzierte Verletzung wieder verschließt, sich deutlich durch die unterschiedlichen MDR1-Konzentrationen unterscheidet. 30 h nach der Verletzung ist bei den mit Lipopolyplexen (siMDR1) behandelten Zellen noch immer ein Spalt zu erkennen. Wohingegen sich dieser bei Verwendung der Polyplexe (siMDR1) schon geschlossen hat. Bei der Kontrolle, bei der die MDR1-Konzentration nicht verändert wurde, schließt sich die Lücke wesentlich schneller. Zusammengefasst lassen die Unterschiede, die hinsichtlich des Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen zu sehen sind, auf einen Zusammenhang mit der MDR1-Konzentration schließen.

Die Ergebnisse des Transwell-Migration-Assays aus **Abbildung 6.12** korreliert mit den Erkenntnissen aus den vorangestellten Versuchen. Die Anzahl der migrierten Zellen ist bei der Kontrollgruppe (C) am höchsten und bei der MDR1-Knockdown Gruppe, die im Vorfeld mit Lipopolyplexen transfiziert wurden, am niedrigsten. Folglich lässt sich auch in diesem Versuch eine Reduzierung der Migrations- und Invasionsneigung der Tumorzellen, die mit der Effizienz des eingesetzten Vektors zunimmt, beobachten. Generell ist die Zellmigration ein sehr dynamischer und komplexer Prozess, bei dem das Zytoskelett reorganisiert werden muss, um die Zellen aus ihrem Verbund zu lösen und letztendlich zu mobilisieren[307].

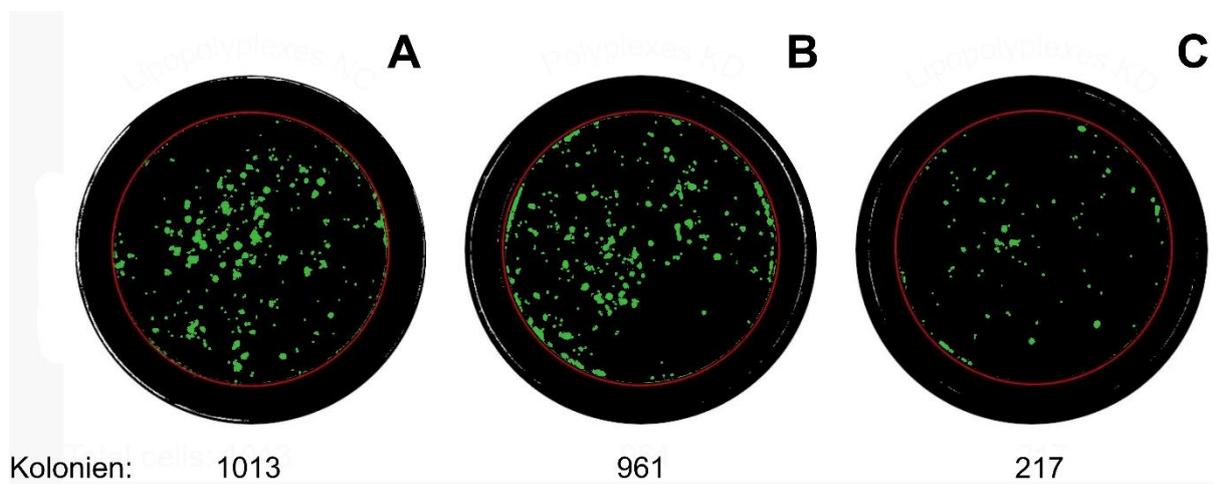


**Abbildung 6.12:** Auswertung des Transwell-Migrations-Assay von Caco-2 Zellen nach Transfektion mit siMDR1 durch Lipopolyplexen (A) oder Polyplexe (B). Als Kontrolle dienen Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA (C). Die Konzentration der eingesetzten siRNA betrug 36 nM.

Veränderungen können daher von vielen Faktoren beeinflusst werden, was bei der Interpretation unserer Ergebnisse Berücksichtigung finden muss. Die übereinstimmenden Erkenntnisse aus unseren Versuchen, auch mit Ergebnissen anderer Arbeiten [308,309], lassen an einem engen Zusammenhang jedoch wenig Zweifel und sprechen insgesamt für die MDR1-Knockdown Therapie, die an mehreren Angriffspunkten die Bekämpfung onkologischer Erkrankungen ermöglicht. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Versuchen konnten wir ein weiteres Mal die Überlegenheit unseres LPP-Vektorsystems im Vergleich zu Polyplexen nachweisen.

### 6.3.3.3 Zellproliferation und -kolonisation

Auch die Proliferation und Kolonisation der Tumorzellen kann durch die Überexpression von MDR1 beeinflusst werden [262]. Grundsätzlich besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Prozessen, die an der Zellproliferation und -kolonisation beteiligt sind und den Vorgängen, die die Zellmigration und -invasion beeinflussen. Für einen umfangreicheren Einblick über die Auswirkungen, die der MDR1-Knockdown mit sich bringt, haben wir eine mögliche Veränderung bezüglich dieser Eigenschaften untersucht.



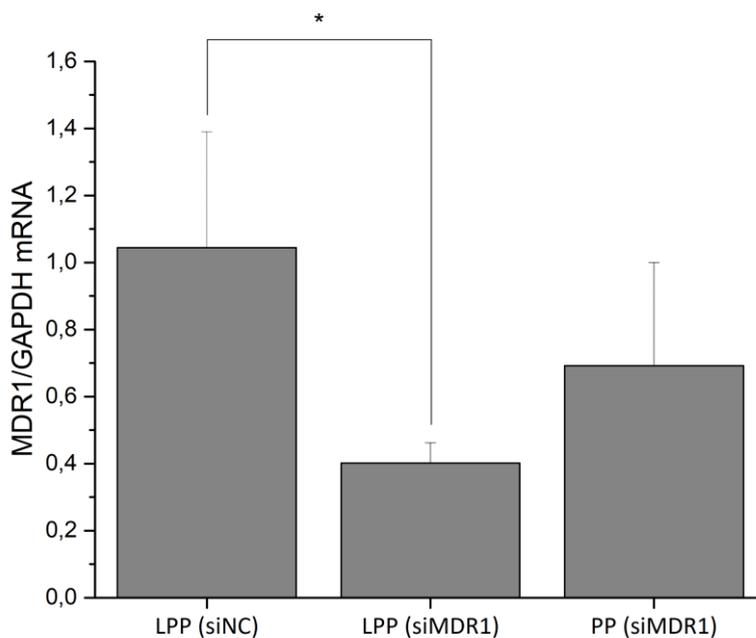
**Abbildung 6.13:** Auswertung des Clonogenic Assays von Caco-2 Zellen nach Transfektion mit siMDR1 durch Lipopolyplexen (C) oder Polyplexe (B). Als Kontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA (A). Die Konzentration der eingesetzten siRNA betrug 36 nM. Die Auszählung der Kolonien erfolgte manuell, ein Zellverbund aus über 50 Zellen wurde als Kolonie gewertet. Die Auszählung erfolgte nach einem Wachstumsintervall von 14 Tagen.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen konnte auch bei der Kolonisation die umfangreichste Reduktion bei der mit siMDR1-Lipopolyplexen behandelten Probe beobachtet werden. Bei der Kontroll-Gruppe ohne vorherige MDR1-Reduktion konnten parallel die

meisten Kolonien ausgezählt werden. Die rückhaltende Einflussnahme des MDR1-Knockdown auf die Zellkolonisation wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben und lässt auch hier auf die Schlussfolgerung schließen, dass durch die Absenkung der MDR1-Konzentration die Ausbreitung der Tumorzellen gestört wird [310,311].

#### 6.3.3.4 MDR1-Knockdown

Um die Effektivität unseres Vektors für seinen angedachten Einsatz direkt zu bestimmen, haben wir die Menge an MDR1-mRNA mittels RT-qPCR in SK-OV-3 Zellen bestimmt. Die Auswertung in **Abbildung 6.14** zeigt, dass wir die Menge an MDR1-mRNA mit unseren Lipopolyplexen um ca. 60 % absenken konnten. Mit den entsprechenden Polyplexen konnte vergleichsweise nur eine 30 % ige Reduktion erreicht werden. In Anbetracht der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche decken sich die beobachteten Veränderungen mit der vorliegenden Auswertung.



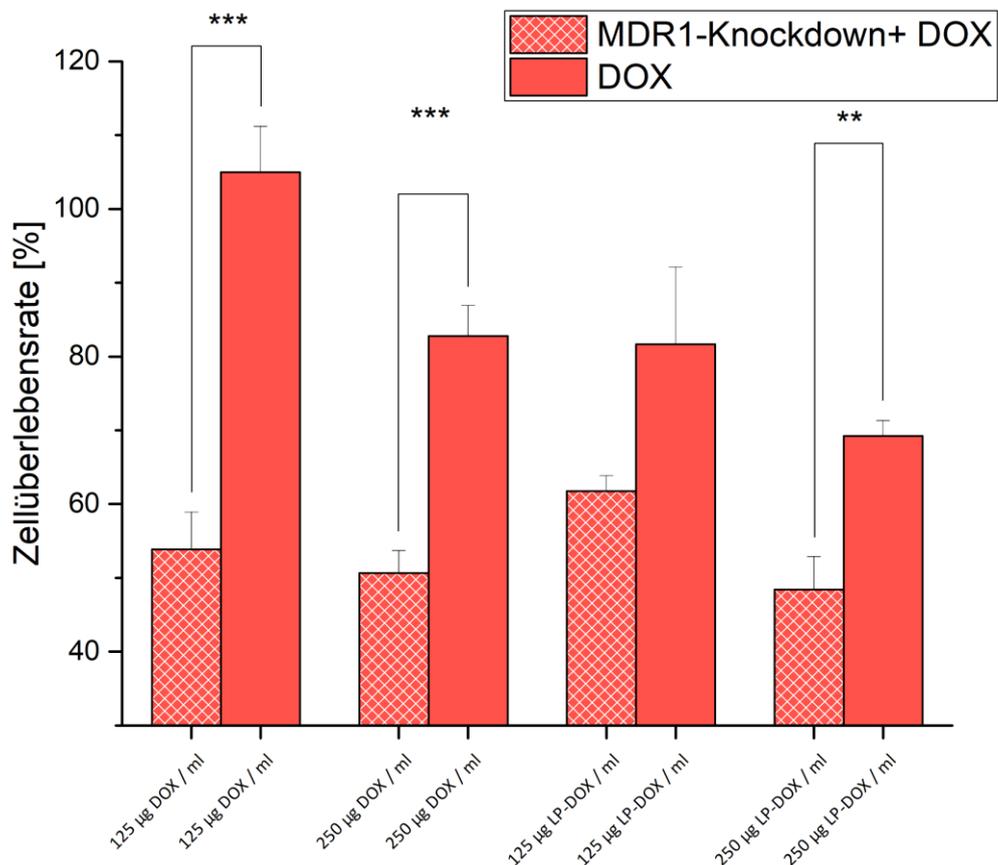
**Abbildung 6.14:** Auswertung der Quantifizierung von MDR1 an SK-OV-3 Zellen als Verhältnis der spezifischen mRNA in Relation zu GAPDH als Referenz. Verglichen wurden Polyplexe (PP) und Lipopolyplexe (LPP) mit siMDR1. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer unspezifischen siRNA. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

Grundsätzlich konnte die Effizienz der verwendeten LPP für den Einsatz zum effektiven MDR1-Knockdown nachgewiesen werden, besonders im Vergleich zu den deutlich

unterlegenen Polyplexen. Eine MDR1-Reduktion um 60 % stellt einen signifikanten Unterschied dar, aufgrund dessen wir eine deutliche Steigerung der DOX-Sensitivität der behandelten Zellen erwarten.

### 6.3.3.5 Doxorubicin Sensitivität

Um letztlich den Einfluss zu quantifizieren, der hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Doxorubicin durch die erniedrigte MDR1-Konzentration verursacht wird, haben wir ein MTT-Assay mit unterschiedlichen DOX-Proben mit und ohne MDR1-Knockdown durchgeführt. Verglichen wurde dafür die reduzierende Wirkung von DOX auf die Zellüberlebensrate an SK-OV-3 Zellen.



