Aus dem Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,

Kopf- und Halschirurgie, Phoniatrie und Pädaudiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Boris A. Stuck

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

Toxikologische Aspekte moderner nichtviraler Gen-Transfektionssysteme

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Patrick Schlote

aus Friedrichroda

Marburg, 2025

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

19.08.2025

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Hertl

Referent: Prof. Dr. med. Robert Mandic | Prof. Dr. rer. nat. Udo Bakowsky

Korreferent: Prof. Dr. Jens Kockskämper

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V
Abbildungsverzeichnis VII
Tabellenverzeichnis IX
1. Einführung 1
1.1 Gentherapie 1
1.2 RNA-Interferenz 3
1.3 Trägersysteme 5
1.4 Organisation des Genoms 10
1.5 Therapie im Genom und Beziehung zum Gendiagnostikgesetz 10
1.6 Toxikologische Eigenschaften 12
1.7 Hilfsstoffe zur Herstellung von Genvehikeln 15
1.7.1 Lipide und Liposomen 15
1.7.2 Positiv geladene Polymere und Polyplexe 16
1.8 Das Reportergen – pCMV-luc 19
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung 20
3. Material und Methoden 22
3.0 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software 22
3.1 Herstellung der Polyplexe 27
3.2 Herstellung der Liposomen und Lipopolyplexe 27
3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS) 30
3.4 Zeta-Potential 31
3.5 Rasterkraftmikroskopie 32
3.6 Kultivierung von SKOV-3 Zelllinien 34
3.7 MTT – Zellviabilitätstest 36
3.8 LDH – Zell Zytotoxizitätstest 37
3.9 Bestimmung der Transfektionseffizienz 38
3.10 Bestimmung des Proteingehaltes (Pierce BCA Protein Assay) 39
3.11 Bestimmung der Hämolyse 40
3.12 Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) 42
3.13 Statistische Auswertung 43
4. Ergebnisse 44
4.1 Polyplexe, Liposomen und Lipopolyplexe 44
4.1.1 Polyplexe 44
4.1.2 Liposomen und Lipopolyplexe 46

4.2 Physikalische Charakterisierung 47
4.2.1 Ergebnisse physikalische Charakterisierung der Polyplexe 47
4.2.2 Ergebnisse physikalische Charakterisierung der Lipopolyplexe 54
4.3. Bewertung der Toxizität 61
4.3.1 Ergebnisse Gerinnungszeit (aPTT) 63
4.3.2 Ergebnisse Hämolyse 64
4.3.3 Ergebnisse MTT-Zell - Viabilitätstest und LDL-Zell – Zytotoxizitätstest 67
4.4 Ergebnisse Testung der Transfektionseffizienz 70
5. Diskussion der Ergebnisse 74
5.1 Vormerkung zur Diskussion der Ergebnisse 74
5.2 Physikalischen Charakterisierung der Polyplexe 75
5.3 Physikalische Charakterisierung der Lipopolyplexe 78
5.4 Diskussion der Toxizitätsuntersuchungen 82
5.5 Diskussion Ergebnisse Gerinnungszeit (aPTT) 82
5.6 Diskussion der Ergebnisse Hämolyse 84
5.7 Diskussion der Ergebnisse MTT-Zell - Viabilitätstest und LDL-Zell – Zytotoxizitätstest 85
5.8 Diskussion der Ergebnisse Testung der Transfektionseffizienz 86
6. Zusammenfassung 88
7. Literaturverzeichnis 92
8. Anhang 105
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer 105
8.2 Danksagung 106

Abkürzungsverzeichnis

AFM ..... atomic force microscopy / Rasterkraftmikroskopie
aPTT ..... aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATTR-Amyloidose ..... ATTR-Amyloidose
BCA ..... Bicinchoninacid
bPEI ..... branched Polyethylenimin
DLS ..... dynamische Lichtstreuung
DNA ..... Deoxyribonucleic acid
DOPE 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DPPC ..... Dipalmitoylphosphatidylcholin
EBSS ..... Earle's Balanced Salt Solution
GUV ..... giant unilamellar vesicles
HMW-PEI ..... hochmolekulares PEI
IMDM ..... Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPEI ..... linear Polyethylenimin
kDa ..... (kilo)Dalton
LDH ..... Laktat-Dehydrogenase
LDL ..... low density lipoprotein
LMW-PEI ..... niedermolekulares PEI
LPPs ..... Lipopolyplexe
LUV ..... large unilamellar vesicles
MPEG ..... Methoxy Polyethylenglycol
mRNA ..... messenger Ribonucleic acid
MTT ..... 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N/P-Verhältnis ..... molares Verhältnis von N-Atomen im Lipid zu P-Atomen im Plasmid
NAD ..... Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PBS ..... phosphate-buffered saline
pCMV-luc ..... porcines Cytomegalovirus-luciferase
PCS ..... Photonenkorrelationsspektroskopie

PDI ..... Polydispersitätsindex

pDMAEMA ..... Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)

pDNA ..... Plasmid-DNA

PEI ..... Polyethylenimin

PPs ..... Polyplexe

RISC ..... RNA-induced silencing complex

RNA ..... Ribonucleic acid

RNAi ..... RNA-Interferenz

RT ..... Raumtemperatur

sec. ..... Sekunden

siRNA ..... small interfering Ribonucleic acid

SUV ..... small unilamellar vesicles

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Prozentualer Anteil der Indikationen im Bereich Gentherapie im Jahr 2017 [32].

Abbildung 1.2 Mögliche Optionen zur Durchführung des therapeutischen Gentransfers [150].

Abbildung 1.3 Verwendete Genvektoren in klinischen Studien im Jahr 2017 [32].

Abbildung 1.4 Grundlegender Mechanismus des nichtviralen Gentransfers [125].

Abbildung 1.5 Typische positiv geladene Polymere zur Komplexierung von DNA/RNA zur Herstellung von Polyplexen und Lipopolyplexen.

Abbildung 1.6 Plasmidkarte von pCMV-luc [1, 35].

Abbildung 1.7 Darstellung des Reaktionsablaufs von Luciferin zu Oxyluciferin zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz [35].

Abbildung 3.1 Herstellung von Liposomen nach der Filmmethode [132].

Abbildung 3.2 Verfahren zur Herstellung von Lipopolyplexen [125].

Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der dynamischen Lichtstreuung.

Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.

Abbildung 3.5 Farbreaktion des MTT-Salzes zu dem schwer löslichen Formazan ((E, Z) -5(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan).

Abbildung 3.6 Reaktionsabfolge eines LDH Assays.

Abbildung 3.7 Darstellung der Farbreaktion des BCA Assays.

Abbildung 3.8 Coatron M1 Einkanal Photometer, TECO [www.teco-medical.com].

Abbildung 4.1 IPEI Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und-AFM Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung.

Abbildung 4.2 bPEI Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.3 PEI F25 Polyplexe, Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.4 pDMAEMA Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.5 Darstellung der zur Herstellung der Lipopolyplexe notwendigen Liposomen DOPE: DPPC: Cholesterol (70: 15: 15 = mol: mol: mol).

Abbildung 4.6 IPEI Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.7 bPEI Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.8 PEI F25 Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.9 pDMAEMA Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen.

Abbildung 4.10 Gerinnungszeit Polyplexe (ohne Lipid) und Lipopolyplexe mit (Lipid bzw. Liposomenbeschichtung).

Abbildung 4.11 Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen PEI-Polymere als Polyplexe (Schwarz) und Lipopolyplexe (Grau) und deren Einfluss auf die Hämolyse.

Abbildung 4.12 Darstellung des pDMAEMA und dessen Einfluss auf die Hämolyse.

Abbildung 4.13 Vergleichende Darstellung Zellviabilität ermittelt mit dem MTT-Essay.

Abbildung 4.14 Vergleichende Darstellung der Zell - Zytotoxizitätstest ermittelt mit dem LDL-Essay. Polyplexe (Schwarz, ohne Lipid) und Lipopolyplexe (Grau, mit Lipid).

Abbildung 4.15 Vergleich der Transfektionseffizienz ausgewählter Polyplexe und Lipopolyplexformulierungen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Allgemeine Gegenüberstellung physikalischer Transfektionsmethoden, viraler vs. nichtviraler Vektoren sowie wichtige nichtvirale Lipoplexe, Nanoplexe, Polyplexe und Lipopolyplexe.

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte

Tabelle 3.2 Verwendetes Zubehör

Tabelle 3.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.4 Chemikalien und Ausgangsstoffe

Tabelle 3.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 3.6 Verwendete Kits und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 3.7 Genutzte Software

Tabelle 4.1 Zusammenfassung IPEI, Polyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.2 Zusammenfassung bPEI, Polyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.3 Zusammenfassung PEI F25, Polyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.4 Zusammenfassung pDMAEMA, Polyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.5 Zusammenfassung IPEI, Lipopolyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.6 Zusammenfassung bPEI, Lipopolyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.7 Zusammenfassung PEI F25, Lipopolyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

Tabelle 4.8 Zusammenfassung pDMAEMA, Lipopolyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM-Teilchengröße

Tabelle 4.9 Zusammenfassung der erhaltenen Daten für die Polyplexe und Lipopolyplexe. Teilchengröße, Zeta-Potential, Zellviabilität (MTT), Toxizität (LDH), Hämolyse, Gerinnungszeit (aPTT) und Transfektionseffizienz. *Alle Daten wurden gerundet und der Mittelwert dargestellt.

1. Einführung

1.1 Gentherapie

Das Potential des in vivo Gentransfers ist weiterhin unbestritten [5, 32, 150]. Viele Anwendungsbereiche wie Tumorerkrankungen, Erbkrankheiten wie z. B. β-Thalassämie oder Immundefekte u. a. sind als Ziele für einen therapeutischen Einsatz der Gentherapie von Interesse (Abbildung 1.1). Gerade während der Corona Pandemie wurde, ein neues, bis dahin nur wenig beachtetes Anwendungsgebiet für die Gentherapie von immenser Bedeutung für die Menschheit, ihre Verwendung als antiviraler Impfstoff. Die weltweite Zulassung der mRNA Impfstoffe von BioNTech/Pfizer und Moderna [159] sowie die Entwicklungen von CureVac sind wegweisend für die zukünftige Forschung auf diesem innovativen Gebiet.

Betrachtet man die Entwicklung der Todesursachenstatistik letzter Jahrzehnte in den Industrienationen [138], so ist abzusehen, dass Krebserkrankungen auch in der Zukunft eine Haupttodesursache sein werden, was die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieoptionen im onkologischen Bereich unter Einbeziehung der Gentherapie offensichtlich macht. Zudem zeigen krebsassoziierte Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten den größten Verlust an Lebensjahren beim Menschen im Vergleich zu anderen Erkrankungen [61]. Ist eine abnorme Gewebevermehrung diagnostiziert und die Dignität eines Malignoms bestätigt, dann ergeben sich in der Regel grundsätzlich nach Staging und Tumorkonferenz als Optionen die Planung von operativen Maßnahmen, die Möglichkeit einer Bestrahlung und/oder chemotherapeutischen bzw. systemtherapeutischen Behandlung. Zuletzt zeigten neue Behandlungsstrategien im Bereich der Immuntherapie weitere Therapieoptionen [76]. Bei fortgeschrittenem Leiden und überregionaler Ausbreitung sind diese Konzepte jedoch meist nicht zufriedenstellend in ihrem Ergebnis. Zudem begrenzen Nebenwirkungen wie Infektanfälligkeit, Knochenmarksuppression und -schädigung die Einsetzbarkeit, vor allem bei Geweben mit hohen Teilungsraten. Nicht zuletzt besteht aus therapeutischer Sicht vor allem darin ein Problem, den Patienten zu ermutigen jenes unerwünschte Wirken zu ertragen, ohne verlässliche Aussagen über die positive Wirkwahrscheinlichkeit und das Ansprechen auf Pharmaka prognostizieren zu können.

Diese Vielzahl unbefriedigender Kasuistiken verlangt nach neuen Behandlungsmöglichkeiten mit spezifischen und individuellen Anpassungsmöglichkeiten bei geringer Toxizität.

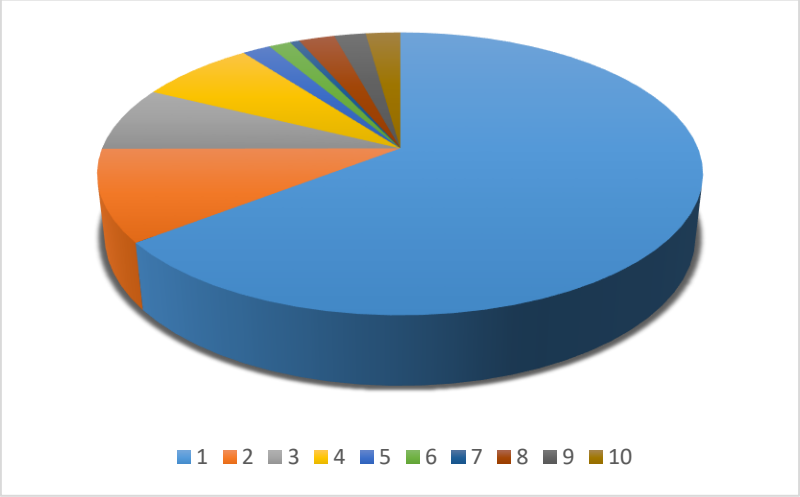

Abbildung 1.1 Prozentualer Anteil der Indikationen im Bereich Gentherapie im Jahr 2017 [32]. 1. Cancer diseases 64,6%; 2. Monogenetic diseases 10,5%; 3. Infectious diseases 7,4%; 4. Cardiovascular diseases 7,4%; 5. Neurological diseases 1,8%; 6. Ocular diseases 1,4%; 7. Inflammatory diseases 0,6%; 8. Other diseases 2,3%; 9. Gene marking 2%; 10. Healthy volunteers 2,2%

Unter einer Gentherapie versteht man prinzipiell das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA, RNA) mithilfe geeigneter Übertragungsmethoden in Gewebe und Zellen mit dem Ziel, die Funktion des vorhandenen fehlerhaften Gens zu ersetzen oder dessen Wirkung abzuschwächen, um einen therapeutischen Nutzen zu erlangen [5, 7, 32, 150]. Dabei ist eine Anwendung direkt im Patienten, aber auch nach der Entnahme autologer Zellen und deren ex vivo „Therapie“ möglich (siehe Abbildung 1.2) [102]. Eine Reparatur defekter Sequenzen durch homologe Rekombination ist eines der möglichen Ziele, welches erreicht werden soll. Im Kontrast zu anderen onkologischen Methoden präsentiert dieses Konzept die Möglichkeit einer hohen Effizienz und spezifischer Therapie durch die Gelegenheit krankheitsassoziierte Gendefekte direkt als Ursache des Leidens erschließen zu können. Fehlerhafte Genabschnitte werden entweder ausgetauscht oder in ihrer Aktivität limitiert. Therapeutische Nukleinsäuren wie DNA und siRNA sind eine vielversprechende Anwendung im Bereich der Krebsbehandlung. Grundsätzlich ist es möglich, mit Transportern spezifische Zielsubstanzen ins Zellinnere zu bringen, um dort entweder durch komplementäre Anlagerung den genetischen Code

direkt zu beeinflussen oder durch Einsatz von entsprechenden Pharmaka Zellen direkt zu zerstören, was von großer Bedeutung sein kann.

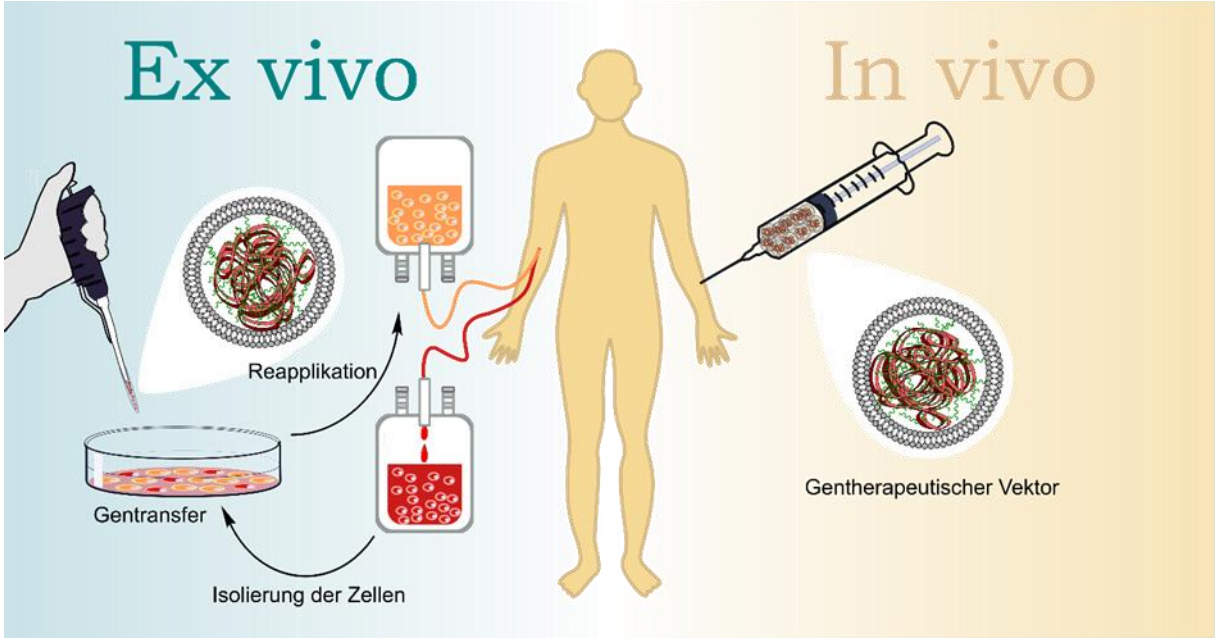

Abbildung 1.2 Mögliche Optionen zur Durchführung des therapeutischen Gentransfers [62]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Sascha Hubing

1.2 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine erfolgreich verwendete Methode in der Analyse und Therapie genetischer Abschnitte. Sie stellt eine potente Therapieoption bei der komplementären Stilllegung von Exonen dar. Die Wirkung wird durch kleine interferierende RNAs vermittelt, welche die sequenzspezifische endolytische Spaltung und anschließende Zersetzung ihrer Ziel-mRNA initiieren. Ursprünglich wurde dieses natürliche System als evolutionärer Reparatur- und Schutzmechanismus verstanden, zur Abschottung geschädigter Erbgutabschnitte [44]. Den Einbau einer solchen siRNA in einen Hemmkomplex wird als RISC (RNA-induced silencing complex) bezeichnet. Seitdem diese Therapieoption besteht, ist es deutlich leichter geworden, die Expression von Zielabschnitten der mRNA spezifisch auszuschalten. Seit 2018 ist ein erster Arzneistoff auf RNA-Basis, das Patisiran, zur Behandlung der hereditären ATTR-Amyloidose (hATTR) durch die FDA zugelassen [5]. Ein wesentlicher Punkt, der den Erfolg derartiger Behandlungen limitiert, ist der erfolgreiche Transport und die Freisetzung der siRNA in die jeweiligen Zielzellen. Für die Entdeckung vom Mechanismus der RNA-

Interferenz erhielten die beiden US-Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin [44].
Sogenannte Suizid-Gensonden sollen perspektivisch in der Lage sein, selektiv Krebszellen zu erreichen und diese zur Apoptose zu zwingen. Abnorme Sequenzen werden erkannt, komplementär gebunden und die Wirksamkeit hierdurch an die Zielzelle gebunden. Trotz dieses enormen Potentials halten bis heute erst wenige solcher Anwendungen Einzug in primäre onkologische Strategien. Einerseits sind bei vielen Erkrankungen die genauen Mutationen noch nicht exakt beschrieben - was immer den grundlegenden Schritt dieses Verfahrens ausmacht. Andererseits besteht ein weiteres Hauptproblem darin, das volle Potential zu nutzen. Eine der grundsätzlichen Herausforderungen bei der Verwendung von therapeutischen Nukleinsäuren ist deren Schutz vor zellulärer Zersetzung, die intrazelluläre Aufnahme und Überwindung von Zellbarrieren, sowie deren gezielte Freisetzung und Zielsteuerung. Dabei sollte es im Idealfall nach Möglichkeit zu keiner immunologischen Reaktion des Organismus oder anderer toxischer Nebenwirkungen kommen. Auch bei den derzeit in Milliarden Dosen verabreichten RNA-Impfstoffen sind diese Probleme relevant und werden diskutiert. Direkt auftretende allergische Reaktionen, Entzündungsreaktionen oder auch die Aktivierung der Thrombozyten Aggregationskaskade sind beobachtete Nebenwirkungen der Vaccine. Detaillierte Untersuchungen zu dieser Thematik werden vorgenommen, stehen für die angewendeten Systeme allerdings noch nicht zur Verfügung. Das bisherige Fehlen eines sicheren und effektiven Transportsystems für Nukleinsäuren spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Die Entwicklung praktikabler Transfersysteme im Rahmen dieser Behandlung konzentrierte sich bisher hauptsächlich auf virale Vektoren, liposomale Systeme und physikalische Methoden.

Die Entwicklung von Gentherapeutika sowie deren Markteintritt ist generell ein langfristiges und teures Projekt. Derzeit sind 10 Gentherapeutika zugelassen, unter Einbeziehung der Impfstoffe von Moderna und BioNTech/Pfizer 12, viele weitere sind in der klinischen Phase. Zum Beispiel wird das Gentherapeutikum „StrimvelisTM“ zur Behandlung des Immundefektes „ADA-SCID“, „LuxturnaTM“ zur Behandlung eines seltenen Gendefekts, der zur frühzeitigen Erblindung führt und „GendicineTM“ zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren angewendet [110, 153, 149].

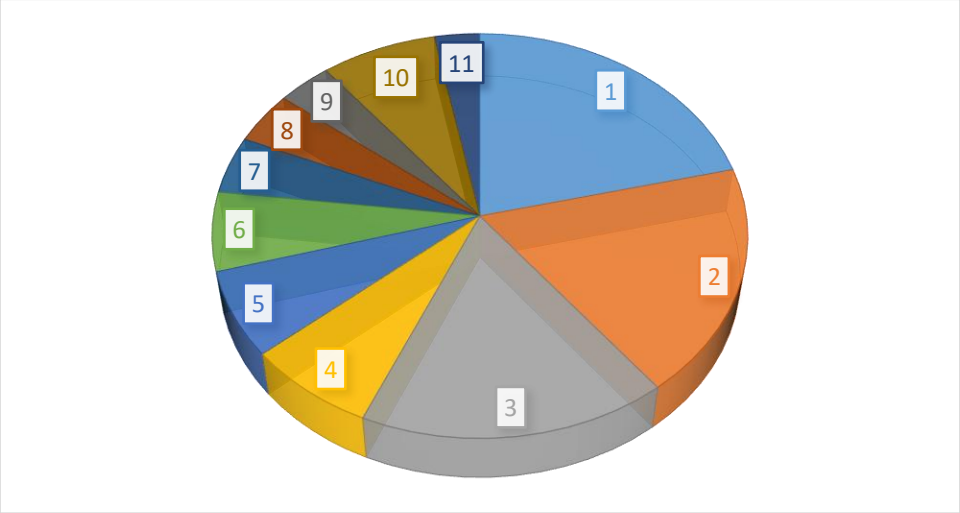

Abbildung 1.3 Verwendete Genvektoren in klinischen Studien im Jahr 2017 [32].1. Adenovirus 21,2%; 2. Retrovirus 18,3%; 3. Naked/Plasmid DNA 17,1%; 4. Adeno-associated virus 7,3%; 5. Vaccina virus 6,8%; 6. Lentivirus 6,3%; 7. Lipofectin 4,6%; 8. Poxvirus 4,2%; 9. Herpes simplex virus 3,6%; 10. Other vectors 7,7%; 11. Unknown 3%

1.3 Trägersysteme

Die Entwicklung praktikabler Transfersysteme im Rahmen einer Gentherapie konzentriert sich momentan hauptsächlich auf virale Vektoren, liposomale Systeme (z. B. Moderna/Corona Impfstoff), physikalische Methoden und zunehmend auch kolloidale Systeme auf der Basis von Polykationen oder Nanopartikeln.

Obwohl virale Vektoren, insbesondere Retroviren, Adenoviren und Adeno-Assoziierte Viren, die Basis für die Mehrzahl der aktuellen klinischen Studien bilden, sind diese langfristig durch ihre begrenzte Fremdgen-Kapazität, Sicherheitsbedenken, antigene Eigenschaften, relativ hohe Produktionskosten und weitere individuelle Probleme limitiert [1, 71]. Trotz dieser offensichtlichen Nachteile werden solche viralen Systeme bei derzeit laufenden klinischen Studien bevorzugt (siehe Abbildung 1.3). Gerade nach den Erfolgen der Impfstoffentwicklung kann aber in der Zukunft davon ausgegangen werden, dass hier ein Umdenken zu erwarten ist.

Physikalische Methoden des Gentransfers erscheinen für besondere Anwendungen vielversprechend. Dazu gehören die DNA-Vakzinierung mittels ballistischen Gentransfers (*Partikel-Bombardement*) oder die direkte intramuskuläre Injektion genauso wie der Gentransfer mittels Elektro-und Sonoporation.

Dem gegenüber stehen nichtvirale Gen-Transfektionssysteme wie Lipoplexe, Polyplexe, Nanoplexe und Lipopolyplexe als eine interessante Alternative zur Verfügung und

gewinnen mehr und mehr an Bedeutung, was auch an den Entwicklungen von Moderna und BioNTech/Pfizer sichtbar wird. Der Vorteil nichtviraler Strukturen ist die im Allgemeinen geringer ausgeprägte immunologische Stimulation sowie ein größeres Fassungsvermögen therapeutischer Nukleinsäure als Wirkstoff. Ein weiterhin wichtiges Kriterium zu ihren Gunsten ist die theoretische Modifikation auf struktureller Basis und der damit verbundenen Möglichkeit, unerwünschte Eigenschaften anzupassen, um toxikologische Aspekte zu verringern. Ein individuelles und maßgeschneidertes Therapeutikum kann geschaffen werden. Ebenso können jene Substanzen in größerer Menge und damit kostengünstig produziert werden. In der Gruppe dieser Vektoren lassen sich, aufgrund von Struktur und biologischer Aktivität, Komplexe auf liposomaler Basis (Lipoplexe) von solchen auf Grundlage von Polykationen (Polyplexe) und organische oder anorganisch kationische Nanopartikel (Nanoplexe) unterscheiden (siehe Tabelle 1.1).

Polyplexe zeigen eine heterogene Zytotoxizität, was jedoch stark von der Art des verwendeten Polymers abhängig ist. Lipoplexe hingegen erwiesen sich als zytotoxisch deutlich verträglicher, leiden jedoch unter geringerer Stabilität und verminderten Transfektionsraten. Sie formen gut verstandene Doppelschichten um die DNA/RNA-Moleküle und schützen diese dadurch effektiv vor Zersetzung. Interaktionen mit der DNA initiieren strukturelle Veränderungen in verschiedene Zustandsformen, abhängig vom verwendeten Lipid, dem Verhältnis von Lipidanteil zu DNA und Inkubationszeit [10] und müssen bei Verwendung als Arzneimittel bedacht werden. Einigen Lipiden wurde im Rahmen von Untersuchungen eine Verbesserung des Endozytose Vorganges zugeschrieben [20, 103, 133]. Einige der Mechanismen, welche die Freisetzung aus dem Endosom steuern, werden bereits durch die jeweilige Formulierung adressiert. So nutzen z. B. Polyplexe mit PEI als Polykation den sogenannten „Protonenschwammeffekt“ aus, um den endlysosomalen Austritt zu beschleunigen. Hier wird der pH-Wert in den lysosomalen und endosomalen Vesikeln so verschoben, dass es zu einer Neuformierung der Lipidmembran (der Endosomen) kommt, was die Permeabilität der Komplexe erhöht und somit zu deren Freisetzung führt [151]. Die Befreiung der Nukleinsäuren aus dem Endosom findet im Falle von Lipoplexen z. B.

durch die Ausbildung einer hexagonalen Phase statt [2]. Der prinzipielle Mechanismus der Freisetzung aus dem Endosom ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Tabelle 1.1 Allgemeine Gegenüberstellung physikalischer Transfektionsmethoden, viraler vs. nichtviraler Vektoren sowie die wichtigen nichtviralen Lipoplexe, Polyplexe, Nanoplexe und Lipopolyplexe.

Physikalische Methoden	• *z.B. Partikel-Bombardement, Elektro-und Sonoporation.* • ***Vorteile**: hohe Transfektionseffizienz; hohe Reproduzierbarkeit; meist keine Probleme mit toxischen Effekten* • ***Nachteile**: faktisch nur ex-vivo einsetzbar; oft hoher technischer Aufwand; teure Geräte; nur kleine Mengen*
virale Vektoren	• *Virushülle oder deren Bestandteile werden zur Komplexierung der Nukleinsäuren verwendet* • ***Vorteile**: hohe Transfektionseffizienz* • ***Nachteile**: immunogen und inflammatorisch; aufwendig in Produktion und Kontrollen; geringe Kapazität an Nukleinsäuren; teuer; Überführung in Massenproduktion schwierig*
nicht-virale Vektoren	• ***Vorteile**: vielfältige Strukturmöglichkeiten und deren Steuerbarkeit; bessere Verträglichkeit; geringe Kosten; schnelle Produktion großer Mengen an Wirkstoff* • ***Nachteile**: oft geringere Transfektionseffizienz*
Lipoplexe	• *Komplex aus Lipid und Nukleinsäure* [20, 103, 66] • ***Vorteile**: gute Zell Internalisation; geringere Toxizität; Schutz vor Zersetzung; sehr gute Biokompatibilität; schnelle Massenproduktion möglich; geringe Herstellungskosten* • ***Nachteile**: geringere Transfektionseffektivität; oft herabgesetzte Stabilität*
Polyplexe	• *Komplex aus Polymer/Polykation und Nukleinsäure* [65, 105, 43, 104] • ***Vorteile**: teilweise guter Schutz vor intrazellulärer Zersetzung [95]; zeigen signifikant weniger Sicherheitsrisiken und können langkettige DNA aufnehmen; günstige Herstellung* • ***Nachteile**: unspezifische Polyplexe interagieren ungewollt aufgrund Elektrostatik mit Gefäßendothel, Plasmaproteinen, Komplementfaktoren und Fibrinogen* [43]; d*ies führt zu kurzen Plasmahalbwertszeiten für Komplexe mit hohen Oberflächenladungen; oft geringe Transfektionseffizienz* [104].

Nanoplexe	• *Komplex aus kationischem Nanopartikel und Nukleinsäure* [77, 117, 73] • ***Vorteile**: sehr stabile Komplexe; große Variationsbreite; auch für ballistische Methoden anwendbar; günstige Herstellung* • ***Nachteile**: oft immunogen; bei der Massenherstellung schwer kontrollierbare Größeneinstellung; oft zu stabil; eingeschränkte Freisetzung der Nukleinsäuren*
Lipopolyplexe	• *Kombination aus Lipoplex und Polyplex; die Nukleinsäuren werden mit dem kationischen Polymer (Polyplex) komplexiert und anschließend mit dem Lipid aus Liposomen (Lipoplex) umhüllt* [118, 114] • ***Vorteile**: hohe Stabilität; geringe Immunogenität; hohe Biokompatibilität; im Vergleich zu Lipoplexen hohe Transfektionseffizienz; große Variabilität in der Struktur; Ladung und Größe gut einstellbar* • ***Nachteile**: komplexes System; Reproduzierbarkeit stellt hohe Anforderungen an Technik*

Nichtvirale Formulierungen wurden in einer Reihe von Studien bereits untersucht, wobei sich deren Interpretation in Bezug auf schädigende Merkmale zumeist als schwierig erwies, da als Endpunkte meist nur Enzymaktivitäten bzw. Proteinfluoreszenz erfasst wurde und dies keine direkte Übertragung der *in-vitro* Modelle auf *in-vivo* zulässt. Alle der drei genannten Komplexe haben Vor- und Nachteile (siehe Tabelle 1.1). So zeigten bereits van de Wetering et al. [140] und Zuhorn et al. [103, 157] bei Polyplexen im Allgemeinen eine erhöhte Zytotoxizität im Zellkulturexperiment.

Ein weiteres allgemeines Problem nichtviraler Systeme besteht in dem notwendigen Schutz der DNA bzw. des genetischen Therapeutikums vor Zersetzung, effizienter zellulärer Aufnahme und Freisetzung aus den endosomalen Kompartimenten und anschließender Überführung in den Nukleus. Nachteile ergeben sich ebenfalls aus der geringeren Erfahrung im Umgang und damit ggf. noch aufwendigere und teurere Herstellung. Das zum Teil noch fehlende Verständnis über die biologische Bedeutung der elektrischen Interaktion zwischen Trägersystem und DNA-Bestandteilen kann zu Problemen führen. Zur Optimierung solcher Systeme lassen sich grundlegende Arbeitsansätze feststellen. Es ist von großer Bedeutung, die genauen Vorgänge der Zellinternalisation zu verstehen und im Anschluss den Ablauf des sogenannten „intrazellulären Routing“, der Freisetzung der DNA aus den Komplexen, im Detail offenzulegen. Um jene Schwerpunkte bearbeiten zu können, sind genaue Kenntnisse zu Bildung, Stabilität, Transport, gesteuertem Zerfall und physiko-chemischen Eigenschaften von außerordentlicher Bedeutung. Zur Klärung dieser Fragestellungen ist es notwendig möglichst detaillierte und umfassende Analysen, zu beispielsweise

Ladungsdichte, Komplexbildungskonstante, biochemische Stabilität, Freisetzungsbedingungen, Pufferkapazität, Sedimentationseigenschaften und morphologischen Veränderungen zu erheben.

Eine weitere essenzielle Problematik ist die Notwendigkeit eines in vitro Modellsystems, welche die Eigenschaften und Gegebenheiten der in vivo Situation ganzheitlich widerspiegelt und an den neuen genetischen Vektoren getestet werden können. Ziel aktueller Forschung muss es daher sein, die Vorteile aller Systeme zu vereinen. Ein ideales Transportsystem hat eine kurze Lebenszeit im Körper, interagiert selbst nicht mit dem Genom, kann in Zielzellen hochselektiv eindringen und verursacht keine unerwünschten Wirkungen. Bisher war es nicht möglich, all diese Stärken in einem Schema zu vereinen. Die Kombination von kationischen Polymeren und Lipoplexen zu Lipopolyplexen hat das Potential, die Transfektionseffizienz und Bioverträglichkeit zu steigern. Grundsätzlich lassen sich synthetische Produkte in wichtigen Eigenschaften wie Molekulargewicht, Einbau und Verknüpfung mit Zell- und Gewebefaktoren, physiko-chemische Struktur und Ladungsverhalten variieren.

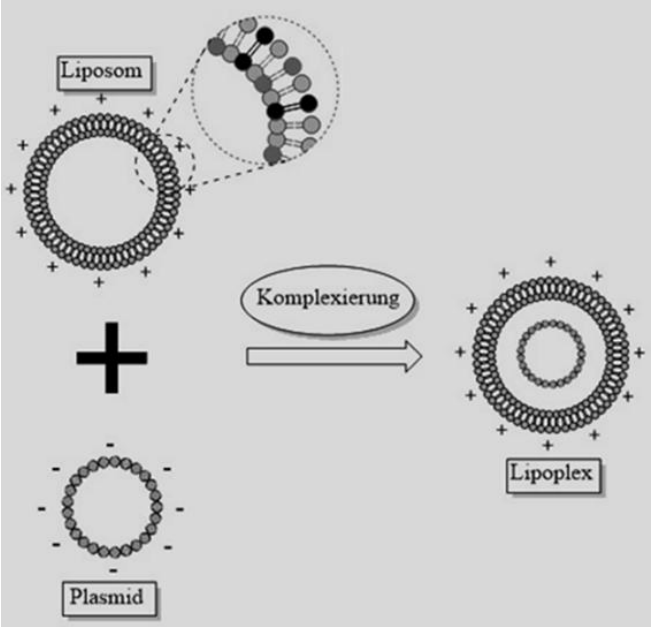

Abbildung 1.4 Grundlegender Mechanismus des nichtviralen Gentransfers. Positiv geladene Liposomen werden in einem definierten Verhältnis (N/P-Verhältnis) mit einer Plasmid-DNA (pDNA z. B. pCMV-luc) inkubiert. Das N/P-Verhältnis gibt hierbei das molare Verhältnis von Stickstoff-Atomen im Lipid zu Phosphat-Atomen im Plasmid an. Durch elektrostatische Wechselwirkungen entstehen die positiv geladenen Lipoplexe. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Udo Bakowsky.

1.4 Organisation des Genoms

Zum genauen Verständnis der möglichen strukturellen Anpassung der verwendeten Trägersysteme ist es notwendig, sich die natürlichen DNA-Proteinkomplexe vor Augen zu führen. Das Erbgut von Eukaryoten kann Längen von mehreren Metern erreichen und wird aus Gründen der Lagerung und dem Transport von Zellprozessen von Chromatin-Proteinen kompakt gebündelt. Ungefähr die Hälfte dieses Chromatins besteht aus Histonen. Diese kleinen basischen Proteine stellen mit verschiedenen Untereinheiten auch die Grundbausteine der Nukleosomen dar. Zu unterscheiden ist ein C-terminales Ende, welches Interaktionen zwischen Histonen untereinander, sowie mit DNA verwirklicht und einem N-terminalen Ende, an welchem basische Lysine und Arginine konzentriert sind [122]. Letztere sind Bereiche post-translationaler Modifikation durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung. Jene Anpassungen spielen eine entscheidende Rolle in Bezug auf Stabilität, Interaktion und elektrische Ladung. So ergibt sich aus der Acetylierung eines Histons eine Neutralisierung einer positiven Ladung und durch Phosphorylierung eine zusätzliche negative Ladung [8]. Dieses Wissen um die Art der Organisation durch chemische Gruppen kann zum Teil bei der Herstellung synthetischer Vektoren genutzt werden, um ungünstigen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu entgehen.

1.5 Therapie im Genom und Beziehung zum Gendiagnostikgesetz

Die therapeutische Option der Modulation genetischer Abschnitte als Behandlungskonzept im pharmakologischen Fachbereich ist bereits seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand modernster Forschung und gelangt aufgrund immer neuer Erkenntnisse wieder ins Zentrum der Aufmerksamkeit. Mögliche Behandlungsstrategien lassen sich vereinfacht als zwei Systeme darstellen, wobei es einerseits die Chance gibt genetische Einheiten innerhalb des Körpers direkt zu verändern. Andererseits ist eine Beeinflussung von außerhalb erreichbar. Beispielhaft sei die Inhibition von potenziell kanzerogenen Exonen, kodierend für ein fehlerhaftes Proteinprodukt, als wünschenswerte Option angeführt. Sich dem Regelkreis entziehende enzymatische Aktivitäten könnten durch Therapie an Introns ausgegliedert werden. Grundsätzlich ist es hierbei in theoretischer Betrachtung vorstellbar entweder schadhafte Bereiche direkt durch Austausch zu ersetzen oder gezielt durch somatischen Einbau zu regulieren. Diese

Möglichkeit der selektiven Regulation und Modifikation von Genabschnitten erwies sich in der Vergangenheit, unter Verwendung viraler Transfektionsvehikel, oftmals als vielversprechende Alternative zu anderen Therapiestrategien. Neuere Erkenntnisse der letzten Jahre offenbaren die Notwendigkeit neuer Trägervehikel für therapeutische RNA-Segmente. Der große Vorteil dieses Anwendungsfeldes liegt in der kausalen Therapie, in Abgrenzung zu der meist symptomatischen Ausrichtung der Medizin. Ein potentiell bedeutsames System stellt das CRISPR/Cas-System dar. Jene Methodik verspricht ein zukunftsträchtiges Modell zum gezielten Schneiden und Neukodieren von DNA-Bausteinen. Besondere Hoffnung verspricht man sich hierbei in der Behandlung von Krebs, AIDS und verschiedenen Erbkrankheiten. Zudem kann ein Nutzen in der Tier- und Pflanzenzüchtung erschlossen werden. Zu den Verfahren werden auch die Zinkfinger-Nukleasen oder TALEN gezählt. Interessant ist dieses Verfahren deshalb, da es die Grundelemente genetischer Transfektionsverfahren mit zelleigenen Reparaturmechanismen kombiniert und so neue Wege eröffnet. Das antivirale, bakterielle Abwehrsystem CRISPR [129] wird verwendet, um DNA an bestimmten Stellen zu schneiden. Nutzt man dies, so ergeben sich Optionen zur Entfernung oder Reparatur unerwünschter Abschnitte des Doppelstranges. Durch Zugabe von DNA-Oligonukleotiden kann eine Veränderung auch auf mRNA-Ebene ermöglicht werden [119].

Bei all dem zu bedenken ist hierbei jedoch die in Deutschland strenge Regelung durch das Gendiagnostikgesetz (GenDG) und den damit verbundenen Limitationen im Hinblick auf ethische Aspekte. Es regelt den Umgang mit genetischen Proben in Erhebung, Verwendung und Verwahrung. Grundvoraussetzung einer Gentherapie ist die konkrete Identifikation von der Norm abweichender und krankheitsauslösender Abschnitte des Genoms. Hierzu sind grundsätzlich zwei Schritte vonnöten. Die Sequenzierung menschlichen Gewebes und der anschließende Vergleich des Genoms betroffener Personen mit gesunden Kontrollgruppen. Entscheidende Limitation spielt hierbei der unter ethischen Aspekten eng definierte Spielraum. Hierbei stehen Interessen des medizinischen Fortschrittes, jenen des Schutzes vor Diskriminierung gegenüber. Die informelle Selbstbestimmung ist in Deutschland ein hohes Gut und das Recht auf Nichtwissen elementar. Unnütz gewonnenes Wissen kann psychische Belastung und finanzielle Ungleichheit im gesellschaftlichen System bedeuten, in einer Zeit, in der das

eigene Risiko mehr und mehr zum Versicherungsgut reift. Der Schutz erhobener sensibler genetischer Daten muss gewahrt und gewährleistet sein. Leider ist dies zum Teil nur durch Begrenzung diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen möglich.

1.6 Toxikologische Eigenschaften

Grundsätzlich sind bei parenteraler Applikation verschiedene unerwünschte toxische Effekte zu bedenken. Vereinfacht kann man diese systematisch in drei Gruppen betrachten. Zum einen sind direkte zytotoxische Reaktionen durch den Wirkstoff möglich, zum anderen spielt die Aktivierung der Thrombozyten eine entscheidende Rolle. Weiterhin können toxische Kaskaden aktivierter Komplementfaktoren zu schädlichen Verläufen, bis hin zur Zerstörung der Zelle führen. Die schädlichen Eigenschaften des verwendeten Wirkstoffes und Transportsystems können einen oder mehrere dieser Bereiche betreffen.

Zentrales Thema vorausgegangener Studien war neben der Transfektionseffizienz die entscheidende Beurteilung der toxikologischen Potenz. Daraus lassen sich Empfehlungen zum Bau zukünftiger Wirkstofftransporter festhalten. So sind in der Literatur verschiedene Eigenschaften von Trägersubstanzen in Bezug auf deren Aktivierung des Komplementsystems geschildert. Es wurde beispielsweise eine konkrete Abhängigkeit zum Amin-Anteil der verwendeten Substanz dargelegt. Ebenso führt eine erhöhte Kettenlänge und eine starke Verzweigung bei den zur Komplexierung verwendeten Polykationen, wie z. B. bei den oft verwendeten Polylysinen, zur Komplementaktivierung. Ein weiteres zu beachtendes Kriterium stellt das Ladungsverhältnis, das N/P-Verhältnis dar (positiver zu negativer Teilladungen), wobei nur jene kationischen Ladungsgruppen entscheidend sind, welche den Faktoren des Komplementsystems auch strukturell zugänglich sind [106, 83]. Die positive Überschussladung des Nukleinsäureträgersystems interagiert mit Blutbestandteilen, im Allgemeinen mit negativ geladenen Oberflächen und insbesondere mit Faktoren des Komplementsystems [65, 106, 83, 78, 97, 85, 120, 92, 17, 94]. Neutrale und negativ geladene Gruppen verbinden sich mit verschiedenen Serumproteinen und Faktoren des Komplementsystems [97]. Anionische Lipide zeigen eine Steigerung der Lyse, als Endglied der Komplementreaktion, durch eine im Zusammenhang nachweislich erhöhte

Aktivität von C5b-7 [85]. Interessant ist die Rolle der Kalziumkonzentration in der Umgebung, da es durch Selbsteinbau zwischen negativen Oberflächenladungen in der Lage ist, Komplexe zu bilden und die Oberflächenladung dadurch in Richtung der Neutralität auszugleichen, was eine Reduktion des Zeta-Potentials erreichen und dadurch zu einem massiven Größenwachstum der Komplexe führen kann [12]. Ebenso zeigte eine besonders hohe Membranfluidität bei Verwendung von Lipoplexen eine erhöhte Lyse-Neigung an Geweben und Zielzellen [85]. Mit Hilfe der Methylierung von Liposomenoberflächen durch Verwendung spezieller endgruppenmodifizierter PEG-Lipide (Polyethylen modifizierte Lipidkopfgruppen wie das DSPC-PEG 2000) [107], kann die Zugänglichkeit negativer Ladungen verringert werden, insbesondere auch gegenüber Antikörpern, was eine generell verminderte unerwünschte Reaktion mit Teilen dieses Systems bedeutet [85]. Allerdings sind jene Hydroxyl- und Methylgruppen selbst ein potentieller Aktivator des alternativen Weges, was die Verwendung limitiert [65]. Weiterhin von Bedeutung sind die Molekülgröße (Molekulargewicht und Moleküllänge bzw. -verzweigungsgrad) der verwendeten kationischen Polymere und die Größe der angewendeten Vehikel, sowie die Konzentration des beim Empfänger vorhandenen Komplementfaktors C3a, welche entscheidend für das Reaktionspotential des Organismus sind [83]. So können etwa hohe Oberflächenladungen zu einer Aktivierung des Komplementsystems und Interaktionen mit dem Faktor C3 führen [106]. Ein Ansprechen verschiedener Komplementfaktoren wurde eruiert, in Abhängigkeit der Primärstruktur des Komplexierungshilfsmittels (Polymer, Nanopartikel, Lipid, Molekulargewicht, Valenzelektrodenanzahl, Kettenlänge, Kationenanzahl etc.), der generellen Größe des erhaltenen Transfektionskomplexes und dem Anteil von Polysacchariden, welche aktivierend wirken [106]. Der Grad an Verunreinigung von pDNA durch Endotoxine ist gering zu halten und den Regulierungen des EuPharm für Parenteralia Abschnitt 09/0520 zu entsprechen. In vorangegangenen Studien konnten Eigenschaften eruiert werden, welche durch Kaskaden zu einer hämolytischen Reaktion des Empfängersystems nach Gabe eines Wirkstoffes führen. Allgemein gilt, je höher die Schädigung der Intima beim Einbringen des Trägerkomplexes ist, desto stärker die Aktivierung der hämostatischen Kaskade [4]. Wichtige zu beachtende Eigenschaften sind die Ionenstärke des Produktes, das Zeta-Potential, die totale Proteinkonzentration, das Verhältnis der primären Aminogruppen zum Gesamtprotein (bezogen auf die

effektiven positiven Ladungen), der osmotische Druck, sowie der pH-Wert (saure Werte, im Vergleich zum physiologischen pH, steigern die Nebenwirkungen) [34, 88, 112]. Interessanterweise konnte kein Zusammenhang mit der Blutgruppe gezeigt werden und die Zugabe eines Antikoagulans auf Zitratbasis führte zu einer Reduktion der Agglutination [34]. Weiterhin zu beachten ist die Infusionsgeschwindigkeit des Pharmakons, da eine zeitlich relativ hohe Konzentration von Lipoplexen zu Erythrozyten zu einer massiven Agglutination führt [34].

Eine Möglichkeit zur Protektion gegenüber Hämolyse besteht in der Hydroxylierung der Oberfläche, was zu einem Schutz durch Polysaccharide führt [88]. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Polyaminen, mit repetitiven Disulfidbrücken in der Hauptkette, was sich im Vergleich zur Zytotoxizität gegenüber PEIs als überlegen zeigte [112]. In gleicher Studie konnte eine Beeinflussung der Puffereigenschaften zu pH-Wert, Molekulargewicht, Kettenlänge und Zeta-Potential durch den Acetylierungs- und Benzoylierungsgrad gezeigt werden, womit sich entscheidende Eigenschaften beeinflussen lassen [112]. Ebenfalls positiv in der Verwendung gegenüber immunologischen Komplementreaktionen, wirken sich eine Vorbehandlung der DNA (Polylysin-DNA in der Studie) mit Polyethylen Glykol und eine möglichst lineare Molekülstruktur aus [106]. In Bezug auf die Thrombozyten Aktivierung konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Erythrozytenaggregation durch geringere elektrostatische Interaktion mit Hilfe negativer oder neutraler Oberflächen vermindert werden kann. Das intensiv untersuchte PEI zeigt sich hierbei besonders hilfreich, da es positive Ladungen gegenüber zellulären Bestandteilen abschirmt und protektiv wirkt, auch durch eine verminderte Aktivität von C3b [4, 25, 37, 43, 59, 65, 134, 139]. Eine weitere Eigenschaft der PEI-Komplexe ist deren Bindung an eine Vielzahl von Proteinen, wie beispielsweise Albumin und Hämoglobin [121]. Weiterhin lässt es sich im Polymerisationsgrad des Polykation-Segmentes variieren und damit in der Effektivität der Ladungsabschirmung anpassen. Die Verwendung kurzer Seitenarme mit Polykation-Struktur und Amidoamingruppen (selektive Adsorption von Heparin aus dem Plasma) zeigt eine geringere unerwünschte Interaktion mit Blutbestandteilen, wohingegen bei langen Ketten und hohem Molekulargewicht die unerwünschten Wirkungen gravierend sind [105, 141, 130, 27].

Eine weitere Möglichkeit die Nebenwirkungen polymerer Gentransfektionssysteme zu verbessern, wird durch die Kombination von Liposomen mit Polyplexen erreicht. Hierbei wird bei den entstehenden Lipopolyplexen die DNA/RNA Komponente mittels des Polymers komplexiert und anschließend mit einer Lipidhülle beschichtet. Dadurch wird die effektive Komplexierung der DNA/RNA Komponente mit den positiven Polymeren zur Stabilisierung ausgenutzt, während die Außenbeschichtung mit Lipiden für eine biokompatible Abschirmung sorgt. Oft zeigen solche Systeme auch eine verbesserte Transfektionseffizienz, wobei diese sowohl von der Wahl des Polymers als auch von der Wahl der Lipide oder Lipidmischungen abhängig ist [35, 114, 115, 125, 136].

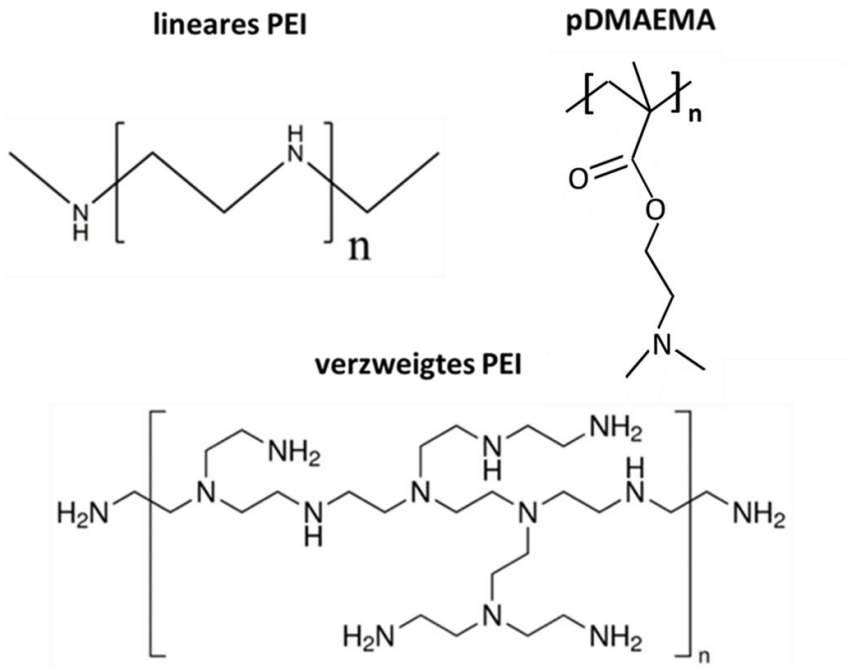

Abbildung 1.5 Typische positiv geladene Polymere zur Komplexierung von DNA/RNA zur Herstellung von Polyplexen und Lipopolyplexen. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Shashank Pinnapireddy (verzweigtes und lineares PEI) [115].

1.7 Hilfsstoffe zur Herstellung von Genvehikeln

1.7.1 Lipide und Liposomen

Lipide werden schon seit Jahrzehnten in der pharmazeutischen Technologie als Hilfsstoffe zur Herstellung parenteraler Formulierungen verwendet. Sie bilden in wässrigem Medium durch Selbstorganisation sphärische Vesikel, sogenannte Liposomen (siehe auch Abbildung 1.4).

Seit ihrer Entdeckung durch Alec D. Bangham in den 1960er Jahren, wurden Liposomen intensiv erforscht und haben ein ganzes Forschungsfeld geschaffen, aus dem kontinuierlich neue Entwicklungen hervorgehen. Liposomen werden für ihre biologische sowie technische Überlegenheit geschätzt und können bis heute, als eines der erfolgreichsten Trägersysteme für Wirkstoffe aller Art erachtet werden [16]. Es handelt sich bei Liposomen um sphärische Vesikel mit einem Durchmesser zwischen wenigen Nanometern und mehreren Mikrometern, die aus einer oder mehreren konzentrischen Lipid-Doppelschichten bestehen. Sie schließen ein wässriges Lumen ein und gehören aus pharmazeutischer Sicht zu den kolloiddispersen Systemen. Sie lassen sich nach Anzahl der Doppelschichten in unilamellare, oligolamellare, multilamellare oder sogar multivesikuläre Liposomen einteilen. Des Weiteren können sie nach der Größe in kleine »small unilamellar vesicles, SUV«, große »large unilamellar vesicles, LUV« und sehr große »giant unilamellar vesicles, GUV« Vesikel eingeteilt werden. Im medizinischen Bereich kommen größtenteils Vesikel zwischen 50 und 1000 nm zum Einsatz [16, 111].

Für einfache Liposomen verwendet man oft die natürlichen Lipide DPPC und Cholesterol. Für die Gentransfektion, zur Bildung von Lipoplexen, eignen sich vor allem Lipide, die eine positiv geladene Kopfgruppe besitzen. Somit können sie mit negativ geladener DNA/RNA komplexieren. Beispiele hierfür sind DOTAP, DOTMA oder DC-Cholesterol [123, 79]. Weiterhin sind sogenannte Helferlipide wie z. B. DOPE nützlich, da sie sowohl die Fusion mit der Zellmembran als auch den Austritt aus dem Endosom durch Ausbildung einer hexagonalen Phase begünstigen [82, 157]. Oft werden Mischungen unterschiedlicher Lipide verwendet, um die Eigenschaften der Genvehikel zu optimieren [113, 118].

1.7.2 Positiv geladene Polymere und Polyplexe

Ebenfalls weit verbreitet und mittlerweile Goldstandard sind die bereits gut erforschten Polymere zum therapeutischen Einsatz, die Polyethylenimine (PEIs). Unter den nichtviralen Genträgersystemen wird das kationische Polymer PEI aufgrund seiner exzellenten Transfektionseffizienz in Zellversuchen eingesetzt und dient als Referenzsubstanz [100]. Innerhalb des Moleküls wiederholen sich Ethylenimin-Einheiten ($-CH_2-CH_2-NH-$), welche jeweils eine Masse von 43 Da besitzen (Abbildung 1.5).

Es gibt verschiedene strukturelle Varianten des PEIs [52, 89, 140, 148, 155], bei denen die unterschiedliche chemische Verknüpfung am Stickstoffatom entscheidend ist. Generell werden PEI in lineare PEI (lPEI) und verzweigte PEI (bPEI) unterteilt, wobei sehr große Unterschiede in der Molmasse (z. B. PEI F25 – ein PEI mit 25 kDa Molekulargewicht, erstmalig isoliert aus bPEI in der Arbeitsgruppe Prof. A. Aigner [40, 41, 51, 60, 125, 146]) realisiert werden können.

Als synthetische positiv geladene Polymere sind diese Verbindungen in der Lage, durch ihre Fähigkeit DNA oder RNA in Komplexen zu kondensieren, den Transport und die Freisetzung zu unterstützen. Ihre elektrostatische Wechselwirkung ermöglicht es mit Plasmiden zu interagieren und kompakte sphärische Komplexe auszubilden. Diese Partikel bezeichnet man als Polyplexe, welche in der Lage sind, große Konstrukte von Nukleinsäuren aufzunehmen [58] und deren Transport zu ermöglichen sowie im Anschluss durch den Vorgang der Endozytose den Zellen zuzuführen [154]. Die erfolgreiche Komplexbindung und damit Grundlage zur Verwendung als Transporter, wird beeinflusst durch das Verhältnis des Stickstoffs aus dem Polykation zu dem Phosphatanteil aus der DNA (sogenanntes N/P-Verhältnis) [58]. Wichtiges Kriterium ist ein Polymerüberschuss im Bezug zur negativ geladenen DNA. Durch Aminogruppen verschiedener Bindung und eine hohe kationische Ladungsdichte bei physiologischem pH, besitzen sie die Möglichkeit der Aminogruppen-Protonierung bei Zugabe von Wasser [46, 135, 87]. Hierdurch besteht die Möglichkeit, nicht kovalente Komplexe mit DNA zu formen und erleichtern den Transport von siRNA. Vor allem lange und große DNA-Stränge kondensieren und verpacken sie in geeigneter Art und Weise. PEIs schützen Nukleinsäuren vor der Zersetzung durch Nukleasen und vermitteln die endosomal-lysosomale Freisetzung der nanoskaligen Komplexe, was auf der Hypothese des sogenannten „Protonen-Schwamm-Effekt“ beruht und erleichtern den DNA-Eintritt in den Nukleus. Weiterhin konnte eine Schutzwirkung vor DNAsen bei speziellen DNA-Formen nachgewiesen werden, vermittelt durch PEI [99]. Selbst üben sie jedoch ebenfalls einen zytotoxischen Einfluss aus. Im Allgemeinen kann man sagen, dass Toxizität mit höherem Molekulargewicht des PEI zunimmt und lineare Formationen des PEI effektiver in der Transfektionseffizienz sind [68, 70]. Außerdem interagieren sie auf unspezifische Weise aufgrund der Eigenladung mit negativ geladenen Oberflächen, was

wiederum die biologische Wirksamkeit einschränkt und behindert. Daher ist es auch hier notwendig, die Struktur der PEIs weiter anzupassen und zu optimieren. Es gibt kommerziell verschiedene Polymerformen, welche unterschiedliche Verhaltensweisen und Eigenschaften besitzen. Grundsätzlich, systemisch betrachtet, zeigt die lineare Form des PEI ein höheres Potential als die verzweigte Form [38].

Ein weiteres Polymer, welches als Gentransfektionssystem genutzt wird, ist das pDMAEMA, welches im Jahre 1996 erstmals von Hennik et al. [140, 21] dargestellt und beschrieben wurde (Abbildung 1.5). Mit seinen tertiären Aminen und einem Molekulargewicht von über 112 kDa wird eine Transfektionseffizienz von rund 90% im Vergleich zum PEI beschrieben [154]. Grundsätzlich weist das pDMAEMA eine höhere Toxizität auf, bildet jedoch kleinere Polyplexe mit einer teilweise verbesserten Transfektionseffizienz. Beide Eigenschaften korrelieren prinzipiell mit dem Molekulargewicht.

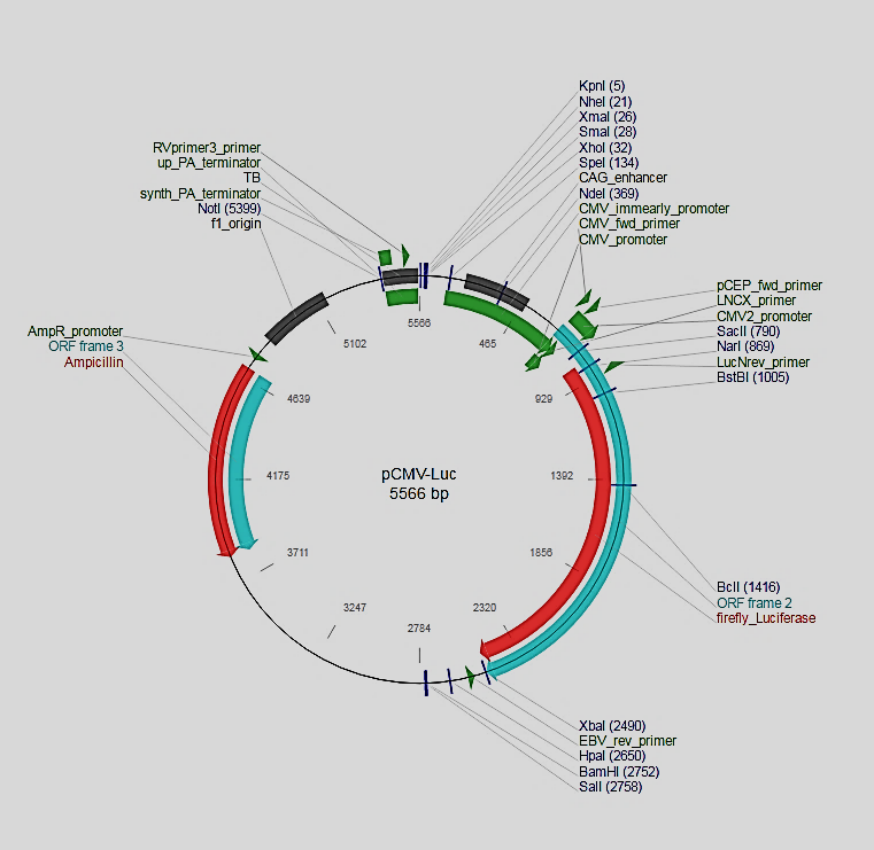

Abbildung 1.6 Plasmidkarte von pCMV-luc [1, 35]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Konrad Engelhardt.

1.8 Das Reportergen – pCMV-luc

Zur Quantifizierung der Gentransfektion benötigt es den Einsatz entsprechender Reportergene. Jene führen letztlich zur intrazellulären Expression eines gut nachweisbaren Produktes, z. B. eines Enzyms. Nach anschließender Zelllyse kann das Enzym mit notwendigen Substraten versetzt werden. Die resultierende Enzym-Substrat-Reaktion kann mittels Fluorimetrie oder Luminometrie erfasst werden. Reportergene sind in sogenannten Plasmidvektoren enthalten, welche frei kommerziell erhältlich sind, wie beispielsweise das Luciferase Plasmid (pCMV-luc) [152]. Als weitere Beispiele können das LacZ-Gen [19], die Chloamphenicolacetyltransferase [91] und das Grün-fluoreszierende Protein [80] genannt werden. Hier wird zur Herstellung der Gentransfektionskomplexe und zur Charakterisierung der Transfektionseffizienz ausschließlich auf die Enzymreaktion des Luciferaseproteins mit seinem zugehörigem Substrat D-Luciferin zurückgegriffen [113, 118, 136]. Der grundlegende Mechanismus besteht in der Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin wie in Abbildung 1.7 dargestellt [69]. Bestimmt werden hierbei Lichtquanten, welche direkt proportional zur Luciferaseaktivität sind und anschließend auf den Proteingehalt normiert werden. Jener wird im Anschluss an ein Transfektionsexperiment mittels eines Pierce BCA Protein Assay bestimmt. Dieses Verfahren stellt eine schnelle und gut auswertbare Methode zum Vergleich der Effizienz unterschiedlicher Transfektionssysteme untereinander im Zellkulturmodell dar.

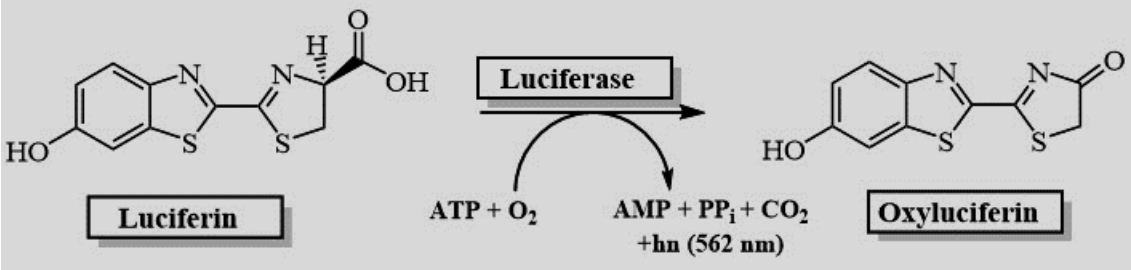

Abbildung 1.7 Darstellung des Reaktionsablaufs von Luciferin zu Oxyluciferin zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz [35]. Um die Transfektionseffizienz zu quantifizieren, wird eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgewertet. Hierbei reagiert das Luciferaseprotein (codiert auf dem Plasmid pCMV-luc) mit dem Substrat D-Luciferin. Durch die Anwesenheit von ATP und O_2 wird Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert. Durch die Messung der emittierten Lichtquanten (Lumineszenz), die neben AMP und CO_2 entstehen, kann die Aktivität der Luciferase bestimmt werden. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Konrad Engelhardt.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene nichtvirale Transfektionssysteme hinsichtlich ihrer toxikologischen Eigenschaften untersucht werden. Dabei ist eines der Hauptziele, einen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Genvehikel, ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und unerwünschten Nebenwirkungen aufzudecken und zu beschreiben. Im Vordergrund stehen Polyplexe aus den positiv geladenen Polymeren bPEI, IPEI, PEI F25 und pDMAEMA sowie die daraus abgeleiteten Lipopolyplexe.

Aufbauend auf vorangegangene Studienresultate zur Transfektion solcher Polyplexe und Lipopolyplexe soll der Einfluss der Lipidhülle auf die physikalischen Eigenschaften, Toxizität und Transfektionseffizienz untersucht werden.

Zusammen mit anderen Untersuchungen zur Transfektionseffizienz können hierdurch Grundlagen zur Verwendung alternativer Transportsysteme offengelegt werden, wobei der potentielle Schaden für den Organismus bei Entwicklung und Zulassung eines Arzneistoffes eine der elementaren Prioritäten darstellt. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Forschungsarbeit toxikologische Aspekte an einer Auswahl von Vektoren analysiert. Besondere Aufmerksamkeit gilt hierbei konkret der Aktivierung des Komplementsystems mit folgender Lyse, sowie allgemein hämolytischer unerwünschter Wirkungen und der Thrombozyten Aggregation. Auch ist es wichtig, die intrinsische Gerinnungszeit mit in die Studien einzubeziehen. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Untersuchungen wurde auf die Primärtoxizität der Formulierungen im Zellkultursystem (MTT, LDH) gelegt. Die Erkenntnisse der letzten Jahre führten zu verschiedenen Konzepten und Hypothesen, welche Mechanismen die Verwendbarkeit von Vektoren beeinflussen. Um ein hohes Maß an Wirksamkeit zu erreichen, sollen diese Bereiche genau verstanden werden, um künftige Vektoren entsprechend anpassen zu können.

Um die Zielsetzung der Dissertation zu erreichen, waren folgende Schritte notwendig:

Herstellung und physikalisch chemische Charakterisierung der Polyplexe und Lipopolyplexe

a) Die positiv geladenen Polymere bPEI, IPEI, PEI F25 und pDMAEMA werden mit dem Plasmid pCMV-luc komplexiert und die Polyplexe gebildet. Bei der Bildung der Komplexe wird das N/P-Verhältnis variiert.
b) Herstellung der Liposomen zur Bildung der Lipopolyplexe unter Verwendung der Lipide DPPC und Cholesterol.
c) Herstellung der Lipopolyplexe durch Fusion der Liposomen mit den Polyplexen.
d) Alle Formulierungen werden hinsichtlich Durchmesser, Polydispersität (PDI) und Zeta-Potential charakterisiert und mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) visualisiert.

Toxikologische Untersuchungen an den Transfektionssystemen

a) Bestimmung der klassischen Toxikologie mittels MTT- und LDH-Assay an SKOV-3 Zellen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Polyplexe und Lipoplexe.
b) Untersuchung der intrinsischen Gerinnung mit Hilfe der Bestimmung der aktivierten partiellen Prothrombinzeit (aPTT).
c) Bestimmung der Hämolyse

Testung der Transfektionseffizienz

An ausgewählten Formulierungen wird die Transfektionseffizienz mit pCMV-luc an SKOV-3 Zellen getestet.

3. Material und Methoden

3.0 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Tabelle 3.1 verwendete Geräte:

Bezeichnung	Bezugsquelle
ALPHA FT-IR Spektrometer	Bruker, Massachusetts, USA
Analysenwaage, Sartorius Secure®	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Coatron M1, Einkanal - Photometer mit einer Laser LED Optik von 470 nm	TECO Medical Instruments, Neufahrn, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss Microsocpy, Jena, Deutschland
Elektrophorese- Netzgerät MP-300V	Major Science, Saratoga, Kalifornien, USA
Eppendorf Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 10-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gefriertrockner Alpha 1-4 LSC	Martin Christ, Osterrode am Harz, Deutschland
Glasrundkolben 5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasrundkolben 500 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Inkubationsschüttler, IKA KS 4000	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
JPK Nanowizard 3	JPK, Berlin, Deutschland
Kontaktthermometer	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Rasterkraftmikroskop Nanoscope IV, Bioscope	Veeco Instruments, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer, IKA®RH basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Malvern Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Worcester, England
Massenspektrometer Q-Trap 2000	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Multikanal Pipette Pipet-Lite Multi Pipette L8-300XLS+	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Rotationsverdampfer Heidolph Laboroto 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Tabelle 3.2 Verwendetes Zubehör.

Bezeichnung	**Bezugsquelle**
Gelelektrophoresezubehör	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rührfisch	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	**Bezugsquelle**
Cantilever (MikroMasch NSC 14/AIBs)	Anfatec, Oelsnitz, Deutschland
Einmalpipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Extraktionshülsen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger, 76 mm x 26 mm	Knittel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polycarbonatmembranen 0,2 µm, 0,1 µm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Silikonwafer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sterilfilter Aufsatz 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3.4 Chemikalien und Ausgangsstoffe.

Bezeichnung	Bezugsquelle
bPEI, verzweigt	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cholesterol	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
GelRed™	Biotium Inc, Kalifornien, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
IPEI PEI Max 22 kDa linear	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium-bromid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
pDMAEMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Plasmid (pCMV-luc)	Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silikonöl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-n-oxyl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Zelllinie SKOV-3	ATCC HTB-77, Manassas, VA, USA

Tabelle 3.5 Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	**Zusammensetzung**	
DNA-Ladepuffer	Glycerol	3,9 ml
	SDS (10 % w/v)	500 µl
	EDTA (0,5 M)	200 µl
	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol	0,025 g
	Milli-Q-Wasser	10 ml
Physiologischer Puffer	HEPES	2,38 g (≙ 10 mM)
	Natriumchlorid	8,75 g (≙ 150 mM)
	Milli-Q-Wasser	1000 ml
	pH 7,4	
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	1000 ml
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	100 ml
KCl/HCl-Puffer	Kaliumchlorid (0,1 M)	50 ml
	Salzsäure (0,1 M)	10,6 ml
	pH 2,0	
Essigsäure/Acetat-Puffer	Essigsäure (0,1 M)	41,0 ml
	Natriumacetat	9,0 ml
	pH 4,0	
TRIS-HCl-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan (0,1 M)	50 ml
	Salzsäure (0,1 M)	41,4 ml
	pH 7,4	
Glycin-NaOH-Puffer	Glycin (0,1M)	50 ml

	Natriumhydroxid (0,1 M) pH 9,0	8,8 ml

Tabelle 3.6 Verwendete Kits und gebrauchsfertige Lösungen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cytotoxicity Detection Kit (Cat. Nr. 11 644 793 001)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
3,13% Natriumcitratpuffer PZN: 0762158	EIFELFANGO Neuenahr, Deutschland
Fetales Kälberserum, FKS Gibco	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
IMDM, Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
0,9% NaCl isotone Lösung (REF: 235 0710)	BRAUN, Melsungen, Deutschland
TEClot aPTT-S (A0300-025) Koagulationstest	TECO Medical Instruments, Neufahrn, Deutschland
Trypsin -EDTA für Zellkultur	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 3.7 Genutzte Software.

Bezeichnung	Bezugsquelle
MS-Office 2019	Microsoft
ChemDraw Professional 15	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
JPK Data Processing	JPK, Berlin, Deutschland
Malvern Processing	Malvern Instruments, Worcester, England
Origin Pro 9.0	Originlab, MA, USA

3.1 Herstellung der Polyplexe

Zur Herstellung der Polyplexe wurden die positiv geladenen Polymere lineares PEI (lPEI), verzweigtes PEI (bPEI), PEI F25 [35, 40, 41, 51, 60, 115, 115, 146] sowie das pDMAEMA [124] zusammen mit dem Plasmid pCMV-luc in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen eingesetzt. Das Herstellungsprotokoll basiert auf vorherigen Arbeiten von Schäfer [125] und Pinnapireddy [114, 115]. Zunächst erfolgte die Äquilibrierung der Polymerproben auf Raumtemperatur (RT) in einem physiologischen Puffer, Verdünnung und fünfminütiger Inkubation bei RT. Anschließend erfolgte die Vermischung der jeweiligen Polymere mit pDNA. Eine Inkubation von 20 min war notwendig zur adäquaten Polyplexbildung. Die Herstellung der Polyplexe erfolgte in 60 min. Pro Ansatz kondensierten wir 2 µg pDNA (Gesamtvolumen: 75 µl) mit einer entsprechenden Menge an Polymeren, gemäß dem gewünschten N/P-Verhältnis (Gesamtvolumen: 75 µl).