**Abbildung 6.15:** Auswertung des MTT-Assays an SK-OV-3 Zellen zur Überprüfung der DOX-Sensitivität nach und ohne vorherigen MDR1-Knockdown. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

Die graphische Darstellung der Auswertung des Versuchs in **Abbildung 6.15** zeigt eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Wirkung von DOX bei den Zellen, die im Vorfeld mit unseren Lipopolyplexen behandelt wurden. Besonders für die geringste Konzentration an freiem DOX ist eine deutliche Reduktion der Zellviabilität zu sehen. Diese Beobachtung ist durch den Rückgewinn der Sensitivität gegenüber dem Modellzytostatikum zu erklären. Mit steigender Konzentration des DOX und durch die Verkapselung in Liposomen wird der Unterschied zwischen MDR1-Knockdown- und Kontroll-Gruppe geringer.

Durch die Erhöhung der DOX-Dosis spielt der Teil, der infolge des Efflux-Mechanismus wieder aus der Zelle transportiert wird, eine verhältnismäßig geringere Rolle. Daher wird für die intrazelluläre Konzentration erstens ohnehin schon die zytotoxische Schwelle überschritten, zum anderen fällt der Effekt, der durch die MDR1-Knockdown vermittelte Erhöhung der intrazellulären DOX-Konzentration bedingt wird, weniger stark ins Gewicht. Dieser proportional bei niedrigeren Zytostatika-Konzentrationen ausgeprägtere Effekt korreliert mit den Ergebnissen früherer Studien zum MDR1-Knockdown, sowohl in Bezug auf DOX, als auch zu anderen Zytostatika [312-314]. Für die klinische Anwendung ist aber gerade die Wirksamkeit in einem niedrigen Konzentrationsbereich nötig, da durch eine Erhöhung der Dosis in-vitro zwar die Wirksamkeit effektiv gesteigert werden kann, es in der Praxis durch kardiotoxische Nebenwirkungen schnell zur Limitation kommt [315,316].

Auch die grundsätzlich höhere Toxizität von liposomalem DOX, die wir in **Abbildung 6.15** beobachten können, haben wir in Übereinstimmung mit wissenschaftlichen Arbeiten zu anderen Nanopartikulären-Systemen [317] und Liposomen [318] erwartet. Eine Begründung für die höhere Effizienz ist der durch die Verkapselung reduzierte Anteil an DOX, der für P-GP frei zugänglich ist und folglich aus der Zelle transportiert werden kann. [319]. Dadurch erklärt sich auch der weniger stark ausgeprägte Anstieg in der Toxizitätssteigerung durch den MDR1-Knockdown, der bei der Untersuchung von liposomalem DOX beobachtet werden kann.

## 6.4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines effektiven Trägersystems, das therapiebegleitend die Effizienz von Zytostatika durch eine Rückgewinnung der Sensitivität erhöhen kann.

Durch die physikochemische Charakterisierung und bildgebende Verfahren konnten wir die erfolgreiche Komplexbildung und Integrität unserer Lipopolyplexe nachweisen. Für die verwendeten Lipopolyplexe konnten wir bereits in der Vergangenheit den effektiven Transport von genetischem Material in Zellen nachweisen. Durch die Ergebnisse der GFP-Transfektion haben wir eine weitere Bestätigung der Effizienz unseres Vektors unter Beweis gestellt. Als Vergleich wurde hier sowie bei den folgenden Experimenten die Relation zur Transfektion mit Polyplexen dargestellt.

Das Hauptaugenmerk der Arbeit war die Reduktion von MDR1 durch RNA-Interferenz und die sich daraus ergebende Rückentwicklung der Resistenz gegen das Anthracyclin-Zytostatika Doxorubicin. Mittels RT-qPCR konnten wir eine Reduzierung der MDR1-mRNA um ca. 60 % nachweisen. Polyplexe haben mit gleicher siMDR1-Konzentration nur eine halb so große Reduktion gezeigt. Besonders für niedrige DOX-Konzentrationen konnten wir in Folge des MDR1-Knockdowns eine ausgeprägte Rückgewinnung der Sensitivität zeigen. Von keiner toxischen Wirkung bei einer Konzentration von 125 µg DOX / ml zu einer Zellüberlebensrate von knapp 50 % bei vorangegangenem MDR1-Knockdown mit Lipopolyplexen. Gerade für die Klinische Praxis ist die Wirksamkeit im unteren Konzentrationsbereich wichtig, da Dosissteigerungen durch schwerwiegende Nebenwirkungen oftmals nicht möglich sind.

Da in engem Zusammenhang mit der Konzentration an MDR1 auch eine Reihe weiterer Faktoren diskutiert werden, die den Verlauf und die Letalität einer Tumorerkrankung maßgeblich beeinflussen, haben wir die Auswirkung des MDR1-Knockdowns auf diese Charakteristika, zu denen Zellmigration, -invasion, -proliferation und -kolonisation gehören, untersucht. Für alle Faktoren konnten wir durch verschiedene in-vitro Versuche eine deutliche Reduktion der jeweiligen Tendenz feststellen, die mit dem Ausmaß der MDR1-Reduzierung korreliert. Diese Erkenntnisse sprechen im Allgemeinen für den Ansatz der MDR1-Knockdown Therapie, da neben der verbesserten Wirksamkeit der Zytostatikatherapie die Ausbreitung der Tumorzellen beeinträchtigt wird.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- [1] B. Fehse, U. Abramowski-Mock, Anwendung des Genome Editing in der somatischen Gentherapie: Eine Einführung, first ed. twentiethtwenty-first, Springer Fachmedien Wiesbaden; Imprint Springer, Wiesbaden, 2021.
- [2] J.C. Fletcher, Ethische Diskussion der Gentherapie am Menschen, in: H.-M. Sass (Ed.), Genomanalyse und Gentherapie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1991, pp. 240-290.
- [3] J. Hampel, Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme: 8. Wahrnehmung und Bewertung der Gentherapie in der deutschen Bevölkerung, second ed., Nomos, 2011.
- [4] Z.A. Bornholdt, H.L. Turner, C.D. Murin, W. Li, D. Sok, C.A. Souders, A.E. Piper, A. Goff, J.D. Shamblin, S.E. Wollen, T.R. Sprague, M.L. Fusco, K.B.J. Pommert, L.A. Cavacini, H.L. Smith, M. Klempner, K.A. Reimann, E. Krauland, T.U. Gerngross, K.D. Wittrup, E.O. Saphire, D.R. Burton, P.J. Glass, A.B. Ward, L.M. Walker, Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014 Ebola virus outbreak, *Science* 351 (2016) 1078-1083. <https://doi.org/10.1126/science.aad5788>.
- [5] E. Barbi, F. Lagona, M. Marsili, J.W. Vaupel, K.W. Wachter, The plateau of human mortality: Demography of longevity pioneers, *Science* 360 (2018) 1459-1461. <https://doi.org/10.1126/science.aat3119>.
- [6] L. Rahib, B.D. Smith, R. Aizenberg, A.B. Rosenzweig, J.M. Fleshman, L.M. Matrisian, Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States, *Cancer Res.* 74 (2014) 2913-2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>.
- [7] J. Hübner, J. Mattutat, A. Katalinic, Verlorene Lebensjahre: Bekanntes und Neues zur Methodik am Beispiel der häufigsten Todesursachen in Deutschland, *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 64 (2021) 1463-1472. <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03424-8>.
- [8] E.L. Tatum, Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine, *Perspect. Biol. Med.* 10 (1966) 19-32. <https://doi.org/10.1353/pbm.1966.0027>.
- [9] C. Dufès, I.F. Uchegbu, A.G. Schätzlein, Dendrimers in gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 2177-2202. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.017>.

- [10] J. Kaiser, How safe is a popular gene therapy vector?, *Science* 367 (2020) 131.  
<https://doi.org/10.1126/science.367.6474.131>.
- [11] J. van Haasteren, S.C. Hyde, D.R. Gill, Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future, *Expert Opin. Biol. Ther.* 18 (2018) 959-972.  
<https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1506761>.
- [12] S.A. Rosenberg, P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R.A. Morgan, R. Moen, E.M. Karson, M.T. Lotze, J.C. Yang, S.L. Topalian, Gene transfer into humans-- immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, *N. Engl. J. Med.* 323 (1990) 570-578. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>.
- [13] H. Müller, C. Rehmann-Sutter, Gentherapie und Ethik, *Schweiz. Med. Wochenschr.* 125 (1995) 34-41.
- [14] C. Klein, Gentherapie monogener Erkrankungen - Rückblick auf ein halbes Jahrhundert, *Drug Res. (Stuttg)* 66 (2016) S17-S18. <https://doi.org/10.1055/s-0042-112402>.
- [15] R.J. Brentjens, J.-B. Latouche, E. Santos, F. Marti, M.C. Gong, C. Lyddane, P.D. King, S. Larson, M. Weiss, I. Rivière, M. Sadelain, Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15, *Nat. Med.* 9 (2003) 279-286. <https://doi.org/10.1038/nm827>.
- [16] M. Kalos, B.L. Levine, D.L. Porter, S. Katz, S.A. Grupp, A. Bagg, C.H. June, T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 95ra73.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002842>.
- [17] D. Ti, M. Bai, X. Li, J. Wei, D. Chen, Z. Wu, Y. Wang, W. Han, Adaptive T cell immunotherapy in cancer, *Sci. China Life Sci.* 64 (2021) 363-371.  
<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1713-9>.
- [18] J. Rosenecker, Aktuelle Entwicklung der Gentherapie bei pädiatrischen Erkrankungen, *Monatsschr Kinderheilkd* 168 (2020) 28-38. <https://doi.org/10.1007/s00112-019-00816-8>.
- [19] E. Smith, P. Blomberg, Genterapi - från idé till verklighet - Ännu har få patienter behandlats och preparaten är ofta mycket dyra - men utvecklingen går fort nu, *Lakartidningen* 114 (2017).
- [20] L.M. Bryant, D.M. Christopher, A.R. Giles, C. Hinderer, J.L. Rodriguez, J.B. Smith, E.A. Traxler, J. Tycko, A.P. Wojno, J.M. Wilson, Lessons learned from the clinical

- development and market authorization of Glybera, *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24 (2013) 55-64. <https://doi.org/10.1089/humc.2013.087>.
- [21] G. Watzek, *Globale Pharmaindustrie - quo vadis?*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, 2020.
- [22] Y. Kim, I.G.H. Schmidt-Wolf, *Gentherapie in Deutschland: Von der ersten klinischen Studie bis heute*, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 140 (2015) 684-686. <https://doi.org/10.1055/s-0041-101663>.
- [23] Rainer Radtke, *Top 50 Arzneimittel weltweit nach Umsatz im Jahr 2021, 2022*. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/312865/umfrage/arzneimittel-top-praeparate-weltweit-nach-umsatz/>.
- [24] G. Richter, M.D. Bacchetta, *Interventions in the human genome: some moral and ethical considerations*, *J. Med. Philos.* 23 (1998) 303-317. <https://doi.org/10.1076/jmep.23.3.303.2581>.
- [25] J.C. Fletcher, *Evolution of ethical debate about human gene therapy*, *Hum. Gene Ther.* 1 (1990) 55-68. <https://doi.org/10.1089/hum.1990.1.1-55>.
- [26] D.B. Resnik, P.J. Langer, *Human germline gene therapy reconsidered*, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001) 1449-1458. <https://doi.org/10.1089/104303401750298607>.
- [27] E.-B. Bröcker, *Gentherapie*, in: G. Plewig, B. Przybilla (Eds.), *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1997, pp. 50-54.
- [28] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J.-P. Benoit, *Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer*, *Biomaterials* 29 (2008) 3477-3496. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.036>.
- [29] W.F. Anderson, *Human gene therapy: scientific and ethical considerations*, *Recomb. DNA Tech. Bull.* 8 (1985) 55-63.
- [30] J. Schulze, J. Lehmann, S. Agel, M.U. Amin, J. Schaefer, U. Bakowsky, *In Ovo Testing Method for Inhalants on a Chorio-Allantoic Membrane*, *ACS Appl. Bio Mater.* 4 (2021) 7764-7768. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01016>.
- [31] J. Lehmann, M.R. Agel, K.H. Engelhardt, S.R. Pinnapireddy, S. Agel, L. Duse, E. Preis, M. Wojcik, U. Bakowsky, *Improvement of Pulmonary Photodynamic Therapy: Nebulisation of Curcumin-Loaded Tetraether Liposomes*, *Pharmaceutics* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081243>.