Zur Variation der Eigenschaften der Transfektionskomplexe wurden für eine Probe mehrere N/P-Verhältnisse getestet. Der Faktor N/P gibt dabei das Verhältnis von Stickstoff in dem kationischen Polymer zum Phosphat der verwendeten pDNA an. Die Berechnung ist wie folgt: Gleichung 1

$$N/P = \frac{m\ (PEI)}{43\ g/mol} * \frac{330\ g/mol}{m\ (pDNA)}$$

Hierbei stellt 330 g/mol für pDNA den Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden Einheit der pDNA und 43 g/mol den Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden positiven Einheit des Polymers dar. Da mit einer Gesamtmasse von 2 µg pDNA (siehe oben) gearbeitet wurde, berechnet sich die Menge an Polymeren am Beispiel von PEI wie folgt: Gleichung 2

$$m(PEI) = N/P * m(pDNA) * \frac{43\ g/mol}{330\ g/mol}$$

3.2 Herstellung der Liposomen und Lipopolyplexe

Als Lipidmischung für die Bildung aller Lipopolyplexe wurde DOPE: DPPC: Cholesterol (70: 15: 15=mol: mol: mol) verwendet. Die Lipidmischung wird aus Stammlösungen mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt. Die Ermittlung der erforderlichen

Volumina an Lipidlösungen erfolgte über das jeweilige Molekulargewicht. Zunächst wurden Lipide in einen 5 ml-Rundkolben pipettierte und falls notwendig mit einem ml organischem LM (Chloroform /MeOH (2/1 v/v) ergänzt. Zum Abdestillieren des Lösungsmittels und zur Gewährleistung eines homogenen und transparenten Lipidfilms am Rundkolbenboden befestigt man das Gefäß mit einer Kombiklammer an einem Rotationsverdampfer. Dieser wurde im Anschluss abgesenkt und mit dem Lösungsmittel-Lipid-Gemisch vollständig in ein +60 °C warmes Wasserbad eingetaucht. Die Spirale des Verdampfer Kühlers leitet eisgekühltes Wasser ein. Hierdurch bildete sich ein Niederschlag des verdampfenden Lösungsmittelgemisches an der Spirale und tropfte in einen Auffangbehälter. Der Rundkolben rotierte durchgehend im Wasserbad mit 285 rpm, während eine Vakuumpumpe, in Abhängigkeit von der Zeit, einen adäquaten Unterdruck erzeugte. Der vollständig getrocknete Lipidfilm wurde anschließend im +60 °C warmen Wasserbad mit HEPES Puffer (pH 7,4) hydratisiert. Durch einfaches Schütteln des Rundkolbens entstanden multilamellare Liposomen. Eine Vorzerkleinerung der großen Liposomen fand mit Hilfe eines Ultraschallbades statt (ca. 10 min), bis eine opaleszierende Dispersion entsteht. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen kam der Lipofast Extruder von Avestin (vorgewärmt auf +52 °C) zum Einsatz. Hierfür entnahm man 1 ml der Liposomenprobe und extrudierte diese 11x durch Polycarbonatmembranen (Porengrößen: 200 nm bzw. 100 nm) [93]. Die anschließende Sterilfiltration der fertigen Liposomen mit Hilfe eines Spritzenfilters (Porengröße: 0,2 µm) bereitete die Liposomen für den Einsatz in Zellkulturexperimenten vor. Derart gewonnene Liposomen lagerten vor Durchführung der Zellexperimente über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C. Die Gesamtkonzentration der Liposomen ergab 6 mg/ml.

Die Herstellung der Lipopolyplexe erfolgte nach der vorherigen Herstellung von Polyplexen und darauffolgender Zumischung von Liposomen in einem Masseverhältnis von 5/1 (µg Liposomen/ µg pDNA). Hierfür wurde eine Inkubation von 60 min bei RT durchgeführt (Abbildung 3.1) [118]. Die Fusionierung der Liposomen mit den Polyplexen erfolgte spontan, während das Mischungsgefäß leicht geschwenkt wurde. Anschließend werden alle Polyplexe und Lipopolyplexe physikalisch chemisch, hinsichtlich ihrer Teilchengröße, des Zeta-Potentials und ihrer Morphologie sowie biologisch hinsichtlich

der aPTT, der Neigung Hämolyse auszulösen, klassischer Zelltoxizität (LDH, MTT) sowie in ausgewählten Fällen der Transfektionseffizienz, untersucht.

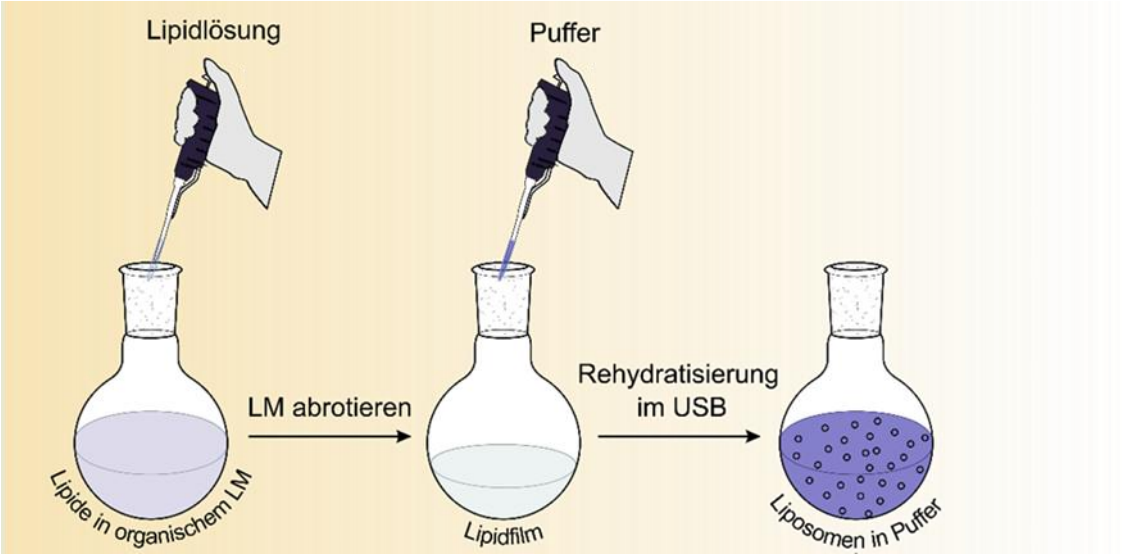

Abbildung 3.1 Herstellung von Liposomen nach der Filmmethode. Lipide werden in einen Rundkolben überführt. Durch Abdestillation des Lösungsmittels entsteht ein Lipidfilm, der anschließend mit einer wässrigen Pufferlösung hydratisiert wird. Durch einfaches Schütteln des Rundkolbens entstehen erst multilamellare Vesikel, die durch Extrusion in unilamellare Liposomen überführt werden können [62]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Sacha Hubing.

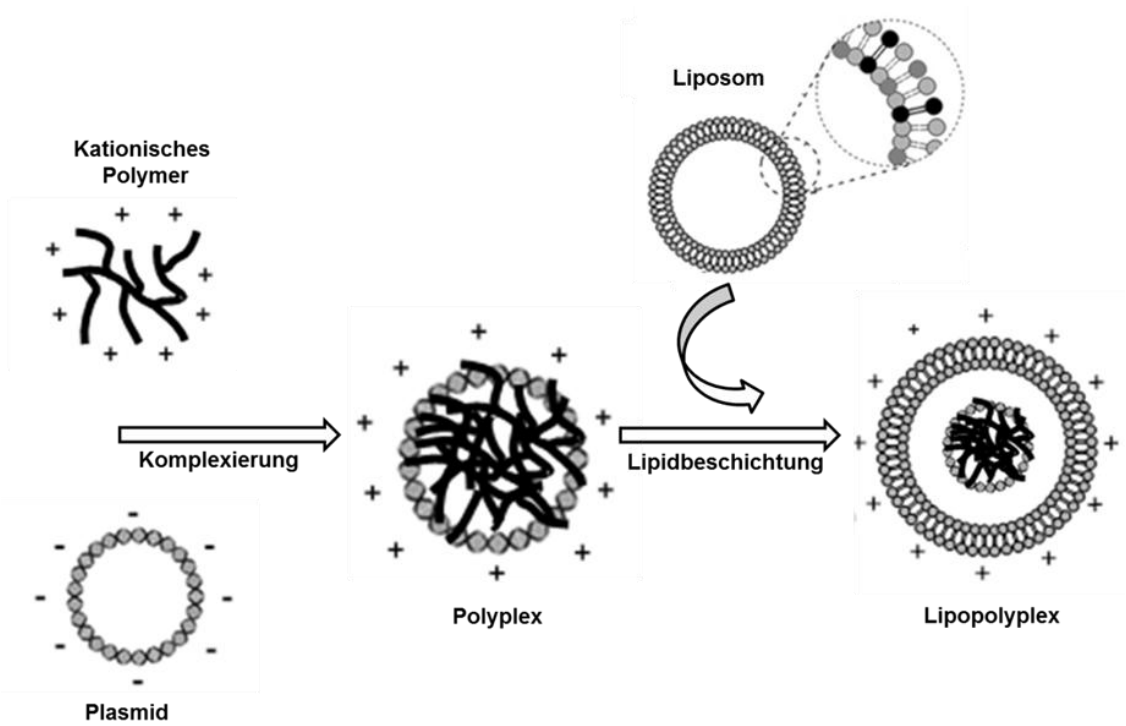

Abbildung 3.2 Verfahren zur Herstellung von Lipopolyplexen; Das kationische Polymer erzeugt bei Inkubation mit pDNA einen positiv geladenen Polyplex. Bei Zugabe von einer wässrigen Liposomendispersion erfolgt die Bildung von sogenannten Lipopolyplexen. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Udo Bakowsky.

3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Bestimmung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers erfolgte unter Verwendung des Verfahrens der Dynamischen Lichtstreuung. Diese ist auch als „Photonenkorrelationsspektroskopie“ (PCS) oder „quasielektrische Lichtstreuung“ (QELS) bekannt. Hierfür wurde ein Zetasizer Nano ZS (Malvern) verwendet. Als Lichtquelle kam ein He-Ne-Laser (683 nm, 10 mW) zum Einsatz. Stokes-Einstein-Gleichung: Gleichung 3

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

D = Diffusionskoeffizient
k = Boltzmann-Konstante
T = Temperatur in Kelvin
η = Viskosität des Mediums
r = Partikelradius

Durch resultierende Interferenz der Lichtstreuungen einzelner Partikel entstehen Fluktuationen in der Streulichtintensität, welche zeitlich ausgewertet werden können. Jene Intensität der Laserlichtstreuung (erfasst in einem Winkel von 173°) dient zur Berechnung der Partikelgröße. Die Brown´sche Molekularbewegung dient zur Grundlage der Errechnung der Partikelgröße [13, 90]. Resultierend hat ein verhältnismäßig kleineres Partikelteilchen eine im Vergleich zu einem Größeren erhöhte Eigenbewegung, welche zu einer detektierbar schnelleren Änderung der gestreuten Lichtquanten führt (Stokes-Einstein-Gesetz) [33]. Zur Messung wurden die einzelnen Proben mit Milli-Q-Wasser in einem Verhältnis 1:500 verdünnt, in eine Küvette (Typ: DTS0160) überführt und auf eine Temperatur von 23 °C gebracht. Drei unabhängige Proben wurden jeweils drei Mal mit mindestens jeweils 10 „runs“ gemessen, um daraus einen Mittelwert unter Ermittlung der Standardabweichung (SD) zu errechnen. Die Position der Laserquelle zur Probe, als auch die Blende zur Regulierung der Laserintensität wurden vom Zetasizer vor jeder Messung automatisch korrigierend eingestellt. Die relative Standardabweichung einer Probe wird durch die Polydispersität (PDI) angegeben. Diese kann grob in drei Kategorien unterteilt werden: als monodispers werden Proben mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,2 oder weniger bezeichnet. Eine Polydispersität von 0,2 - 0,3 wird als mittlerer Wert betrachtet, welche auf eine

bimodale Partikelgrößenverteilung hinweisen kann. Bei einer Polydispersität > 0,3 ist die Probe sehr uneinheitlich und wird als polydispers bezeichnet.

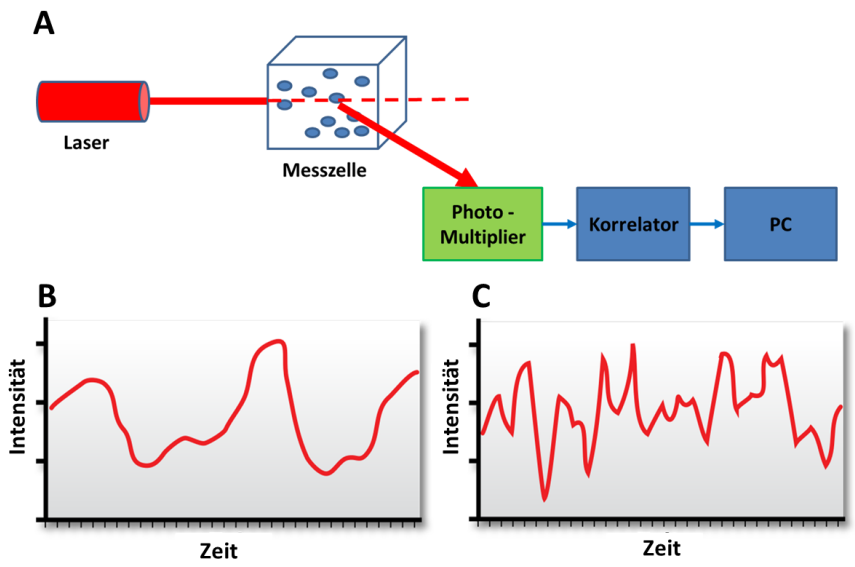

Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der dynamischen Lichtstreuung. A) Der Laserstrahl trifft auf Partikel, die sich in einer Küvette befinden und wird gestreut. Durch Erfassung des Streulichts in einem Winkel von 173 ° durch einen Detektor und nachgeschalteten Korrelators können „Zitterbewegungen“ der einzelnen Partikel gemessen werden (B und C). Das Ausmaß dieser Partikelbewegungen steht im Zusammenhang mit den einzelnen Partikelgrößen. Große Partikel zeigen pro Zeiteinheit weniger Bewegungen (B), als kleinere Partikel (C) die deutlich mehr „Zitterbewegungen“ ausführen.

3.4 Zeta-Potential

Das Vorhandensein gelöster Ionen in einer Dispersion führt zur Anlagerung von Gegen Ionen an der Partikeloberfläche. Hierdurch bildet sich eine Helmholtz-Doppelschicht. Durch erweiterte Anlagerung lockerer gebundener Ionen entsteht eine diffus ungeordnete Schicht. Kumuliert erscheinen diese Partikel in ihrer Ladung neutral, da sich Ladungen am Partikel und Ionenladung innerhalb des Suspensionsmediums ausgleichen [63]. Um das Zeta-Potential zu bestimmen, wurde ebenfalls der Zetasizer Nano ZS (Malvern, Deutschland) verwendet und die Ermittlung fand im direkten Anschluss an die Größenmessung der Partikel statt. Das Messprinzip zur Bestimmung ist die Laser-Doppler-Anemometrie. Hierfür wird an beiden Elektroden der Küvette eine Spannung angelegt, mit dem Ziel der Wanderung der Partikel mit ihren Ladungen zu den jeweils gegensätzlichen Elektroden. Die Bewegung durch den Laser führt zur Lichtstreuung und gleichzeitig reißt die lockere diffuse Schicht ab, welche letztendlich das Zeta-Potential

bestimmt. Die entsprechende Umrechnung von der Bewegungsgeschwindigkeit des Partikels in ein Zeta-Potential gelingt mittels der Henry-Funktion bzw. der Hückel- und Smoluchowski-Näherung [131]. Gleichung 4:

Henry-Gleichung:

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

ε = Dielektrizitätskonstante der Probe
ζ = Zeta-Potential
f(Ka) = Henry Funktion
η = dynamische Viskosität
U_E = elektrophoretische Beweglichkeit

3.5 Rasterkraftmikroskopie

Zur exakten Bestimmung allgemeiner Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit von Liposomen und Transfektionskomplexen wurde das Rasterkraftmikroskop verwendet. Die Messungen fanden an dem institutseigenen Nanowizard 3 (JPK-Instruments, Berlin) oder dem Nanoscope IV Bioscope (Veeco Instruments, Darmstadt) statt. Hierzu befand sich das Mikroskop während der Messung in einer schallisolierten Kammer, bei einer Raumtemperatur von +23°C. Bei dieser Methode dient eine feinste Nadel (Tip genannt) am Ende eines Cantilevers zur Abtastung der Partikel. Dieser Cantilever verhält sich ähnlich einer Feder mit einer Kraftkonstante einer entsprechenden Amplitude und Frequenz. Jeder dieser kommerziell erhältlichen Geräte besitzt spezifische Einstellungen, welche exakt auf die vorliegende Probe abgestimmt werden müssen [14, 127, 1036]. Für beispielsweise harte Proben werden Cantilever mit hoher Kraftkonstante benötigt. Umgekehrt wird bei weichen Substanzen wie Liposomen, Polyplexen oder Lipoplexen zwingend Cantilever mit einer niedrigen Kraftkonstante benötigt. Zur Messung wurde ein Cantilever (NSC 14/AIBs, MikroMasch, Anfatec, Oelsnitz, Deutschland) mit pyramidaler Si_3N_4 Spitze verwendet. Der Cantilever hatte eine Länge von 125 µm, eine Breite von 25 µm sowie eine Dicke von 2,1 µm. Die Kraftkonstante betrug 5 N/m und die Resonanzfrequenz lag bei ca. 140 kHz. Aufgrund

der Messtechnik können Oberflächenstrukturen mit Höhen und Tiefen auf der Probe dargestellt werden, resultierend als verschieden starke räumliche Auslenkungen der Nadel in x, y und z Richtung. Außerdem wird durch die veränderliche Höhe der Probe und die Materialeigenschaften, wie z. B. Weichheit, die Bewegung des Cantilevers gedämpft, was die Amplitude bzw. das Amplitudensignal empfindlich beeinflusst. Diese Auslenkungen werden durch einen Laserstrahl detektiert, der von der Rückseite des Cantilevers auf einen Photodetektor reflektiert wird. Gemessen wurde vorzugsweise im „intermittent-contact“-Modus, wobei die Nadel des Cantilevers die Probe nur zwischenzeitlich berührt, jedoch keinen dauerhaften Kontakt ausübt [75]. Der Vorteil ist, dass sowohl Nadel als auch Probenoberfläche geschont werden. Die Liposomen, Polyplexe sowie Lipopolyplexe wurden vor der Messung 1:100 in Milli-Q-Wasser verdünnt und auf einen 1 x 1 cm großen Silikonwafer pipettiert. Nach zwanzigminütiger Inkubation wurde die Suspension abgesaugt und die zurückbleibenden Partikel analysiert. Die Bildausschnitte hatten eine Größe von 3 x 3 µm. Die Scangeschwindigkeit betrug 0,5 - 1,5 Hz. Die Größenbestimmungen der Partikel wurden mit Hilfe des Höhenbildes durchgeführt. Hierzu zählte man in einem Bildausschnitt mindestens 50 Partikel. Die Zählung wird auf drei weiteren Bildausschnitten wiederholt und man bildete einen Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung zur Dokumentation.

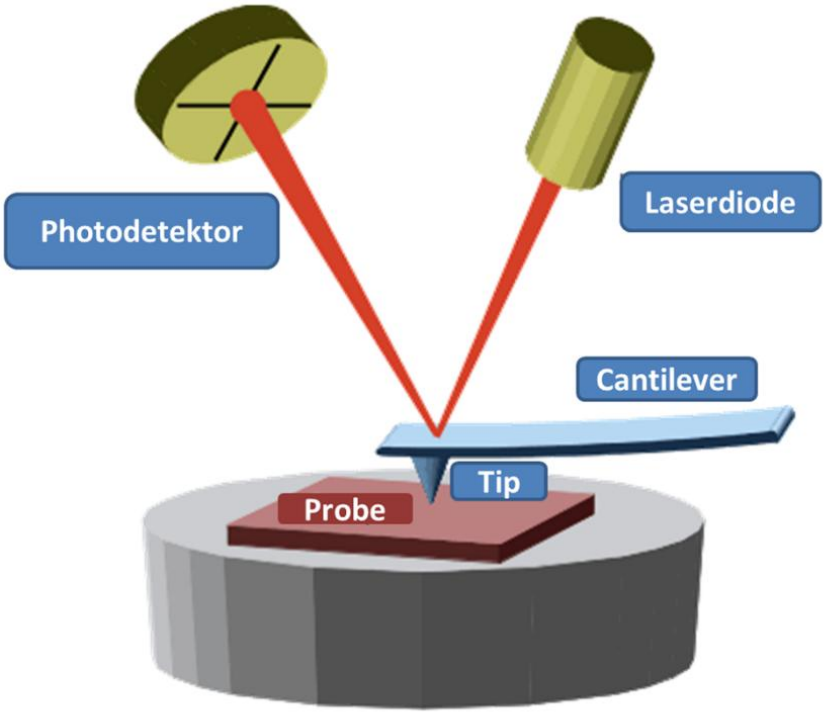

Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.
Eine Messspitze (engl. *tip*), die sich an der Spitze des Cantilevers befindet, wird als Messsonde (engl. *probe*) in geringem Abstand über die Probenoberfläche geführt. Ein piezoelektrischer Scanner bewegt hierfür entweder die Spitze über die Probe oder die Probe unter der feststehenden Spitze. Die Verbiegungen des Cantilevers, hervorgerufen durch Kräfte zwischen Probe und Spitze, werden hochaufgelöst gemessen, meist indem ein Laserstrahl auf die Spitze gerichtet und der reflektierte Strahl mit einem Photodetektor aufgefangen wird.

3.6 Kultivierung von SKOV-3 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl bei Transfektionsexperimenten als auch bei Untersuchungen zur Toxizität (MTT, LDH) die Zelllinie SKOV-3 (ATCC HTB-77, Manassas, USA), abgeleitet von einen ovariellen Adenokarzinoms, eingesetzt [114, 115, 125, 136]. Bei der Kultivierung der Zellen wurden zunächst 10 ml vorgewärmtes IMDM (Capricorn Scientific, Lot Nr. CP16-1182) Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Übertragung auf die gefrorenen SKOV-3 Zellen und als nächster Schritt die Rücküberführung der angetauten Zellen in mehreren Schritten, bis hin zum vollständigen Auftauen, in das 15ml Reaktionsgefäß. Eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 U/min (300 g) schloss sich an. Der sich ergebende Überstand wurde vorsichtig unter Raumtemperatur abgesaugt und das verbleibende Pellet in 10 ml IMDM-Medium

resuspendiert. Es erfolgte die Pipettierung von jeweils einem Drittel und der restlichen zwei-Drittel der Zellen auf jeweils eine Petrischale. Anschließend gingen die Schalen in den Brutschrank und die Zelllinien wurden bei 8,5% CO_2, 37°C und 95% relative Luftfeuchtigkeit kultiviert. Eine Inkubationszeit von 48h bis eine Konfluenz von 80% erreicht war, schloss sich an. Anschließend erfolgten die Ablösung und Aussaat der Zellen auf 96 Well Mikrotiterplatten.

Nachdem im Anschluss das Medium aus den Petrischalen vorsichtig abgesaugt wurde, wird das verbliebene Zellpellet mit 5ml EBSS-Puffer gewaschen. Nach dieser Zugabe erfolgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 10 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurde 1ml Accutase Cell Detachment Lösung hinzugegeben, nachdem zuvor der EBSS-Puffer abgesaugt wurde. Eine erneute Inkubation bis zur vollständigen Ablösung der Zellen erfolgte für einige Minuten im Brutschrank bei 37°C. Jene vollständige Ablösung konnte unter dem Mikroskop bestätigt und erfasst werden und so im Anschluss die Zellen im 9ml IMDM-Medium resuspendiert werden. Zunächst erfolgte nun die gründliche Homogenisierung der Zellen und die Suspension wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Pipettierung eines Tropfens der Suspension in eine Neubauer Zählkammer und unter dem Mikroskop die Bestimmung der Zellzahl. Die verbliebene Zellsuspension kam für 5 min bei 1000/min zur Abzentrifugation. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10ml Medium zur Resuspension überführt.

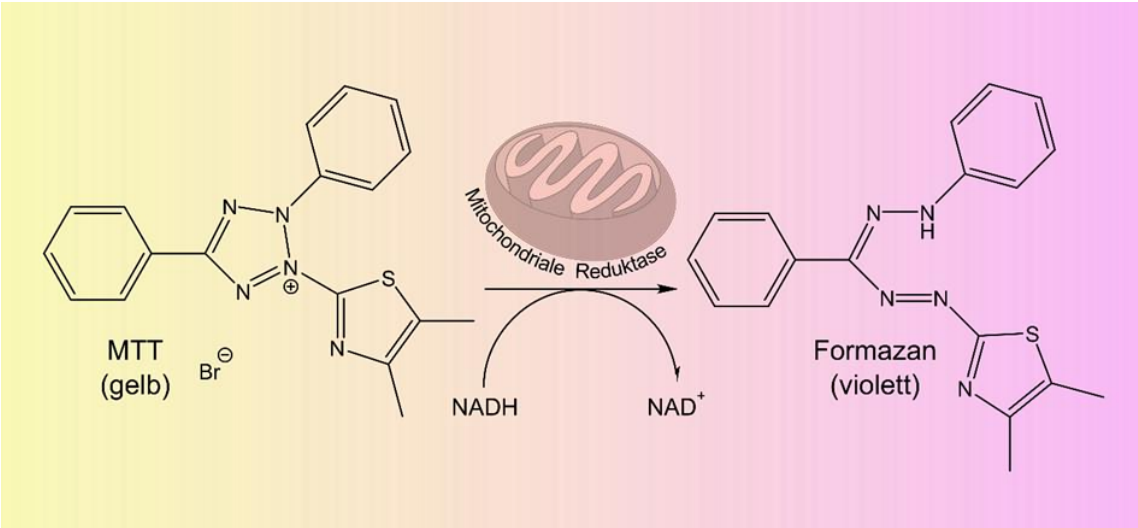

Abbildung 3.5 Farbreaktion des MTT-Salzes zu dem schwer löslichen Formazan ((E, Z) -5(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan). Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Testes beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Reduktion ist abhängig von den mitochondrialen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH [62]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Sascha Hubing.

Für die folgend beschriebenen Zytotoxizitäts- und Zellviabilitätstestungen erfolgte die Aussaat der Zelllinie mit $1x10^4$ Zellen pro Well in einer 96 Well Mikrotiterplatte. Im Anschluss wurden alle Platten zur Kultivierung in den Brutschrank gegeben, bei 8,5% CO_2, 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 24h.

3.7 MTT – Zellviabilitätstest

Der MTT-Test ist einer der am häufigsten verwendeten Testsysteme zur Ermittlung des Wachstums und der Lebensfähigkeit von Zellen. Die Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase dient als Grundlage [114, 115, 125, 136].
Mit Hilfe des Nachweises der Reduktion des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid dient der MTT-Test dem *in-vitro* Nachweis von metabolisch aktiven, lebenden Zellen (siehe Abbildung 3.5). Indirekt wird hierbei die intrazelluläre Aktivität der Mitochondrien ermittelt, was mit dem blau-violetten Formazan gelingt. Zunächst erfolgt die Resuspendierung der Formazan Kristalle mit Dimethylsulfoxid und im Anschluss deren photometrische Bestimmung der Testansätze. Je mehr biologisch und metabolisch aktive Zellen im Testsubstrat vorhanden sind, desto intensiver die Färbung. Gleichung 5:

$$Viabilität(\%) = \frac{Extinktion_{Probe} - Extinktion_{negativ\ Kontrolle}}{Extinktion_{positiv\ Kontrolle} - Extinktion_{negativ\ Kontrolle}} x100$$

Die Aussaat der Zellen erfolgte auf 96-Well-Platten ($1x10^4$ SKOV-3 Zellen / $0{,}32cm^2$ pro Well) 24 h vor dem Experiment. Zunächst wurden 25µl der Probenlösung (entspricht für jede Formulierung 0,2 µg pDNA) zusammen mit 75 µl IMDM-Medium in die Kammern der 96 Well Mikrotiterplatten gegeben. Mit dem Ziel der Überprüfung der Viabilität, wurde nach 4 Stunden weiteres 100 µl IMDM-Medium hinzugefügt und der Überstand nach 48h im Brustschrank, bei 8,5% CO_2, 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit

abgesaugt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 4h im Brutschrank, nachdem 200 µl der 1:10 verdünnte MTT-Reaktionslösung hinzugefügt wurden. Der Überstand wurde vorsichtig angesaugt und 200 µl DMS hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte bei 510 nm die photometrische Bestimmung am Plattenreader (FLUOstar). Sowohl die Testansätze als auch die negative und positive Kontrolle, wurden mit jeweils dreifacher Wiederholung getestet. Als Negativkontrolle verwendeten wir mit 50 µl DMSO behandelte Zellen und als positive Kontrolle das IMDM-Medium. So lässt sich eine Viabilität der Zellen nach Formel 5 berechnen.

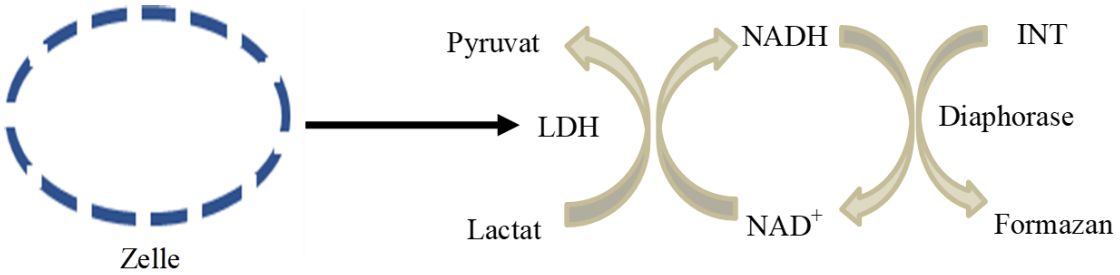

Abbildung 3.6 Reaktionsabfolge eines LDH Assays. Bei Beschädigung der Plasmamembran wird LDH in das Zellkulturmedium freigesetzt. Die freigesetzte LDH kann durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion quantifiziert werden. Zunächst katalysiert LDH durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH die Umwandlung von Laktat in Pyruvat. Anschließend wird NADH mit INT durch Diaphorase zu einem roten Formazan-Produkt reduziert. Deshalb ist die Menge des gebildeten Formazans direkt proportional zur Menge der freigesetzten LDH im Medium nach [35]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Konrad Engelhardt.

3.8 LDH – Zell Zytotoxizitätstest

Mit Hilfe des in-*vitro* verwendeten Lactatdehydrogenase (LDH)-Tests ist es möglich, den Einfluss von toxikologischen Stoffen auf Zellen zu eruieren. LDH ist ein Enzym, welches sich im Zytoplasma der Zellen befindet. Kommt es zu einer Zerstörung der Zellmembran, so tritt es rasch in das Zellkulturmedium aus. Dessen quantifizierter Nachweis dient als Rückschluss über den Zustand der Zelle bzw. Membranschäden. Wir verwendeten einen Nachweis-Kit (Cytotoxicity Detection Kit, Roche Applied Science, Cat. Nr. 11644793001), welcher auf zwei aufeinander folgenden Redoxreaktionen beruht. Im ersten Schritt wird Lactat zu Pyruvat konvergiert (Abbildung 3.6), hierbei wird das Co-Enzym NAD^+ durch die Übertragung von Wasserstoff zu $NADH/H^+$ reduziert. Im folgenden Schritt überträgt der Katalysator Diaphorase den Wasserstoff des $NADH/H^+$ auf INT, ein dezent gelblich

gefärbtes Tetrazolium-Salz (2-[4-Idophenyl] -3-[4-nitrophenyl] -5-phenyltetrazoliumchlorid). Hierbei erfolgt eine Reduktion des INT zu einem mehr rötlich gefärbten Formazan-Salz. Die Aktivität der LDH im Zellkulturmedium ist abhängig vom Ausmaß der zerstörten Zellen. Folglich resultiert ein direkter Nachweis und Zusammenhang von der Formazan Bildung und der Rotfärbung des Testansatzes. Zur konkreten Ermittlung der Zytotoxizität wurden 25µl der Probenlösung (entspricht für jede Formulierung 0,2 µg pDNA) in die Kammern der 96 Well Mikrotiterplatten ($1x10^4$ SKOV-3 Zellen / $0,32cm^2$ pro Well) gegeben, zusammen mit 75 µl des IMDM-Mediums. Es folgte eine Ruhephase von 4 Stunden. Im Anschluss erfolgte die weitere Hinzugabe von 100 µl IMDM-Medium. Im Brutschrank wurde der Ansatz bei 8,5% CO_2, 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 48h inkubiert und nach Ablauf der Zeit der Überstand vorsichtig auf neue 96 Well Mikrotiterplatten pipettiert. Im Anschluss wurde 100 µl frische Reaktionslösung aus dem Detektionskit hinzugefügt und die Platten bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung bei 490 nm. Sowohl die Testansätze als auch alle positiven und negativen Kontrollen wurden jeweils dreifach gemessen [114, 115, 125, 136].

Hintergrundkontrolle: IMDM-Medium (200µl)
Positiv Kontrolle (Low): spontane LDH-Abgabe von unbehandelten Zellen, (100µl/Well)
Positiv Kontrolle (High): maximale LDH-Abgabe (50µl DMSO + 50µl IMDM-Medium).

Die Zytotoxizität kann anhand folgender Formel ermittelt werden: Gleichung 6

$$Zytotoxizität(\%) = \frac{Extinktion_{Probe} - Extinktion_{Hintergrund} - Extinktion_{LOW\ Kontrolle}}{Extinktion_{HIGH\ Kontrolle} - Extinktion_{LOW\ Kontrolle}} x100$$

3.9 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Als Vorbereitung erfolgte 24 Stunden vor dem Experiment eine Ausplattierung der SKOV-3 Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte. Hierfür erfolgte die Lösung der Zellen am Vortag aus einer Petrischale, sowie Überführung eines geringen Volumens in eine Neubauer-Zählkammer mit anschließender quantitativer Evaluation unter einem Lichtmikroskop (freundlicherweise erfolgt durch MTA Fr. E. Mohr). Die Zellzahl pro Well

betrug 1 x 10^4, sodass zum Zeitpunkt der Transfektion eine optische Zellkonfluenz von 70 - 80 % vorlag. Die nächtliche Haltung der Zellen in Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2.

Lipopolyplexe und Polyplexe wurden für die Transfektionsexperimente frisch hergestellt. Die Herstellungszeit beträgt 60 min. was in der praktischen Planung der Experimente beachtet werden musste. Generell wurden pro Ansatz 25 µl (entspricht für jede Formulierung 0,2 µg pDNA) entnommen, jeweils in 3 Wells pipettiert und bis 100 µl mit Serum-haltigem Medium verdünnt. Nach 4h Inkubationszeit ersetzte man das Medium mit frischem serum-haltigem Medium (200 µl) und ließ die Zellen 48h wachsen. Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen mit 200 µl PBS-Puffer gewaschen und nachfolgend mit 50 µl Lysepuffer für 30 min im Laborschüttler lysiert. 20 µl des Lysats übertrug man in eine weiße 96-Well-Platte, setzte sie in das Mikroplatten-Lesegerät, welches durch einen automatischen Pipettiervorgang 50 µl Luciferinsubstrat (470 µM D-Luciferin, 270 µM Koenzym A, 33,3 mM DTT, 530 µM ATP, 1,07 mM H_2CO_3, 4 Mg^{2+} x 5 H_2O, 2,67 mM $MgSO_4$, 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA) hinzufügte [114, 115, 125, 136].

3.10 Bestimmung des Proteingehaltes (Pierce BCA Protein Assay)

Der Proteingehalt der Zellen im Anschluss an die Transfektion wurde als Bezugsgröße zur Luciferaseaktivität verwendet [114, 125, 136, 115]. Hierzu wurden 20µl des Zelllysates in eine transparente 96-Well-Platte pipettiert. Ergänzend erfolgte der Zusatz von 200µl einer Mischung aus Reagenz A und Reagenz B (1:20) und dreißigminütige Inkubation im Laborschüttler bei 37°C. Das Prinzip des Assays zur Detektion der Proteinkonzentration beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} -Ionen in alkalischem Milieu, in der Anwesenheit von Proteinen. Je zwei Moleküle des Nachweisreagenz - der 2,2-Bichinolyl-4,4-dicarbonsäure - können mit einem Cu^{1+}- Ion einen wasserlöslichen Komplex bilden, welcher sich durch eine starke Absorption bei 562 nm auszeichnet (Abbildung 3.7) [144].

Photometrisch erfolgte die Evaluation der Violettfärbung der Probe nach erfolgreicher Reaktion bei 562 nm. Über einen weiten Bereich besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen dem Grad der Färbung und der vorhandenen

Proteinkonzentration, welche aus dem Extinktionswert der Probe ermittelt werden konnte. Weiterhin erfolgte die exakte Bestimmung der Proteinkonzentration durch Erstellung einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin. Die lineare Beziehung zwischen Konzentration des Standards und Absorption ermöglichte die Ermittlung des unbekannten Proteingehaltes innerhalb der Wells.

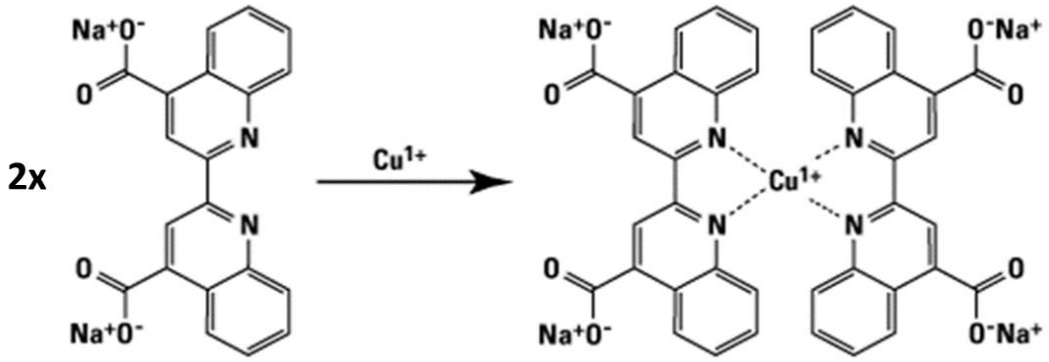

Abbildung 3.7 Darstellung der Farbreaktion des BCA Assays. Je zwei Moleküle des Nachweis Reagenzes, der 2,2-Bichinolyl-4,4-dicarbonsäure, können mit einem Cu^{1+}- Ion einen wasserlöslichen Komplex bilden, der sich durch eine starke Absorption bei 562 nm auszeichnet [35]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Konrad Engelhardt.

3.11 Bestimmung der Hämolyse

Aufgrund der Unfähigkeit der körpereigenen Erythrozyten zur aktiven Proteinsynthese, bei fehlendem Zellkern, ergibt sich eine eingeschränkte Lebensdauer dieser Zellen von rund 115-120 Tagen. Der Funktionszustand verringert sich im Verlauf dieses Zeitraumes kontinuierlich, was bei fehlender eigener dynamischer Formanpassung in den kleinsten Gefäßen zu einer Selektion und anschließendem extravaskulären Abbau in Milz, Leber und Knochenmark führt. So treten der Blutfarbstoff Hämoglobin, Kalium und weitere intrazelluläre Stoffe im Rahmen dieses Hämolyseprozesses aus. Diese Erscheinungen kann man in Messungen erfassen oder klinisch am Patienten anhand eines Ikterus oder einer Hämoglobinurie und verfärbtem Stuhl wahrnehmen.

In dieser Arbeit wurde zur Hämolysebestimmung ein von Evans et al. 2013 [39] beschriebener Test verwendet. Es handelt sich um eine geeignete und schnelle Methode zur Evaluation der Zellkompatibilität von Erythrozyten mit Lipopolyplexen bzw. Polyplexen. Grundsätzlich werden die Komponenten in einem gemeinsamen

Reaktionsansatz für eine definierte Zeit und unter festgelegter Temperatur gemeinsam inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine photometrische Detektion bei 405nm, wobei eine Aussage über die prozentual zerstörten Erythrozyten ermöglicht wird. Eine 100%ige Hämolysereferenz dient als Positivkontrolle.

Für die Hämolyseuntersuchungen war die vorab Präparation von Erythrozyten notwendig. Im ersten Schritt wurde hierfür eine frische Probe venöses Blut durch sauberes Einstechen in die *Vena basilica* im ulnarseitigen Unterarmbereich gewonnen. Das Vollblut (9 Teile) wird anschließend mit 3,13% Natriumcitratpuffer (1 Teil, PZN: 0762158 EIFELFANGO, Neuenahr, Deutschland) vermischt und die Probe bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R Zentrifuge, Heraeus Thermo Scentific). Die Lagerung und Stabilität des aufbereiteten Plasmas beträgt: 4h bei 18 - 26°C, 8h bei 2 - 8°C, 14 Tage bei -20°C, 6 Monate bei -70°C.

Für die Messungen wurden die abzentrifugierten Blutzellen aus der Citratplasma Vorbereitung 3-mal in 0,9% NaCl Spüllösung resuspendiert und wiederholt bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Waschschritt, verdünnt man die Erythrozyten im Mischungsverhältnis 1:50 mit 10mM HEPES Puffer [29].

Im verwendeten Ansatz wurden 50µl der Polyplexe bzw. Lipopolyplexe (entspricht für jede Formulierung 0,4 µg pDNA) mit N/P-Verhältnissen von 1 bis 35 zusammen mit 50µl unserer aufbereiteten Erythrozyten auf eine 96 Well Mikrotiterplatte gegeben und im Inkubator bei 37°C für eine Stunde inkubiert [115]. Im Anschluss erfolgte für zehn Minuten die Zentrifugation bei 300 x g. Der sich daraus ergebende Überstand wurde mit großer Vorsicht auf eine neue 96 Well Mikrotiterplatte überführt und der photometrischen Messung bei 540 nm zugeführt. Als Negativkontrolle wurde die Erythrozytendispersion selbst verwendet und als Positivkontrolle diente DMSO. Mit Hilfe der Formel wird die Hämolyse berechnet: Gleichung 7

$$Hämolyse\ (\%) = \frac{Extinktion_{\ Probe} - Extinktion_{\ Blindwert}}{Extinktion_{\ positiv\ Kontrolle} - Extinktion_{\ Blindwert}} x100$$

3.12 Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

Mit Hilfe der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit lassen sich Aussagen über den Funktionszustand des endogenen Systems sowie der gemeinsamen Endstrecke der Hämostase aus dem endogenen und exogenen System, wie auch den Einfluss eines Wirkstoffträgersystems auf dieses System, ableiten. Die Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII werden als isolierte Einheit betrachtet, nachdem eine Zugabe von verschiedenen Oberflächenaktivatoren, Phospholipiden und Kalzium erfolgte. Normwertige Ergebnisse liegen zwischen 25s – 38s. Eine abweichende Messung kann ein Hinweis auf genetische Erkrankungen des Hämostasesystems sein, wie beispielsweise einer Hämophilie A oder B. Defizite der genannten Gerinnungsfaktoren und des Fletcher Faktors können pathologische Werte ebenso, wie die Anwesenheit von Heparin, Leberfunktionseinschränkungen, Mangel an Vitamin K oder aber eine unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung erklären. Im klinischen Alltag dient die Bestimmung des Wertes einer Evaluation der Heparin- und Cumaringabe, beispielsweise bei zuvor antikoagulierten Patienten, welche im Rahmen einer operativen Versorgung vorrübergehend mit Heparin therapeutisch geführt werden.

Zur Untersuchung des menschlichen Plasmas in *vitro* unter Laborbedingungen dient das Einkanal Photometer Coatron M1 (Laser LED Optik von 470 nm, TECO). Grundsätzlich kann dieses Gerät mehrere Gerinnungsparameter bestimmen, welche alle in der Endstrecke des Fibrinkomplexes enden. Das aPTT-S Reaktionskit (TEClot aPTT-S, A0300-025), welches in dieser Arbeit verwendet wurde, nutzt Silikat als Aktivator und zur Stabilisierung Phospholipide [115, 29].

Zur Vorbereitung der Untersuchungen wurde die $CaCl_2$ Lösung (0,025M) zunächst für ca. 10 min im Coatron M1 Photometer vorgewärmt. Anschließend wurden 25µl vorbereitete Plasma Probe in eine Testküvette pipettiert und für 1 - 2 min bei 37°C vorgewärmt. Danach wurden 25µl aPTT-Reagenz zur Probe hinzugefügt und für 3 min bei 37°C inkubiert. Parallel zur Zugabe von 25µl $CaCl_2$ Lösung (0,025M) wurde die Messung gestartet.

Zur Aufnahme einer Plasmakurve wurde aufbereitetes Plasma in definierter Menge von 0 bis 25µl eingesetzt. Das fehlende Volumen (Gesamtvolumen 25µl) wurde mit 0,9% isotoner NaCl Lösung ergänzt. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Zur Untersuchung der Proben wurden 25µl Plasma und die 25 µl der Nanopartikeldispersion (entspricht für jede Formulierung 0,2 µg pDNA) in die Testküvette pipettiert und für 1 - 2 min bei 37°C vorgewärmt. Das fehlende Volumen wurde mit PBS-Puffer ergänzt. Danach sind 50 µl aPTT-Reagens zur Probe hinzugefügt worden. Der Ansatz wurde anschließend für genau 3 min bei 37°C inkubiert. Parallel zur Zugabe von 50 µl $CaCl_2$ (0,025 M) konnte die photometrische Messung erfolgen.

Abbildung 3.8: Coatron M1 Einkanal Photometer, TECO

3.13 Statistische Auswertung

Sämtliche Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, mindestens in Triplikaten durchgeführt und deren Ergebnisse als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Zur Bestimmung statistischer Signifikanz wurden Zweistichproben-*t*-Tests durchgeführt, wobei Wahrscheinlichkeitswerte (*p*-Werte) von $p < 0{,}05$ als signifikant betrachtet wurden. Weiterhin wurden statistische Signifikanzunterschiede mit * für $p < 0{,}05$ bzw. ** für $p < 0{,}01$ und *** für $p < 0{,}001$ dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Polyplexe, Liposomen und Lipopolyplexe

4.1.1 Polyplexe

Unter den verschiedenen Arten von nichtviralen Trägern wurden kationische Polymere auf Aminbasis aufgrund ihrer zahlreichen intrinsischen Vorteile gegenüber viralen Vektoren, wie einfache Synthese, geringe Immunogenität und hohe Nukleinsäureverpackungskapazität, intensiv für die Entwicklung von Gentransfektionssytemen untersucht [10, 26]. Polyethylenimin ist eines der am besten untersuchten und charakterisierten kationischen Polymere [81, 18]. Angesichts des Ausmaßes der Verzweigung kann PEI in zwei grundlegende Erscheinungsformen unterteilt werden: lineares PEI (lPEI) und verzweigtes PEI (bPEI) (siehe Abb 1.5). lPEI enthält sekundäre Amine, [96] dagegen enthält bPEI primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen. Das Ausmaß der Verzweigung von PEI hat einen signifikanten Einfluss auf die Transfektionseffizienz und Toxizität. Im Allgemeinen ist bPEI in der Lage, Nuklearsäuren stärker zu komprimieren als lPEI mit ähnlichem Molekulargewicht, während lPEI sich durch eine geringe Zytotoxizität in vivo auszeichnet [15]. Außerdem beeinflusst die Länge freier PEI-Ketten auch die Transfektionseffizienz und Toxizität der Vektoren. Einige Autoren konnten zeigen, dass PEI-Polyplexe mit freien Fragmenten (bPEI) viel effizienter bei der Gentransfektion sind und mehr Zytotoxizität aufwiesen als solche ohne freie Ketten. Interessanterweise fanden sie auch heraus, dass die Transfektionseffizienz von bPEI-Polyplexen bei einem niedrigen N/P-Verhältnis höher war als die von lPEI-Polyplexen [81, 101, 115, 146]. Darüber hinaus assoziiert sich die Gentransfektionseffizienz von PEI positiv mit dem Molekulargewicht, wobei die Zytotoxizität eine negative Korrelation aufweist. Hochmolekulares PEI (HMW-PEI) weist eine hohe Transfektionseffizienz auf. Insbesondere PEI mit einem hohen Molekulargewicht von 25 kDa wurde lange als „Goldstandard“ der Gentransfektion angesehen, während die starke kationische Dichte aufgrund der inhärenten Nichtabbaubarkeit eine schwere Toxizität induziert [81, 115, 137]. Im Vergleich dazu weist niedermolekulares PEI (LMW-PEI) eine geringe Toxizität auf, erzeugt aber gleichzeitig eine geringe Gentransfektionsaktivität [45, 48, 60, 86, 98, 146, 108]. Mittlere Molekuargewichte wie beim PEI F25 werden oft als der praktikable Mittelweg mit guter

Transfektionseffizienz und tolerabler Toxizität beschrieben [40, 41, 51, 60, 114, 125, 146].

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die PEI-vermittelten zytotoxischen Reaktionen stark mit Störungen in Zellmembranen und bioenergetischen Prozessen verknüpft sind. Prinzipiell steht die Toxizität polymerer Kationen, wie dem PEI oder auch dem pDMAEMA, zur Bildung von Gentransfektionssystemen in Verbindung mit deren Polymerkonzentration, Molekulargewicht, elektrischer Ladung und Struktur [45, 47, 48, 54, 55, 56, 64, 86, 98, 108, 146]. Die polydisperse Natur solcher Polykationen erschwert detaillierte Struktur-Aktivitäts-Beziehungsstudien hinsichtlich der Toxizität, Transfektionseffizienz und der Form bzw. der Gestalt der Komplexe.

Die inhärente Zytotoxizität und meist schlechte Blutkompatibilität der PEI-basierten, wie auch der pDMAEMA Genvehikel steht einer breiten klinischen Anwendung derzeit im Wege. Aus diesem Grund wurden breite Untersuchungen unternommen, um solche Einschränkungen zu überwinden. Zur Verbesserung der Blutkompatibilität, wie auch der Zirkulationszeit, wird oft die „Stealth-Technologie“ genutzt, um die übermäßigen positiven Oberflächenladungen der Polymere abzuschirmen. Das Pfropfen von abbaubaren natürlichen oder synthetischen Materialien in die PEIs oder das Einführen von hydrophoben Segmenten in die PEI-Ketten ist ebenfalls wirksam zur Verbesserung der Biokompatibilität [109]. Die Einführung der PEG- Ketten als Schutzmittel reduzierte die Toxizität deutlich, allerdings hatte dies auch eine Verringerung der Transfektionseffizienz zur Folge. Dieses ungelöste „PEG-Dilemma“ machte weitere Modifikationen erforderlich, wobei hydrophiles Poly-2-Methyloxazol, negativ geladene Polysaccharide einschließlich Alginsäure, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Poly-γ-Glutaminsäure und Lipide zum Schutz der Oberfläche verwendet werden, um die Ladung von kationischen Polymeren abzuschirmen [10].

Für die Effektivität der Transfektion sind neben den intrinsischen biologischen Faktoren der gentherapeutischen Systeme auch deren physikalische Eigenschaften, wie die Oberflächenladung, deren Größe sowie Gestalt verantwortlich.

Besonders die Größe (Durchmesser) hat einen bedeutenden Einfluss auf den Transport zum Zielort und ebenfalls für die Aufnahme in die Zielzellen. Große Partikel ≥500 nm können faktisch nur durch Phagozytose internalisiert werden, während kleinere Polyplexe (100 nm - 250 nm) meist durch Endozytose aufgenommen werden. Der Aufnahmeweg kann dabei von Zelltyp zu Zelltyp merklich variieren [49, 114, 115, 125].

4.1.2 Liposomen und Lipopolyplexe

Liposomen haben die Eigenschaft mit Zellen zu interagieren. Sie können Intermembrantransfer, d. h. Transfer zwischen den Phospholipid-Doppelschichten der Zellen und Liposomen; Kontaktfreisetzung, d. h. die Freisetzung des wässrigen Inhalts des Liposoms bei Zellkontakt aufgrund einer Erhöhung der Permeabilität der liposomalen Membran; Adsorption; Zellfusion, bei der Liposomen und Zellmembranen miteinander verschmelzen; Phagozytose und Endozytose. Größe, Form, Oberflächenladung und Zusammensetzung der Liposomen sind die bestimmenden Faktoren für zelluläre Interaktionen und Aufnahme. Aufgrund der Ähnlichkeit der Zusammensetzung mit biologischen Membranen und der einfachen Optimierung sind Liposome eine beliebte Wahl für die Verabreichung von Arzneimitteln und genetischen Material. Mit Liposomen können Biokompatibilität, Bioverfügbarkeit, Zirkulationszeit und Löslichkeit der Ladung verbessert werden. Abhängig von ihrer Anwendung können entweder kationische, anionische oder zwitterionische Lipide in der liposomalen Formulierung eingesetzt werden [42, 28, 57, 126, 147].

Aufgrund ihrer elektrostatischen Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren sind kationische Liposomen die erste Wahl für den Gentransport [9, 11, 53, 103, 145, 158], was sich auch bei den Vaccinen der Firmen BioNTech oder Moderna widerspiegelt. Ohne entsprechende Abschirmung der Oberflächenladung neigen kationische Liposome jedoch dazu, zytotoxisch zu sein und eine geringe Lagerstabilität aufzuweisen [128]. Andererseits zeigen anionische liposomale Formulierungen eine geringe Toxizität, gerade wenn sie mit zwitterionischen Phospholipiden (z. B. Dipalmitoylphosphatidylcholin; DPPC) und Helferlipiden (z. B. DOPE und Cholesterin) formuliert werden [35, 103, 114, 115, 125, 136].

In der hier vorgestellten Studie haben wir die biokompatiblen Eigenschaften von Liposomen mit den optimalen (Nukleinsäure-) Kondensations- und Schutzeigenschaften kationischer Polymere kombiniert, um ein Hybrid-Gentransfektionssystem zu entwickeln. Die Kombination von kationischen Polymeren und Liposomen, die Lipopolyplexe, haben in vitro vielversprechende Transfektions- und Knockdown-Effizienzen gezeigt [35, 40, 41, 51, 60, 74, 114, 125, 146]. Da die Zellmembran ebenfalls aus Phospholipiden besteht, verbessert die Verkapselung kationischer Nanopartikel in Liposomen auf Phospholipidbasis die Biokompatibilität [40, 41, 51, 60, 115, 125, 146]. Zur Herstellung der in der Studie verwendeten Polyplexe bzw. Lipopolyplexe wurden unterschiedliche PEI`s (IPEI, bPEI, PEI F25) und das neuerdings viel beachtete pDMAEMA [22, 23, 24, 136, 140, 124] verwendet.

Es sollte systematisch versucht werden die Strukturbeziehungen der kationischen Polymere und die physikalischen Eigenschaften der entstandenen Komplexe (Polyplexe bzw. die korrespondierenden Lipopolyplexe) und die resultierende Toxizität, Blutkompatibilität und die Transfektionseffizienz abzuleiten.

4.2 Physikalische Charakterisierung

4.2.1 Ergebnisse physikalische Charakterisierung der Polyplexe

Die wichtigsten Kriterien für ein effizientes Design von nanoskaligen Genvehikeln sind die Größe, die Oberflächenladung und die Gestalt. Als optimal werden Teilchendurchmesser < 250-300 nm, ein leicht positives bis neutrales Zeta-Potential sowie eine sphärische reguläre Form mit einheitlichem Polydispersitätsindex angesehen. Die Größe, der in wässrigen Lösungen suspendierten Komplexe, wird routinemäßig durch dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt und als hydrodynamischer Durchmesser bezeichnet, da sich die Komplexe in einem hydratisierten Zustand befinden. Angegeben wird hier immer der mittlere Durchmesser z-AvE. Um die physiologischen Bedingungen mit denen der Messungen zu korrelieren und eine ionenreiche Umgebung für die Laser-Doppler-Geschwindigkeitsmessung zu ermöglichen, wurden alle Messungen bei physiologischem pH-Wert unter Verwendung von 20 mM HEPES mit 150 mM NaCl (pH 7,4) als Verdünnungspuffer durchgeführt. Außerdem ermöglicht die Gerätetechnik eine Ermittlung des Zeta-Potentials. Die AFM-

Technik [127, 36] ermöglicht die Visualisierung der Genvehikel und gleichzeitig wird die Möglichkeit eröffnet die Daten aus den PCS-Messungen zu bestätigen.

In den Abbildungen 4.1-4.4 sind Beispiele für Einzelmessungen mit PCS und AFM für die jeweiligen Polyplexe aus unterschiedlichen PEI`s (IPEI, bPEI, PEI F25) und dem pDMAEMA zu sehen. Alle Daten der Teilchengrößenbestimmung mit PCS/AFM, der Polydispersitätsindex und das Zeta-Potential der entstandenen Komplexe in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis von 1-35 sind in den Tabellen 4.1 bis 4.4 zusammengefasst.

Beim IPEI (Abb. 4.1 und Tab. 4.1) wird bei einem N/P-Verhältnis von 2,5 ein Durchmesser von 380 nm (PDI 0,46, Zeta-Potential -2,9 mV) erhalten, welcher bei einem N/P-Verhältnis 15 auf 200 nm (PDI 0,19, +8 mV) abnimmt. Sowohl Teilchengröße, Verteilung und Zeta-Potential erreichen hier optimale Werte. Bei höheren N/P-Verhältnissen steigt die Teilchengröße wieder an, bei einer leicht inhomogeneren Verteilung (größerer PDI), wobei das Zeta-Potential auf +30 mV ansteigt.

bPEI Komplexe (Abb. 4.2 und Tab. 4.2) zeigen einen vergleichbaren Verlauf als beim IPEI beobachtet. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen formen sich sehr inhomogene große Komplexe (500 nm, Zeta-Potential um Null, PDI >0,6), ab einem N/P-Verhältnis von 10 haben die Partikel eine einheitliche monodisperse Größenverteilung (PDI 0,2) bei reproduzierbaren Durchmessern von ca. 115 nm und einem Zeta-Potential von über + 30 mV. Mit zunehmenden N/P-Verhältnissen ändert sich hier kaum etwas an der Struktur und Größe der Komplexe, nur das Zeta-Potential steigt weiter bis auf maximal + 43 mV an.

Komplexe aus PEI F25 (Abb. 4.3 und Tab. 4.3) zeigten ab einem N/P-Verhältnis 15 eine deutliche Abnahme der Teilchengröße auf 200 nm, bei weiterer Erhöhung setzte sich die Kondensation der Komplexe bis auf 90 nm (N/P 30) fort. Ab N/P-10 zeigte sich eine homogene monodisperse Größenverteilung mit zufriedenstellendem PDI von 0,28. Das Zeta-Potential erreichte maximal +35 mV. Die Komplexe ab N/P 10 zeigen bei der Visualisierung eine runde sphärische Gestalt und waren stabil.

Auch bei den Komplexen mit pDMAEMA (Abb. 4.4 und Tab. 4.4) ist eine deutliche Abhängigkeit der Größe und Gestalt von den N/P-Verhältnissen zu beobachten. Beginnend ab einem N/P-Verhältnis von 1 verringert sich die Größe von > 500 nm auf ca. 200 nm (N/P 35). Generell ist der PDI höher als 0,3, was immer auf eine polymodale Teilchengrößenverteilung hinweist. Es werden nie so kleine Komplexe wie im Fall der PEI-Formulierungen erreicht. Das Zeta-Potential besitzt bei einem N/P von 35 seinen höchsten Wert von +31 mV. Die Visualisierung mittels AFM gestaltete sich schwierig, da oft Messfehler und Interaktionen zwischen Messspitze / Probe zu beobachten waren (Abb. 4.4 B und C). Innerhalb dieser Arbeit konnten die hiermit verbundenen messtechnischen Probleme nicht behoben werden, was sich auf die Qualität der Abbildung auswirkte.

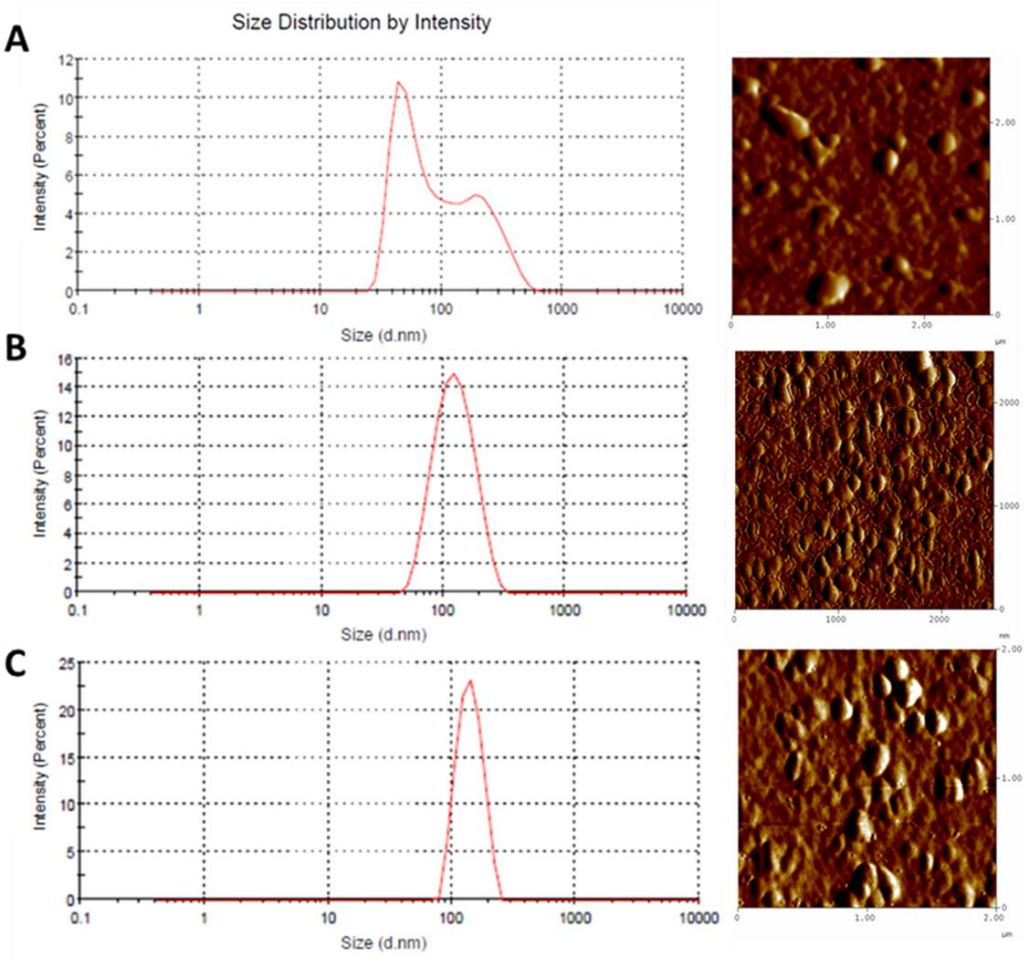

Abbildung 4.1 IPEI Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten

Durchmessers der Einzelmessung, A) IPEI N/P 1 - 447,5 nm, B) IPEI N/P 10 - 114,4 nm und C) IPEI N/P 25 - 133,8 nm

Tabelle 4.1 Zusammenfassung IPEI Polyplexe. PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

IPEI/linear PEI	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
N/P-Verhältnis	PCS	AFM		
1	544,3 ± 41,4	475,6 ± 75,7	+ 1,0 ± 1,2	0,64 ± 0,11
2,5	312,7 ± 18,2	n.b.	+ 22,5 ± 3,1	0,45 ± 0,09
5	210,7 ± 11,4	n.b.	+ 28,4 ± 3,0	0,41 ± 0,09
10	114,1 ± 12,2	132,5 ± 12,8	+ 32,5 ± 1,4	0,21 ± 0,08
15	116,4 ± 13,3	129,7 ± 14,5	+ 34,5 ± 2,5	0,21 ± 0,10
20	128,6 ± 12,5	n.b.	+ 36,2 ± 3,1	0,23 ± 0,10
25	132,3 ± 11,5	n.b.	+ 43,5 ± 3,8	0,22 ± 0,09
30	118,3 ± 13,6	143,2 ± 17,9	+ 41,5 ± 3,6	0,28 ± 0,09
35	125,1 ± 9,8	137,6 ± 15,4	+ 40,8 ± 2,9	0,25 ± 0,10

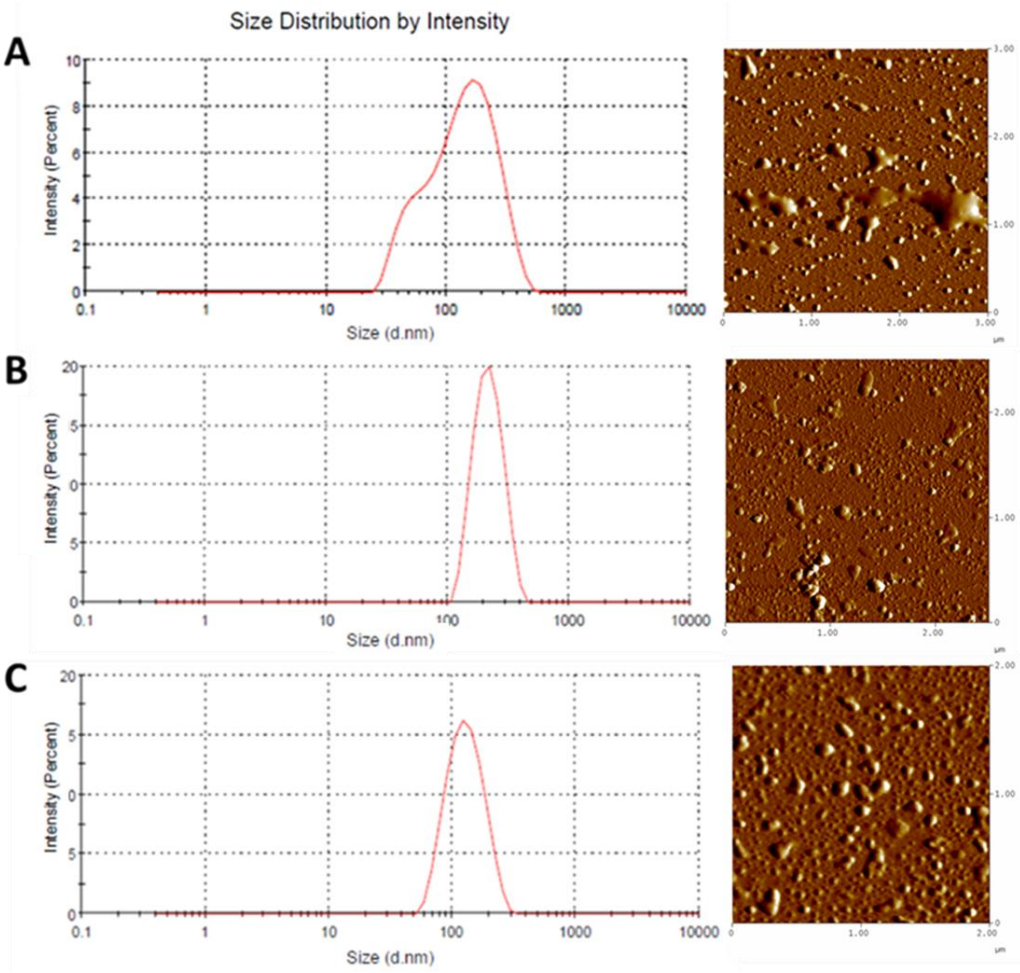

Abbildung 4.2 bPEI Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) bPEI N/P 5 - 289,7 nm, B) bPEI N/P 15 - 123,7 nm, C) bPEI N/P 35 - 119,4 nm.

Tabelle 4.2 Zusammenfassung bPEI Polyplexe PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

bPEI/verzweigtes PEI N/P-Verhältnis	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
	PCS	AFM		
1	388,4 ± 12,0	~ 400	-5,3 ± 10	0,78 ± 0,19
2,5	465,3 ± 31,5	n.b.	+ 17,6 ± 2,5	0,55 ± 0,17
5	310,3 ± 12,6	n.b.	+23,5 ± 1,7	0,43 ± 0,09
10	142,7 ± 20,6	126,5 ± 11,3	+33,7 ± 2,8	0,18 ± 0,01
15	122,3 ± 12,2	120,7 ± 7,9	+35,6 ± 3,0	0,16 ± 0,01
20	127,6 ± 20,1	n.b.	+34,6 ± 3,3	0,15 ± 0,01
25	106,9 ± 12,5	99,6 ± 9,1	+34,8 ± 3,0	0,21 ± 0,02
30	122,3 ± 10,7	n.b.	+41,3 ± 4,2	0,18 ± 0,01
35	117,4 ± 15,8	n.b.	+40,8 ± 3,3	0,22 ± 0,01

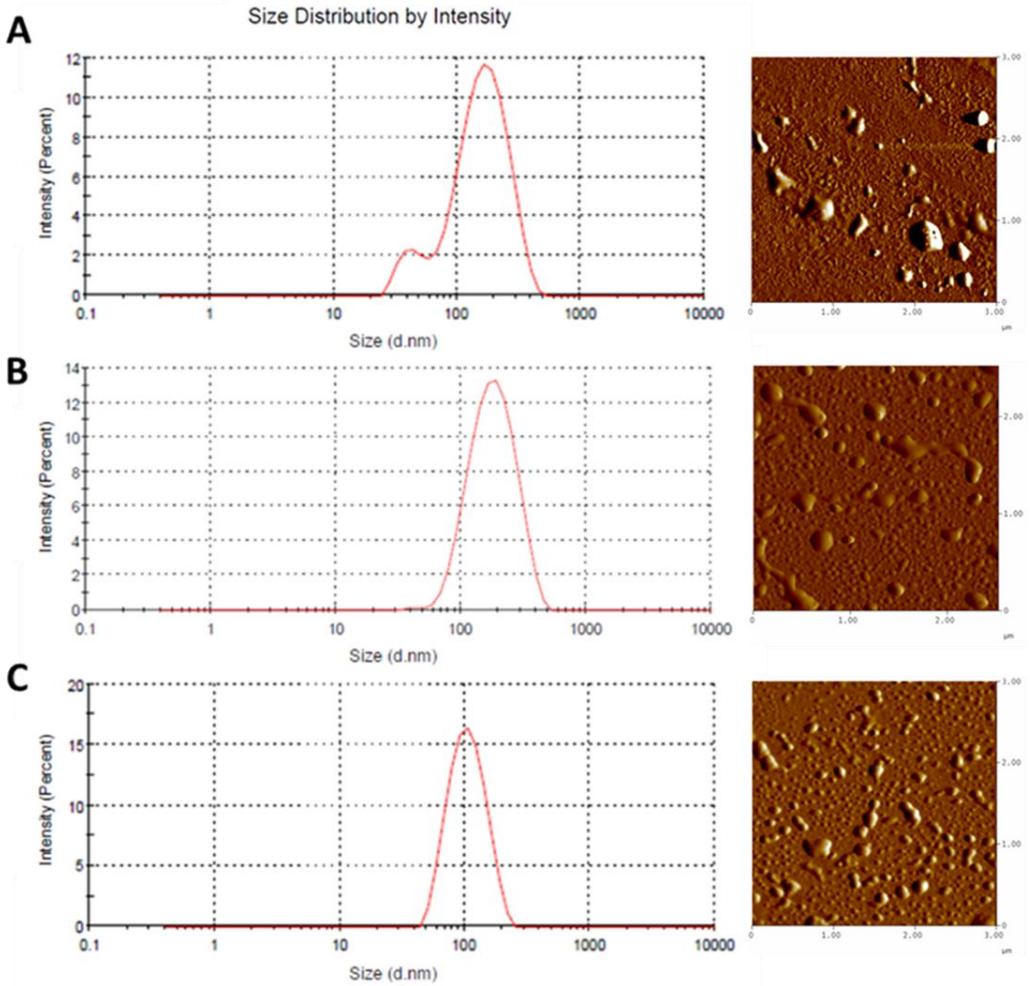

Abbildung 4.3 PEI F25 Polyplexe, Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) PEI F25 N/P 2,5 - 258,5 nm, B) PEI F25 N/P 10 - 190,4 nm und C) PEI F25 N/P 35 - 98,5 nm

Tabelle 4.3 Zusammenfassung PEI F25 Polyplexe, PCS-Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

PEI F25	**Durchmesser [nm] ± SD**		**Zeta-Potential [mV] ± SD**	**PDI ± SD**
N/P-Verhältnis	**PCS**	**AFM**		
1	420,5 ± 28,1	n.b.	-4,6 ± 3,5	0,66 ± 0,11
2,5	280,7 ± 30,4	n.b.	+18,4 ± 3,5	0,43 ± 0,12
5	260,2 ± 17,2	225,8 ± 13,8	+28,0 ± 1,5	0,33 ± 0,07
10	200,3 ± 20,5	n.b.	+32,1 ± 2,8	0,28 ± 0,03
15	120,4 ± 18,4	132,7 ± 11,4	+31,8 ± 3,0	0,22 ± 0,02
20	145,4 ± 18,6	n.b.	+33,8 ± 2,6	0,21 ± 0,02
25	125,4 ± 20,7	138,9 ± 11,7	+32,4 ± 2,0	0,16 ± 0,01
30	92,5 ± 7,5	87,3 ± 12,4	+32,5 ± 2,8	0,18 ± 0,02
35	97,3 ± 7,2	109,6 ± 17,5	+34,7 ± 3,2	0,18 ± 0,01