- [32] N. Adachi, K. Sato, A. Usas, F.H. Fu, M. Ochi, C.-W. Han, C. Niyibizi, J. Huard, Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 1920-1930.
- [33] A.G. Vulto, M.A.L. Pluim, Klinische gentherapie: genen op recept?, *Tijdschr. Diergeneeskd.* 127 (2002) 52-56.
- [34] S.C.-N. Chang, H.L. Chuang, Y.R. Chen, J.K. Chen, H.-Y. Chung, Y.-L. Lu, H.-Y. Lin, C.-L. Tai, J. Lou, Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration, *Gene Ther.* 10 (2003) 2013-2019. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302106>.
- [35] A.-K. Zaiss, Q. Liu, G.P. Bowen, N.C.W. Wong, J.S. Bartlett, D.A. Muruve, Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors, *J. Virol.* 76 (2002) 4580-4590. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4580-4590.2002>.
- [36] U.P. Davé, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, Gene therapy insertional mutagenesis insights, *Science* 303 (2004) 333. <https://doi.org/10.1126/science.1091667>.
- [37] U. Mock, L. Nickolay, B. Philip, G.W.-K. Cheung, H. Zhan, I.C.D. Johnston, A.D. Kaiser, K. Peggs, M. Pule, A.J. Thrasher, W. Qasim, Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy, *Cytotherapy* 18 (2016) 1002-1011. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.05.009>.
- [38] A. Fischer, S. Hacein-Bey-Abina, Gene therapy for severe combined immunodeficiencies and beyond, *J. Exp. Med.* 217 (2020). <https://doi.org/10.1084/jem.20190607>.
- [39] C. Manriquez-Roman, E.L. Siegler, S.S. Kenderian, CRISPR Takes the Front Seat in CART-Cell Development, *BioDrugs* 35 (2021) 113-124. <https://doi.org/10.1007/s40259-021-00473-y>.
- [40] F. Tucci, S. Scaramuzza, A. Aiuti, A. Mortellaro, Update on Clinical Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Inherited Monogenic Diseases, *Mol. Ther.* 29 (2021) 489-504. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.020>.
- [41] W. Walther, U. Stein, Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases, *Drugs* 60 (2000) 249-271. <https://doi.org/10.2165/00003495-200060020-00002>.
- [42] P. Mancheño-Corvo, P. Martín-Duque, Viral gene therapy, *Clin. Transl. Oncol.* 8 (2006) 858-867. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0149-y>.

- [43] L.S. Young, P.F. Searle, D. Onion, V. Mautner, Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application, *J. Pathol.* 208 (2006) 299-318.  
<https://doi.org/10.1002/path.1896>.
- [44] K. Lundstrom, *Viral Vectors in Gene Therapy*, *Diseases* 6 (2018).  
<https://doi.org/10.3390/diseases6020042>.
- [45] J.N. Warnock, C. Daigre, M. Al-Rubeai, Introduction to viral vectors, *Methods Mol. Biol.* 737 (2011) 1-25. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_1).
- [46] K. Lundstrom, Latest development in viral vectors for gene therapy, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 117-122. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00042-2).
- [47] Y.H. Chen, M.S. Keiser, B.L. Davidson, *Viral Vectors for Gene Transfer*, *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 8 (2018) e58. <https://doi.org/10.1002/cpmo.58>.
- [48] B. Semete, L.I.J. Booyesen, L. Kalombo, J.D. Venter, L. Katata, B. Ramalapa, J.A. Verschoor, H. Swai, In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249 (2010) 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.09.002>.
- [49] A.G. Schatzlein, Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress, *Anticancer. Drugs* 12 (2001) 275-304. <https://doi.org/10.1097/00001813-200104000-00001>.
- [50] J.L. Shirley, Y.P. de Jong, C. Terhorst, R.W. Herzog, Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors, *Mol. Ther.* 28 (2020) 709-722.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>.
- [51] *Gentherapie in Deutschland: Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme ; Themenband der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht*, 2nd ed., Forum W - Wiss. Verl., Dornburg, 2011.
- [52] M.A. Kay, J.C. Glorioso, L. Naldini, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics, *Nat. Med.* 7 (2001) 33-40.  
<https://doi.org/10.1038/83324>.
- [53] S.R. Pinnapireddy, L. Duse, B. Strehlow, J. Schäfer, U. Bakowsky, Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 158 (2017) 93-101.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.022>.
- [54] C.H. Sum, S.M. Shortall, S. Wong, S.D. Wettig, Non-viral Gene Delivery, *Experientia supplementum* (2012) 110 (2018) 3-68. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78259-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78259-1_2).

- [55] K. Kodama, Y. Katayama, Y. Shoji, H. Nakashima, The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 2155-2161. <https://doi.org/10.2174/092986706777935276>.
- [56] K. Itaka, K. Kataoka, Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.019>.
- [57] A. Wahane, A. Waghmode, A. Kappahn, K. Dhuri, A. Gupta, R. Bahal, Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25122866>.
- [58] Q. Muhammad, Y. Jang, S.H. Kang, J. Moon, W.J. Kim, H. Park, Modulation of immune responses with nanoparticles and reduction of their immunotoxicity, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 1490-1501. <https://doi.org/10.1039/c9bm01643k>.
- [59] R.B. Shmueli, D.G. Anderson, J.J. Green, Electrostatic surface modifications to improve gene delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 535-550. <https://doi.org/10.1517/17425241003603653>.
- [60] S.-D. Li, L. Huang, Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery, *Gene Ther.* 13 (2006) 1313-1319. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302838>.
- [61] H. Boulaiz, J.A. Marchal, J. Prados, C. Melguizo, A. Aránega, Non-viral and viral vectors for gene therapy, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 51 (2005) 3-22.
- [62] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145-160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>.
- [63] Y.S. Tarahovsky, G.R. Ivanitsky, Liposomes in gene therapy. Structural polymorphism of lipids and effectiveness of gene delivery, *Biochemistry (Mosc)* 63 (1998) 607-618.
- [64] H. Gao, K.M. Hui, Synthesis of a novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives, *Gene Ther.* 8 (2001) 855-863. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301471>.
- [65] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J. Control. Release* 114 (2006) 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.

- [66] I. Koltover, T. Salditt, J.O. Rädler, C.R. Safinya, An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science* 281 (1998) 78-81. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.78>.
- [67] Y. Hattori, S. Hu, H. Onishi, Effects of cationic lipids in cationic liposomes and disaccharides in the freeze-drying of siRNA lipoplexes on gene silencing in cells by reverse transfection, *J. Liposome Res.* 30 (2020) 235-245. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1630643>.
- [68] A. Hildebrand, K. Beyer, R. Neubert, P. Garidel, A. Blume, Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts, *J. Colloid Interface Sci.* 279 (2004) 559-571. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.06.085>.
- [69] C.R. Safinya, Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 440-448. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00230-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00230-x).
- [70] Y. Hattori, S. Suzuki, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in targeted gene delivery with mannosylated cationic liposomes via intravenous route, *J. Control. Release* 108 (2005) 484-495. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.08.012>.
- [71] A.P. Dabkowska, D.J. Barlow, A.V. Hughes, R.A. Campbell, P.J. Quinn, M.J. Lawrence, The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers, *J. R. Soc. Interface* 9 (2012) 548-561. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0356>.
- [72] S.C. Semple, A. Chonn, P.R. Cullis, Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes, *Biochemistry* 35 (1996) 2521-2525. <https://doi.org/10.1021/bi950414i>.
- [73] J.L. Thewalt, M. Bloom, Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams, *Biophysical Journal* 63 (1992) 1176-1181. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81681-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81681-8).
- [74] Y. Barenholz, Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *J. Control. Release* 160 (2012) 117-134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [75] J.V. Jokerst, T. Lobovkina, R.N. Zare, S.S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine (Lond)* 6 (2011) 715-728. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.19>.
- [76] Y. Bao, Y. Jin, P. Chivukula, J. Zhang, Y. Liu, J. Liu, J.-P. Clamme, R.I. Mahato, D. Ng, W. Ying, Y. Wang, L. Yu, Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of

- siRNA/lipid nanoparticle complexes, *Pharm. Res.* 30 (2013) 342-351.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-012-0874-6>.
- [77] X. Cheng, R.J. Lee, The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 99 (2016) 129-137.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.
- [78] Y.S. Tarahovsky, Cell transfection by DNA-lipid complexes - lipoplexes, *Biochemistry (Mosc)* 74 (2009) 1293-1304. <https://doi.org/10.1134/s0006297909120013>.
- [79] L. Wightman, R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, E. Wagner, Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo, *J. Gene Med.* 3 (2001) 362-372. <https://doi.org/10.1002/jgm.187>.
- [80] E. Ruoslahti, Y. Yamaguchi, Proteoglycans as modulators of growth factor activities, *Cell* 64 (1991) 867-869. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90308-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90308-1).
- [81] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W.S. Cheow, Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 427-443. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>.
- [82] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4429-4432.
- [83] J. Schäfer, S. Höbel, U. Bakowsky, A. Aigner, Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery, *Biomaterials* 31 (2010) 6892-6900.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.043>.
- [84] J. Suh, H.J. Paik, B.K. Hwang, Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's, *Bioorganic Chemistry* 22 (1994) 318-327.  
<https://doi.org/10.1006/bioo.1994.1025>.
- [85] M.X. Tang, F.C. Szoka, The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes, *Gene Ther.* 4 (1997) 823-832. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300454>.
- [86] M. Günther, J. Lipka, A. Malek, D. Gutsch, W. Kreyling, A. Aigner, Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 438-449. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.007>.
- [87] R.V. Benjaminsen, M.A. Matthebjerg, J.R. Henriksen, S.M. Moghimi, T.L. Andresen, The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH, *Mol. Ther.* 21 (2013) 149-157. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.185>.

- [88] G. ZUBER, Towards synthetic viruses, *Advanced Drug Delivery Reviews* 52 (2001) 245-253. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00213-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00213-7).
- [89] L.M.P. Vermeulen, S.C. de Smedt, K. Remaut, K. Braeckmans, The proton sponge hypothesis: Fable or fact?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 129 (2018) 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>.
- [90] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene Med.* 7 (2005) 992-1009. <https://doi.org/10.1002/jgm.773>.
- [91] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 5177-5181. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5177>.
- [92] H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr, D. Escande, Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7507-7511. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7507>.
- [93] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7297-7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- [94] D.J. Gary, J. Min, Y. Kim, K. Park, Y.-Y. Won, The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-based siRNA complexes, *Macromol. Biosci.* 13 (2013) 1059-1071. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300046>.
- [95] M. Rezaee, R.K. Oskuee, H. Nassirli, B. Malaekheh-Nikouei, Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems, *J. Control. Release* 236 (2016) 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.023>.
- [96] K. Juskiewicz, A.F. Sikorski, A. Czogalla, Building Blocks to Design Liposomal Delivery Systems, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21249559>.
- [97] A. Ewe, A. Schaper, S. Barnert, R. Schubert, A. Temme, U. Bakowsky, A. Aigner, Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2663-2673. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.037>.

- [98] Q.-Y. Zhang, P.Y. Ho, M.-J. Tu, J.L. Jilek, Q.-X. Chen, S. Zeng, A.-M. Yu, Lipidation of polyethylenimine-based polyplex increases serum stability of bioengineered RNAi agents and offers more consistent tumoral gene knockdown in vivo, *Int. J. Pharm.* 547 (2018) 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.026>.
- [99] J.M. Meissner, M. Toporkiewicz, A. Czogalla, L. Matuszewicz, K. Kuliczowski, A.F. Sikorski, Novel antisense therapeutics delivery systems: In vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody, *J. Control. Release* 220 (2015) 515-528. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.015>.
- [100] S.R. Pinnapireddy, L. Duse, B. Strehlow, J. Schäfer, U. Bakowsky, [Duplikat] [Duplikat] Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 158 (2017) 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.022>.
- [101] A. Ewe, O. Panchal, S.R. Pinnapireddy, U. Bakowsky, S. Przybylski, A. Temme, A. Aigner, Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo, *Nanomedicine* 13 (2017) 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.005>.
- [102] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.* 41 (2001) 189-207. [https://doi.org/10.1016/s0065-2571\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2571(00)00013-3).
- [103] B. Linder, U. Weirauch, A. Ewe, A. Uhmann, V. Seifert, M. Mittelbronn, P.N. Harter, A. Aigner, D. Kögel, Therapeutic Targeting of Stat3 Using Lipopolyplex Nanoparticle-Formulated siRNA in a Syngeneic Orthotopic Mouse Glioma Model, *Cancers (Basel)* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11030333>.
- [104] M.F. Attia, N. Anton, J. Wallyn, Z. Omran, T.F. Vandamme, An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites, *The Journal of pharmacy and pharmacology* 71 (2019) 1185-1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>.
- [105] M. Toporkiewicz, J. Meissner, L. Matuszewicz, A. Czogalla, A.F. Sikorski, Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges, *Int. J. Nanomedicine* 10 (2015) 1399-1414. <https://doi.org/10.2147/IJN.S74514>.

- [106] J. Yoo, C. Park, G. Yi, D. Lee, H. Koo, Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems, *Cancers (Basel)* 11 (2019).  
<https://doi.org/10.3390/cancers11050640>.
- [107] J. Jerzykiewicz, A. Czogalla, Polyethyleneimine-Based Lipopolyplexes as Carriers in Anticancer Gene Therapies, *Materials (Basel)* 15 (2021).  
<https://doi.org/10.3390/ma15010179>.
- [108] R.S. Williams, S.A. Johnston, M. Riedy, M.J. DeVit, S.G. McElligott, J.C. Sanford, Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 2726-2730.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2726>.
- [109] N.S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 9568-9572. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9568>.
- [110] S. Kuriyama, A. Mitoro, H. Tsujinoue, T. Nakatani, H. Yoshiji, T. Tsujimoto, M. Yamazaki, H. Fukui, Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun, *Gene Ther.* 7 (2000) 1132-1136.  
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301192>.
- [111] P. Christou, W.F. Swain, N.S. Yang, D.E. McCabe, Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 7500-7504. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7500>.
- [112] C. Kneuer, M. Sameti, E.G. Haltner, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.-M. Lehr, Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA, *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000) 257-261.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00435-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00435-4).
- [113] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.* 109 (2009) 259-302. <https://doi.org/10.1021/cr800409e>.
- [114] W.H. de Jong, P.J.A. Borm, Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards, *Int. J. Nanomedicine* 3 (2008) 133-149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>.
- [115] K.K. Sandhu, C.M. McIntosh, J.M. Simard, S.W. Smith, V.M. Rotello, Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 3-6. <https://doi.org/10.1021/bc015545c>.

- [116] M. Thomas, A.M. Klivanov, Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 9138-9143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1233634100>.
- [117] D. Luo, W.M. Saltzman, Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface, *Nat Biotechnol* 18 (2000) 893-895. <https://doi.org/10.1038/78523>.
- [118] I. Roy, T.Y. Ohulchansky, D.J. Bharali, H.E. Pudavar, R.A. Mistretta, N. Kaur, P.N. Prasad, Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 279-284. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408039101>.
- [119] C. Guo, R.A. Gemeinhart, Assessment of a modular transfection system based upon cellular localization of DNA, *Mol. Pharm.* 1 (2004) 309-316. <https://doi.org/10.1021/mp049969a>.
- [120] C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.M. Lehr, A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 926-932. <https://doi.org/10.1021/bc0000637>.
- [121] Y. Jin, S. Kannan, M. Wu, J.X. Zhao, Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells, *Chemical research in toxicology* 20 (2007) 1126-1133. <https://doi.org/10.1021/tx7001959>.
- [122] J. Brüßler, E. Marxer, A. Becker, R. Schubert, J. Schümmelfeder, C. Nimsky, U. Bakowsky, Correlation of structure and echogenicity of nanoscaled ultrasound contrast agents in vitro, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117 (2014) 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.029>.
- [123] G. Maret, P.E. Wolf, Multiple light scattering from disordered media. The effect of brownian motion of scatterers, *Z. Physik B - Condensed Matter* 65 (1987) 409-413. <https://doi.org/10.1007/BF01303762>.
- [124] C.F. Phelps, Dynamic light scattering, with application to chemistry, biology and physics, *Biochemical Education* 5 (1977) 22. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(77\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(77)90025-5).
- [125] J.T. Edward, Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation, *J. Chem. Educ.* 47 (1970) 261. <https://doi.org/10.1021/ed047p261>.

- [126] K. Sakai-Kato, K. Yoshida, K.-I. Izutsu, Effect of surface charge on the size-dependent cellular internalization of liposomes, *Chem. Phys. Lipids* 224 (2019) 104726. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.01.004>.
- [127] M.C. Smith, R.M. Crist, J.D. Clogston, S.E. McNeil, Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5779-5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>.
- [128] R.J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, Academic Press, 2013.
- [129] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, *J. Colloid Interface Sci.* 261 (2003) 402-410. [https://doi.org/10.1016/s0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9797(03)00142-5).
- [130] Binnig, Quate, Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930-933. <https://doi.org/10.1103/physrevlett.56.930>.
- [131] A. Knoll, R. Magerle, G. Krausch, Tapping Mode Atomic Force Microscopy on Polymers: Where Is the True Sample Surface?, *Macromolecules* 34 (2001) 4159-4165. <https://doi.org/10.1021/ma001311x>.
- [132] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>.
- [133] J. McCauley, A. Zivanovic, D. Skropeta, Bioassays for anticancer activities, *Methods Mol. Biol.* 1055 (2013) 191-205. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14).
- [134] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in: *Cancer Cell Culture*, Humana Press, 2011, pp. 237-245.
- [135] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W.S. Cheow, Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 427-443. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>.
- [136] E. Wagner, Polymers for nucleic acid transfer-an overview, *Adv. Genet.* 88 (2014) 231-261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00008-0>.
- [137] B. Brissault, C. Leborgne, C. Guis, O. Danos, H. Cheradame, A. Kichler, Linear topology confers in vivo gene transfer activity to polyethylenimines, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 759-765. <https://doi.org/10.1021/bc050287v>.

- [138] G.D. JONES, A. LANGSJOEN, S.M.M.C. NEUMANN, J. ZOMLEFER, THE POLYMERIZATION OF ETHYLENIMINE, *J. Org. Chem.* 09 (1944) 125-147.  
<https://doi.org/10.1021/jo01184a002>.
- [139] D.D. Dunlap, A. Maggi, M.R. Soria, L. Monaco, Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3095-3101.  
<https://doi.org/10.1093/nar/25.15.3095>.
- [140] T. Reschel, C. Konák, D. Oupický, L.W. Seymour, K. Ulbrich, Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations, *J. Control. Release* 81 (2002) 201-217.  
[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00045-7).
- [141] S.-M. Zou, P. Erbacher, J.-S. Remy, J.-P. Behr, Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse, *J. Gene Med.* 2 (2000) 128-134.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-2254\(200003/04\)2:2<128:AID-JGM95>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-2254(200003/04)2:2<128:AID-JGM95>3.0.CO;2-W).
- [142] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsässer, T. Kissel, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1273-1279. <https://doi.org/10.1023/a:1014861900478>.
- [143] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials* 24 (2003) 1121-1131. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00445-3).
- [144] W.T. Godbey, M.A. Barry, P. Saggau, K.K. Wu, A.G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 321-328. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<321:aid-jbm5>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<321:aid-jbm5>3.0.co;2-r).
- [145] A.M. Mebert, C.J. Baglolle, M.F. Desimone, D. Maysinger, Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity, *Food Chem. Toxicol.* 109 (2017) 753-770.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.054>.
- [146] E.G. Vrieling, Q. Sun, T.P.M. Beelen, S. Hazelaar, W.W.C. Gieskes, R.A. van Santen, N.A.J.M. Sommerdijk, Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2005) 68-78.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2005.010>.
- [147] C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.M. Lehr, [Duplikat] A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-

- nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 926-932. <https://doi.org/10.1021/bc0000637>.
- [148] M.N.V. Ravi Kumar, M. Sameti, S.S. Mohapatra, X. Kong, R.F. Lockey, U. Bakowsky, G. Lindenblatt, H. Schmidt, C.M. Lehr, [Duplikat] Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4 (2004) 876-881. <https://doi.org/10.1166/jnn.2004.120>.
- [149] A. Watermann, J. Brieger, Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer, *Nanomaterials (Basel)* 7 (2017). <https://doi.org/10.3390/nano7070189>.
- [150] A. Wahane, A. Waghmode, A. Kapphahn, K. Dhuri, A. Gupta, R. Bahal, [Duplikat] Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25122866>.
- [151] X. Yang, H. Tang, K. Cao, H. Song, W. Sheng, Q. Wu, Templated-assisted one-dimensional silica nanotubes: synthesis and applications, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 6122. <https://doi.org/10.1039/c0jm04516k>.
- [152] K.K. Bansal, D.K. Mishra, A. Rosling, J.M. Rosenholm, Therapeutic Potential of Polymer-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles, *Applied Sciences* 10 (2020) 289. <https://doi.org/10.3390/app10010289>.
- [153] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications, *Nano Res.* 1 (2008) 99-115. <https://doi.org/10.1007/s12274-008-8018-3>.
- [154] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic: An update, *Bioeng. Transl. Med.* 4 (2019) e10143. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>.
- [155] A. Barkat, S. Beg, S.K. Panda, K. S Alharbi, M. Rahman, F.J. Ahmed, Functionalized mesoporous silica nanoparticles in anticancer therapeutics, *Semin. Cancer Biol.* 69 (2021) 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.022>.
- [156] E. Phillips, O. Penate-Medina, P.B. Zanzonico, R.D. Carvajal, P. Mohan, Y. Ye, J. Humm, M. Gönen, H. Kalaigian, H. Schöder, H.W. Strauss, S.M. Larson, U. Wiesner, M.S. Bradbury, Clinical translation of an ultras-small inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 260ra149. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009524>.

- [157] A.S. Levina, M.N. Repkova, Z.R. Ismagilov, V.F. Zarytova, Methods of the Synthesis of Silicon-Containing Nanoparticles Intended for Nucleic Acid Delivery, *Eurasian Chem. Tech. J.* 20 (2018) 177. <https://doi.org/10.18321/ectj720>.
- [158] X. Du, F. Kleitz, X. Li, H. Huang, X. Zhang, S.-Z. Qiao, Disulfide-Bridged Organosilica Frameworks: Designed, Synthesis, Redox-Triggered Biodegradation, and Nanobiomedical Applications, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1707325. <https://doi.org/10.1002/adfm.201707325>.
- [159] T.M. Mukherjee, K. Smith, J.G. Swift, Scope of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and freeze fracture technique in diagnostic cytology of effusions, *Scan. Electron Microsc.* (1983) 1317-1327.
- [160] K.E. Carr, P.G. Toner, K.M. Saleh, Scanning electron microscopy, *Histopathology* 6 (1982) 3-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1982.tb02698.x>.
- [161] D.C. Joy, J.B. Pawley, High-resolution scanning electron microscopy, *Ultramicroscopy* 47 (1992) 80-100. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(92\)90186-N](https://doi.org/10.1016/0304-3991(92)90186-N).
- [162] M. Lindroth, P.B. Bell, B.A. Fredriksson, X.D. Liu, Preservation and visualization of molecular structure in detergent-extracted whole mounts of cultured cells, *Microsc. Res. Tech.* 22 (1992) 130-150. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070220203>.
- [163] P.B. Bell, M. Lindroth, B.A. Fredriksson, Use of sputter coating to prepare whole mounts of cytoskeletons for transmission and high-resolution scanning and scanning transmission electron microscopy, *J. Electron Microsc. Tech.* 7 (1987) 149-159. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060070302>.
- [164] O. SMITHIES, Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults, *Biochem. J.* 61 (1955) 629-641. <https://doi.org/10.1042/bj0610629>.
- [165] S. Adkins, M. Burmeister, Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 17-23. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0325>.
- [166] N.C. Stellwagen, Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution, *Electrophoresis* 30 Suppl 1 (2009) S188-95. <https://doi.org/10.1002/elps.200900052>.
- [167] C. Aaij, P. Borst, The gel electrophoresis of DNA, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (1972) 192-200. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90426-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90426-1).