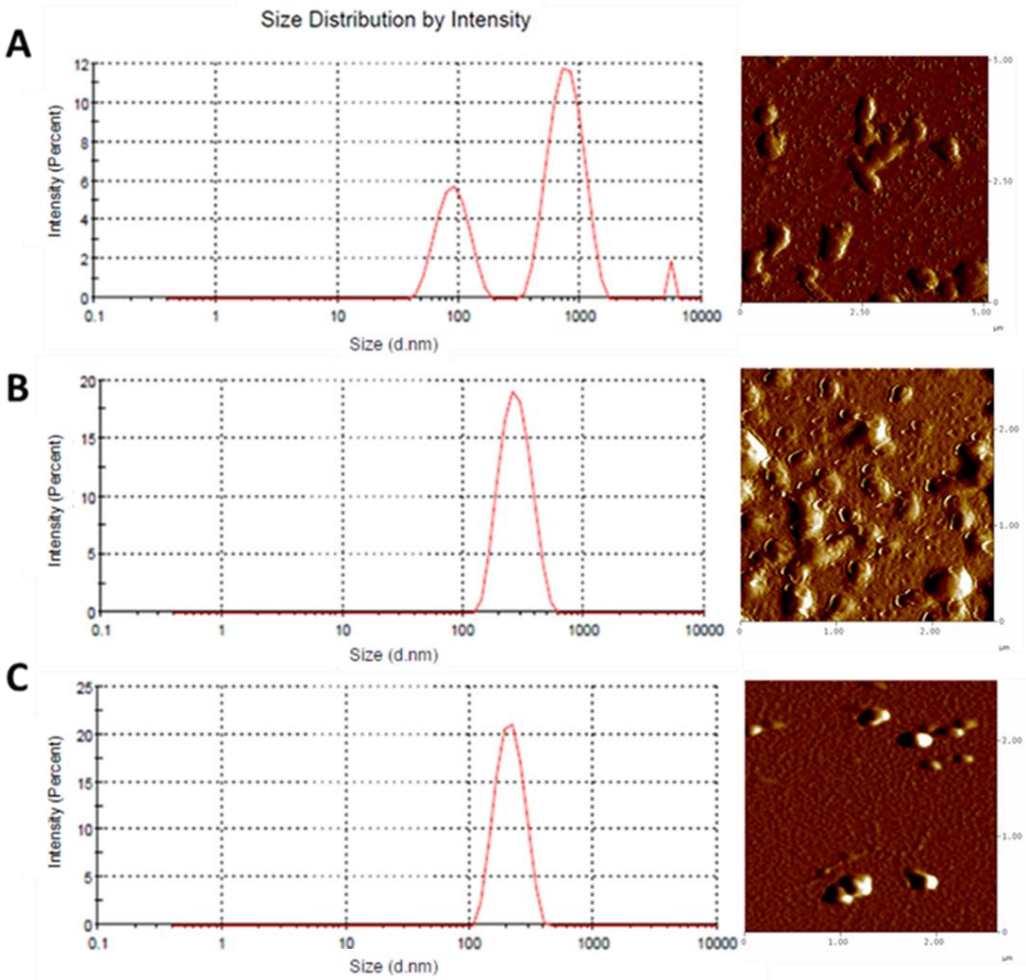

Abbildung 4.4 pDMAEMA Polyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) pDMAEMA N/P 1 - 498,1 nm, B) pDMAEMA N/P 15 - 258,2 nm, C) pDMAEMA N/P 35 - 215,7 nm

Tabelle 4.4 Zusammenfassung pDMAEMA Polyplexe PCS Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

pDMAEMA	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
N/P-Verhältnis	PCS	AFM		
1	547,7 ± 33,6	~ 450	-9,3 ± 1,6	0,55 ± 0,14
2,5	325,7 ± 17,5	n.b.	-1,4 ± 0,5	0,46 ± 0,13
5	318,6 ± 21,5	n.b.	+8,4 ± 2,1	0,41 ± 0,11
10	270,3 ± 24,7	312,0 ± 16,4	+21,3 ± 1,7	0,38 ± 0,13
15	260,4 ± 18,1	n.b.	+24,6 ± 2,2	0,37 ± 0,09
20	254,0 ± 22,0	n.b.	+27,3 ± 3,0	0,33 ± 0,11
25	244,4 ± 17,6	220,5 ± 14,5	+ 26,8 ± 4,1	0,35 ± 0,08
30	243,7 ± 15,1	n.b.	+ 27,4 ± 3,1	0,37 ± 0,11
35	217,0 ± 12,3	215,5 ± 10,5	+31,4 ± 3,0	0,34 ± 0,12

4.2.2 Ergebnisse physikalische Charakterisierung der Lipopolyplexe

Es gibt eine Vielzahl von Studien, welche den Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Transfektionseffizienz gerade bei Lipoplexen [40, 41, 42, 51, 57, 60, 114, 125, 126, 136, 146, 147] untersuchen. Nur wenige Untersuchungen befassen sich mit Lipidmischungen für Liposomen zur Herstellung von Lipopolyplexen [114, 125]. Liposomale Formulierungen auf Basis von Phospholipiden wie DOTAP, DOPE, DPPC, MPEG und Cholesterin scheinen dabei am vielversprechendsten. Pinnapireddy und Schäfer evaluierten die Zusammensetzung DOPE: DPPC: Cholesterol (70: 15: 15 = mol: mol: mol) als eine optimale Komposition, welche in dieser Arbeit ausschließlich zur Herstellung der Lipopolyplexe verwendet wurde. Pinnapireddy [114, 115], Schäfer [125] und Ewe [41] untersuchten das Gewichtsverhältnis Lipid zu Polyplex von 1:1 bis 15:1. Je nach Lipidmischung der Liposomen wurde ein Verhältnis von 2:1 bis 10:1 als optimal gefunden. Hier kam immer ein Lipid: Polyplex Verhältnis als Masseverhältnis 5:1 zur Anwendung. Abbildung 4.5 zeigt die Teilchengrößenmessung und die Visualisierung mittels AFM. Um die Größe der Liposomen zu reduzieren und eine homogene unilamellare Population zu erhalten, wurden die liposomalen Formulierungen extrudiert, was auch durch die scharfe Teilchengrößenverteilung mit einem PDI von 0,18 (180 nm, Zeta-Potential -23 mV) und die gleichmäßig runden Liposomen zu sehen ist. Die physikalischen Parameter wurden auch so von Engelhardt, Duse, Pinnapireddy, Schäfer, Aigner, Tariq und anderen Arbeitsgruppen mit Teilchengrößen zwischen 100 bis 200 nm und Zeta-Potentialen von
-22 bis -30 mV erhalten [35, 40, 41, 42, 51, 57, 60, 114, 115, 125, 126, 136, 146, 147].
Um die kationische Ladung abzuschirmen und das häufigste Problem bei Polyplexen, nämlich die Aggregation, anzugehen, wurden Polyplexe mit der liposomalen Kombinationen DOPE: DPPC: Cholesterol verkapselt, um Lipopolyplexe zu bilden.

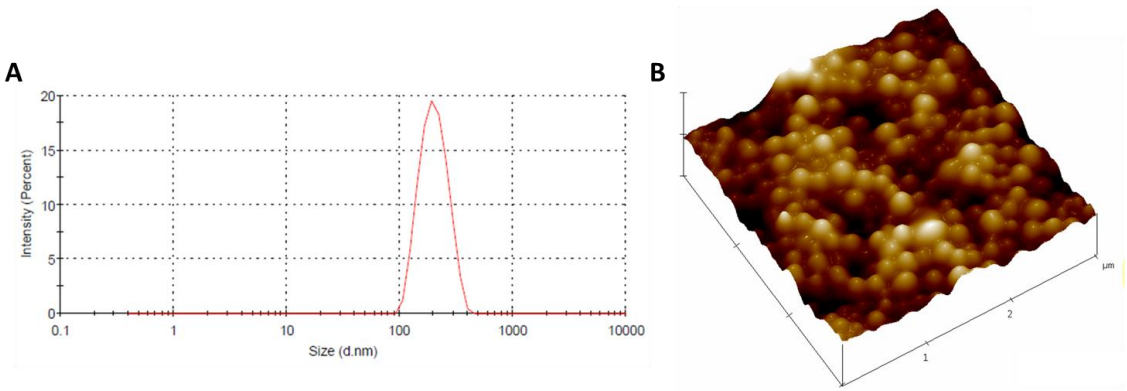

Abbildung 4.5 Darstellung der zur Herstellung der Lipopolyplexe notwendigen Liposomen DOPE: DPPC: Cholesterol (70: 15: 15 = mol: mol: mol). A) Einzelmessung des mittleren Durchmessers mit PCS, z-AvE 187 nm, PDI 0,18) Visualisierung mit AFM, mittlerer Durchmesser 181,6 ± 6,4 nm

Wenn Liposomen zu Nukleinsäure-Polykation-Komplexen hinzugefügt werden, findet nach dem ersten Kontakt eine umfassende Reorganisation der Lipidmembranen statt, was zu Polymer-Nukleinsäure-Komplexen mit Lipidbeschichtung führt (vergl. Abbildung 3.2 im Material Abschnitt und [115]). Diese Strategie überwindet das mit kationischen Polymeren verbundene Problem der Oberflächenladung. Die extrazelluläre Zytotoxizität der Komplexe wird verringert, wodurch Raum für rezeptorvermitteltes Targeting ohne Beeinträchtigung durch unspezifische Ladung-Ladung-Wechselwirkungen geschaffen wird. Die Transfektionseffizienz von Gentransportvehikeln hängt von ihrer Oberflächenladung, Größe, Steifigkeit und Stabilität ab, insbesondere in der physiologischen Umgebung [40, 41, 51, 60, 73, 113, 114, 115, 118, 125, 136, 146]. Daher wurde eine einzigartige Kombination von Lipiden für die Formulierung von Lipopolyplexen ausgewählt, um die gewünschten physikalisch-chemischen Eigenschaften zu erhalten. Aufgrund der geringen positiven Ladung und einem Größenbereich zwischen 100 und 200 nm sowie verbesserter Stabilität wurden in die liposomalen Formulierungen Hilfslipide eingearbeitet. Diese haben einen erheblichen Einfluss auf die Elektrostatik, die Lipidselbstorganisation, den Hydratationsgrad, die Packungsparameter und die Oberflächenladung [115, 60, 40, 57, 103, 145, 158]. Die verwendete Lipidmischung enthält DOPE und Cholesterin, welche nach einer Reihe von Experimenten als optimale Helferlipide ausgewählt wurden. Das häufigste Problem bei Gentransportvehikeln ist das Entweichen des Transportvehikels aus dem Endosom und anderen Zellkompartimenten [18, 74, 103, 113, 136, 157, 145, 158].

In den Abbildungen 4.6 bis 4.9 sind exemplarische Ergebnisse der PCS und AFM-Analytik der hergestellten Lipopolyplexe dargestellt, die Tabellen 4.5 bis 4.8 zeigen die zusammenfassenden Resultate.

IPEI Lipopolyplexe (Abb. 4.6, Tab 4.5) zeigen mit zunehmenden N/P-Verhältnis einen Anstieg des Zeta-Potentials von N/P 1 mit -31 mV zu N/P 35 mit + 31 mV. Bei N/P 1 werden Teilchengrößen von 190 nm mit einem PDI von 0,33 erhalten, mit einem N/P von 2,5 steigt der Durchmesser auf das Doppelte an (380 nm, PDI 0,46), wobei das Zeta-Potential annähernd Neutralität (-2,9 mV) erreicht. N/P-Verhältnisse von 10 und 15 zeigen mit Teilchengrößen von ca. 200 nm und Zeta-Potentialen von unter +10 mV, bei sehr engen Teilchengrößenverteilungen (PDI 0,17-0,14) optimale physikalische Parameter.

Die bPEI Lipopolyplexe (Abb. 4.7, Tab 4.6) zeigen ein ähnliches Verhalten wie die IPEI-Komplexe. Es werden bei geringen N/P-Verhältnissen und überwiegenden Ladungen der Liposomen kleine Teilchengrößenverteilungen (190 nm, PDI 0,21), im Bereich der äquimolaren Ladungen (N/P 2,5 und 5) sehr inhomogene Komplexformulierungen mit Partikelgrößen >500 nm, und ab N/P 10 sehr einheitliche Komplexe, allerdings mit bereits sehr hohen positiven Ladungen (> +20 mV) organisiert. Mit zunehmenden N/P-Verhältnis werden auch wieder größere Komplexe von über 200 nm (N/P 35, PDI 0,43, Zeta-Potential +27,7) beobachtet.

Wie aus den vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu erwarten war zeigten PEI F25 Lipopolyplexe (Abb. 4.8, Tab 4.7) eine ebenfalls deutliche Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses zur Teilchengröße und des Zeta-Potentials. Sehr inhomogene Proben sind bei N/P 2,5 zu beobachten, was auch in den AFM-Visualisierungen sichtbar wird. Hier sind drei diskrete Partikelpopulationen zu beobachten (70 nm, 100 nm, 850 nm, Abb. 4.8 A). Ab einem N/P-Verhältnis von 10 werden immer kleine PDI-Werte von ca. 0,2 erhalten. Im Gegensatz zu den anderen PEI-Komplexen wird eine optimale Teilchengröße von deutlich unter 200 nm auch bei höheren N/P-Verhältnissen möglich, wo bei N/P 30 ca. 110 nm bei einem PDI von 0,2 erhalten werden.

Die pDMAEMA Lipopolyplexe (Abb. 4.9, Tab 4.8) zeigen im Vergleich zu den PEI´s ein abweichendes Verhalten. Die AFM-Visualisierungen in Abb. 4.9 zeigt immer eher runde Partikel, welche an Liposomen erinnern. Eine typische Polyplexgestalt wird eher nicht beobachtet. Bei N/P-Verhältnissen von 1 bis 5 lassen sich kaum Daten zur Teilchengröße gewinnen. Die Komplexe sind sehr groß, oft im Bereich von 1000 nm. Die Liposomen werden noch als „Einzelpeak“ bei den DLS-Messungen beobachtet (Abb. 4,9 A). Ab einem N/P-Verhältnis von 10 werden Teilchengrößen von ca. 200 nm bei PDI‘s von 0,25 bis 0,35 gemessen. Auch bei einem N/P-Verhältnis von 35 wird noch eine Teilchengröße von 215 nm erhalten.

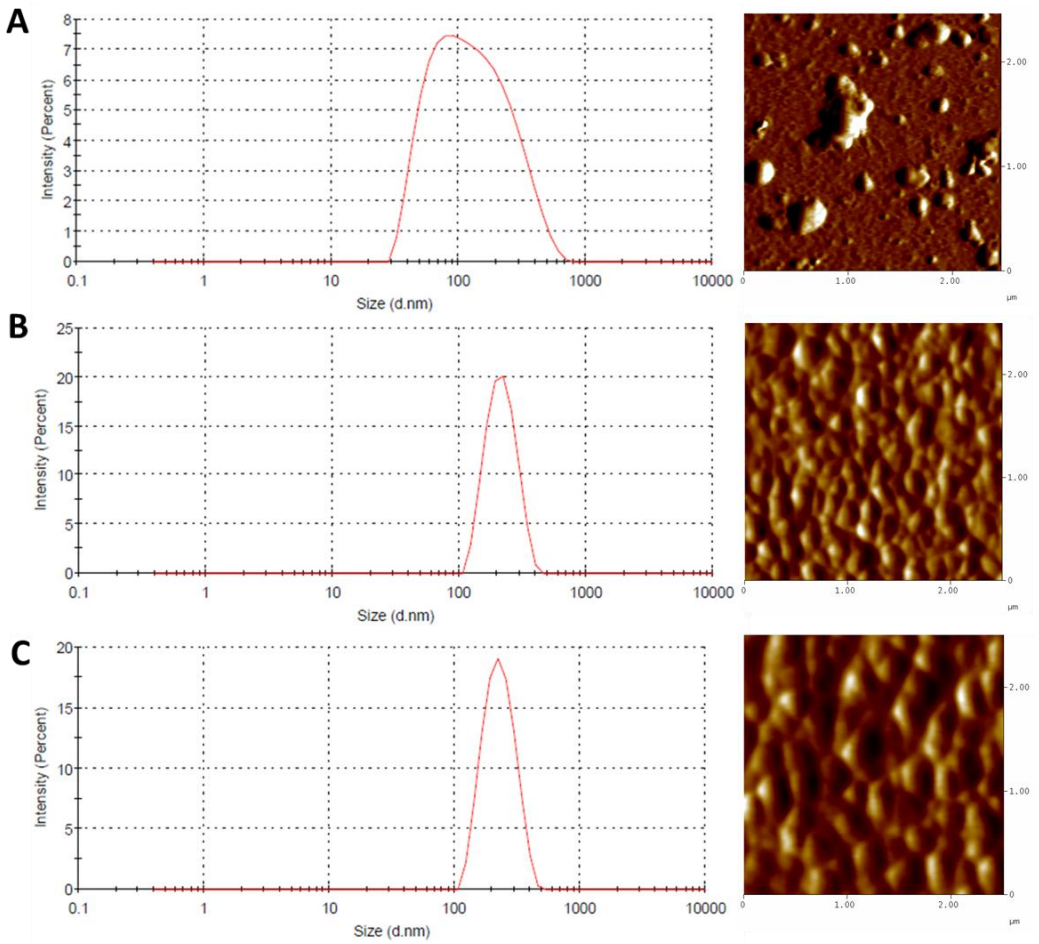

Abbildung 4.6 IPEI Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) IPEI N/P 2,5 - 320,5 nm, B) IPEI N/P 15 - 204,9 nm, C) IPEI N/P 30 - 230,6 nm

Tabelle 4.5 Zusammenfassung IPEI Lipopolyplexe PCS Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

IPEI/linear PEI N/P-Verhältnis	Durchmesser [nm] ± SD PCS	Durchmesser [nm] ± SD AFM	Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
1	187,4 ± 10,9	176,6 ± 23,8	- 31,4 ± 3,3	0,33 ± 0,09
2,5	380,2 ± 33,1	n.b.	- 2,9 ± 1,6	0,46 ± 0,13
5	276,0 ± 22,4	n.b.	+ 1,0 ± 0,3	0,31 ± 0,14
10	225,4 ± 13,7	201,3 ± 19,2	+ 6,7 ± 2,4	0,14 ± 0,03
15	217,3 ± 9,3	199,5 ± 12,0	+ 8,2 ± 1,2	0,17 ± 0,02
20	222,8 ± 14,4	n.b.	n.b.	0,26 ± 0,09
25	n.b	n.b.	n.b.	n.b.
30	243,2 ± 18,9	275,8 ± 21,1	+ 29,6 ± 4,1	0,42 ± 0,11
35	351,6 ± 22,8	n.b.	+ 31,0 ± 3,8	0,41 ± 0,11

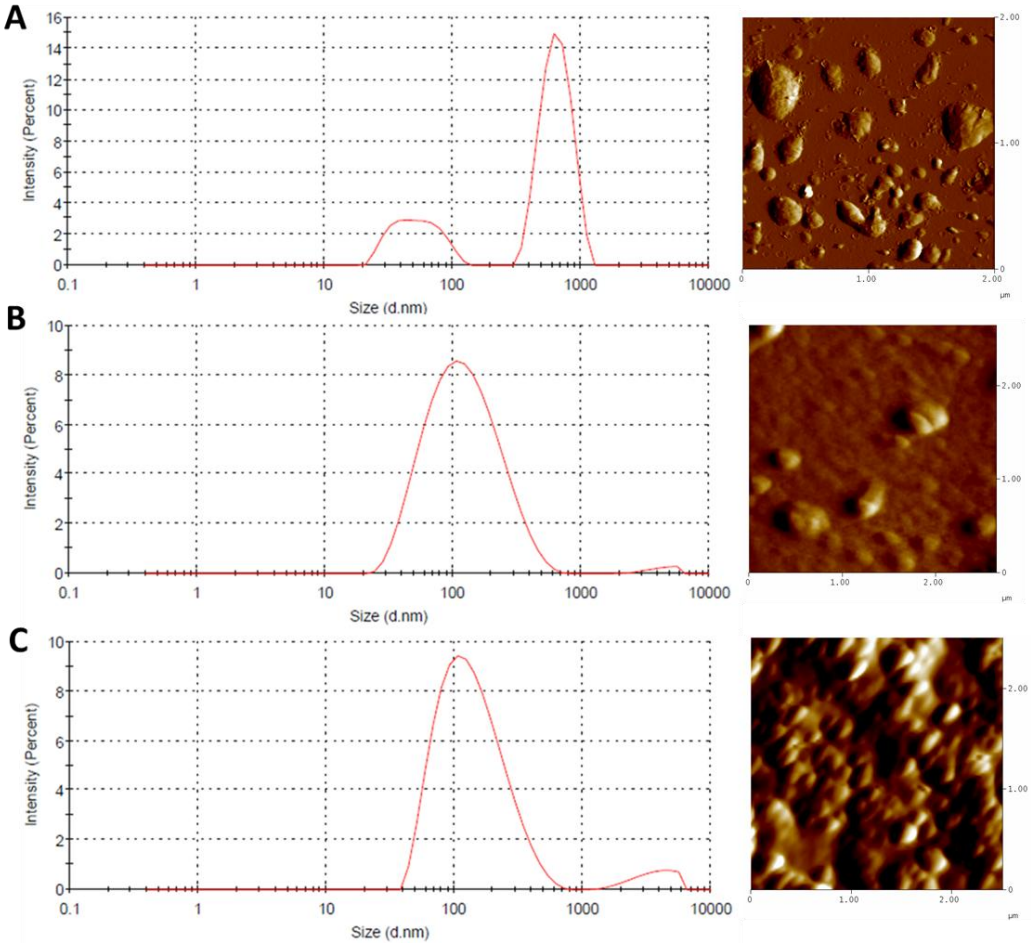

Abbildung 4.7 bPEI Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) bPEI N/P 2,5 - 655,0 nm, B) bPEI N/P 10 - 172,3 nm, C) bPEI N/P 30 - 154,4 nm

Tabelle 4.6 Zusammenfassung bPEI Lipopolyplexe PCS Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

bPEI/verzweigtes PEI N/P-Verhältnis	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
	PCS	AFM		
1	188,0 ± 13,3	n.b.	- 28,3 ± 3,1	0,21 ± 0,02
2,5	> 500	n.b.	- 23,7 ± 2,9	> 0,5
5	> 500	n.b.	+ 2,8 ± 4,3	> 0,5
10	172,8 ± 11,4	178,0 ± 24,1	+ 22,3 ± 3,6	0,23 ± 0,03
15	167,0 ± 6,5	174,6 ± 10,2	+ 24,5 ± 2,5	0,18 ± 0,02
20	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	165,3± 15,2	n.b.	+ 31,4 ± 2,5	0,32± 0,09
35	237,0 ± 17,1	n.b.	+ 27,7 ± 4,9	0,43± 0,11

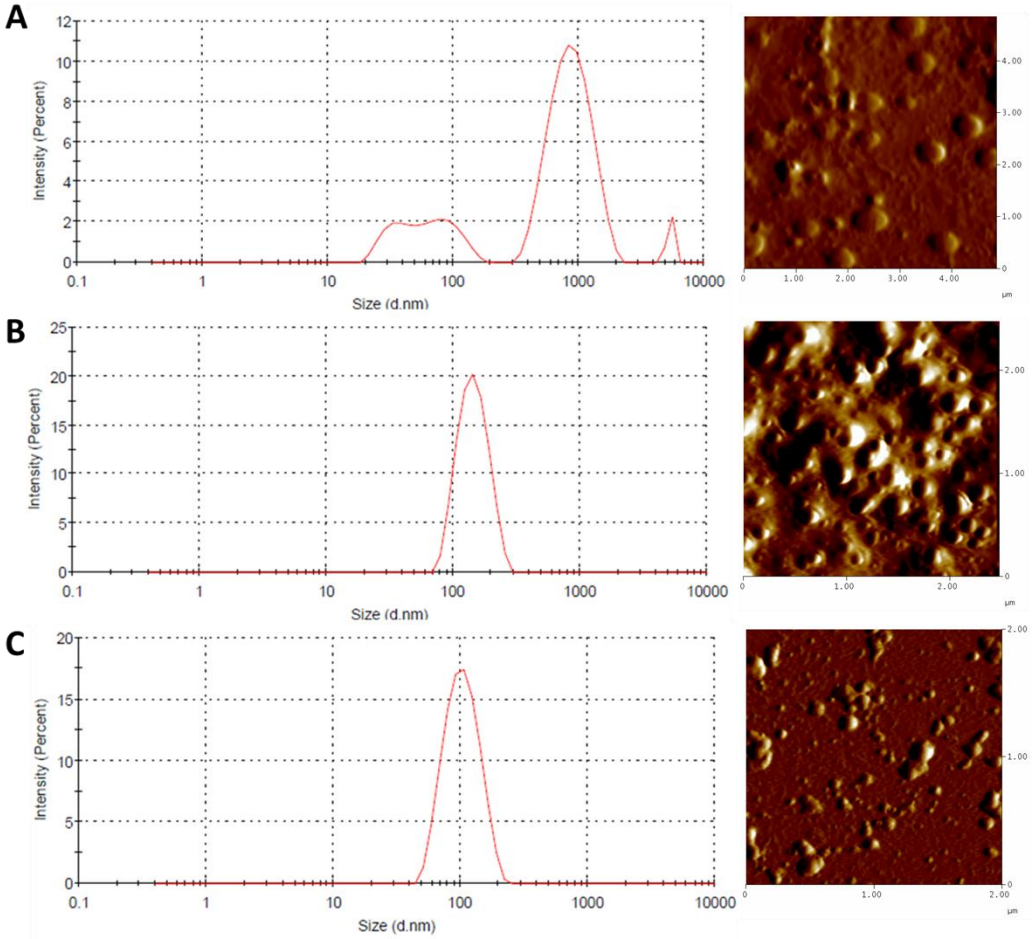

Abbildung 4.8 PEI F25 Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) N/P 2,5 - 799,0 nm (Partikelpopulationen 70 nm, 100 nm, 850nm), B) N/P 15 - 136,4 nm, C) N/P 35 - 100,5 nm

Tabelle 4.7 Zusammenfassung PEI F25 Lipopolyplexe PCS Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM

PEI F25	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
N/P-Verhältnis	PCS	AFM		
1	213,9 ± 25,3	n.b.	- 28,1 ± 4,5	0,28 ± 0,08
2,5	> 500	n.b.	- 22,9 ± 2,8	> 0,5
5	322,4 ± 32,7	n.b.	- 7,7 ± 2,6.	> 0,5
10	154, 6 ± 9,9	n.b.	+ 8,5 ± 1,9.	0,25 ± 0,03.
15	137,0 ± 12,0	156,7 ± 14,1	+ 21,0 ± 4,4	0,22 ± 0,04
20	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	112,9 ± 8,8	100,4 ± 12,9	+ 29,1 ± 2,2	0,20 ± 0,02
35	110,6 ± 10,3	122,2 ± 21,3	+ 32,4 ± 4,1	0,28 ± 0,06

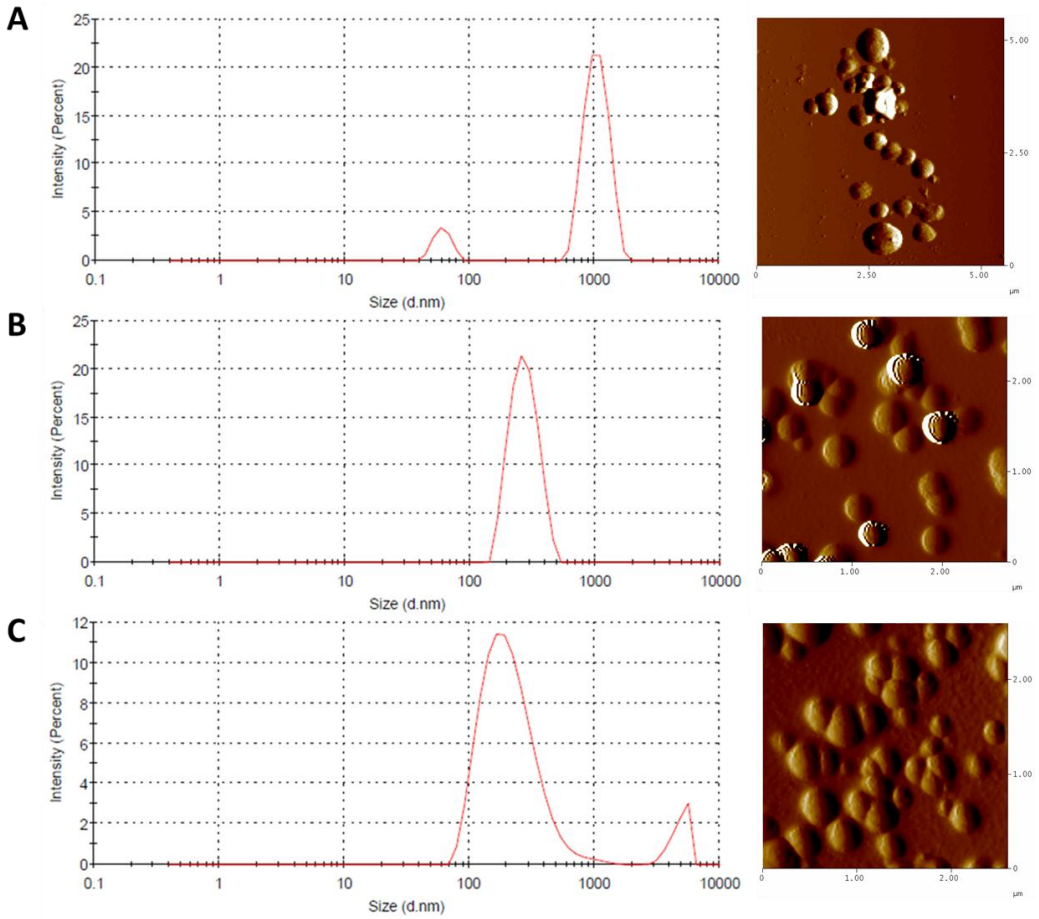

Abbildung 4.9 pDMAEMA Lipopolyplexe Darstellung der PCS-Daten und AFM-Teilchengrößenmessungen einschließlich der Angabe des hier dargestellten Durchmessers der Einzelmessung, A) pDMAEMA N/P 2,5 - 1051,0 nm, B) pDMAEMA N/P 15 - 242,8 nm, C) pDMAEMA N/P 35 - 218,1 nm

Tabelle 4.8 Zusammenfassung pDMAEMA Lipopolyplexe PCS Daten, Zeta-Potential, PDI und AFM-Teilchengröße

pDMAEMA	Durchmesser [nm] ± SD		Zeta-Potential [mV] ± SD	PDI ± SD
N/P-Verhältnis	PCS	AFM		
1	> 500	n.b.	- 27,8 ± 4,5	> 0,5
2,5	> 500	795,6 ± 42,3	- 23,6 ± 4,2	> 0,5
5	> 500	n.b.	- 14,5 ± 2,9	> 0,5
10	224,8 ± 18,3	256,7 ± 35,1	+ 6,7 ± 3,1	0,34 ± 0,09
15	232,0 ± 13,7	255,3 ± 24,9	+ 18,9 ± 4,2	0,25 ± 0,04
20	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
35	215,6 ± 13,7	227,1 ± 18,8	+ 30,7 ± 2,9	0,33 ± 0,09

4.3. Bewertung der Toxizität

Neben der physikalischen Stabilität und optimaler technologischer Parameter wie sie in den vorherigen Kapiteln untersucht wurden, ist für eine Identifikation eines potentiell nutzbaren Gentherapeutikums die Charakterisierung potentiell schädlicher Einflüsse auf körpereigene Systeme wie z. B. auf Zellen oder das Blut unerlässlich. Diese Faktoren können als die generelle Toxizität der Formulierung beschrieben werden. Hier wurden als analytische Verfahren zu deren Bestimmung der MTT-Zellviabilitätstest (siehe Kapitel 3.7), der LDH-Zytotoxizitätstest (siehe Kapitel 3.8), die Bestimmung der Hämolyse (siehe Kapitel 3.11) und die „activated Partial Thromboplastin Time“ (aPTT, siehe Kapitel 3.12) verwendet. Die folgenden Untersuchungen hatten das Ziel, die Toxizität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Komplexe, speziell dem N/P-Verhältnis, bei vergleichbaren Konzentrationen zu untersuchen.

Der MTT-Test gibt dabei Informationen über das Wachstum und die Lebensfähigkeit von Zellen. Durch die Messung der Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase wird indirekt die intrazellulare Aktivität der Mitochondrien ermittelt, was eine direkte Aussage über die zelluläre Toxizität einer Wirkstoffformulierung zulässt.

Beim LDH-Test kann man durch die Bestimmung der extrazellularen Lactatdehydrogenase Aktivität den Zustand der Zelle beurteilen bzw. Rückschlüsse auf Membranschäden ziehen, welche durch die Zellmembraninteraktion mit dem

Genvehikel entstanden sind. Diese Messmethode zeigt sehr schnell, hauptsächlich durch physikalische Faktoren wie Ladung oder Teilchengröße, getriggerte Veränderungen an Zellen an. Ein wichtiger Fakt, um die Integrität und das Design der Formulierung bewerten zu können.

Da die hier untersuchten Formulierungen vornehmlich für die parenterale Applikation im Blut vorgesehen sind, ist die Untersuchung der Wechselwirkung mit Blut ein unerlässlicher Bestandteil der Charakterisierung. Dazu steht die Methode der Messung der Hämolyse und der aPTT zur Verfügung. Während bei der Hämolyse der direkte Einfluss der Wirkstoffformulierung auf die Stabilität der körpereigenen Erythrozyten vermessen wird, gewinnt man bei der aPTT-Informationen zu Auswirkungen auf die Hämostase aus dem endogenen und exogenen System. Beide Effekte sind vornehmlich bedingt durch physikalische Parameter wie Osmolarität, Ladung, Teilchengröße aber auch der Oberflächenbeschaffenheit der Formulierung.
Im Folgenden werden die einzelnen Methoden der Evaluierung der Toxizität der Poly- bzw. Lipopolyplexe in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis und der Lipidbeschichtung dargestellt.

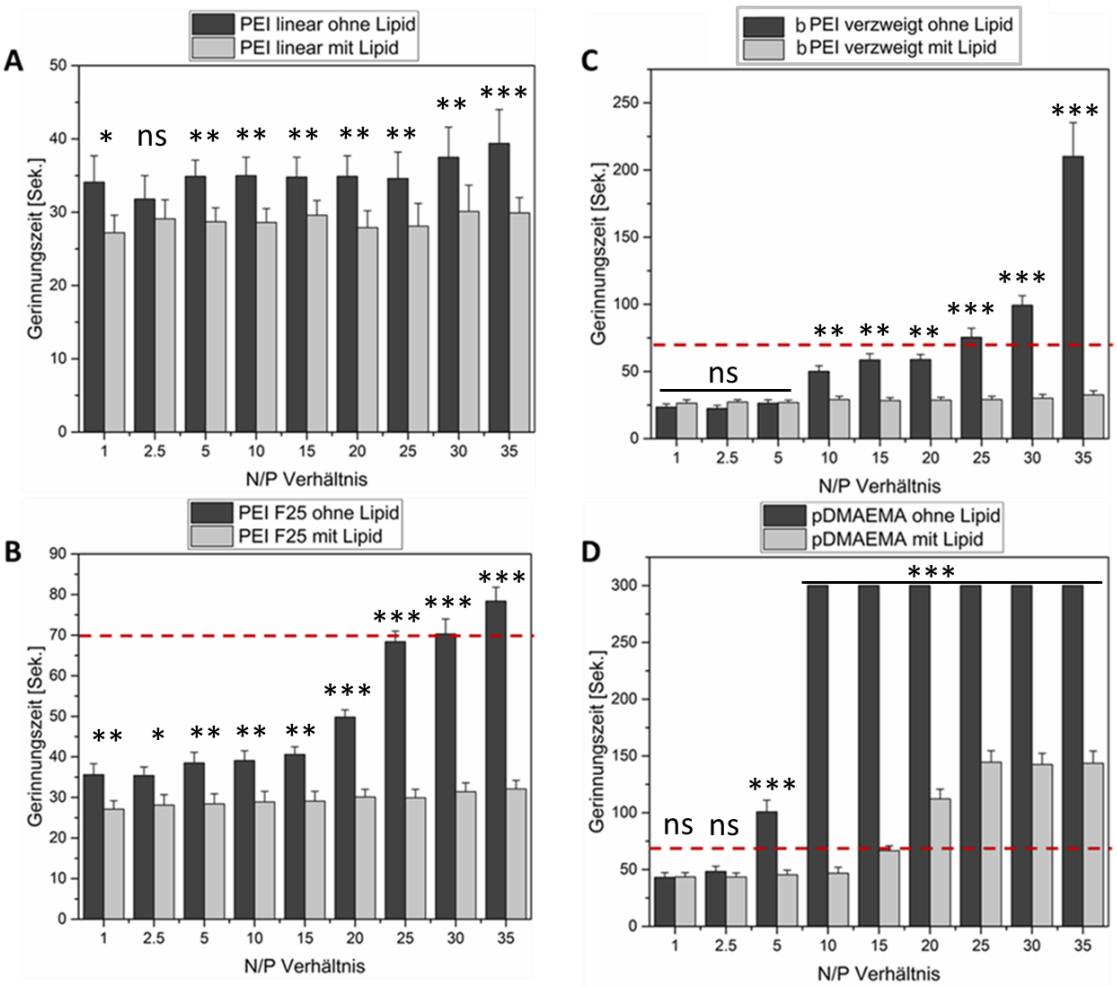

Abbildung 4.10 Gerinnungszeit Polyplexe (ohne Lipid) und Lipopolyplexe mit (Lipid bzw. Liposomenbeschichtung) mit A) IPEI, B) PEI F25, C) bPEI, D) pDMAEMA, Normbereich 25-38 Sekunden, als tolerierbar für eine Applikation werden Werte unter 70 Sekunden allgemein akzeptiert. Messobergrenze bei 300 wird bei pDMAEMA teilweise überschritten. n = 6 für alle Gruppen, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ns nicht signifikant.