- [168] M. Chalfie, Green fluorescent protein, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 651-656.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x>.
- [169] R.S. Dwyer, J.C. Malinverni, D. Boyd, J. Beckwith, T.J. Silhavy, Folding LacZ in the periplasm of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 3343-3350.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01843-14>.
- [170] C. Folgueira, J.M. Requena, Pitfalls of the CAT reporter gene for analyzing translational regulation in *Leishmania*, *Parasitol. Res.* 101 (2007) 1449-1452.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0640-6>.
- [171] S.M. Marques, J.C.G. Da Esteves Silva, Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions, *IUBMB Life* 61 (2009) 6-17.  
<https://doi.org/10.1002/iub.134>.
- [172] J.P. Yang, L. Huang, Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA, *Gene Ther.* 3 (1996) 542-548.
- [173] N. Iwabe, K. Kuma, M. Hasegawa, S. Osawa, T. Miyata, Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 9355-9359.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9355>.
- [174] O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical principles and methods*, Rev. ed., World Scientific, New Jersey, NJ, 2012.
- [175] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 319-337.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2014.953051>.
- [176] G. Orts-Gil, K. Natte, D. Drescher, H. Bresch, A. Manton, J. Kneipp, W. Österle, Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates, *J Nanopart Res* 13 (2011) 1593-1604. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9910-9>.
- [177] R.J. Cristiano, L.C. Smith, M.A. Kay, B.R. Brinkley, S.L. Woo, Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 11548-11552.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11548>.
- [178] T. Provder, Challenges in particle size distribution measurement past, present and for the 21st century, *Progress in Organic Coatings* 32 (1997) 143-153.  
[https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(97\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(97)00043-X).

- [179] A. Malek, O. Merkel, L. Fink, F. Czubyko, T. Kissel, A. Aigner, In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236 (2009) 97-108.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.014>.
- [180] G. Orts-Gil, K. Natte, D. Drescher, H. Bresch, A. Manton, J. Kneipp, W. Österle, [Duplikat] Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates, *J Nanopart Res* 13 (2011) 1593-1604.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9910-9>.
- [181] R. Jevprasesphant, The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers, *International Journal of Pharmaceutics* 252 (2003) 263-266.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00623-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00623-3).
- [182] P. Chollet, M.C. Favrot, A. Hurbin, J.-L. Coll, Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes, *J. Gene Med.* 4 (2002) 84-91.  
<https://doi.org/10.1002/jgm.237>.
- [183] B.I. Florea, C. Meaney, H.E. Junginger, G. Borchard, Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures, *AAPS PharmSci* 4 (2002) E12. <https://doi.org/10.1208/ps040312>.
- [184] Y. Yue, F. Jin, R. Deng, J. Cai, Z. Dai, M.C.M. Lin, H.-F. Kung, M.A. Matthebjerg, T.L. Andresen, C. Wu, Revisit complexation between DNA and polyethylenimine--effect of length of free polycationic chains on gene transfection, *J. Control. Release* 152 (2011) 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.020>.
- [185] S. Boeckle, K. von Gersdorff, S. van der Piepen, C. Culmsee, E. Wagner, M. Ogris, Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer, *J. Gene Med.* 6 (2004) 1102-1111. <https://doi.org/10.1002/jgm.598>.
- [186] J. Moan, Q. Peng, An outline of the hundred-year history of PDT, *Anticancer Res.* 23 (2003) 3591-3600.
- [187] Q. Zhang, L. Li, Photodynamic combinational therapy in cancer treatment, *J. BUON.* 23 (2018) 561-567.
- [188] A.M. Rkein, D.M. Ozog, Photodynamic therapy, *Dermatol. Clin.* 32 (2014) 415-25, x. <https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009>.
- [189] G.B. Kharkwal, S.K. Sharma, Y.-Y. Huang, T. Dai, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for infections: clinical applications, *Lasers Surg. Med.* 43 (2011) 755-767.  
<https://doi.org/10.1002/lsm.21080>.

- [190] H. Abrahamse, M.R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.* 473 (2016) 347-364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- [191] E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds, Nanodrug applications in photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 8 (2011) 14-29. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>.
- [192] S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh, Current states and future views in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 12 (2011) 46-67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>.
- [193] L. Duse, S.R. Pinnapireddy, B. Strehlow, J. Jedelská, U. Bakowsky, Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126 (2018) 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.005>.
- [194] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098-1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- [195] F. Schmitt, L. Juillerat-Jeanerret, Drug targeting strategies for photodynamic therapy, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 12 (2012) 500-525. <https://doi.org/10.2174/187152012800617830>.
- [196] T.A. Debele, S. Peng, H.-C. Tsai, Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 22094-22136. <https://doi.org/10.3390/ijms160922094>.
- [197] S.A. Fahmy, H.M.E.-S. Azzazy, J. Schaefer, Liposome Photosensitizer Formulations for Effective Cancer Photodynamic Therapy, *Pharmaceutics* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091345>.
- [198] S. Moghassemi, A. Dadashzadeh, R.B. Azevedo, O. Feron, C.A. Amorim, Photodynamic cancer therapy using liposomes as an advanced vesicular photosensitizer delivery system, *J. Control. Release* 339 (2021) 75-90. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.09.024>.
- [199] M.A. Deluca, *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications*, Elsevier Science, Burlington, 2013.
- [200] E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux, Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16 (2018) 551-564. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>.

- [201] A.J. Syed, J.C. Anderson, Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond, *Chem. Soc. Rev.* 50 (2021) 5668-5705. <https://doi.org/10.1039/d0cs01492c>.
- [202] M. Bancirova, J. Lasovský, The photodynamic effect: the comparison of chemiexcitation by luminol and phthalhydrazide, *Luminescence* 26 (2011) 410-415. <https://doi.org/10.1002/bio.1245>.
- [203] R.W. Redmond, J.N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 391-475.
- [204] D. Bartusik-Aebisher, Ł. Ożóg, D. Aebisher, Alternative methods of photodynamic therapy and oxygen consumption measurements-A review, *Biomed. Pharmacother.* 134 (2021) 111095. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111095>.
- [205] N.T. Blum, Y. Zhang, J. Qu, J. Lin, P. Huang, Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 594491. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594491>.
- [206] C.-Y. Hsu, C.-W. Chen, H.-P. Yu, Y.-F. Lin, P.-S. Lai, Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy, *Biomaterials* 34 (2013) 1204-1212. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.044>.
- [207] C.M. Magalhães, J.C.G. Esteves da Silva, L. Pinto da Silva, Chemiluminescence and Bioluminescence as an Excitation Source in the Photodynamic Therapy of Cancer: A Critical Review, *Chemphyschem* 17 (2016) 2286-2294. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600270>.
- [208] T. Theodossiou, J.S. Hothersall, E.A. Woods, K. Okkenhaug, J. Jacobson, A.J. MacRobert, Firefly luciferin-activated rose bengal: In vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 1818-1821.
- [209] N. Nakajima, N. Kawashima, A basic study on hypericin-PDT in vitro, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 9 (2012) 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2012.01.008>.
- [210] A. Vogler, Fluorescence spectra of complexes of hypericin with s2 metal cations, *Inorganic Chemistry Communications* 54 (2015) 61-62. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2015.02.012>.
- [211] X. Zhang, B. Jin, W. Zheng, N. Zhang, X. Liu, T. Bing, Y. Wei, F. Wang, D. Shangguan, Interaction of hypericin with guanine-rich DNA: Preferential binding to

- parallel G-Quadruplexes, *Dyes and Pigments* 132 (2016) 405-411.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.05.009>.
- [212] P. Miskovsky, Hypericin--a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules, *Curr. Drug Targets* 3 (2002) 55-84.
- [213] X. Dong, Y. Zeng, Z. Zhang, J. Fu, L. You, Y. He, Y. Hao, Z. Gu, Z. Yu, C. Qu, X. Yin, J. Ni, L.J. Cruz, Hypericin-mediated photodynamic therapy for the treatment of cancer: a review, *The Journal of pharmacy and pharmacology* 73 (2021) 425-436.  
<https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa018>.
- [214] R.W. Redmond, J.N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 391-475.
- [215] N. Plenagl, L. Duse, B.S. Seitz, N. Goergen, S.R. Pinnapireddy, J. Jedelska, J. Brüßler, U. Bakowsky, Photodynamic therapy - hypericin tetraether liposome conjugates and their antitumor and antiangiogenic activity, *Drug Deliv.* 26 (2019) 23-33.  
<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1531954>.
- [216] N. Plenagl, B.S. Seitz, L. Duse, S.R. Pinnapireddy, J. Jedelska, J. Brüßler, U. Bakowsky, Hypericin inclusion complexes encapsulated in liposomes for antimicrobial photodynamic therapy, *Int. J. Pharm.* 570 (2019) 118666.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118666>.
- [217] J. Ng, N. Henriquez, A. MacRobert, N. Kitchen, N. Williams, S. Bown, Bioluminescence-activated photodynamic therapy for luciferase transfected, grade 4 astrocytoma cells in vitro, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 38 (2022) 102856.  
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102856>.
- [218] H.H. Seliger, W.D. McElroy, THE COLORS OF FIREFLY BIOLUMINESCENCE: ENZYME CONFIGURATION AND SPECIES SPECIFICITY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52 (1964) 75-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.52.1.75>.
- [219] D.R. Gill, L.A. Davies, I.A. Pringle, S.C. Hyde, The development of gene therapy for diseases of the lung, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 355-368.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3317-z>.
- [220] M. Kolb, G. Martin, M. Medina, K. Ask, J. Gauldie, Gene therapy for pulmonary diseases, *Chest* 130 (2006) 879-884. <https://doi.org/10.1378/chest.130.3.879>.
- [221] Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered DNA-polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and ···, 2003.

- [222] A.R. Martin, W.H. Finlay, Nebulizers for drug delivery to the lungs, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 889-900. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.995087>.
- [223] R.B. Dunne, S. Shortt, Comparison of bronchodilator administration with vibrating mesh nebulizer and standard jet nebulizer in the emergency department, *Am. J. Emerg. Med.* 36 (2018) 641-646. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2017.10.067>.
- [224] M. Otto, Y. Kropp, L. Kummer, M. Thiel, C. Tsagogiorgas, Können Mesh-Vernebler die prähospitale Aerosoltherapie verbessern? Eine In-vitro-Studie an simulierten Notfallpatient\*innen mit Atemnot, *Anaesthesiologie* 71 (2022) 758-766. <https://doi.org/10.1007/s00101-022-01183-y>.
- [225] A. Bohr, M. Beck-Broichsitter, Generation of tailored aerosols for inhalative drug delivery employing recent vibrating-mesh nebulizer systems, *Ther. Deliv.* 6 (2015) 621-636. <https://doi.org/10.4155/tde.15.18>.
- [226] L. Peraro, J.A. Kritzer, Neue Methoden und Designprinzipien für zellgängige Peptide, *Angewandte Chemie* 130 (2018) 12042-12057. <https://doi.org/10.1002/ange.201801361>.
- [227] V. Sokolova, M. Epple, Anorganische Nanopartikel zum Transport von Nucleinsäuren in Zellen, *Angew. Chem.* 120 (2008) 1402-1416. <https://doi.org/10.1002/ange.200703039>.
- [228] A.U. Andar, R.R. Hood, W.N. Vreeland, D.L. DeVoe, P.W. Swaan, Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms, *Pharm Res* 31 (2014) 401-413. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1171-8>.
- [229] M.S. Muthu, S.A. Kulkarni, J. Xiong, S.-S. Feng, Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 332-340. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.045>.
- [230] A. Nagayasu, K. Uchiyama, H. Kiwada, The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 75-87. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(99\)00041-1](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(99)00041-1).
- [231] D.J. Woodbury, E.S. Richardson, A.W. Grigg, R.D. Welling, B.H. Knudson, Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions, *J. Liposome Res.* 16 (2006) 57-80. <https://doi.org/10.1080/08982100500528842>.
- [232] T. Yamaguchi, M. Nomura, T. Matsuoka, S. Koda, Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome, *Chem. Phys. Lipids* 160 (2009) 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.04.002>.

- [233] P. Leskinen, M. Virta, M. Karp, One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast, *Yeast* 20 (2003) 1109-1113. <https://doi.org/10.1002/yea.1024>.
- [234] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 380-387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [235] M.L. Schipper, M.R. Patel, S.S. Gambhir, Evaluation of firefly luciferase bioluminescence mediated photodynamic toxicity in cancer cells, *Mol. Imaging Biol.* 8 (2006) 218-225. <https://doi.org/10.1007/s11307-006-0048-1>.
- [236] M.L. Schipper, M.R. Patel, S.S. Gambhir, Evaluation of firefly luciferase bioluminescence mediated photodynamic toxicity in cancer cells, *Mol. Imaging Biol.* 8 (2006) 218-225. <https://doi.org/10.1007/s11307-006-0048-1>.
- [237] D.E. Jenkins, Y.S. Hornig, Y. Oei, J. Dusich, T. Purchio, Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice, *Breast Cancer Res* 7 (2005) R444-54. <https://doi.org/10.1186/bcr1026>.
- [238] T. Troy, D. Jekic-McMullen, L. Sambucetti, B. Rice, Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models, *Mol Imaging* 3 (2004) 153535002004031. <https://doi.org/10.1162/15353500200403196>.
- [239] S. Gerscher, J.P. Connelly, G.M. van Beijersbergen Henegouwen, A.J. MacRobert, P. Watt, L.E. Rhodes, A quantitative assessment of protoporphyrin IX metabolism and phototoxicity in human skin following dose-controlled delivery of the prodrugs 5-aminolaevulinic acid and 5-aminolaevulinic acid-n-pentylester, *Br. J. Dermatol.* 144 (2001) 983-990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04186.x>.
- [240] L. Xu, X. Zhang, W. Cheng, Y. Wang, K. Yi, Z. Wang, Y. Zhang, L. Shao, T. Zhao, Hypericin-photodynamic therapy inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells through induction of apoptosis and suppression of viral transcription, *Retrovirology* 16 (2019) 5. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0467-0>.
- [241] Di Fan, T. Wang, J. Hu, L. Zhou, J. Zhou, S. Wei, Plasmid DNA-Based Bioluminescence-Activated System for Photodynamic Therapy in Cancer Treatment, *ChemMedChem* 16 (2021) 1967-1974. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000979>.
- [242] H.-H. Yu, Q.-P. Deng, Q.-H. Zheng, Y. Wang, J. Shen, J.-H. Zhou, Hypericin nanoparticles for self-illuminated photodynamic cytotoxicity based on bioluminescence resonance energy transfer, *Int. J. Pharm.* 620 (2022) 121738. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121738>.

- [243] P. Corbeau, Interfering RNA and HIV: reciprocal interferences, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000162. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000162>.
- [244] T.A. Volpe, C. Kidner, I.M. Hall, G. Teng, S.I.S. Grewal, R.A. Martienssen, Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi, *Science* 297 (2002) 1833-1837. <https://doi.org/10.1126/science.1074973>.
- [245] Y. Tomari, C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, P.D. Zamore, A protein sensor for siRNA asymmetry, *Science* 306 (2004) 1377-1380. <https://doi.org/10.1126/science.1102755>.
- [246] D.S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P.D. Zamore, Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell* 115 (2003) 199-208. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00759-1).
- [247] N. Agrawal, P.V.N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K. Mukherjee, RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 657-685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>.
- [248] H.J. Ditzel, M. Tuttolomondo, S. Kauppinen, *Design and Delivery of SiRNA Therapeutics*, Springer, New York, NY, 2021.
- [249] M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H.J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature* 464 (2010) 1067-1070. <https://doi.org/10.1038/nature08956>.
- [250] M.E. Kleinman, K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J.Z. Baffi, R.J.C. Albuquerque, S. Yamasaki, M. Itaya, Y. Pan, B. Appukuttan, D. Gibbs, Z. Yang, K. Karikó, B.K. Ambati, T.A. Wilgus, L.A. DiPietro, E. Sakurai, K. Zhang, J.R. Smith, E.W. Taylor, J. Ambati, Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3, *Nature* 452 (2008) 591-597. <https://doi.org/10.1038/nature06765>.
- [251] S.M. Hoy, Patisiran: First Global Approval, *Drugs* 78 (2018) 1625-1631. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>.
- [252] J. Yang, Patisiran for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 12 (2019) 95-99. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1567326>.
- [253] L.J. Scott, Givosiran: First Approval, *Drugs* 80 (2020) 335-339. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0>.

- [254] R.A. Naqvi, D. Shukla, A.R. Naqvi, SARS-CoV-2 targeting by RNAi and host complement inhibition: A two-pronged subterfuge for COVID-19 treatment, *Immun. Inflamm. Dis.* 10 (2022) 22-25. <https://doi.org/10.1002/iid3.549>.
- [255] R.L. Setten, J.J. Rossi, S.-P. Han, The current state and future directions of RNAi-based therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 421-446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>.
- [256] S. Essex, G. Navarro, P. Sabhachandani, A. Chordia, M. Trivedi, S. Movassaghian, V.P. Torchilin, Phospholipid-modified PEI-based nanocarriers for in vivo siRNA therapeutics against multidrug-resistant tumors, *Gene Ther.* 22 (2015) 257-266. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.97>.
- [257] T. Ozben, Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2903-2909. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.020>.
- [258] C. Chen, J.E. Chin, K. Ueda, D.P. Clark, I. Pastan, M.M. Gottesman, I.B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell* 47 (1986) 381-389. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90595-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90595-7).
- [259] S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh, J. Behravan, S. Arabzadeh, Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors, *Life Sci.* 214 (2018) 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>.
- [260] M. Tabata, M. Tsubaki, T. Takeda, K. Tateishi, K. Tsurushima, M. Imano, T. Satou, T. Ishizaka, S. Nishida, Dasatinib reverses drug resistance by downregulating MDR1 and Survivin in Burkitt lymphoma cells, *BMC Complement. Med. Ther.* 20 (2020) 84. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2879-8>.
- [261] 670. P-Glycoprotein Knock-Down by Chitosan/MDR1-siRNA Nanoparticles Increases Sensitivity to Chemotherapeutics, *Molecular Therapy* 22 (2014) S259. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(16\)35683-0](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)35683-0).
- [262] S.-Y. Katoh, M. Ueno, N. Takakura, Involvement of MDR1 function in proliferation of tumour cells, *J. Biochem.* 143 (2008) 517-524. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm242>.
- [263] F. Zhang, H. Zhang, Z. Wang, M. Yu, R. Tian, W. Ji, Y. Yang, R. Niu, P-glycoprotein associates with Anxa2 and promotes invasion in multidrug resistant breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 87 (2014) 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.003>.
- [264] S.P. Cole, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan, R.G. Deeley, Overexpression of a transporter gene in

- a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258 (1992) 1650-1654.  
<https://doi.org/10.1126/science.1360704>.
- [265] M. Yamauchi, H. Kumazawa, T. Satta, I. Sugawara, K. Isobe, Y. Kodera, K. Ito, T. Watanabe, H. Takagi, Prediction of doxorubicin resistance in gastrointestinal cancer by P-glycoprotein staining, *Eur. J. Cancer* 28A (1992) 1422-1427.  
[https://doi.org/10.1016/0959-8049\(92\)90536-b](https://doi.org/10.1016/0959-8049(92)90536-b).
- [266] L. O'Driscoll, M. Clynes, Biomarkers and multiple drug resistance in breast cancer, *Curr. Cancer Drug Targets* 6 (2006) 365-384.  
<https://doi.org/10.2174/156800906777723958>.
- [267] Y. He, Y. Bi, Y. Hua, D. Liu, S. Wen, Q. Wang, M. Li, J. Zhu, T. Lin, D. He, X. Li, Z. Wang, G. Wei, Ultrasound microbubble-mediated delivery of the siRNAs targeting MDR1 reduces drug resistance of yolk sac carcinoma L2 cells, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 104. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-104>.
- [268] C. Hilgendorf, H. Spahn-Langguth, M. Rhedin, C.-G. Regårdh, B. Löwenadler, P. Langguth, Selective downregulation of the MDR1 gene product in Caco-2 cells by stable transfection to prove its relevance in secretory drug transport, *Mol. Pharm.* 2 (2005) 64-73. <https://doi.org/10.1021/MP049931Y>.
- [269] G.-D. Pan, J.-Q. Yang, L.-N. Yan, G.-P. Chu, Q. Liu, Y. Xiao, L. Yuan, Reversal of multi-drug resistance by pSUPER-shRNA-mdr1 in vivo and in vitro, *World J. Gastroenterol.* 15 (2009) 431-440. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.431>.
- [270] C. Liu, G. Zhao, J. Liu, N. Ma, P. Chivukula, L. Perelman, K. Okada, Z. Chen, D. Gough, L. Yu, Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel, *J. Control. Release* 140 (2009) 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.013>.
- [271] S. Chan, K. Friedrichs, D. Noel, T. Pintér, S. van Belle, D. Vorobiof, R. Duarte, M. Gil Gil, I. Bodrogi, E. Murray, L. Yelle, G. von Minckwitz, S. Korec, P. Simmonds, F. Buzzi, R. González Mancha, G. Richardson, E. Walpole, M. Ronzoni, M. Murawsky, M. Alakl, A. Riva, J. Crown, Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer, *JCO* 17 (1999) 2341-2354.  
<https://doi.org/10.1200/jco.1999.17.8.2341>.
- [272] J.D. Cowan, J. Neidhart, S. McClure, C.A. Coltman, C. Gumbart, S. Martino, L.F. Hutchins, R.L. Stephens, C.B. Vaughan, C.K. Osborne, Randomized trial of doxorubicin,

- bisantrene, and mitoxantrone in advanced breast cancer: a Southwest Oncology Group study, *J Natl Cancer Inst* 83 (1991) 1077-1084. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.15.1077>.
- [273] V. Makwana, J. Karanjia, T. Haselhorst, S. Anoopkumar-Dukie, S. Rudrawar, Liposomal doxorubicin as targeted delivery platform: Current trends in surface functionalization, *Int. J. Pharm.* 593 (2021) 120117. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120117>.
- [274] S. Rivankar, An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy, *J. Cancer Res. Ther.* 10 (2014) 853-858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>.
- [275] L. Harris, G. Batist, R. Belt, D. Rovira, R. Navari, N. Azarnia, L. Welles, E. Winer, Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma, *Cancer* 94 (2002) 25-36. <https://doi.org/10.1002/cncr.10201>.
- [276] A. Apte, E. Koren, A. Koshkaryev, V.P. Torchilin, Doxorubicin in TAT peptide-modified multifunctional immunoliposomes demonstrates increased activity against both drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer models, *Cancer Biol. Ther.* 15 (2014) 69-80. <https://doi.org/10.4161/cbt.26609>.
- [277] S. Mirzaei, M.H. Gholami, F. Hashemi, A. Zabolian, M.V. Farahani, K. Hushmandi, A. Zarrabi, A. Goldman, M. Ashrafizadeh, G. Orive, Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects, *Drug Discov. Today* 27 (2022) 436-455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.020>.
- [278] X. Zhang, C. Hu, C.-Y. Kong, P. Song, H.-M. Wu, S.-C. Xu, Y.-P. Yuan, W. Deng, Z.-G. Ma, Q.-Z. Tang, FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT, *Cell Death Differ* 27 (2020) 540-555. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0372-z>.
- [279] J.T. Caleffi, M.C.E. Aal, H.d.O.M. Gallindo, G.H. Caxali, B.P. Crulhas, A.O. Ribeiro, G.R. Souza, F.K. Delella, Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances, *Life Sci.* 286 (2021) 120028. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120028>.
- [280] D.d.C. Antonino, M.M. Soares, J.d.M. Júnior, P.B. de Alvarenga, Mohallem, Renata de Freitas Ferreira, C.D. Rocha, L.A. Vieira, A.G. de Souza, M.E. Beletti, B.G. Alves, J.O. Jacomini, L.R. Goulart, K.A. Alves, Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model, *Reproductive BioMedicine Online* 38 (2019) 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013>.