4.3.1 Ergebnisse Gerinnungszeit (aPTT)

In Abbildung 4.10 sind die vermessenen Gerinnungszeiten aus den aPTT-Untersuchungen zusammenfassend dargestellt. Als normwertige Ergebnisse werden Zeiten zwischen 25s – 38s angesehen, Zeiten bis 70 Sekunden sind akzeptabel [114, 29, 6]. In den Diagrammen sind Daten für die Polyplexe (schwarz) und die Lipopolyplexe (grau) vergleichend zu sehen.

Das auch praktisch bereits für Gentransfektionskomplexe vielfach genutzte lineare PEI (IPEI, Abbildung 4.10 A) zeigt sowohl bei den Polyplexen als auch den Lipopolyplexen in

einem N/P-Verhältnis von 1 bis 35 eine Gerinnungszeit von unter 70 Sekunden, meist sind die erhaltenen Werte sogar im Normbereich unter 30 Sekunden. Tendenziell steigen die Gerinnungszeiten bei höherem N/P-Verhältnis für die Polyplexe an, während die Werte für die Lipopolyplexe innerhalb der Standardabweichungen annährend identisch bleiben. Hoch signifikante Unterschiede zwischen Polyplexen und Lipopolyplexen werden ab einem N/P-Verhältnis von 35 nachgewiesen.

Für das verzweigte PEI (bPEI, Abbildung 4.10 C) ergibt sich ein anderes Bild. Bei N/P-Verhältnissen von 1-5 werden bei den Polyplexen Normwerte von unter 30 Sekunden erreicht, von N/P 1-20 unter 70 Sekunden und mit zunehmendem N/P-Verhältnis (über N/P 25) sind die Grenzwerte deutlich überschritten. Die Lipopolyplexe bleiben bei allen N/P-Verhältnissen im Normbereich. Die Unterschiede zwischen Polyplexen und Lipopolyplexen sind ab einem N/P-Verhältnis von 10 signifikant.

Das PEI F25 (Abbildung 4.10 B) zeigt einen visuell vergleichbaren Verlauf der Gerinnungszeiten zum bPEI. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis steigt die Gerinnungszeit an, bei den Polyplexen wird der Normbereich nie erreicht, die tolerierbare Grenze bei N/P 25 erreicht. Die Werte für die Lipopolyplexe sind immer im Normbereich. Der Unterschied zwischen Polyplexen und Lipopolyplexen ist immer signifikant.

Beim pDMAEMA (Abbildung 4.10 D) steigt die Gerinnungszeit schnell mit dem N/P-Verhältnis an. Ohne Lipidbeschichtung wird bereits bei einem Verhältnis von 5 der maximal tolerierbare Wert von 70 Sekunden überschritten. Hier werden die messtechnisch möglichen Werte von 300 Sekunden bereits bei N/P 10 erreicht. Bis zu einem N/P-Verhältnis von 15 kann die Lipidbeschichtung eine Absenkung der Gerinnungszeit in den tolerierbaren Bereich (70 Sekunden) ermöglichen. Bei höheren N/P-Verhältnissen verbessert die Lipidbeschichtung die Gerinnungszeit zwar signifikant, der Grenzwert wird allerdings trotzdem überschritten.

4.3.2 Ergebnisse Hämolyse

In Abbildung 4.11 und 4.12 sind die Ergebnisse aus den Hämolyse Untersuchungen (siehe Kapitel 3.11) zusammenfassend dargestellt. Als Grenzwert für tolerable

Ergebnisse werden allgemein 10% Hämolyse akzeptiert [6, 30, 31, 116]. Bei allen hier untersuchten PEI-Komplexen (Abbildung 4.11) wird der tolerable Grenzwert nicht erreicht. Alle Komplexe besitzen nur einen geringen Einfluss auf die Hämolyse und sind prinzipiell für eine Applikation parenteral über die Blutbahn geeignet.

Die gemessenen Werte für die Hämolyse nehmen für alle Polymere mit zunehmendem N/P-Verhältnis zu, die Beschichtung mit Lipiden erbringt auch in diesen Untersuchungen eine Verbesserung der Kompatibilität mit dem Blut, was sich in einer Reduktion der Hämolyse äußert. Positiv zu bemerken ist, dass auch bei hohen N/P-Verhältnissen keine toxischen Werte bei den eingesetzten Konzentrationen erreicht werden. Beim IPEI verbessert die Lipidbeschichtung die Hämokompatibilität, beim bPEI ist dieser Effekt ab einem N/P-Verhältnis von 15 signifikant, beim PEI F25 ab N/P 15 hoch signifikant. Im Fall des pDMAEMA (Abbildung 4.12) ist ein deutlicher Einfluss des N/P-Verhältnisses wie auch der Lipidbeschichtung zu erkennen. Der Unterschied zwischen Lipopolyplex und Polyplex ist immer signifikant.

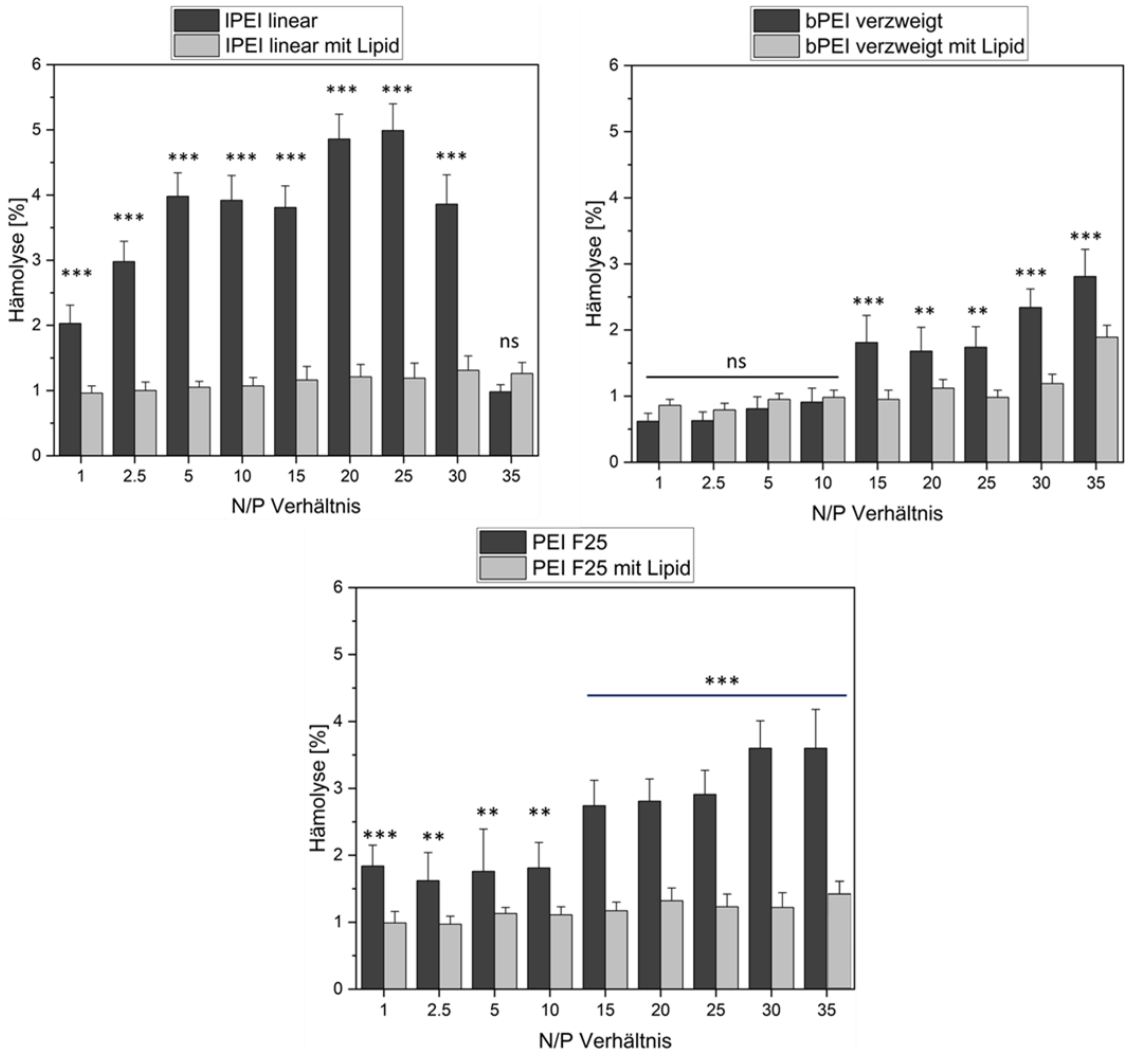

Abbildung 4.11 Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen PEI-Polymere als Polyplexe (schwarz) und Lipopolyplexe (grau) und deren Einfluss auf die Hämolyse. A) lineares PEI (IPEI), B) verzweigtes PEI (bPEI) und C) PEI F25. Als tolerabel gilt ein klinischer Wert von bis zu 10% Hämolyse. n = 6 für alle Gruppen, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ns nicht signifikant.

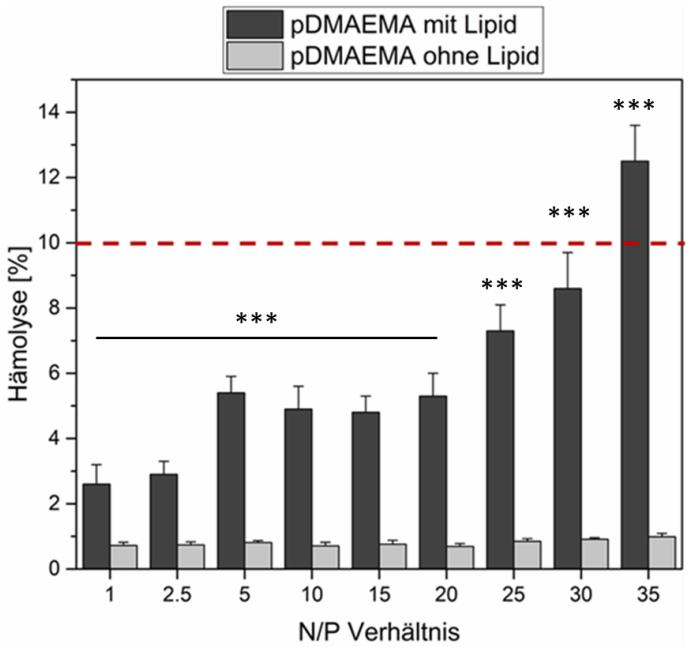

Abbildung 4.12 Darstellung von pDMAEMA und dessen Einfluss auf die Hämolyse. Polyplexe (schwarz) und Lipopolyplexe (grau). Als tolerabel gilt ein klinischer Wert von 10% Hämolyse. n = 6 für alle Gruppen, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ns nicht signifikant.

4.3.3 Ergebnisse MTT-Zell - Viabilitätstest und LDL-Zell – Zytotoxizitätstest

Als Erstes wurden, basierend auf in der Arbeitsgruppe Bakowsky eingesetzter Konzentrationen sowie Literaturdaten [40, 51, 72, 84, 114, 115, 125, 146], Werte für die Toxizität der reinen Polymere ermittelt. Dabei wurde nur der MTT-Vitalitätstest verwendet. Dazu wurden unter Versuchsbedingungen wie in dieser Arbeit allgemein verwendet (siehe Kapitel 3.7) unterschiedliche Konzentrationen der Polymere gelöst und mit den Zellen inkubiert (1µg/ml, 2µg/ml und 10µg/ml). Bei 1µg zeigten die Polymere IPEI, bPEI und PEI F25 eine niedrige Toxizität und ein Zellüberleben von deutlich über 80%, wohingegen beim pDMAEMA bereits hier nur ca. 50% der Zellen überlebten. Auch bei 10µg überlebten bei IPEI, bPEI und PEI F25 noch zwischen 40 und 50% der Zellen, während die Überlebensrate beim pDMAEMA deutlich unter 15% lag (5µg ca. 20%).

Abbildung 4.13 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für vom N/P-Verhältnis abhängigen MTT-Tests der Polyplexe und Lipopolyplexe. Bei allen Polyplexen ist eine Abnahme der Viabilität mit zunehmendem N/P-Verhältnis zu beobachten. Während bei allen PEI-Komplexen bis zu einem Verhältnis von 20 eine Viabilität von über 80% erhalten bleibt,

liegt diese bei den pDMAEMA Polyplexen bereits darunter. Bei N/P 35 sinkt die Viabilität für alle Polyplexe auf 60-70%. Eine Ausnahme bildet hier das PEI F25. Hier bleibt die Überlebensrate stabil über 80%, wobei die Schwankungsbreite zunimmt.
Für alle Lipopolyplexe werden bessere bis deutlich verbesserte Viabilität im Vergleich zu den analogen Polyplexen erhalten. Nur bei hohen N/P-Verhältnissen (N/P 30 und 35) des pDMAEMA´s wird der Wert von 80% Überleben unterschritten.

Die Daten über die LDH-Zell – Zytotoxizitätstests sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Für alle Polyplexe wird ein deutlicher Anstieg der Zytotoxizität bei N/P-Verhältnissen zwischen 10 und 15 beobachtet. Während bei IPEI und bPEI bei einem N/P-Verhältnis von 35 die höchste Toxizität von etwa 10% erreicht wird, bleibt beim PEI F25 der Wert, trotz Anstieg, immer unter moderaten 2%. Die Toxizität des pDMAEMA´s steigt ab N/P 10 schnell an und erreicht mehr als 50%, wobei die Schwankungsbreite innerhalb der Testreihen sehr groß war.
Die Lipopolyplexe bleiben bei allen PEIs sehr niedrig mit ca. 2%, wohingegen beim pDMAEMA auch 20% erreicht werden.

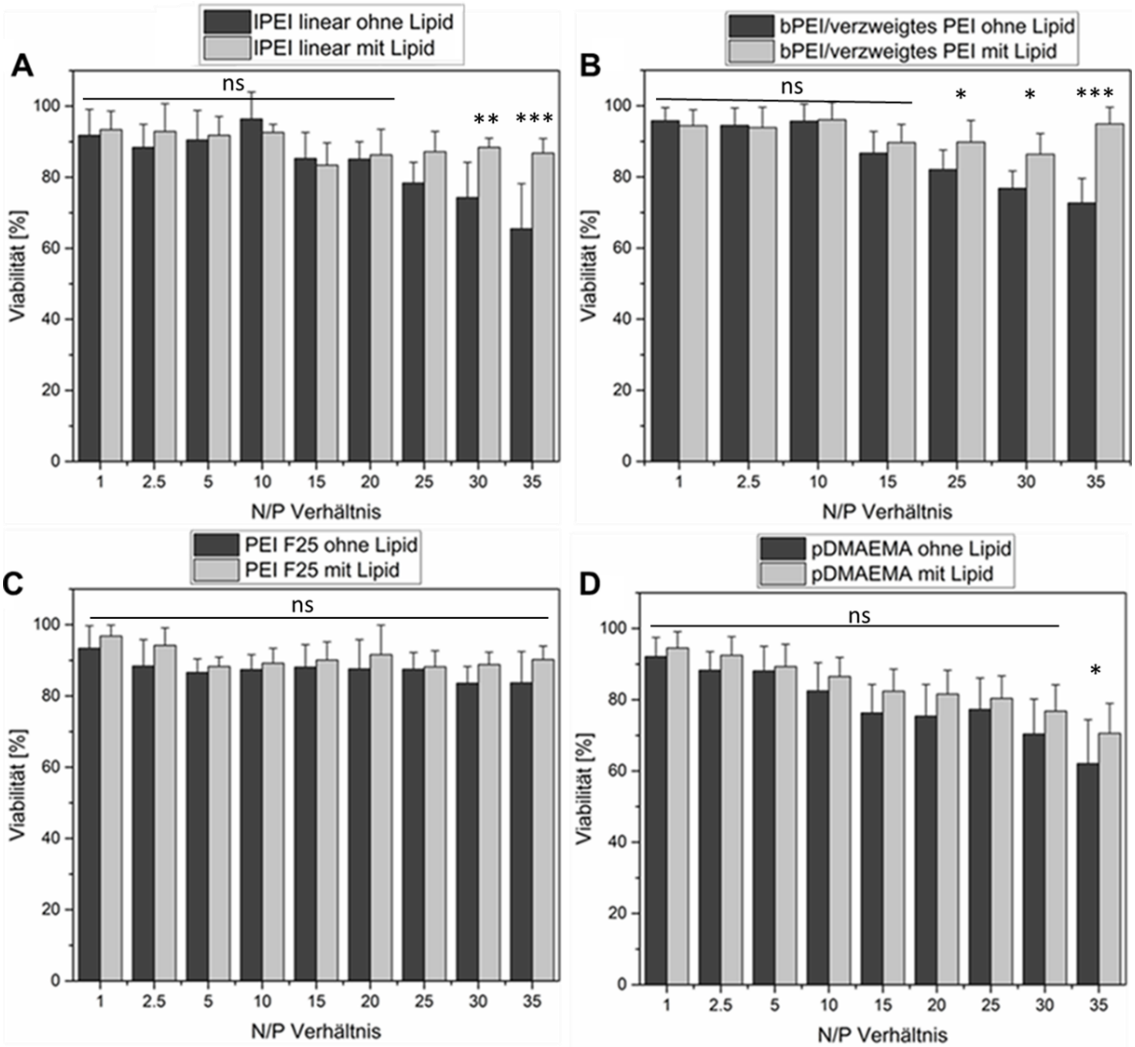

Abbildung 4.13 Vergleichende Darstellung der Zellviabilität, ermittelt mit dem MTT Assay. Polyplexe (schwarz, ohne Lipid) und Lipopolyplexe (grau, mit Lipid). A) IPEI, B) bPEI, C) PEI F25, D) pDMAEMA. Als Normierung der positiven Kontrolle wurde die Zell-Viabilität ohne Zugabe von Polyplexen/ Lipopolyplexen auf 100% gesetzt, als Negativkontrolle unter Zugabe von 1% Triton X100 auf 0%. n = 6 für alle Gruppen, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ns nicht signifikant.

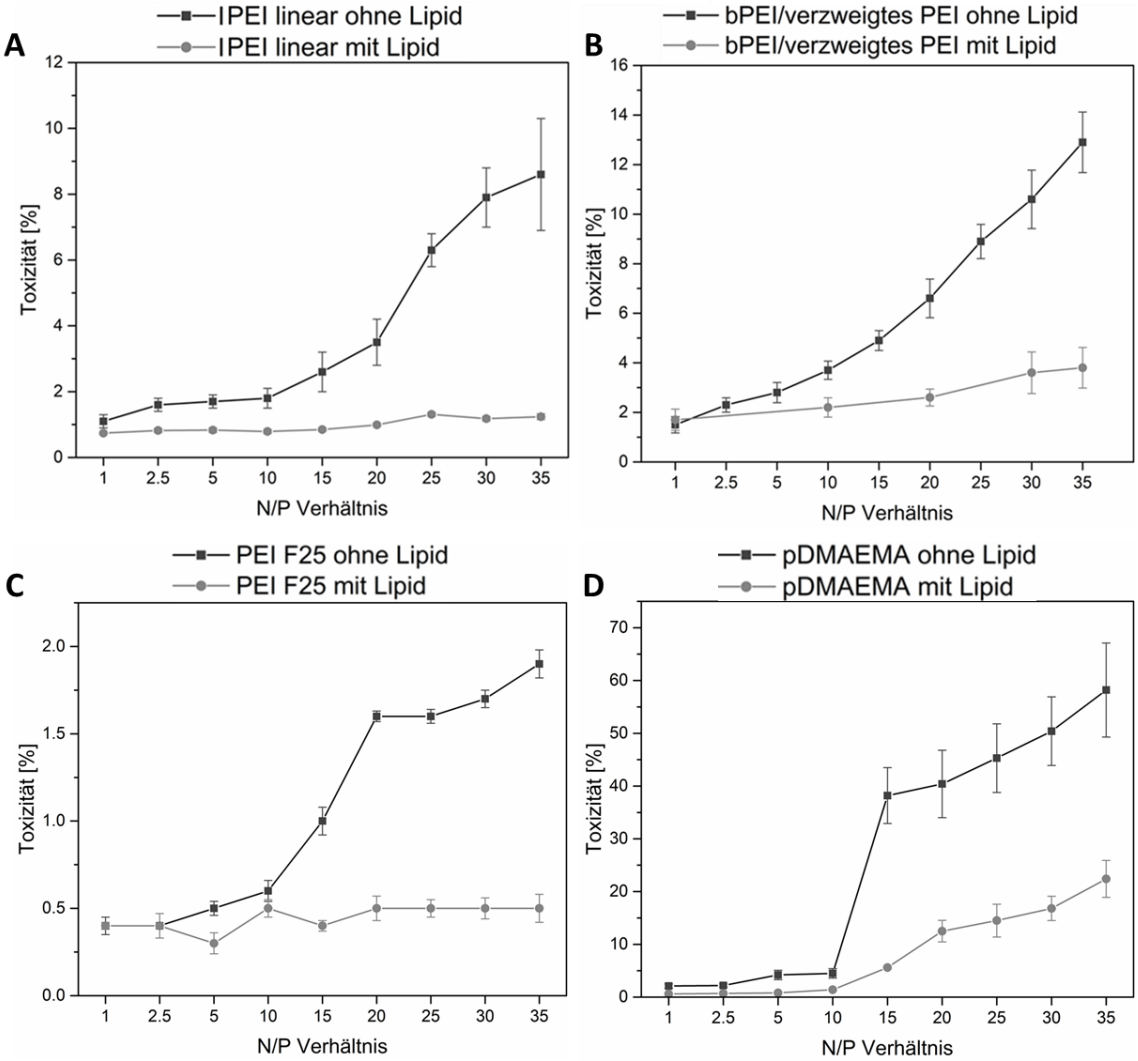

Abbildung 4.14 Vergleichende Darstellung der Zell – Zytotoxizitätstests, ermittelt mit dem LDH Assay. Polyplexe (schwarz, ohne Lipid) und Lipopolyplexe (grau, mit Lipid). A) IPEI, B) bPEI, C) PEI F25, D) pDMAEMA. Zur besseren Visualisierung des Effektes der Lipidbeschichtung wurde die Darstellung als Kurvendiagramm gewählt. A) ab einem N/P-Verhältnis von 15 ist P < 0,001 ***, B) ab einem N/P-Verhältnis von 15 ist P < 0,001 ***, C) ab einem N/P-Verhältnis von 10 ist P < 0,001 ***, D) ab einem N/P-Verhältnis von 15 ist P < 0,001 ***. n = 6

4.4 Ergebnisse Testung der Transfektionseffizienz

Die letzte und wichtigste Kenngröße bei der Bewertung von Genvehikeln ist deren Transfektionseffizienz (Kapitel 3.9). Für deren Charakterisierung wurden anhand der vorliegenden Ergebnisse aus Teilchengröße, Zeta-Potential, Form und Gestalt wie auch der Auswertung der toxikologischen Untersuchungen eine Selektion an potenziell optimalen Polyplexen und deren korrespondierenden Lipopolyplexen getroffen. Zur Evaluierung der Effektivität wurden die entsprechenden Komplexe wie in Kapitel 3.2

beschrieben hergestellt und mit pCMV-luc-Plasmid beladen bzw. die Beladungsmenge an Plasmid entsprechend einen N/P-Verhältnis von 5 bis 35 vorgenommen, wobei die applizierte Menge an pCMV-luc-Plasmid pro Probe 0,2 µg entspricht, um vergleichbare Daten zu erhalten. Für die Lipopolyplexe kam immer ein Lipid/Polyplex Verhältnis von 5:1 (w:w) zum Einsatz, wobei die anderen Parameter zu den korrespondierenden Polyplexen identisch waren.

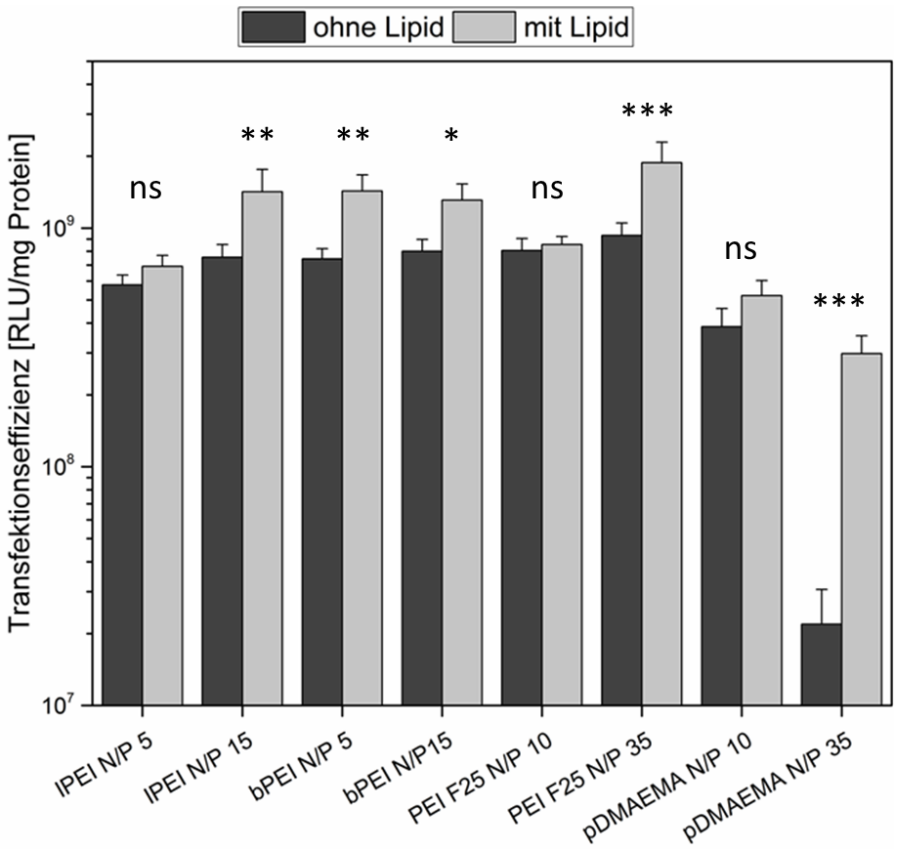

Abbildung 4.15 Vergleich der Transfektionseffizienz ausgewählter Polyplex- und Lipopolyplexformulierungen. Als Kontrolle diente das unmodifizierte und unkomplexierte Luciferase Plasmid pCMV-luc, welches einen Proteinwert (RLU/mg Protein) von 5700 ± 1220 erreichte. n = 3 für alle Gruppen, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ns nicht signifikant.

Die Transfektionseffizienzen der jeweils verwendeten N/P-Verhältnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Für IPEI und bPEI werden N/P 5 und 15, für das PEI F25 und das pDMAEMA jeweils N/P 10 und 35 verwendet. Die Lipopolyplexe zeigen immer eine höhere Transfektionseffizienz gegenüber den korrespondierenden Polyplexen. Nicht bei allen N/P-Verhältnissen ist der Unterschied auch signifikant (IPEI N/P 5 und PEI F25 N/P 10). Die Transfektionseffizienz ist bei den untersuchten Formulierungen allerdings auch immer sehr hoch. Nur im Fall des pDMAEMA kann die Effizienz der Polyplexe (N/P 35) nicht überzeugen.

Generell können die in der Literatur beschriebenen hohen Transfektionseffizienzen für PEI Polyplexe und Lipopolyplexe bestätigt werden. Im verwendeten Zellkulturmodell spielen die Faktoren der Hämokompatibilität oder auch andere toxikologische Faktoren eine weniger bedeutende Rolle. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass für alle PEI`s bei N/P unter 5 die Transfektion äußerst gering ist, obwohl deren Toxizität sehr gering ist. Bei N/P-Verhältnissen über 30 wird eine sehr gute Transfektion erreicht, obwohl die Komplexe merkliche Probleme hinsichtlich ihrer Toxizität aufzeigen. Man kann davon ausgehen, dass Zellen die weniger von den negativen Eigenschaften der Komplexe betroffen sind, eine hohe Transfektionseffizienz sowie Proteinexpression aufweisen. Dabei ist davon auszugehen, dass sicherlich nur noch 50-70% der Zellen überhaupt an der Protein Produktion beteiligt sind. Experimente, welche physikalische und molekulare Eigenschaften der Zellen analysieren, wie z. B. mittels FACS, wurden nicht durchgeführt, würden hier aber einen genaueren Aufschluss erbringen.

Tabelle 4.9 Zusammenfassung der erhaltenen Daten für die Polyplexe und Lipopolyplexe. Teilchengröße, Zeta-Potential, Zellviabilität (MTT), Toxizität (LDH), Hämolyse, Gerinnungszeit (aPTT) und Transfektionseffizienz. *Alle Daten wurden gerundet und ohne Standardabweichung dargestellt.

Formulierung*	Größe [nm]	Zeta-Potential [mV]	MTT [%]	LDH [%]	Hämolyse [%]	aPTT [sec.]	Transfektion [RLU/mg Protein]
IPEI N/P 5							
Polyplex	210	+ 28	90	2,0	4,0	35	$5,7\ 10^{8}$
Lipopolyplex	276	+ 1	92	0,5	1,0	28	$7,1\ 10^{8}$
IPEI N/P 15							
Polyplex	116	+ 34	82	2,5	4,0	38	$7,5\ 10^{8}$
Lipopolyplex	217	+ 8	80	0,5	1,1	30	$1,5\ 10^{9}$
bPEI N/P 5							
Polyplex	310	+ 3	95	2,5	0,8	25	$7,0\ 10^{8}$
Lipopolyplex	>500	+ 3	95	1,5	0,8	25	$1,4\ 10^{9}$
bPEI N/P 15							
Polyplex	122	+ 35	90	4,5	2,0	52	$7,9\ 10^{8}$
Lipopolyplex	167	+ 24	93	1,7	1,0	27	$1,2\ 10^{9}$
PEI F25 N/P 10							
Polyplex	200	+ 32	88	0,5	2,3	35	$8,0\ 10^{8}$
Lipopolyplex	154	+ 21	90	0,5	1,0	28	$8,9\ 10^{8}$
PEI F25 N/P35							
Polyplex	97	+ 32	83	1,7	3,2	75	$9,5\ 10^{8}$
Lipopolyplex	110	+ 32	90	0,5	1,1	30	$1,9\ 10^{9}$
pDMAEMA N/P 10							
Polyplex	270	+ 21	77	3,0	5,5	>300	$3,8\ 10^{8}$
Lipopolyplex	224	+ 7	82	0,5	0,5	44	$8,5\ 10^{8}$
pDMAEMA N/P 35							
Polyplex	217	+ 24	64	50	12,5	>300	$7,2\ 10^{7}$
Lipopolyplex	215	+ 30	73	15	0,5	125	$2,9\ 10^{8}$

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1 Vormerkung zur Diskussion der Ergebnisse

Um die Ergebnisse der physikalischen Charakterisierung der Polyplexe und Lipopolyplexe angemessen zu diskutieren, ist es wichtig, die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur sowie die spezifischen Beobachtungen dieser Studie zu berücksichtigen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass alle untersuchten Polymere bei niedrigen N/P-Verhältnissen tendenziell größere, irreguläre Aggregate mit breiter Größenverteilung bilden, was durch die hohen PDI-Werte und die AFM-Visualisierungen bestätigt wird. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis nehmen die Teilchengrößen ab und die Homogenität der Partikel verbessert sich, was auf eine stabilere Komplexbildung hinweist. Besonders bei den Lipopolyplexen ist eine deutliche Abhängigkeit der Partikelgröße und des Zeta-Potentials vom Mischungsverhältnis erkennbar, wobei die physikalischen Eigenschaften in einem Bereich liegen, der für die Anwendung als Vehikel in der Gentherapie geeignet erscheint.

Es ist jedoch zu betonen, dass die Durchführung dieser Untersuchungen äußerst anspruchsvoll war. Die Analysen stellten hohe Anforderungen an die verwendeten Messtechniken, da die Komplexe oft polymodal, inhomogen und schwer zu charakterisieren bzw. zu visualisieren waren. Zudem wurden zahlreiche Einzeluntersuchungen durchgeführt, um die physikalischen Eigenschaften umfassend darzustellen. Solche Studien wurden bisher in der Literatur noch nie in einer so umfassenden und zusammenfassenden Weise durchgeführt, was die Komplexität und den hohen Forschungsaufwand dieser Arbeit unterstreicht. Die Ergebnisse lassen sich im Kontext vergleichbarer Studien interpretieren und bieten wertvolle Hinweise auf die optimale Formulierung sowie auf die Zusammenhänge zwischen Struktur, Stabilität, Biokompatibilität und Funktionalität der Poly- und Lipopolyplexe. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse im Detail diskutiert, um die Zusammenhänge zwischen Struktur, Stabilität, Biokompatibilität und Funktionalität der Poly- und Lipopolyplexe zu beleuchten.

5.2 Physikalischen Charakterisierung der Polyplexe

In der Literatur gibt es viele Untersuchungen zum Einfluss der N/P-Verhältnisse auf die Struktur der Polyplexe, systematische Datenerhebungen sind allerdings kaum zu finden. Die wichtigsten Publikationen zur Thematik wurden von Schäfer et al., Pinnapireddy et al., Kneuer et al., Aigner et al., Moghimi et al., Behr et al., Wagner et al. [15, 40, 41, 51, 60, 73, 81, 98, 114, 115, 125, 146] zu ausgewählten N/P-Verhältnissen veröffentlicht. Alle vier verwendeten Polymere zeigen bei niedrigen N/P-Verhältnissen die Tendenz, recht große irreguläre Aggregate mit Durchmessern von 500 nm und größer zu bilden. Der hohe PDI (> 0,5) spricht zudem für eine breite Teilchengrößenverteilung, was auch durch die AFM-Visualisierung bestätigt wird (Abb. 4.1 A, 4.2 A, 4.3 A, 4.4 A). Die PCS-Einzelmessungen zeigen hier auch oftmals mehrere und sehr breite Peaks, was auf unterschiedliche diskrete Teilchenpopulationen hinweist. Das Zeta-Potential ist nahe Null oder negativ, da immer noch ein Ladungsüberschuss durch die DNA besteht. Mit zunehmenden N/P-Verhältnissen werden die Teilchengrößen kleiner und die Teilchengrößenverteilung (PDI) homogener, wobei ein PDI von unter 0,2 eine monodisperse Teilchengrößenverteilung kennzeichnet.

IPEI: Bei den IPEI-Komplexen werden bei niedrigen N/P-Verhältnissen große PDI-Werte und auch Teilchengrößen über 350 nm beobachtet. Auch die PDI-Werte von über 0,4 kennzeichnen eine polydisperse Teilchengrößenverteilung. Mit zunehmenden N/P-Verhältnissen werden die Komplexe deutlich kleiner (N/P 10, unter 200 nm, Tabelle 4.1, Abb. 4.1) und auch monodispers (PDI unter 0,3). Bei sehr großen N/P-Verhältnissen erhält man hohe Zeta-Potentiale (hier werden auch sehr kleine Teilchengrößen von unter 150 nm erreicht, bei einer sehr scharfen Teilchengrößenverteilung) von mehr als +30 mV, was für eine Applikation als ungünstig erachtet wird [73]. Dieser Einfluss des N/P-Verhältnisses auf das Zeta-Potential, die Teilchengröße und die Teilchengrößenverteilung wurde auch schon von den Arbeitsgruppen Schäfer, Kneuer, Aigner und Pinnapireddy beobachtet und auf eine Reorganisation in der Komplexfeinstruktur zurückgeführt [40, 41, 51, 60, 73, 114, 115, 125, 146]. Insgesamt sind die in diesem Abschnitt der Dissertation erhaltenen Ergebnisse mit vorherigen Daten der Arbeitsgruppe Bakowsky quantitativ vergleichbar. Durch die Varianz der zum Kauf zur Verfügung stehenden PEI-Chargen, auch innerhalb des Zeitraums der hier

dargestellten Arbeiten, sind die oft nur geringfügigen Abweichungen von den Literaturwerten erklärbar. Generell zeigten Polyplexe des IPEI´s eine Abnahme von der Teilchengröße zwischen einem N/P-Verhältnis von 2,5 und von 22, von 210 nm auf 124 nm, bei deutlich positiven Zeta-Potentialen von größer 30 mV (N/P 22), was auch durch die Literatur bestätigt wurde [74, 114, 115].

bPEI: Wie in Tabelle 4.2 zu sehen, wird bei Messungen mit dem PCS eine Teilchengröße von 388 nm (N/P = 1, PDI ca. 0,8) beobachtet. Auch Abbildung 4.2 A zeigt eine deutlich bimodale Verteilung im Fall von bPEI (N/P = 5), wie sie auch beim N/P von 1 und 2,5 beobachtet wurde. Dabei werden Teilchenpopulationen von ca. 80-100 nm und ein zweiter Peak mit 200 – 400 nm nachweisbar, bei einem mittleren Durchmesser von etwa 300 nm (PDI 0,43). Beim verwendeten Messprinzip werden sehr große Teilchen, auf Grund von Sedimentationsprozessen während der Messung, oft nicht korrekt wiedergegeben. Die unterschiedlichen Komplexgrößen können als Folge der unvollständigen Komplexierung diskutiert werden. Auch diffusionskontrollierte oder mischungsbedingte Prozesse können zu einem solchem Ergebnis beigetragen haben. Da aus der Literatur [40, 41, 51, 60, 73, 114, 115, 125, 146] bekannt ist, dass solche Komplexe eher geringe Bedeutung für ein funktionierendes Transportvehikel haben, wurde wie auch bei den folgenden Komplexen auf eine Untersuchung des Phänomens verzichtet. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis werden die Komplexe stabiler und auch kleiner, wobei sich das Zeta-Potential erhöhte. Ähnliche Daten fand auch Pinnapireddy [114], wobei sich hier die Komplexgröße von 298 nm auf 188 nm bei einem N/P-Verhältnis von 3 bis 20 verringerte, mit einer Erhöhung des Zeta-Potentials von +22 auf +40 mV. Auch Kneuer [74] zeigte einen vergleichbaren Verlauf von Größe (100 nm, N/P 7,5) und Zeta-Potential (+ 32 mV). Das sich bei höheren N/P-Verhältnissen unmittelbar nach der Komplexierung Aggregate bildeten, konnte nicht bestätigt werden, was in [15] angedeutet wird. In der vorliegenden Studie konnten auch hier immer runde und separate Komplexe mit dem AFM nachgewiesen werden. In anderen Arbeiten wie z. B. von Khalvati [72] werden für bPEI Komplexe deutlich kleinere Teilchengrößen vermessen (75-100nm, +30 mV), ohne aber eine Visualisierung zur Bestätigung aufzuzeigen. Außerdem muss hier bemerkt werden, dass es schwer war, Komplexe mit einem N/P-Verhältnis von 2,5 zu visualisieren, was vermutlich auf

Messspitzeninteraktion zurückzuführen ist. Ähnliches wurde auch von Schäfer [125] beobachtet.