- [281] W.L. Haisler, D.M. Timm, J.A. Gage, H. Tseng, T.C. Killian, G.R. Souza, Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1940-1949. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>.
- [282] National Institutes of Health, NIH Grantees Win 2008 Nobel Prize in Chemistry for the Discovery and Development of the Green Fluorescent Protein, GFP, 2015. [https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-grantees-win-2008-nobel-prize-chemistry-discovery-development-green-fluorescent-protein-gfp#:~:text=Osamu%20Shimomura%20first%20isolated%20GFP%20from%20the%20jellyfish,a%20luminous%20genetic%20tag%20for%20various%20biological%20phenomena.\(accessed 10 August 2022\)](https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-grantees-win-2008-nobel-prize-chemistry-discovery-development-green-fluorescent-protein-gfp#:~:text=Osamu%20Shimomura%20first%20isolated%20GFP%20from%20the%20jellyfish,a%20luminous%20genetic%20tag%20for%20various%20biological%20phenomena.(accessed%2010%20August%202022)).
- [283] D.M. Chudakov, M.V. Matz, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 1103-1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>.
- [284] D.M. Chudakov, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.10.005>.
- [285] R. Schneider, M. Borges, M. Kadyrov, Forskolin-induced differentiation of BeWo cells stimulates increased tumor growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the turkey (*Meleagris gallopavo*) egg, *Ann. Anat.* 193 (2011) 220-223. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.007>.
- [286] E. Preis, J. Schulze, B. Gutberlet, S.R. Pinnapireddy, J. Jedelská, U. Bakowsky, The chorioallantoic membrane as a bio-barrier model for the evaluation of nanoscale drug delivery systems for tumour therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews* 174 (2021) 317-336. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.022>.
- [287] D. Ribatti, The CAM assay in the study of the metastatic process, *Exp. Cell Res.* 400 (2021) 112510. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112510>.
- [288] D. Ribatti, The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay, *Reprod. Toxicol.* 70 (2017) 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.004>.
- [289] M.E. Alishahedani, M. Yadav, K.J. McCann, P. Gough, C.R. Castillo, J. Matriz, I.A. Myles, Therapeutic candidates for keloid scars identified by qualitative review of scratch assay research for wound healing, *PLoS One* 16 (2021) e0253669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253669>.

- [290] R. Kalluri, R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- [291] S. BOYDEN, The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes, *J. Exp. Med.* 115 (1962) 453-466. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.453>.
- [292] J. Marshall, Transwell(®) invasion assays, *Methods Mol. Biol.* 769 (2011) 97-110. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_8).
- [293] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [294] R. Kronstein-Wiedemann, T. Tonn, Colony Formation: An Assay of Hematopoietic Progenitor Cells, *Methods Mol. Biol.* 2017 (2019) 29-40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9574-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9574-5_3).
- [295] U.E. Gibson, C.A. Heid, P.M. Williams, A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res.* 6 (1996) 995-1001. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995>.
- [296] E.M. Wagner, Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR, *Methods Mol. Biol.* 1027 (2013) 19-45. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_2).
- [297] A. Lehmusvuori, A.-H. Tapio, P. Mäki-Teeri, K. Rantakokko-Jalava, Q. Wang, H. Takalo, T. Soukka, Homogeneous duplex polymerase chain reaction assay using switchable lanthanide fluorescence probes, *Anal. Biochem.* 436 (2013) 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.007>.
- [298] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263 (1994) 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>.
- [299] M. Paolillo, R. Colombo, M. Serra, L. Belvisi, A. Papetti, E. Ciusani, S. Comincini, S. Schinelli, Stem-Like Cancer Cells in a Dynamic 3D Culture System: A Model to Study Metastatic Cell Adhesion and Anti-Cancer Drugs, *Cells* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8111434>.
- [300] R. Montesano, G. Schaller, L. Orci, Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors, *Cell* 66 (1991) 697-711. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90115-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90115-F).
- [301] M. Simian, M.J. Bissell, Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 31-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>.

- [302] F.J. Sharom, Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function, *Front. Oncol.* 4 (2014) 41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00041>.
- [303] G. Bradley, V. Ling, P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression, *Cancer Metastasis Rev.* 13 (1994) 223-233. <https://doi.org/10.1007/BF00689638>.
- [304] I. Tariq, M.Y. Ali, H. Janga, S. Ali, M.U. Amin, G. Ambreen, U. Ali, S.R. Pinnapireddy, J. Schäfer, L.N. Schulte, U. Bakowsky, Downregulation of MDR 1 gene contributes to tyrosine kinase inhibitor induce apoptosis and reduction in tumor metastasis: A gravity to space investigation, *Int. J. Pharm.* 591 (2020) 119993. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119993>.
- [305] D. Duff, A. Long, Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion, *Cell. Signal.* 35 (2017) 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.005>.
- [306] C.R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, L.V. Yang, In vitro cell migration and invasion assays, *Journal of visualized experiments JoVE* (2014). <https://doi.org/10.3791/51046>.
- [307] H. Yamaguchi, J. Condeelis, Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 642-652. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.07.001>.
- [308] R. Li, C. Wu, H. Liang, Y. Zhao, C. Lin, X. Zhang, C. Ye, Knockdown of TWIST enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in doxorubicin-resistant HepG2 cells by suppressing MDR1 and EMT, *Int. J. Oncol.* 53 (2018) 1763-1773. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4495>.
- [309] Y.-H. Wang, Y. Imai, M. Shiseki, J. Tanaka, T. Motoji, Knockdown of the Wnt receptor Frizzled-1 (FZD1) reduces MDR1/P-glycoprotein expression in multidrug resistant leukemic cells and inhibits leukemic cell proliferation, *Leuk. Res.* 67 (2018) 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.01.020>.
- [310] D. Liu, J. Ke, Y. Liu, H. Rao, Z. Tang, Y. Liu, Z. Zhang, L. You, X. Luo, Z. Sun, Z. He, F. Li, Z. Qiu, J. Hu, M.N. Mbadhi, J. Tang, F. Wu, S. Li, The interaction between PDCD4 and YB1 is critical for cervical cancer stemness and cisplatin resistance, *Mol. Carcinog.* 60 (2021) 813-825. <https://doi.org/10.1002/mc.23345>.
- [311] I. Tariq, S.R. Pinnapireddy, L. Duse, M.Y. Ali, S. Ali, M.U. Amin, N. Goergen, J. Jedelská, J. Schäfer, U. Bakowsky, Lipodendriplexes: A promising nanocarrier for

- enhanced gene delivery with minimal cytotoxicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 135 (2019) 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.12.013>.
- [312] D. Yi, L. Xu, R. Wang, X. Lu, J. Sang, miR-381 overcomes cisplatin resistance in breast cancer by targeting MDR1, *Cell Biol. Int.* 43 (2019) 12-21. <https://doi.org/10.1002/cbin.11071>.
- [313] S.G. Creemers, P.M. van Koetsveld, W.W. de Herder, F. Dogan, G.J.H. Franssen, R.A. Feelders, L.J. Hofland, MDR1 inhibition increases sensitivity to doxorubicin and etoposide in adrenocortical cancer, *Endocr. Relat. Cancer* 26 (2019) 367-378. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0500>.
- [314] K. Machioka, K. Izumi, Y. Kadono, H. Iwamoto, R. Naito, T. Makino, S. Kadomoto, A. Natsagdorj, E.T. Keller, J. Zhang, A. Mizokami, Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines, *Oncotarget* 9 (2018) 16185-16196. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24609>.
- [315] M. Songbo, H. Lang, C. Xinyong, X. Bin, Z. Ping, S. Liang, Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Toxicol. Lett.* 307 (2019) 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.013>.
- [316] E. Tahover, Y.P. Patil, A.A. Gabizon, Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: focus on liposomes, *Anticancer. Drugs* 26 (2015) 241-258. <https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000182>.
- [317] M. Susa, A.K. Iyer, K. Ryu, F.J. Hornicek, H. Mankin, M.M. Amiji, Z. Duan, Doxorubicin loaded Polymeric Nanoparticulate Delivery System to overcome drug resistance in osteosarcoma, *BMC Cancer* 9 (2009) 399. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-399>.
- [318] B. Ouyang, W. Poon, Y.-N. Zhang, Z.P. Lin, B.R. Kingston, A.J. Tavares, Y. Zhang, J. Chen, M.S. Valic, A.M. Syed, P. MacMillan, J. Couture-Sen cal, G. Zheng, W.C.W. Chan, The dose threshold for nanoparticle tumour delivery, *Nat. Mater.* 19 (2020) 1362-1371. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0755-z>.
- [319] A. Shafei, W. El-Bakly, A. Sobhy, O. Wagdy, A. Reda, O. Aboelenin, A. Marzouk, K. El Habak, R. Mostafa, M.A. Ali, M. Ellithy, A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 1209-1218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.059>.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.1:** Anteile der verlorenen Lebensjahre (CELT-basiert) in Deutschland 1998 und 2018 für die jeweils 10 bedeutendsten Todesursachen gemäß Level 2 der Global-Burden-of-Disease-(GBD-)Klassifikation. Datenquelle: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) [7]. - 5 -

**Abbildung 1.2:** Volumen der Gentherapeutischen Arzneimittel, die sich in der präklinischen Vorregistrierungsphase befinden (1995–2018) [21] - 8 -

**Abbildung 1.3:** Zeitstrahl von den in der EU-Zulassungen Gentherapeutischen Arzneimittel. Berücksichtigt sind die Jahre 2010 bis 2022. Nach Angaben des Paul-Ehrlich-Institut. - 9 -

**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Unterschiede von ex-vivo und in-vivo Gentherapie am Beispiel der Applikation von Lipopolyplexen als Gentherapeutischer Vektor. - 11 -

**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung von verschiedenen Wegen der liposomalen Wirkstofffreisetzung. Liposomen können spezifisch (**a**) oder unspezifisch (**b**) an der Zelloberfläche adsorbieren oder mit der Zellmembran verschmelzen (**c**), um anschließend ihren Inhalt in das Zytoplasma freizusetzen. (**d**) zeigt die Destabilisierung des adsorbierten Liposoms durch Zellmembrankomponenten, der freigesetzte Wirkstoff kann die Zellmembran anschließend durch Mikropinozytose passieren. Liposomen können direkt oder Transferprotein-vermittelt Lipidkomponente mit der Zellmembran austauschen (**e**) oder über spezifische oder unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (**f**). Das Endosom wird anschließend zum Lysosom, aus dem die Wirkstofffreisetzung erfolgt (**g**), oder es folgt eine Endosomen-Destabilisierung (**h**), in dessen Folge es zur Lyse der Membranen kommt [62]. - 16 -

**Abbildung 1.6:** Synthese von bPEI und lPEI aus den jeweiligen Ausgangsstoffen Aziridin oder 2-Ethyl-2-Oxazolin. - 17 -

**Abbildung 1.7:** Strukturelle Darstellung des Aufbaus, der Beladung und der Modifikation von PEI-basierten Lipopolyplexen. (**a**) Aufbau von Polyplexen aus verzweigtem oder linearem PEI mit DNA/RNA. (**b**) Aufbau von Lipopolyplexen aus den kationischen Lipiden DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) und DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) mit Cholesterol. (**c**) Lipopolyplexe aus PEG-lierten Liposomen durch Verwendung von DSPE-PEG (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamin) konjugiert mit Polyethylenglykolketten. (**d**) Umgekehrte Lipopolyplexe, bei denen die Polyplexe kovalent an hydrophobe Anker (z. B. Triamcinolonacetonid) gebunden sind. (**e**) Lipopolyplex mit

Zielliganden (z. B. Antikörper, Transferrin, Aptamere), die durch modifizierte Lipide über Polyethylenglykol (PEG) an die Oberfläche konjugiert sind. - 19 -

**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Herstellung von Liposomen mit der Filmbildungsmethode und anschließenden Homogenisierung mit einem Extruder. - 32 -

**Abbildung 3.2:** Struktur der für die Liposomenherstellung verwendeten Lipide DOPE, DPPC und Cholesterol. - 33 -

**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Herstellung von Polyplexen sowie Lipopolyplexen unter Verwendung von pDNA, IPEI und Liposomen - 34 -

**Abbildung 3.4:** Skizze der zur Herstellung von Polyplexen und Lipopolyplexen benötigten Arbeitsschritte. - 35 -

**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Zetasizer Nano ZS mit einer Übersicht der Anordnung der einzelnen Bauteile. - 37 -

**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung eines Partikels und der Ionen in seinem Dispersionsmedium. An die negativ geladene Partikeloberfläche lagert sich eine Schicht Hydroxidionen an, darauf folgt eine Schicht Anionen. Gemeinsam bilden diese die Sternschicht aus. Darauf folgt die diffuse Schicht aus Anionen und Kationen. - 39 -

**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung einer Rasterkraftmikroskopiemessung. An der Spitze der AFM-Nadel befindet sich der sogenannte Cantilever. Ein Laser bestrahlt die Rückseite des Cantilevers, während dieser die Probe abtastet. Jede Auslenkungen wird so durch den Laserstrahl übertragen und von einer Photodiode detektiert. - 41 -

**Abbildung 3.8:** Farbreaktion des gelben, wasserlöslichen MTT-Salzes zum violetten, schwer wasserlöslichen Formazan. - 42 -

**Abbildung 4.1:** Strukturelle Darstellung von linearem PEI (links) und verzweigtem PEI (rechts). - 45 -

**Abbildung 4.2:** Strukturelle Darstellung eines Silica-Nanopartikels mit verschiedenen Beladungsvariationen (rechtes Drittel), Modifikationen zur Spezialisierung des Targetings (linkes Drittel) oder Verwendung für Bildgebende Verfahren (unteres Drittel) [145]. - 46 -

**Abbildung 4.3:** Herstellung und Beladung unseres Transfektionssystems. Silica-NP werden mit PEI verbunden, im Anschluss wird der Komplex mit pDNA beladen. Die einzelnen Herstellungsschritte erfolgen im Ultraschallbad. - 47 -

**Abbildung 4.4:** Abbildung der Luciferase-katalysierten Decarboxylierung von D-Luciferin zu Oxyluciferin, bei der Licht mit einem Emissionsmaximum von etwa 560 nm emittiert wird. - 52 -

**Abbildung 4.5:** Graphische Darstellung der Messergebnisse eines Zetasizer Nano. Die Partikelgrößenverteilung ist als Anzahl gewählt. A zeigt die Auswertung der Vermessung von selbst suspendierten SiO<sub>2</sub>-NP. B zeigt die Auswertung der Vermessung von Levasil® 200/40. C zeigt die Auswertung der Vermessung von Levasil®-PEI-Komplexe. Rot, grün und blau stellen die Graphen der drei aufeinander folgenden Einzelmessungen eines Messdurchlaufs dar.