PEI F25: Die auch hier, wie beim bPEI, beobachtete polymodale Teilchengrößenverteilung bei kleinen N/P-Verhältnissen von 1-2,5, kann auch als Folge der nicht vollständigen oder inhomogenen Komplexbildung angesehen werden (Teilchengröße 250 bis 450 nm, PDI größer 0,4, Abb. 4.3). Bei der Messung des mittleren Teilchendurchmessers, wie in Tabelle 4.3 angegeben, werden die kleinen, nicht sedimentierenden Komplexe, bedingt durch die Messmethode, überproportional in die Daten einbezogen. Durch die teilweise große Inhomogenität der Proben ließen sich auch keine Daten durch die AFM-Technik gewinnen. Die nicht kontrollierbare Interaktion der Probenoberfläche mit der Sensorspitze verhinderte hier reproduzierbare Messungen. Oft waren auf der Probe Aggregate zu beobachten, die höher als der maximale z-Höhenregulierung der Sensorspitze des AFM waren. Eine Messung war dann gar nicht möglich.

Mit zunehmender Komplexstabilität bei N/P-Verhältnissen über 15, kommt es zur Bildung kleiner Komplexe mit einer sehr engen Teilchengrößenverteilung (PDI 0,2) mit deutlich positivem Zeta-Potential (+31 mV). Schäfer et al. und Aigner et al. untersuchten erstmals PEI F25 Komplexe [35, 40, 41, 51, 60, 74, 114, 115, 125, 146], wobei hier große Unterschiede in der Teilchengröße (N/P 15 und N/P 33), vermessen durch PCS (Teilchengröße von 380 bzw. 210 nm) und AFM (ca. 65 nm), bei hohen PDIs (größer 0,3) gefunden wurden. Als Erklärung wurde hier die Bildung von dispergierbaren Aggregaten angeführt, welche im AFM in den Untereinheiten visuell aufgelöst werden konnten, während die PCS nur das Aggregat detektierte. Als optimale Formulierung wird hier das N/P-Verhältnis 33 angeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden ab einem N/P-Verhältnis von 15 immer positiv geladene Komplexe mit sehr guten Teilchengrößenverteilungen mit PDI 0,2 und kleiner, bei Teilchengrößen von unter 150 nm, gefunden. Ab diesem N/P-Verhältnis konnten keine Aggregationen mehr visualisiert werden. Da die hier ermittelten Daten auch reproduzierbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass es bei den ersten Herstellungen der Lipopolyplexe/ Polyplexe eventuell entwicklungstechnisch bedingte Probleme gab [125], die

hinsichtlich der Methode zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit bereits ausgeräumt waren.

pDMAEMA: Die hohen Teilchengrößen bei niedrigen N/P-Verhältnissen (bis 5) machen eine genaue Messung der Teilchengrößen mit den hier angewendeten Methoden nur schwer möglich. Auch die polymodale Teilchengrößenverteilung (Abb. 4.4 A) mit der Gewichtung hin zu großen sedimentierenden Partikeln (600 – 1000 nm) macht eine Untersuchung schwierig. Die Interaktionen zwischen der Abtastspitze des AFMs und den Komplexen verschlechterte ebenfalls die Möglichkeit der Visualisierung der Komplexe als auch Messungen deren Größe, wie dies auch bei den PEI-Komplexen mit niedrigem N/P-Verhältnis oft zu beobachten war. Mit zunehmenden N/P von 10 und 15 stabilisieren sich die Komplexe, wobei Teilchengrößen von ca. 250 nm bei akzeptablen PDI-Werten von ca. 0,35 erhalten wurden. Eine rein monomodale Teilchengrößenverteilung wird allerdings nie erreicht. Samsonova [124] und Tariq [136] untersuchten einzelne vergleichbare Komplexe mit Größen zwischen 90 und 250 nm, mit durchweg positiven Zeta-Potentialen. In der Arbeitsgruppe von Wim Hennink waren, bei N/P-Verhältnissen von 10, 170-210 nm (Zeta-Potential +30 mV) in unterschiedlichen Publikationen erhalten worden [18, 22, 23, 124, 136]. Angaben über Stabilitäten oder Teilchengrößenverteilungen werden keine gemacht.

5.3 Physikalische Charakterisierung der Lipopolyplexe

Wie bereits beschrieben, sind die Lipopolyplexe (LPPs) eine neue Klasse von Genvehikeln, welche erstmals von Schäfer et al. [125] beschrieben wurde. In diesen Wirkstoffträgersystemen werden die biokompatiblen Eigenschaften von Liposomen mit den sehr stabilen Komplexeigenschaften von Polymeren kombiniert. Dies eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten und auch eine Vielfalt an möglichen Materialmodifikationen bis hin zum Design moderner Nanokomposite.

IPEI Lipopolyplexe (Abb. 4.6, Tab 4.5) zeigen mit zunehmendem N/P-Verhältnis einen Anstieg des Zeta-Potentials von N/P 1 mit -31 mV zu N/P 35 mit + 31 mV, während die Teilchengröße eine nicht lineare Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis zeigt. Bei N/P 1 (mediane Teilchengröße ca. 190 nm, bei einer Teilchengrößenverteilung von 30 bis 800

nm) dominiert bei den Messungen der Einfluss der Liposomen (Teilchengröße ca. 180 nm), welche in den Mittelwert der Teilchengrößen mit einbezogen bzw. nicht von den reinen Polyplexen, auf Grund der verwendeten Messtechniken (PCS und AFM), unterschieden werden können. Die Teilchengrößenverteilung ist ebenfalls sehr breit (Abb. 4.6 A). Allerdings spricht der PDI von 0,33 für eine annähernd bimodale Verteilung der Größe mit breiter Kurvenverteilung. Die deutlich sichtbare Verringerung des Zeta-Potentials im Vergleich zu den Korrespondierenden PPs (N/P = 1, -31 mV) ist durch das Mischungsverhältnis Liposom (negative Ladung -23 mV) zu Polyplex (N/P = 1, +1 mV) bedingt, welches bezogen auf die DNA immer konstant ist. Am Beginn der Komplexfusion überwiegt der Ladungsanteil der negativen Liposomen, welcher bei höheren N/P-Verhältnissen zuerst durch den positiven Komplex kompensiert und letztendlich zu positiven Ladungen hin verschoben wird. Die Teilchengröße wird ebenfalls durch die Mischungsverhältnisse dominiert. Der steigende PDI verdeutlicht die polydisperse Inhomogenität der Teilchengrößenverteilung (N/P von 2,5, 380 nm, PDI 0,46), was sicherlich als Folge der verringerten elektrostatischen Abschirmung der Komplexe gewertet werden kann, was auch das Wachsen der Komplexe erklärt. N/P-Verhältnisse von 10 und 15 stellen Formulierungen mit optimalen physikalischen Parametern dar. Die gezeigten Daten sind prinzipiell mit den von Pinnapireddy [115] für N/P 10 mit Durchmessern von 201 nm, Zeta-Potenzial + 3,7 mV und PDI von 0,19 äquivalent. Auch Ewe et al. zeigen vergleichbare Ergebnisse [41]. Bei noch größeren N/P-Verhältnissen wachsen die Größe und das Zeta-Potential, bei deutlicher Verschlechterung der Homogenität. Generell ist die Teilchengröße der Lipopolyplexe größer als die der korrespondierenden Polyplexe. Dies wurde auch so bei anderen Autoren beobachtet [35, 114, 115, 125].

Die bPEI Lipopolyplexe (Abb. 4.7, Tab 4.6) zeigen ein ähnliches Verhalten wie die vorstehend beschriebenen IPEI-Komplexe, bei von Liposomen dominierten Teilchengrößen und Zeta-Potentialen bei niedrigen N/P-Verhältnissen (bis N/P 5). Eine Ladungskompensation Liposom/ Polyplex tritt oberhalb N/P 10 deutlich in Erscheinung, da hier ein sprunghafter Anstieg des Zeta-Potentials von ca. 3 mV (Teilchengröße > 500nm) auf über 22 mV (Teilchengröße ca. 170 nm) stattfindet. Die höhere intrinsische Oberflächenladung der bPEI-Moleküle im Vergleich zu den IPEI`s kann zu einer

Umlagerung innerhalb der Lipopolyplexe führen, was eine dauerhafte Ladungsabschirmung durch die Liposomen beeinträchtigt [114]. Andere Autoren fanden für ähnliche Komplexe bei N/P 15 Durchmesser von 210 nm (PDI 0,2) und ein Zeta-Potential von +9,5 mV [114, 115]. Verglichen mit den in dieser Arbeit gefundenen Daten mit ca. 170 nm (PDI 0,18) und +24 mV, fällt besonders das höhere Zeta-Potential auf. Der Unterschied könnte auf dem unterschiedlichen pH-Wert der Untersuchungen basieren, wobei hier pH 7,4 und bei Pinnapireddy et al. [115] pH 5,6 verwendet wurde. Mit zunehmenden N/P-Verhältnis werden auch wieder größere Komplexe von über 200 nm (N/P 35, PDI 0,43, Zeta-Potential +27,7) beobachtet. Der vergrößerte PDI bei hohen N/Ps spricht hier für eine polydisperse Teilchengrößenverteilung und es kann die Möglichkeit einer einsetzenden Phasenseparation diskutiert werden.

Bei den PEI F25 Lipopolyplexen (Abb. 4.8, Tab 4.7) ist der Einfluss der Liposomen bei der finalen Komplexbildung bei niedrigen N/P-Verhältnissen ebenfalls deutlich erkennbar. Erst ab N/P 10 werden positive Zeta-Potentiale erhalten, die Netto-Ladungen steigen auch langsam an. Sicherlich ist die Oberflächenladung der Polyplexe hierfür die entscheidende Grundlage. Diese ermöglicht es den Liposomen, die Oberfläche homogen zu beschichten. Erst nach der Kompensation der Kernladung des Polyplexes kann die Außenladung schnell ansteigen. Dieser Effekt dürfte auch für die Ausbildung stabiler Komplexe bei höheren N/P-Verhältnissen bei sehr homogenen Teilchengrößenverteilungen und geringem PDI verantwortlich sein. Das PEI F25 wird in der Literatur [40, 41, 51, 60, 113, 114, 115, 125, 146] als eines der interessantesten Polykationen und als modernes Transfektionshilfsmittel bezeichnet. Viele Untersuchungen und Studien sind erhältlich. Dabei fokussieren viele Arbeiten hier auf Komplexe mit N/P-Verhältnissen über 30. Üblicherweise werden Teilchengrößen zwischen 100 und 250 nm mit Zeta-Potentialen über +30 mV für die Formulierungen angegeben, leider oft ohne genaue Angabe der Messbedingungen [40, 41, 84, 115, 125] oder der verwendeten pH-Werte oder Puffer. Nach den Daten dieser Studien würde man aus den physikalischen Ergebnissen eine optimale Komposition zwischen N/P 20-35 erwarten. Niedrigere Ladungen bei gleichfalls geringer Teilchengröße würden hier ebenfalls ein Optimum bedeuten. N/P 15 mit 137 nm, einem PDI von 0,22, entsprechend einer näherungsweise monodispersen Teilchengrößenverteilung und einem Zeta-

Potential von +22 mV entspricht den in der Aufgabenstellung angestrebten Parametern. Für die Transfektionsstudien wurden deswegen sowohl das N/P 15 wie auch das bereits beschriebene N/P 35-Verhältnis in die Untersuchungen mit einbezogen.

Bei den **pDMAEMA Lipopolyplexen** (Abb. 4.9, Tab 4.8) ist es oft schwierig die Teilchengröße zu bestimmen und auch die Gestalt zu visualisieren, was auf die Ladungswechselwirkungen und die große Teilchengröße zurückzuführen sein könnte. Erst bei N/P-Verhältnissen von 10 werden Durchmesser von ca. 200 nm mit sehr gutem Zeta-Potential von ca. +7 mV beobachtet. Die AFM-Visualisierungen in Abb. 4.9 zeigt immer eher runde Partikel, welche an Liposomen erinnern. Auch die PCS-Daten bei der Ermittlung des z-AvE, deuten eher auf eine Mischung von Liposom und Polyplex hin, die später in eine vollständige Aufnahme der pDMAEMA Polyplexe in die Liposomen übergeht. Bei den PEI`s wird ein vollkommen neuer „Durchdringungs -“ Komplex gebildet [40, 41, 51, 60, 114, 115, 125, 136, 146], dies scheint hier nicht der Fall zu sein. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen sind sehr inhomogene Formulierungen vorhanden, die messtechnisch nur schwer analysierbar waren, bei PDI´s größer 0,5 und Teilchengrößen über 500 nm. Dies ist insofern überraschend, da die Gesamtoberflächenladung der Teilchen negativ und damit aggregationshemmend ist. Ab einem N/P-Verhältnis von 15 sind die Formulierungen aus physikalischer Sicht tolerierbar.

Generell kann resümierend für die physikalischen Experimente zur Herstellung für alle Lipopolyplexe zusammengefasst werden, dass bei allen PEI Lipopolyplexen stabile Komplexe mit guten PDI und Teilchengrößen bereits bei N/P-Verhältnissen von 10 bis 15 erreichbar sind. Die Oberflächen haben eine moderate positiv Ladung, deutlich geringer als bei den korrespondierenden Polyplexen, auch die Stabilität ist vergleichend erhöht. Ab diesen N/Ps werden visuell (mittels AFM) einheitlich sphärische Komplexe gebildet. Auch die physikalischen Eigenschaften der pDMAEMA Lipopolyplexe sind den Kriterien (ca. 200 nm, ca. 20 mV, PDI kleiner 0,3) entsprechend als Vehikel für Gentherapeutika einsetzbar.
Aus den vorliegenden Daten werden LPPs und PPs von N/P-Verhältnissen 10 – 35 für die Transfektion vorgeschlagen.

5.4 Diskussion der Toxizitätsuntersuchungen

In der Literatur sind nur wenige Daten zur Gerinnung der hier verwendeten Polyplexe und Lipopolyplexe zu finden. Selbst Daten von den verwendeten Polymeren sind nicht verfügbar oder aber nicht unter Standardbedingungen durchgeführt worden. Dies betrifft besonders Untersuchungen der aPTT und der Hämolyse wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden. MTT und LDH wurden an einer Vielzahl von komplexbildenden Polymeren durchgeführt, wobei diese vornehmlich als Vergleichsproben zur Bewertung der eigentlich durchgeführten Experimente dienten und oft nicht eigenständig behandelt worden. Insofern ist auch hier eine vergleichende Bewertung schwierig.

5.5 Diskussion Ergebnisse Gerinnungszeit (aPTT)

In Pinnapireddy [125] erhöhte sich durch Zugabe von Komplexen die Gerinnungszeit auf 34,2 sec. (Lipopolyplexe) und 37,1 sec. (lPEI-Polyplexe; N/P 9,5). Durchaus vergleichbar mit den hier vermessenen Werten N/P 10 und N/P 15 mit 35 sec für die IPEI Polyplexe und eine Abnahme auf 27,5 sec (auf N/P 10 und N/P 15) bei den IPEI mit Lipopolyplexen. In dieser Arbeit waren untersuchte Proben sogar biokompatibler und hatten einen geringeren Einfluss auf die Gerinnungszeit. Beim auch in [125] untersuchten bPEI wurden 61,8 sec. (bPEI-Polyplexe; N/P 15), also nahe dem noch tolerierbaren Grenzwert von 70 sec. gemessen. Auch bei unseren Untersuchungen war mit 68 sec. der Grenzwert fast erreicht. Bei LLPs mit einem N/P 15 sinkt die Gerinnungszeit dann auf einen sehr guten Wert von 27,5 Sekunden. Ab einem N/P-Verhältnis von 30 überschreiten die PPs die Grenzwerte, wohingegen die LPPs weiterhin unter 30 sec. verbleiben. Das PEI F25 zeigt bei allen N/P-Verhältnissen, gegenüber dem bPEI, verbessert Gerinnungszeiten. Erst bei N/P 25 werden diese äquivalent (zu PPs). Bei den LPPs werden zu den korrespondierenden PPs immer niedrigere Zeiten (ca. 28 sec.) erhalten und nie der Grenzwert überschritten. Bei dem pDMAEMA stellt sich eine komplett abweichende Situation dar. Bereits ab einem N/P von 5 wird der Grenzwert überschritten, bis zu einem N/P von 15 kann die Lipidbeschichtung der LPPs diesen Effekt noch verhindern, darüber hinaus kann man davon ausgehen, dass die Komplexe nicht Blut kompatibel sind.

Wie auch zu Beginn der Untersuchungen in der Hypothese angenommen, verbessert die Lipidbeschichtung die Kompatibilität der Genvehikel signifikant. Dies tritt mit zunehmendem N/P-Verhältnis immer deutlicher in Erscheinung. Wie auch in der Literatur bekannt, nimmt die Wechselwirkung mit Zellen mit zunehmendem N/P-Verhältnis und damit steigendem Zeta-Potential (siehe Kapitel 4.1 und 4.2) zu. Das Zeta-Potential steigt von etwa -10 mV auf ca. + 30 mV (N/P 30) an. Ohne (PPs) bzw. mit Lipidbeschichtung (LPPs) wird ein vergleichbarer Wert der Gerinnungszeit bei hohen N/P-Verhältnissen nur bei dem IPEI erreicht, wobei die LPPs immer niedrigere Werte aufweisen. In Abhängigkeit von der Polymerstruktur und der molekularen Ladungsverteilung kompensieren die Ladungen der Lipide bzw. die Organisation der Lipidhülle oft nur unvollständig. Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten bei den Verzweigten PEI-Derivaten bPEI und PEI F25 sowie dem pDMAEMA.

Bei mittleren N/P-Verhältnissen wird durch das Lipid die Ladung kompensiert, was zu geringerer positiver Ladung bei vergleichbaren N/P-Verhältnissen führt. Was sich auch in der Gerinnungszeit widerspiegelt.

Inwieweit die Kapazität die Hämostase beeinflusst, ist hingegen sehr wenig bekannt. Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen aber einen Einfluss der Oberflächenladung der Formulierungen. Die Gerinnungszeit nimmt mit zunehmendem N/P-Verhältnis zu, wobei es je nach verwendetem Polymer große Unterschiede gibt. Die Lipidbeschichtung und Erzeugung der Lipopolyplexe hat ebenfalls immer einen positiven Einfluss auf die Gerinnung. Durch die Lipide wird sowohl eine Abschirmung der Oberflächenladung der Komplexe erreicht. Auch wird durch die Lipidzusammensetzung (diese wurde hier nicht ausführlich untersucht, unterschiedliche Lipidzusammensetzungen und auch PP: Lipid Verhältnisse sind in [35, 114, 125] zu finden) eine verbesserte Biokompatibilität ermöglicht. Die unzureichende Kompatibilität der Gerinnungswerte beim pDMAEMA kann hierdurch allerdings nicht erklärt werden, da ähnliche Zeta-Potentiale auch bei den untersuchten PEI Polyplexen erhalten werden. Eventuell sind hier die bereits bei der physikalisch chemischen Charakterisierung dargestellte Art der Komplexbildung für die beobachtete Wirkung verantwortlich.

Zusammenfassend bewertend kann folgende Reihenfolge der toxischen Eigenschaft „Gerinnungszeit“ für die Poly- und Lipopolyplexe gegeben werden (von sehr gut nach

schlecht): **Polyplexe IPEI < PEI F25 < bPEI << pDMAEMA, Lipopolyplexe IPEI = PEI F25 = bPEI << pDMAEMA**.

5.6 Diskussion der Ergebnisse Hämolyse

Betrachtet man die Daten differenziert, so kann man feststellen, dass beim IPEI der Einfluss des N/P-Verhältnisses auf die Hämolyse am größten ausgeprägt ist. Mit zunehmenden N/P-Verhältnis steigt die Hämolyse von 2 % (N/P 1) auf ca. 5 % (N/P 25) an, wobei der Grenzwert von 10% nie erreicht wird. Hier trägt die Lipidbeschichtung auch zu einer signifikanten Verbesserung bei. Generell führt die Lipidhülle zu einer Verbesserung der Biokompatibilität. Die Hämolyse sinkt, unabhängig vom N/P-Verhältnis bei den LPPs auf ca. 1%.

Auch beim bPEI und PEI F 25 ist dieser Effekt zu beobachten und ab einem N/P-Verhältnis von 15 signifikant für die PPs, wobei auch hier die Grenzwerte nie erreicht werden. Vergleichbare Ergebnisse werden auch in der Literatur für die reinen Polymere beschrieben [29, 84]. Lee beschreibt aber auch, dass bei sehr hohen Polymerkonzentrationen von 10 µg und mehr, ohne Komplexierung, eine Hämolyse von 80% erreicht wird. Sowohl die Konzentration an Polymer war bei diesen Untersuchungen größer, auch handelte es sich um freies Polymer, was andere Interaktionen mit den Blutzellen bedeuten kann. Zumindest waren die niedrigen Konzentrationen, mit denen dieser Arbeit für die PPs vergleichbar. Man kann bei den hier vorgestellten Komplexen wohl davon ausgehen, dass keine oder nur sehr wenige freie Polymere in der Formulierung vorhanden sein sollten.

Zunehmende N/P-Verhältnisse beim pDMAEMA führen schnell zu einer Verschlechterung der Stabilität und Vergrößerung der Hämolyse. Unerwartet stark ist hier aber auch der Schutzeffekt der Lipidhülle zu bewerten. Nur beim N/P-Verhältnis von 35 wird der Grenzwert bei den PPs überschritten. Alle LPPs mit Lipidhülle zeigen eine sehr geringe Hämolyse von ca. 1%. Die Abschirmung der Lipidhülle war hinsichtlich dieser Untersuchungen optimal.

Zusammenfassend bewertend kann folgende Reihenfolge der toxischen Eigenschaft „Hämolyse“ für die Poly- und Lipopolyplexe gegeben werden (von sehr gut nach schlecht):

Polyplexe bPEI < PEI F25 < IPEI << pDMAEMA, Lipopolyplexe IPEI = PEI F25 = bPEI = pDMAEMA.

5.7 Diskussion der Ergebnisse MTT-Zell - Viabilitätstest und LDL-Zell – Zytotoxizitätstest

Der beobachtete Verlauf der Untersuchungen, sowohl des MTT- als auch des LDL-Tests, waren nicht überraschend. Wie bereits aus einigen Publikationen zur Thematik bekannt war [35, 40, 41, 60, 98, 115, 114, 125, 146] nimmt die Zellviabilität mit steigendem N/P-Verhältnis für alle Polyplexe ab. Lipopolyplexe zeigen eine verbesserte Biokompatibilität, was bei den Untersuchungen auch deutlich sichtbar wird. Beim PEI F25 ist die prinzipielle Toxizität der Komplexe (sowohl Polyplexe als auch Lipopolyplexe) so gering, dass nie ein signifikanter Unterschied zwischen den Formulierungen beobachtet werden kann. Beim bPEI ist die Toxizität der Polyplexe ab einem N/P-Verhältnis von etwa 20 offensichtlich. Der Unterschied zu den Lipopolyplexen wird hier auch ersichtlich und ab einem N/P-Verhältnis von 35 auch hoch signifikant. Dieser Verlauf wurde auch schon von Ewe, Pinnapireddy und Schäfer beobachtet [40, 41, 114, 125]. Aber es werden nur in wenigen Fällen die allgemein akzeptierte Grenze für eine merkliche Toxizität und das Erreichen der 80% Viabilitätsgrenze unterschritten (IPEI PPs N/P 30 und 35, bPEI PPs N/P 30 und 35 und pDMAEMA ab N/P 10).

Der LDL-Test ist in reagiert je nach Testansatz potentiell etwas sensitiver auf toxische Veränderungen als der MTT-Test. Das wird auch in Abbildung 4.14 deutlich. Bei den Polymeren IPEI, PEI F25 und pDMAEMA wird ein deutlicher Anstieg der Toxizität ab einem N/P-Verhältnis von 10 beobachtet. Dieser ist sprunghaft. Prinzipiell fällt er mit dem starken Anstieg des Zeta-Potentials zu hoch positiven Werten zusammen, was auf eine Ladungsabhängigkeit des LDL-Wertes hindeutet. Beim bPEI findet man eher eine stetig steigende Zunahme der Toxizität, welche allerdings auch ab einem N/P von 10 zu beobachten ist.

Die Toxizität und die damit verbundene Membraninteraktion der Polyplexe nimmt mit zunehmendem Zeta-Potential zu. Die Größe der Komplexe als auch deren Polydispersität scheint hingegen keinen bedeutenden Einfluss zu haben, obwohl die Komplexe in einer Größe zwischen ca. 800 nm bis unter 100 nm variierten. Die Lipidbeschichtung der Lipopolyplexe kompensiert teilweise diese positive Oberflächenladung, was eigentlich nur zu einem späteren Anstieg der Toxizität führen

sollte, wie dies im Falle des pDMAEMA deutlich markant ist. Aber die Lipopolyplexe zeigen auch bei identisch hoher positiver Ladung von teilweise über +30mV eine sehr geringe Toxizität gegenüber den Zellen. Wie schon von Schäfer, Engelhardt und Pinnapireddy [114, 115, 125] diskutiert, scheint die Lipidhülle eine weitere effektive Abschirmung der Polyplexe zu bieten. Dabei kann die stabile Hydrathülle um die LPPs und ein effektiverer Born-Effekt eine Rolle spielen. Um eine weitere Bedeutung der Lipidhülle schlüssig zu belegen, sind weiterführende Studien notwendig und sinnvoll. Derzeit wird in der AG Bakowsky weiter an dieser Thematik gearbeitet und es sind hier sicherlich weitere Ergebnisse zu erwarten, die über den Stand dieser Arbeit hinausgehen.

Zusammenfassend bewertend kann folgende Reihenfolge der toxischen Eigenschaften „MTT und LDH“ für die Poly- und Lipopolyplexe gegeben werden (von sehr gut nach schlecht):

Polyplexe PEI F25 < IPEI < bPEI << pDMAEMA, Lipopolyplexe IPEI = PEI F25 = bPEI << pDMAEMA.

5.8 Diskussion der Ergebnisse Testung der Transfektionseffizienz

Für die hier dargestellten Ergebnisse gilt generell, dass die korrespondierenden Lipopolyplexe eine höhere Transfektionseffizienz erreichen als die Polyplexe. Dies ist sicherlich eine Folge der verringerten Toxizität. Da mehr Zellen pro Zeiteinheit am Leben bzw. vital sind, wird eine höhere summarische Transfektion vermessen, was auch durch die Messmethode begründet ist. Innerhalb der PEI-Populationen werden vergleichbare Effizienzen für die Transfektion erreicht, wobei das IPEI und bPEI bei niedrigeren N/P-Verhältnissen eine optimalere Leistung erreichen als das PEI F25. In unterschiedlichen Publikationen [31, 40, 41, 72, 115] wird auch darauf hingewiesen, dass IPEI eine höhere Effizienz bei niedrigeren N/P-Verhältnissen erreicht als das bPEI, wohingegen das PEI F25 deutlich höhere N/P-Verhältnisse benötigt, um effektiv zu sein [40, 41, 114, 115, 125]. Die Unterschiede traten in den vorliegenden Untersuchungen nicht signifikant in Erscheinung.

Eine deutliche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom N/P-Quotienten wurde hingegen beim pDMAEMA beobachtet. Während bei einem N/P-Verhältnis von 10 auch

die Lipidbeschichtung kaum eine Verbesserung der Effizienz erbrachte, konnten die Lipopolyplexe bei N/P 35 eine deutlich höhere Transfektion aufweisen. Hier wird die erhöhte Toxizität des pDMAEMA signifikant bemerkbar und erst die Lipidbeschichtung reduziert diese. In der Literatur wird auf die hohe Transfektionseffizienz des pDMAEMA verwiesen, wobei die Autoren wenige Daten zur Toxizität liefern [142, 143, 3]. Unsere Daten bestätigen allerdings, dass ab einem N/P von 10 die Toxizität massiv in allen Bereichen anwächst und für eine Anwendung problematisch werden könnte.

Zusammenfassend bewertend kann folgende Reihenfolge der entscheidenden Eigenschaft „Transfektionseffizienz“ für die Poly- und Lipopolyplexe gegeben werden (von sehr gut nach schlecht):

Polyplexe PEI F25 = bPE < lPEI << pDMAEMA, Lipopolyplexe PEI F25 < bPEI = lPEI << pDMAEMA.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung unterschiedlicher nichtviraler Transfektionssysteme auf der Basis von positiv geladenen Polymeren wie dem bPEI, IPEI, PEI F25 und pDMAEMA. Im Vordergrund der Untersuchungen stand dabei einen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Genvehikel, ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und unerwünschten Nebenwirkungen aufzudecken und darzustellen. Von besonderem Interesse war es, den Einfluss der Lipidhülle bei der Bildung von Lipopolyplexen aus Polyplexen auf deren physikalische Eigenschaften wie Zeta-Potential, Teilchengröße oder Gestalt, aber auch die Veränderung der Toxizität und der Transfektionseffizienz zu klären.

Durch die physikochemische Charakterisierung (PCS, Zeta-Potential) und bildgebende Verfahren (AFM) konnten wir die erfolgreiche Komplexbildung und Integrität der hergestellten Polyplexe und Lipopolyplexe nachweisen. Die positiv geladenen Polymere bPEI, IPEI, PEI F25 und pDMAEMA wurden mit dem das Enzym Luciferase exprimierenden Plasmid pCMV-luc komplexiert und die Polyplexe gebildet. Bei der Bildung der Komplexe wurde das N/P-Verhältnis variiert und der Einfluss auf die physikalischen Parameter verfolgt. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen überwiegt bei allen Polyplexen die negative Ladung des Plasmids. Oft ist es sehr schwierig die Teilchengröße zu vermessen oder mit der AFM-Technik die entstandenen Polyplexe zu visualisieren. Es herrscht eine breite Teilchengrößenverteilung vor, die Formierung homogener Polyplexe ist nicht abgeschlossen, eine phasenseparierte Verteilung von Polymer und Plasmid kann oft beobachtet werden. Mit N/P-Verhältnissen von größer 10 stabilisieren sich die Polyplexe und deren Aggregationstendenz lässt nach (erhöhter PDI). Die Polymere besitzen unterschiedliche optimale Zusammensetzungen hinsichtlich des N/P-Verhältnisses, um eine möglichst kleine Teilchengröße mit moderatem Zeta-Potential aufzuweisen. Optimalerweise kann man mit allen Polyplexen Teilchengrößen von 200nm und kleiner erzeugen. Das Beschichten der Polyplexe mit Lipiden und die Formierung der Lipopolyplexe führt schneller (bei niedrigeren N/P-Verhältnissen) zu stabilen und sphärisch geformten Komplexen. Die Lipidschicht bewirkt eine Abschirmung der Ladung und verhindert die Aggregation. Bei vergleichbaren N/P-Verhältnissen und verwendeten Polymeren, sind die Lipopolyplexe immer etwas größer

als die korrespondierenden Polyplexe, bei niedriger Nettoladung. Die Stabilität ist ebenfalls größer.

Die Fragestellung nach dem Einfluss der Zusammensetzung (N/P-Verhältnis, Lipidbeschichtung) auf die Toxizität ist recht komplex und schwer zu beantworten. Je nach Applikationsort kann man unterschiedliche Kriterien für die Toxizität definieren, mit der Notwendigkeit der Anpassung vor Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden toxikologische Untersuchungen an den Transfektionssystemen mit dem MTT- und LDH-Assay an SKOV-3 Zellen, der Untersuchung der intrinsischen Gerinnung mit Hilfe der Bestimmung der aktivierten partiellen Prothrombinzeit (aPTT) und der Bestimmung der Hämolyse durchgeführt. Alle positiv geladenen Polymere zeigen einen prinzipiellen Einfluss auf Körperfunktionen, die mehr oder weniger toxische Ereignisse auslösen. Das generelle Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass eine Lipidbeschichtung auf Polyplexen einen positiven Effekt auf deren toxische Eigenschaften hat. Die Lipidhülle wirkt abschirmend, was besonders deutlich bei der aPTT-Zeit und der Hämolyse zu sehen ist. Positive Ladungen wirken sich negativ auf die Parameter aus und Lipide können durch ihre biokompatiblen Eigenschaften diese kompensieren. Lipopolyplexe zeigten in den vorliegenden Untersuchungen immer eine geringere Toxizität. Dabei waren die Eigenschaften der IPEI, PEI F25 und bPEI-Polymere weitestgehend vergleichbar sowohl als Polyplexe als auch als Lipopolyplexe. Die latente Toxizität vom pDMAEMA konnte nicht immer ausreichend kompensiert werden. Alle Polymere zeigten ein N/P-Verhältnis abhängiges Verhalten bei allen Toxizitätsparametern.

Abschließend wurde an ausgewählten Formulierungen die Transfektionseffizienz mit pCMV-luc an SKOV-3 Zellen getestet. Auch hier konnte eine erhöhte Effizienz der Lipopolyplexe zu den korrespondierenden Polyplexen beobachtet werden. Dies kann als Folge der verringerten Toxizität, aber auch der verbesserten Biokompatibilität angesehen werden.

Summary

The aim of this work was to develop and characterize different non-viral transfection systems based on positively charged polymers such as bPEI, IPEI, PEI F25 and pDMAEMA. The focus of the investigations was to uncover and demonstrate a connection between the composition of the gene vehicles, their physicochemical properties and undesirable side effects. Of particular interest was to clarify the influence of the lipid shell in the formation of lipopolyplexes from polyplexes on their physical properties such as zeta potential, particle size or shape, but also the change in toxicity and transfection efficiency.

Through physicochemical characterization (PCS, zeta potential) and imaging techniques (AFM) we were able to demonstrate the successful complex formation and integrity of the polyplexes and lipopolyplexes produced. The positively charged polymers bPEI, IPEI, PEI F25 and pDMAEMA were complexed with the luciferase expressing plasmid pCMV-luc and the polyplexes were formed. When the complexes are formed, the N/P ratio is varied and the influence on the physical parameters is monitored. At low N/P ratios, the negative charge of the plasmid predominates in all polyplexes. It is often very difficult to measure the particle size or to visualize the resulting polyplexes using AFM technology. There is a broad particle size distribution, the formation of homogeneous polyplexes is not complete, and a phase-separated distribution of polymer and plasmid can often be observed. With N/P ratios greater than 10, the polyplexes stabilize and their tendency to aggregate decreases (increased PDI). The polymers have different optimal compositions with regard to the N/P ratio in order to have the smallest possible particle size with a moderate zeta potential. Optimally, with different N/P ratios, particle sizes of 200 nm and smaller can be produced with all polyplexes. Coating the polyplexes with lipids and forming the lipopolyplexes leads more quickly (at lower N/P ratios) to stable and spherically shaped complexes. The lipid layer shields the charge and prevents aggregation. With comparable N/P ratios and the polymers used, the lipopolyplexes are always slightly larger than the corresponding polyplexes with a lower net charge. The stability is also greater.