- 55 -

**Abbildung 4.6:** Graphische Auswertung der Messergebnisse des hydrodynamischen Durchmessers bei Lagerung über einen längeren Zeitintervall bei 4° C. Grafik A zeigt den unbeladenen Vektor aus Levasil® und PEI. Grafik B zeigt den gleichen Vektor, der im Anschluss an die Herstellung mit pDNA beladen wurde. Alle Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 3 Messvorgängen dargestellt.

- 56 -

**Abbildung 4.7:** Aufnahme der Gelelektrophoresematrix mit Detektion der DNA durch Ethidiumbromid. A zeigt den Vergleich von ungebundener pDNA zu beladenen Silica-PEI-Vektoren auf 5 µg / ml, 7,5 µg / ml, 10 µg / ml Endkonzentration. B ist ein Kontrollversuch mit der optimalen Beladungsmenge an pDNA.

- 57 -

**Abbildung 4.8:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Levasil®-PEI-Komplexen im „intermittent contact“-Modus mit 0.5 bis 1.5 Hz. Für die Messungen wurde ein Cantilever NSC 14/AlBs mit pyramidalen Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Spitze verwendet. Die Kraftkonstante betrug 5 N/m, die Resonanzfrequenz 160 kHz. Bild A und B zeigen Aufnahmen von verschiedenen Konzentrationen derselben Probe.

- 58 -

**Abbildung 4.9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Levasil®-PEI-Komplexen (A) und Levasil®-PEI-DNA-Komplexen (B). Der weiße Maßstab in der unteren, rechten Ecke stellt 100 nm dar.

- 59 -

**Abbildung 4.10:** Auswertung des MTT-Assay an L929 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Levasil® (links) oder einer manuell hergestellten Silica-NP-Suspension (rechts). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

- 60 -

**Abbildung 4.11:** Auswertung des MTT-Assay an L929 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PEI mit 25 kDa (links) oder 2 kDa (rechts). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert.

- 61 -

**Abbildung 4.12:** Auswertung des MTT-Assay an L949 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen unseres Vektors aus Levasil® und PEI (25 kDa). Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung (1 %) verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. - 62 -

**Abbildung 4.13:** Transfektionseffizienz unseres Vektors komplexiert mit pCMV-luc an SK-OV-3 Zellen in drei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen. Polyplexe mit demselben N/P-Verhältnis dienten als Referenz. - 63 -

**Abbildung 5.1:** Vereinfachte Darstellung der Biolumineszenz induzierten PDT. Nach Transfektion mit pCMV-luc bildet die Zelle Luciferase. Diese wird in Peroxisomen transportiert, wo sie die Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches von dem Photosensitizer Hypericin absorbiert wird. Folglich kommt es zur Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zur Apoptose der Zelle führen. - 68 -

**Abbildung 5.2:** Strukturformel von Hypericin - 69 -

**Abbildung 5.3** [217]: Absorptionsspektrum von Hypericin über dem Emissionsspektrum von D-Luciferin. - 70 -

**Abbildung 5.4:** Schematische Darstellung der Herstellung von Lipopolyplexen. Als Ziel dieser Arbeit soll ein System entstehen, das sowohl alle Edukte der BL-Reaktion, als auch das entsprechende Gen, sowie den PS in die Zielzelle transportieren kann. - 72 -

**Abbildung 5.5:** Foto des verwendeten Aerogen® Solo Inhalators. Rechts in Verbindung mit einer modifizierten Combitips® advanced 50 µl-Pipettenspitze zur gerichteten Verneblung der Proben. - 73 -

**Abbildung 5.6:** Auswertung der Quantifizierung des emittierten Lichts mit einer Wellenlänge von 560 nm, dargestellt als RLU (relative Lichteinheiten) nach Zugabe unterschiedlicher Zubereitungen von D-Luciferin. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium verwendet. Die Messung der Emission erfolgte im Abstand von 0 h / 3,5 h / 4,5 h / 5,5 h und 24 h nach der Probezugabe. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ . - 78 -

**Abbildung 5.7:** Auswertung der Quantifizierung des emittierten Lichts mit einer Wellenlänge von 560 nm, dargestellt als RLU (relative Lichteinheiten) nach Zugabe unterschiedlicher Zubereitungen von D-Luciferin und Hypericin. Die Messung der Emission erfolgte im Abstand von 0 h / 3,5 h / 4,5 h / 5,5 h und 24 h nach der Probezugabe. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ . - 79 -

**Abbildung 5.8:** Auswertung des MTT-Assays an SK-OV-3 Zellen zur Überprüfung der Toxizität von D-Luciferin. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ . - 81 -

**Abbildung 5.9:** Auswertung des MTT-Assays an HeLa-LG Zellen zur Überprüfung der phototoxischen Wirksamkeit von Hypericin. Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ . - 82 -

**Abbildung 6.1:** Bildung des siRNA-induzierten Silencing-Komplexes (RISC) der doppelsträngigen siRNA mit Argonaute-Protein, Transactivation-Response-Binding-Protein (TRBP) und Dicer. Darauf folgt die Aktivierung des RISC durch asymmetrische Abwicklung des codogenen siRNA-Strangs. Durch den aktivierten RISC kommt es zur komplementären Bindung der adressierten mRNA, wodurch deren Translation verhindert wird. - 86 -

**Abbildung 6.2:** Mechanismus der Hemmung von MDR1 durch RNA-Interferenz am Beispiel von Doxorubicin. Durch die Bindung der MDR1-mRNA durch den RISC wird die Translation zum MDR1-Gen gehemmt. Daraus folgt eine Downregulierung der Expression von P-Glykoprotein, wodurch der aktive Transport von Doxorubicin aus der Zelle reduziert wird und die Konzentration an intrazellulärem Doxorubicin wieder ansteigt. - 88 -

**Abbildung 6.3:** Strukturformel von Doxorubicin mit dem Klassetypischen Anthrachinon-Grundgerüst. - 89 -

**Abbildung 6.4:** Schematische Abbildung der Herstellung von 3D-Tumor-Sphroiden durch elektromagnetischer Levitation nach vorangegangener Magnetisierung der Zellen mit NanoShuttle-PL®. - 92 -

**Abbildung 6.5:** Schematische Übersicht die Verwendung des Transwell Einsatzes in einer 6-Well Platte für die Durchführung des Migration Assays. - 96 -

**Abbildung 6.6:** Aufnahme der Gelelektrophoresematrix mit Detektion der DNA durch Ethidiumbromid. Als Proben wurden von links siMDR1, Polyplexe mit siMDR1 und Lipopolyplexe mit siMDR1 aufgetragen. - 101 -

**Abbildung 6.7:** Darstellung von Liposomen (A, A'), Polyplexen (B, B') und Lipopolyplexen (C, C') mit dem Rasterkraftmikroskop im „intermittent contact“-Modus mit 0.5 bis 1.5 Hz. Für die Messungen wurde ein Cantilever NSC 14/AIBs mit pyramidalen  $\text{Si}_3\text{N}_4$  Spitze verwendet. Die Kraftkonstante betrug 5 N/m, die Resonanzfrequenz 160 kHz. - 102 -

**Abbildung 6.8:** Aufnahme von SK-OV-3 Zellen nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Lichtmikroskop (CKX-53 Olympus) mit Fluoreszenzdetektionsfilter. Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug 1 µg / ml.

- 103 -

**Abbildung 6.9:** Aufnahme von 3D-Tumorsphäroiden aus Caco-2 Zellen nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Mikroskop (CKX-53 Olympus) mit Fluoreszenzdetektionsfilter. Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug 1 µg / ml.

- 104 -

**Abbildung 6.10:** Aufnahme der CAM nach der Transfektion von pCMV-GFP mit Lipopolyplexen (A) und Polyplexen (B) mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 700). Die eingesetzte pCMV-GFP-Konzentration betrug 1 µg / ml.

- 105 -

**Abbildung 6.11:** Mikroskopische Aufnahmen (CKX-53 Olympus) von SK-OV-3 Zellen. In die konfluente Zellschicht wurde zum Zeitpunkt 0 h eine Kerbe gekratzt. Vorangegangen wurden die Zellen mit siMDR1 durch Lipopolyplexen oder Polyplexe transfiziert (siRNA-Konzentration 36 nM). Als Kontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA.

- 106 -

**Abbildung 6.12:** Auswertung des Transwell-Migrations-Assay von Caco-2 Zellen nach Transfektion mit siMDR1 durch Lipopolyplexen (A) oder Polyplexe (B). Als Kontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA (C). Die Konzentration der eingesetzten siRNA betrug 36 nM.

- 107 -

**Abbildung 6.13:** Auswertung des Clonogenic Assays von Caco-2 Zellen nach Transfektion mit siMDR1 durch Lipopolyplexen (C) oder Polyplexe (B). Als Kontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer Kontroll-siRNA (A). Die Konzentration der eingesetzten siRNA betrug 36 nM. Die Auszählung der Kolonien erfolgte manuell, ein Zellverbund aus über 50 Zellen wurde als Kolonie gewertet. Die Auszählung erfolgte nach einem Wachstumsintervall von 14 Tagen.

- 108 -

**Abbildung 6.14:** Auswertung der Quantifizierung von MDR1 an SK-OV-3 Zellen als Verhältnis der spezifischen mRNA in Relation zu GAPDH als Referenz. Verglichen wurden Polyplexe (PP) und Lipopolyplexe (LPP) mit siMDR1. Als Negativkontrolle dienten Lipopolyplexe mit einer unspezifischen siRNA. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ .

- 109 -

**Abbildung 6.15:** Auswertung des MTT-Assays an SK-OV-3 Zellen zur Überprüfung der DOX-Sensitivität nach und ohne vorherigen MDR1-Knockdown. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium verwendet und für die Auswertung als 100 % Viabilität gesetzt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X Lösung 1 % verwendet und die Absorption als Blindwert von

allen Messwerten subtrahiert. Wahrscheinlichkeitswert [\*]  $p < 0,05$ , [\*\*]  $p < 0,01$  und [\*\*\*]  $p < 0,001$ . - 110 -

## 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1</b> .....	- 13 -
<b>Tabelle 3.1</b> .....	- 25 -
<b>Tabelle 3.2</b> .....	- 27 -
<b>Tabelle 3.3</b> .....	- 27 -
<b>Tabelle 3.4</b> .....	- 28 -
<b>Tabelle 3.5</b> .....	- 30 -
<b>Tabelle 3.6</b> .....	- 31 -
<b>Tabelle 3.7</b> .....	- 34 -
<b>Tabelle 4.1</b> .....	- 54 -
<b>Tabelle 5.1</b> .....	- 76 -
<b>Tabelle 6.1</b> .....	- 99 -
<b>Tabelle 6.2</b> .....	- 100 -

## 7.4 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

### **“ Genterapeutische Vektoren für die Tumorthherapie”**

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Gießen, 30. Januar 2023

.....  
Sascha Hubing