The question of the influence of the composition (N/P ratio, lipid coating) on toxicity is quite complex and difficult to answer. Depending on the application site, different criteria for toxicity can be defined or this is important for the application. In the present study, toxicological studies were carried out on the transfection systems using the MTT and LDH assay on SKOV-3 cells, the investigation of intrinsic coagulation using the determination of the activated partial prothrombin time (aPTT) and the determination of hemolysis. All positively charged polymers show a fundamental influence on body functions that trigger more or less toxic events. The general result of this work shows that a lipid coating on polyplexes has a positive effect on their toxic properties. The lipid shell has a shielding effect, which is particularly evident in the aPTT time and hemolysis. Positive charges have a negative effect on the parameters and lipids can compensate for this through their biocompatible properties. Lipopolyplexes always showed improved toxicity in the present studies. The properties of the IPEI, PEI F25 and bPEI polymers were largely comparable both as polyplexes and as lipopolyplexes. The latent toxicity of pDMAEMA could not always be adequately compensated. All polymers showed an N/P-ratio-dependent behavior for all toxicity parameters.

Finally, the transfection efficiency of pCMV-luc in SKOV-3 cells was tested with selected formulations. Here too, an increased efficiency of the lipopolyplexes compared to the corresponding polyplexes was observed. This can be seen as a result of the reduced toxicity, but also the improved biocompatibility.

7. Literaturverzeichnis

1. Aiuti A. Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID. Curr Opin Mol Ther . 2002 Oct;4(5):515-22. -8

2. Antonietti M, Förster S. Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. Advanced Materials. 2003; 15: 1323-1333. -15

3. Agarwal S, Zhang Y, Maji S, Greiner, A PDMAEMA based gene delivery materials, Materials today, 2012, 15, 388-393, https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70165-7 -152

4. Akagi D, Oba M, Koyama H, Nishiyama N, Fukushima S, Miyata T, Nagawa H, Kataoka K, Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. Gene Ther. 2007 Jul;14(13):1029-38. doi: 10.1038/sj.gt.3302945. Epub 2007 Apr 26. -44

5. Alnylam Pharmaceuticals: A Multicenter, Open-Label, Extension Study to Evaluate the Long-term Safety and Efficacy of Patisiran in Patients With Familial Amyloidotic Polyneuropathy Who Have Completed a Prior Patisiran Clinical Study, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02510261, abgerufen am 18. August 2021. -4

6. Ali S, Amin MU, Ali MY, Tariq I, Pinnapireddy SR, Duse L, Goergen N, Wölk C, Hause G, Jedelská J, Schäfer J, Bakowsky U., Wavelength dependent photo-cytotoxicity to ovarian carcinoma cells using temoporfin loaded tetraether liposomes as efficient drug delivery system. Eur J Pharm Biopharm. 2020 May; 150:50-65. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.03.008. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151728 -145

7. Anonymous. Gene therapy clinical trials. John Wiley & Sons, 2002 (www. wiley.co.uk/genmed) -157

8. Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 15;88(22):10148-52. doi: 10.1073/pnas.88.22.10148. -29

9. Aqil F., Munagala R., Jeyabalan J., Vadhanam M.V., Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems, Cancer Lett. 2013 Jun 28;334(1):133-41. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.032. Epub 2013 Feb 19. -133

10. Arnaldur Hall, Ulrich Lächelt, Jiri Bartek, Ernst Wagner, Seyed Moein Moghimi, Polyplex Evolution: Understanding Biology, Optimizing Performance, 2017, Molecular Therapy, Volume 25, Issue 7, 1476-1490, https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.024. -113

11. Bansal S.S., Goel M., Aqil F., Vadhanam M.V., Gupta R.C., Advanced Drug Delivery Systems of Curcumin for Cancer Chemoprevention, Cancer Prev Res (Phila). 2011 Aug;4(8):1158-71. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0006. Epub 2011 May -134

12. Barrán-Berdón AL, Yélamos B, Malfois M, Aicart E, Junquera E. Ca(2+)-mediated anionic lipid-plasmid DNA lipoplexes. Electrochemical, structural, and biochemical

studies. Langmuir. 2014 Oct 7;30(39):11704-13. doi: 10.1021/la502823z. Epub 2014 Sep 25. -42

13. Berne BJ, Pecora R. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. Courier Corporation. https://doi.org/10.1002/pi.4980090216 -89

14. Binnig G, Quate CF, Gerber, C. Atomic force microscope. Physical Review Letters. 1986; 56: 930. -93

15. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., and Behr J.P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Aug 1;92(16):7297-01.doi:10.1073/pnas.92.16.7297. -110

16. G. Bozzuto, A. Molinari, Liposomes as nanomedical devices, Int J Nanomedicine. 2015 Feb 2:10:975-99. doi: 10.2147/IJN.S68861. eCollection 2015. -58

17. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv Drug Deliv Rev 2002 Sep 13;54(5):631-51. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00044-3. -40

18.Casper J, Schenk SH, Parhizkar E, Detampel P, Dehshahri A, Huwyler J. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications. J Control Release. 2023 Oct; 362:667-691. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.09.001. Epub 2023 Sep 18. -142

19. Chalfie M. Green fluorescent protein. Photochemistry and Photobiology. 1995; 62: 651-656. -81

20. Chesnoy S., Huang L., Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000, 29:27-47. -11

21. Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE. Freeze-drying of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-based gene delivery systems. Pharm Res. 1997 Dec;14(12):1838-41. doi: 10.1023/a:1012164804441. -106

22. Cherng JY, Talsma H, Verrijk R, Crommelin DJ, Hennink WE. The effect of formulation parameters on the size of poly-((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. Eur J Pharm Biopharm. 1999 May;47(3):215-24. doi: 10.1016/s0939-6411(98)00103-9. -139

23. Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE., Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. Pharm Res. 1996 Jul;13(7):1038-42. doi: 10.1023/a:1016054623543. -140

24. Cherng JY, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, Jiskoot W, Talsma H, Zuidam NJ, Hennink WE, Crommelin DJ. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. J Control Release. 1999 Aug 5;60(2-3):343-53. doi: 10.1016/s0168-3659(99)00089-9. -141

25. Dash PR, Read ML, Barrett LB, Wolfert MA, Seymour LW. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. Gene Ther. 1999 Apr;6(4):643-50. doi: 10.1038/sj.gt.3300843. -51

26. Davis M.E. Non-viral gene delivery systems. Curr Opin Biotechnol. 2002 Apr;13(2):128-31. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00294-x. -107

27. Dey R.K., Ray A.R., Synthesis, characterization, and blood compatibility of polyamidoamines copolymers, Biomaterials. 2003 Aug;24(18):2985-93. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00122-4. -56

28. Dingle J.T., Jacques P.J., Shaw I.H., Lysosomes in applied biology and therapeutics, in: C. Toothill (Ed.) Lysosomes in biology and pathology, Headington Hill Hall, 1981, pp. 74-74. -131

29. Dritzler S, Master Thesis, THM Friedberg Giessen, Interaktionen von nanoskaligen Arzneistoffträgern mit Modellmembranen unter der besonderen Berücksichtigung toxikologischer Aspekte. 2017 -105

30. Duse L, Agel MR, Pinnapireddy SR, Schäfer J, Selo MA, Ehrhardt C, Bakowsky U., Photodynamic Therapy of Ovarian Carcinoma Cells with Curcumin-Loaded Biodegradable Polymeric Nanoparticles. Pharmaceutics. 2019 Jun 15;11(6):282. doi: 10.3390/pharmaceutics11060282. -146

31. Duse L, Pinnapireddy SR, Strehlow B, Jedelská J, Bakowsky U. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. Eur J Pharm Biopharm. 2018 May; 126:233-241. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.10.005. Epub 2017 Oct 7. -148

32. Edelstein M. Indications addressed by gene therapy clinical trials, available at http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/ (accessed on October 14, 2017) -1

33. Edward JT. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. J. Chem. Educ. 1970; 47: 261. -90

34. Eliyahu H, Servel N, Domb AJ, Barenholz Y., Lipoplex-induced hemagglutination: potential involvement in intravenous gene delivery. Gene Ther. 2002 Jul;9(13):850-8. doi: 10.1038/sj.gt.3301705. -45

35. Engelhardt, Konrad; Dissertation, Universität Marburg 2017, Herstellung und Charakterisierung tetraetherlipidhaltiger Lipoplexe und Lipopolyplexe als neuartige Vehikel für die orale Gentherapie -28

36. Engelhardt K, Preis E, Bakowsky U. Visualization and Characterization of Liposomes by Atomic Force Microscopy. Methods Mol Biol. 2023; 2622:253-263. doi: 10.1007/978-1-0716-2954-3_23. -104

37. Erbacher P, Bettinger T, Belguise-Valladier P, Zou S, Coll JL, Behr JP, Remy JS.Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). J Gene Med. 1999 May-Jun;1(3):210-22. doi: 10.1002/(SICI)1521-2254(199905/06)1:3<210::AID-JGM30>3.0.CO;2-U. -50

38. Erbacher ET AL. Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. J Drug Target. 2004 May;12(4):223-36. doi: 10.1080/10611860410001723487. -79

39. Evans BC, Nelson CE, Yu SS, Beavers KR, Kim AJ, Li H, Nelson HM, Giorgio TD, Duvall CL. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. J Vis Exp. 2013 Mar 9;(73):e50166. doi: 10.3791/50166. -96

40. Ewe A, Panchal O, Pinnapireddy SR, Bakowsky U, Przybylski S, Temme A, Aigner A.Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo. Nanomedicine. 2017 Jan;13(1):209-218. doi: 10.1016/j.nano.2016.08.005. Epub 2016 Aug 20. -101

41. Ewe A, Schaper A, Barnert S, Schubert R, Temme A, Bakowsky U, Aigner A. Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. Acta Biomater. 2014 Jun;10(6):2663-73. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.037. Epub 2014 Mar 1. -102

42. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, Proc Natl Acad Sci U S A, 84 (1987) 7413-7417. -130

43. Fischer D; Bieber T; Li Y; Elsässer HP; Kissel T; A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. PMID:10468031 -19

44. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans, Nature 1998. 391, 806-811. -3

45. Gao, X., Yao, L., Song, Q., Zhu, L., Xia, Z., Xia, H., Jiang, X., Chen, J., and Chen, H., The association of autophagy with polyethylenimine-induced cytotoxicity in nephritic and hepatic cell lines. Biomaterials 2011, 32, 8613–8625. -122

46. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: mollecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. J. Biomed Mater Res 1999; 45:268-75. -73

47. Grandinetti, G., Ingle, N.P., and Reineke, T.M., Interaction of poly(ethylenimine)-DNA polyplexes with mitochondria: implications for a mechanism of cytotoxicity. Mol. Pharm. 2011, 8, 1709–1719. -120

48. Grandinetti, G., Smith, A.E., and Reineke, T.M., Membrane and nuclear permeabilization by polymeric pDNA vehicles: efficient method for gene delivery ormechanism of cytotoxicity? Mol. Pharm. 2012, 9, 523–538. -121

49. Grosse S, Aron Y, Thévenot G, Monsigny M, Fajac I., Cytoskeletal involvement in the cellular trafficking of plasmid/PEI derivative complexes. J Control Release. 2007 Sep 11;122(1):111-7. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.06.015. Epub 2007 Jun 23. -125

50. Grosse S, Aron Y, Thévenot G, François D, Monsigny M, Fajac I., Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. J Gene Med. 2005 Oct;7(10):1275-86. doi: 10.1002/jgm.772. -126

51. Grzelinski M, Urban-Klein B, Martens T, Lamszus K, Bakowsky U, Höbel S, Czubayko F, Aigner A. RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through

polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. Hum Gene Ther. 2006 Jul;17(7):751-66. doi: 10.1089/hum.2006.17.751. -100

52. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. Eur J Pharm Biopharm. 2013 Nov;85(3 Pt A):427-43. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.07.002. Epub 2013 Jul 17. -68

53. Hafez I.M., Cullis P.R., Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery, Adv Drug Deliv Rev. 2001 Apr 25;47(2-3):139-48. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00103-x. -132

54. Hall, A., Larsen, A.K., Parhamifar, L., Meyle, K.D., Wu, L.P., and Moghimi, S.M., High resolution respirometry analysis of polyethylenimine-mediated mitochondrial energy crisis and cellular stress: Mitochondrial proton leak and inhibition of the electron transport system. Biochim. Biophys. Acta 2013, 1827, 1213–1225. -115

55. Hall, A., Parhamifar, L., Lange, M.K., Meyle, K.D., Sanderhoff, M., Andersen, H., Roursgaard, M., Larsen, A.K., Jensen, P.B., Christensen, C., Polyethylenimine architecture-dependent metabolic imprints and perturbation of cellular redox homeostasis. Biochim Biophys Acta. 2015 Mar;1847(3):328-342. doi: 10.1016/j.bbabio.2014.12.002. Epub 2014 Dec 5. -116

56. Hall, A., Wu, L.P., Parhamifar, L., and Moghimi, S.M., Differential Modulation of Cellular Bioenergetics by Poly(L-lysine)s of Different Molecular Weights. Biomacromolecules 2015, 16, 2119–2126. -114

57. Hoekstra K., van Renswoude J., Tomasini R., Scherphof G., Interaction of phospholipid vesicles with rat hepatocytes: further characterization of vesicle-cell surface interaction; use of serum as a physiological modulator, Membr Biochem, 4 (1981) 129-147. -127

58. Honoré I, Grosse S, Frison N, Favatier F, Monsigny M, Fajac I, Transcription of plasmid DNA: Influence of plasmid DNA/polyethylenimine complex formation. J Control Release. 2005 Oct 20;107(3):537-46. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.06.018. -71

59. Hosseinkhani H, Azzam T, Tabata Y, Domb AJ. Dextranespermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection. Gene Ther. 2004 Jan;11(2):194-203. doi: 10.1038/sj.gt.3302159. -48

60. Höbel S, Prinz R, Malek A, Urban-Klein B, Sitterberg J, Bakowsky U, Czubayko F, Aigner A. Polyethylenimine PEI F25-LMW allows the long-term storage of frozen complexes as fully active reagents in siRNA-mediated gene targeting and DNA delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2008 Sep;70(1):29-41. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.03.014. Epub 2008 Mar 30. -99

61. 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. -159

62. Sascha Hubing, Gentherapeutische Vektoren für die Tumortherapie, Dissertation, 2022, Universität Marburg -160

63. Hunter RJ. Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2). Academic press. 2013. https://doi.org/10.1016/C2013-0-07389-6 -91

64. Hunter, A.C., Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Dec 1;58(14):1523-31. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.008. Epub 2006 Sep 28. -117

65. Husteden C, Doberenz F, Goergen N, Pinnapireddy SR, Janich C, Langner A, Syrowatka F, Repanas A, Erdmann F, Jedelská J, Bakowsky U, Groth T, Wölk C. Contact-Triggered Lipofection from Multilayer Films Designed as Surfaces for in Situ Transfection Strategies in Tissue Engineering. ACS Appl Mater Interfaces. 2020 Feb 26;12(8):8963-8977. doi: 10.1021/acsami.9b18968. Epub 2020 Feb 12. -17

66. Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1977; 470: 185-201. -16

67. Itaka K., Kataoka K. Recent development of nonviral gene delivery systems with virus like structures and mechanisms. Eur J Pharm Biopharm 2009; 71:475-83.7 -10

68. Ito T, Yoshihara C, Hamada K, Koyama Y. DNA/polyethylenimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor supression in mice. Biomaterials. 2010 Apr;31(10):2912-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.032. Epub 2010 Jan 4. -78

69. Iwabe N, Kuma KI, Hasegawa M, Osawa S, Miyata T. Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. PNAS. 1989; 86: 9355-9359. -84

70. Jiang HL, Kim TH, Kim YK, Park IY, Cho MH, Cho CS. Efficient gene delivery using chitosan-polyethylenimine hybrid systems. Biomed Mater. 2008 Jun;3(2):025013. doi: 10.1088/1748-6041/3/2/025013. Epub 2008 May 14. -77

71. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. Nat Rev Genet 2011; 12:316-28. -9

72. Khalvati B, Sheikhsaran F, Sharifzadeh S, Kalantari T, Behzad Behbahani A, Jamshidzadeh A, Dehshahri A.Delivery of plasmid encoding interleukin-12 gene into hepatocytes by conjugated polyethylenimine-based nanoparticles. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017 Aug;45(5):1036-1044. doi: 10.1080/21691401.2016.1202256. Epub 2016 Jun 30. -144

73. Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr CM A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. Bioconjug Chem. 2000 Nov-Dec;11(6):926-32. doi: 10.1021/bc0000637. -24

74. Kneuer C, Ehrhardt C, Bakowsky H, Kumar MN, Oberle V, Lehr CM, Hoekstra D, Bakowsky U. The influence of physicochemical parameters on the efficacy of non-viral DNA transfection complexes: a comparative study. J Nanosci Nanotechnol. 2006 Sep-Oct;6(9-10):2776-82. doi: 10.1166/jnn.2006.409. -143

75. Knoll A, Magerle R, Krausch G. Tapping mode atomic force microscopy on polymers: where is the true sample surface?, Macromolecules. 2001; 34: 4159-4165. -94

76. P Knopf et. al, Acidosis-mediated increase in IFN-γ-induced PD-L1 expression on cancer cells as an immune escape mechanism in solid tumors. 2023; DOI: 10.1186/s12943-023-01900-0 -156

77. Kodama K. Katayama Y. Shoji Y, Nakashima H, The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers. Curr Med Chem 2004, 4:876-81. -22

78. Kozlov LV, Zhdanov RI, Guzova VA, Podobed V, Sviridov YV, Bogdanenko EV, Shvets VI, Dyabina S, Ermakov AS, Action of nonviral gene delivery vectors on human complement system: low anticomplementary activity of lipoplexes based on lacZ plasmid and phospholipid/oligocation liposomes. Cytobios. 2001:106 Suppl 1:67-74. PMID:11534830 -35

79. Kumar VV. Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15;88(2):444-8. doi: 10.1073/pnas.88.2.444. -61

80. Ralf Kuehn, pCMV-luc, available at https://www.addgene.org/45968/ (accessed on 13 October 2017) -83

81. Lächelt U., and Wagner E., Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). Chem Rev. 2015 Oct 14;115(19):11043-78. doi: 10.1021/cr5006793. Epub 2015 Apr 15. -108

82. Lai E, van Zanten JH. Monitoring DNA/poly-L-lysine polyplex formation with time-resolved multiangle laser light scattering Biophys J. 2001 Feb;80(2):864-73. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76065-1. -62

83. Lee G., Barron Kathleen B., Meyer Francis C., Szoka Jr., Effects of Complement Depletion on the Pharmacokinetics and Gene Delivery Mediated by Cationic Lipid–DNA Complexes; 1998, Human gene therapy, doi:10.1089/hum.1998.9.3-315. -34

84. Lee H, Jeong J H, Park T G, A new gene delivery formulation of polyethylenimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide, J Control Release. 2001 Sep 11;76(1-2):183-92. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00426-6. -153

85. Liu C, Marshall P, Schreibman I, Vu A, Gai W, Whitlow M, Interaction between terminal complement proteins C5b-7 and anionic phospholipids. Blood. 1999 Apr 1;93(7):2297-301.PMID:10090939 -37

86. Lin, C.W., Jan, M.S., Kuo, J.H., Hsu, L.J., and Lin, Y.S., Protective role of autophagy in branched polyethylenimine (25K)- and poly(L-lysine) (30-70K)-induced cell death. Eur. J. Pharm. Sci. 2012, 47, 865–874. -123

87. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. Polyethylenimine-based nonviral gene delivery systems. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Jul;60(2):247-66. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011. -75

88. Luo XH, Huang FW, Qin SY, Wang HF, Feng J, Zhang XZ, Zhuo RX, A strategy to improve serum-tolerant transfection activity of polycation vectors by surface hydroxylation. Biomaterials. 2011 Dec;32(36):9925-39. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.011. Epub 2011 Sep 17. -46

89. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Human gene therapy. 1993; 4: 419-431. -68

90. Maret G, Wolf PE. Multiple light scattering from disordered media. The effect of Brownian motion of scatterers. Zeitschrift für Physik B Condensed Matter. 1987; 65: 409-413. -88

91. Marques SM, Esteves da Silva JC. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. IUBMB Life. 2009 Jan;61(1):6-17. doi: 10.1002/iub.134. -82

92. Maruyama K, Iwasaki F, Takizawa T, Yanagie H, Niidome T,Yamada E, et al. Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/ sugar-containing polyanion ternary complex. Biomaterials 2004 Jul;25(16):3267-73. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.004. -39

93. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1986; 858: 161-168. -86

94. McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, et al. Organspecific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. Am J Physiol 1997; 273:H387e404. -41

95. Merdan T, Kopecek J, Kissel T., Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. Adv Drug Deliv Rev. 2002 Sep 13;54(5):715-58. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00046-7. -21

96. Mintzer, M.A., and Simanek, E.E., Nonviral vectors for gene delivery. Chem Rev. 2009 Feb;109(2):259-302. doi: 10.1021/cr800409e. -109

97. Moghimi SM, Hamad I, Andresen TL, Jørgensen K, Szebeni J. Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy (polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. FASEB J. 2006 Dec;20(14):2591-3. doi: 10.1096/fj.06-6186fje. Epub 2006 Oct 25. -36

98. Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., and Szewczyk, A., A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. Mol Ther. 2005 Jun;11(6):990-5. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.02.010. -118

99. Moret I, Peris JE, Guillem VM, et al. Stability of PEI/DNA and DOTAP/DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin, and serum. J Control Release. 2001 Sep 11;76(1-2):169-81.doi: 10.1016/s0168-3659(01)00415-1. -76

100. Neu M, Fischer D, Kissel T, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethyleneimine) and its derivates. J Gene Med 2005; 7(8):992-1009 -65

101. Neu, M., Fischer, D., and Kissel, T., Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. J Gene Med. 2005 Aug;7(8):992-1009. doi:10.1002/jgm.773. -111

102. S.B. Neumann, C.-M. Becker, Möglichkeiten und Grenzen der somatischen Gentherapie und der Stammzelltransplantation, Thieme Verlag 2003 -158

103 Oberle V., Bakowsky U., Zuhorn I.S., Hoekstra D., Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism, Biophys J. 2000 Sep;79(3):1447-54. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76396-X. -135 +-12!!!

104. Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components,extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. Gene Ther 1999;6:595e605. -20

105. Olivia M. Merkel; Rudolf Urbanics; Peter Bedocs; Zoltan Rozsnyay; Laszlo Rosivall; Miklos Toth; Thomas Kissel; Janos Szebeni; In vitro and in vivo complement activation and related anaphylactic effects associated with polyethylenimine and polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.035 -18

106. O'Connell M. R., Oakes B. L., Sternberg S. H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J. A., Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature 2014. Band 516, Nummer 7530, S. 263–266, ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature13769. PMID 25274302. -33

107. Parr MJ, Ansell SM, Choi LS, Cullis PR. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. Biochim Biophys Acta. 1994 Oct 12;1195(1):21-30. doi: 10.1016/0005-2736(94)90004-3. -43

108. Parhamifar, L., Andersen, H., Wu, L., Hall, A., Hudzech, D., and Moghimi, S.M., Polycation-mediated integrated cell death processes. Adv Genet., 2014, 88:353-98. doi: 10.1016/B978-0-12-800148-6.00012-2. -119

109. Petersen H., Fechner P.M., Martin A.L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C.J., Fischer D., Davies M.C., Kissel T., Polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biologicalactivities as gene delivery system, Bioconjug. Chem. 2002, 13 (4) 845– 854. -124

110. Plank C, Mechtler K, Szoka Jr FC, Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. Hum Gene Ther 1996; 12:1437e46. -5

111. Nikola Plenagl, Dissertation, Liposomale Formulierungen von Hypericin zur Anwendung in der photodynamischen Therapie, Philipps-Universität Marburg, 2019. -59

112. Piest M, Engbersen JFJ. Effects of charge density and hydrophobicity of poly(amido amine)s for non-viral gene delivery. J Control Release. 2010 Nov 20;148(1):83-90. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.109. Epub 2010 Jul 24. -47

113. Pinnapireddy SR, Raafat El Assy M, Schlote P, Bakowsky U. Glycosylated Artificial Virus-Like Hybrid Vectors for Advanced Gene Delivery. Polymers (Basel). 2019 Feb 1;11(2):243. doi: 10.3390/polym11020243. -64

114. Pinnapireddy SR, Duse L, Strehlow B, Schäfer J, Bakowsky U. Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017; 158: 93-101. -26

115. Shashank Reddy Pinnapireddy, Dissertation, Composite nanocarriers for nucleic acid delivery; Philips Universität Marburg, 2017 -85

116. Raschpichler M, Agel MR, Pinnapireddy SR, Duse L, Baghdan E, Schäfer J, Bakowsky U. In situ intravenous photodynamic therapy for the systemic eradication of blood stream infections. Photochem Photobiol Sci. 2019 Feb 13;18(2):304-308. doi: 10.1039/c8pp00267c. -147

117. Ravi Kumar MN, Sameti M, Mohapatra SS, Kong X, Lockey RF, Bakowsky U, Lindenblatt G, Schmidt H, Lehr CM. J Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. Nanosci Nanotechnol. 2004 Sep;4(7):876-81. doi: 10.1166/jnn.2004.120. PMID: 15570975 -23

118. Ravi Kumar MN, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. Biomaterials. 2004 May;25(10):1771-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.069. -25

119. Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M., The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. In: Biochimie. Band 117, 2015, S. 119–128, doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025, PMID 25868999 -32

120. Rhaese S, von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Kreuter J, Langer K. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. J Control Release 2003; 2003 Sep 19;92(1-2):199-208.doi: 10.1016/s0168-3659(03)00302-x. -38

121. Rosenecker J, Naundorf S, Gersting SW, Hauck RW, Gessner A, Nicklaus P, Müller RH, Rudolph C. Interaction of bronchoalveolar lavage fluid with polyplexes and lipoplexes: analysing the role of proteins and glycoproteins. J Gene Med. 2003 Jan;5(1):49-60. doi: 10.1002/jgm.291. -53

122. Roth SY, Allis CD. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? Trends Biochem Sci. 1992 Mar;17(3):93-8. doi: 10.1016/0968-0004(92)90243-3. -30

123. Safinya CR. Structures of lipid–DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. Curr Opin Struct Biol. 2001 Aug;11(4):440-8. doi: 10.1016/s0959-440x(00)00230-x. -60

124. Samsonova O., Pfeiffer C., Hellmund M., Merkel O.M., Kissel T., Low Molecular Weight pDMAEMA-block-pHEMA Block-Copolymers Synthesized via RAFT-Polymerization: Potential Non-Viral Gene Delivery Agents?, Polymers, 3 2011 693-718. -97

125. Schäfer J, Höbel S, Bakowsky U, Aigner A. Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. Biomaterials. 2010 Sep;31(26):6892-900. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.043. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20561681 -27

126. Scherphof G, Morselt H, Regts J, Wilschut JC. The involvement of the lipid phase transition in the plasma-induced dissolution of multilamellar phosphatidylcholine

vesicles. Biochim Biophys Acta. 1979 Sep 21;556(2):196-207. doi: 10.1016/0005-2736(79)90042-7. -128

127. Sitterberg J, Gaspar MM, Ehrhardt C, Bakowsky U. Atomic force microscopy for the characterization of proteoliposomes. Methods Mol Biol. 2010; 606:351-61. doi: 10.1007/978-1-60761-447-0_23. -103

128. J. Smisterova, A. Wagenaar, M.C. Stuart, E. Polushkin, G. ten Brinke, R. Hulst, J.B. Engberts, D. Hoekstra, Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery, J Biol Chem, 276 (2001) 47615-47622 -138

129. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P., CRISPR–a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. In: Nature reviews. Microbiology. Band 6, Nummer 3, 2008, S. 181–186, ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro1793. PMID 18157154 -31

130. Sushkevich G.N., Dubovik B.V., Baluda V.P., Étlis V.S., Shomina F.N., Synthetic polycations as activators of the endogenous mechanism of platelet aggregation, Bull. Exp. Biol. Med. 83 (1977) 627–630. -55

131. Sze A, Erickson D, Ren L, Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. J Colloid Interface Sci. 2003 May 15;261(2):402-10. doi: 10.1016/S0021-9797(03)00142-5. -92

132. Szoka Jr F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annual review of biophysics and bioengineering. 1980; 9: 467-508. -87

133. Tabatt K, Kreuer C, Sameti M, Olbrich C, Muller RH, Lehr CM, et al., Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. J Control Release 2004:97(2):321-32. -13

134. Tang GP, Zeng JM, Gao SJ, Ma YX, Shi L, Li Y, et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. Biomaterials. 2003 Jun;24(13):2351-62. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00029-2. -49

135. Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology oft he resulting complexes. Gene Ther 1997; 4:823-32. -74

136. Tariq I, Ali MY, Sohail MF, Amin MU, Ali S, Bukhari NI, Raza A, Pinnapireddy SR, Schäfer J, Bakowsky U. Lipodendriplexes mediated enhanced gene delivery: a cellular to pre-clinical investigation. Sci Rep. 2020 Dec 8;10(1):21446. doi: 10.1038/s41598-020-78123-6. -57

137. Tian Y, Zhao Y, Yin C, Tan S, Wang X, Yang C, Zhang TD, Zhang X, Ye F, Xu J, Wu X, Ding L, Zhang J, Pei J, Wang XT, Zhang RX, Xu J, Wang W, Filipe CDM, Hoare T, Yin DC, Qian A, Deng X. Polyvinylamine with moderate binding affinity as a highly effective vehicle for RNA delivery. J Control Release. 2022 May;345:20-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.03.003. Epub 2022 Mar 3. -112

138. Todesursachenstatistik Statistisches Bundesamt 21.09.2024; https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg235878 -155

139. Tseng WC, Jong CM. Improved stability of polycationic vector by dextrangrafted branched polyethylenimine. Biomacromolecules. 2003 Sep-Oct;4(5):1277-84.doi: 10.1021/bm034083y. -52

140. van de Wetering P, Cherng JY, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE. 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. J Control Release. 1998 Apr 30;53(1-3):145-53. doi: 10.1016/s0168-3659(97)00248-4 -66

141. Velasco D, Rethore G, Newland B, Parra J, Elvira C, Pandit A, Rojo L, San Roman J, Low polydispersity (N-ethyl pyrrolidine methacrylamide-co-1-vinylimidazole) linear oligomers for gene therapy applications. Eur J Pharm Biopharm. 2012 Nov;82(3):465-74. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.08.002. Epub 2012 Aug 23. -54

142. Verbaan FJ, Klein Klouwenberg P, van Steenis JH, Snel CJ, Boerman O, Hennink WE, Storm G. Application of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes for gene transfer into human ovarian carcinoma cells. Int J Pharm. 2005 Nov 4;304(1-2):185-92. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.07.018. Epub 2005 Aug 29. -149

143. Verbaan FJ, Oussoren C, van Dam IM, Takakura Y, Hashida M, Crommelin DJ, Hennink WE, Storm G., The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. Int J Pharm. 2001 Feb 19;214(1-2):99-101. doi: 10.1016/s0378-5173(00)00642-6. -150

144. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. Basic protein and peptide protocols. Methods Mol Biol. 1994:32:5-8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5. -95

145. Wasungu L., Hoekstra D., Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes, J Control Release. 2006 Nov 28;116(2):255-64. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.06.024. Epub 2006 Jun 28. -136

146. Werth S, Urban-Klein B, Dai L, Höbel S, Grzelinski M, Bakowsky U, Czubayko F, Aigner A. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. J Control Release. 2006 May 15;112(2):257-70. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.02.009. Epub 2006 Mar 6. -98

147. Wilschut J., Hoekstra D., Membrane fusion: lipid vesicles as a model system, Chem Phys Lipids, 1986, 40: 145-166. -129

148. Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. J Gene Med. 2001 Jul-Aug;3(4):362-72. doi: 10.1002/jgm.187. -67

149. Wilson JM. Gendicine: The first commercial gene therapy product; Chinese translation of editorial. Human gene therapy. 2005; 16: 1014-1015. -7

150. Wirth T. A short perspective on gene therapy: Clinical experience on gene therapy of gliomablastoma multiforme. World J Exp Med 2011; 1(1): 10-16 [PMID: 24520527 DOI: 10.5493/wjem.v1.i1.10] -2

151. XU Y, Szoka Jr FC, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. Biochemistry 1996; 35(18):5616-13 -14

152. Yang JP, Huang L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. Gene Therapy. 1996; 3: 542-548. -80

153. Ylä-Herttuala S. ADA-SCID gene therapy endorsed by European medicines agency for marketing authorization. Mol Ther. 2016 Jun;24(6):1013-1014. doi: 10.1038/mt.2016.98. -6

154. Zhang Y, Zheng M, Kissel T, Agarwal S, Design and biophysical characterization of bioresponsive degradable poly (dimethylaminoethyl-methacrylate) based polymers for in vitro DNA transfection. Biomacromolecules. 2012 Feb 13;13(2): 313-22.doi: 10.1021/bm2015174. Epub 2012 Jan 17. -72

155. Zhang L, Li L, Hoffmann GA, Hoffman RM. Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases. Biochemical and biophysical research communications. 1996; 220: 633-636. -70

156. Zhong D, Jiao Y, Zhang Y, Zhang W, Li N, Zuo Q, Wang Q, Xue W, Liu Z, Effects of the gene carrier polyethylenimines on structure and function of blood components. Biomaterials. 2013 Jan;34(1):294-305. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.060. Epub 2012 Oct 13 -151

157. Zuhorn IS, Oberle V, Visser WH, Engberts JB, Bakowsky U, Polushkin E, Hoekstra D. Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency. Biophys J. 2002 Oct;83(4):2096-108. doi: 10.1016/S0006-3495(02)73970-2. -63

158. Zuhorn, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers, Eur Biophys J. 2007 Apr;36(4-5):349-62. doi: 10.1007/s00249-006-0092-4. Epub 2006 Sep 22. -137

159. Zulassungsübersicht inkl. Informationen Paul-Ehrlich-Institut 21.09.2024; https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/covid-19/covid-19-node.html -154

8. Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Prof. Dr. Bakowsky, Dr. Duse, Dr. Engelhardt, Prof. Dr. Mandic, MTA Mohr, Dr. Pinnapireddy, Dr. Preis, Dr. Schäfer

Meine akademischen Lehrenden in Halle waren:

PD Dr. Bazwinksy-Wutschke, Dr. Bomplitz, Dr. Braun, Prof. Dr. Buerke, Prof. Dr. Bucher, Dr. Burghoff, Dr. Busse, Dr. Burow, Prof. Dr. Claassen, Prof Dr. Csuk, Prof. Dr. Ebbinghaus, Prof. Dr. Dr. Fischer, Prof. Dr. Foth, Prof. Dr. Gekle, Prof. Dr. Girndt, Dr. Gläser, Prof. Dr. Grünauer-Kloevekorn, Dr. Hagemann, Prof. Dr. Katrin Hoffmann, Prof. Dr. Hatzfeld, PD Dr. Helm, Prof. Dr. Hollemann, Prof. Dr. Horstkorte, Prof. Dr. Jordan, Dr. Kellner, Prof. Dr. Keyßer, Prof. Dr. Kielstein (Nave), Dr. Klemenz, Dr. Kreft, Prof. Dr. Körholz, Prof. Dr. Lessig, Prof. Dr. Mau, Prof. Dr. Markwardt, Dr. Meisel, Dr. Meyer, Dr. T. Müller, PD Dr. Navarrete Santos, Dr. Prof. Dr. Neumann, Prof. Dr. Peschke, PD Dr. Pillmann, Prof. Dr. Posern, Dr. Reichert, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. med. Rujescu,. Schmidt-Pokrzywniak, Dr. Müller-Siecheneder, Dr. Schlote, Dr. Schnell, Prof. Dr. Schultka, Prof. Dr. Seliger, Prof. Dr. Steger, Dr. Stoevesandt, Prof. Dr. Strauß, Prof. Dr. Taube, Prof. Dr. Taute, Prof. Dr. Thews, Prof. Dr. Thomssen, Prof. Dr. Watzke, Dr. Weber, Prof. Dr. Werdan, Prof. Dr. Wohlrab

8.2 Danksagung

Über die Dauer meiner Arbeiten zur Promotion durfte ich mit einer Vielzahl von Personen zusammenarbeiten, die mich bei der Entstehung der vorliegenden Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich einen großen Dank an Herrn Prof. Dr. Bakowsky und Herrn Prof. Dr. Mandic richten, die mir die Gelegenheit gegeben haben als Doktorand an diesem spannenden Projekt mitzuwirken und daraus die vorliegende Dissertation anzufertigen. Zudem bedanke ich mich sehr herzlich für die ausgiebige wissenschaftliche Unterstützung, viel Engagement und der reichlich gewährten Geduld während meiner gesamten Promotionszeit, welche nach dem praktischen Teil doch viel länger gedauert hat als geplant.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. Konrad Engelhardt für die generelle Hilfsbereitschaft, das Erstellen von AFM-Aufnahmen sowie die Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Problemen mit den liposomalen Formulierungen. Frau Dr. Lili Duse, Herrn Dr. Shashank Reddy Pinnapireddy, Herrn Dr. Jens Schäfer und Herrn Dr. Eduard Preis danke ich sehr für die Erklärungen und Hilfestellungen bei allen Belangen zu den Gentransfektionskomplexen und deren Formulierungen.

Für die Einarbeitung und Unterstützung in der Zellkultur möchte ich mich bei Frau Eva Mohr bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich ebenfalls bei allen anderen Kollegen und Ehemaligen des Arbeitskreises Bakowsky und des Arbeitskreises Mandic für die gegenseitige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit. Ich danke euch von Herzen für eure allgegenwärtige Unterstützung.