

**Das endotheliale Targeting von  
E-Selektin-gerichteten Immunliposomen  
als Ansatzpunkt für neuartige  
antiinflammatorische Therapieprinzipien**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Claudia Ulbrich**

Bonn, August 2009

Den wichtigsten Menschen  
in meinem Leben

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Prof. Dr. Alf Lamprecht

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn elektronisch publiziert:

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online)

Erscheinungsjahr 2009



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	11
1 Einleitung .....	15
2 Theoretischer Teil .....	17
2.1 Die Entzündung .....	17
2.1.1 Die Adhäsionskaskade als zentraler Schritt der Entzündungsreaktion .....	17
2.1.2 Die Familie der Selektine .....	19
2.1.2.1 Liganden der Selektine .....	20
2.1.2.2 L-Selektin .....	21
2.1.2.3 E-Selektin .....	21
2.1.2.4 P-Selektin .....	22
2.1.3 Chemokine und ihre Bedeutung .....	23
2.1.3.1 Klassifizierung der Chemokine .....	23
2.1.3.2 Bindungspartner der Chemokine – Chemokinrezeptoren und Glykosaminoglycane (GAG) .....	26
2.1.3.3 Expression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren auf Th-Zellen .....	27
2.1.3.4 Dysregulationen im Rahmen pathologischer Entzündungsreaktionen ...	28
2.1.3.5 Antiinflammatorische Strategien .....	29
2.2 Liposomales Targeting .....	31
2.2.1 Probleme bei der Applikation von Liposomen .....	31
2.2.2 Modifizierungen der Liposomen .....	33
2.2.3 Target-Sensitivität – gezielte Wirkstofffreisetzung an der Zelloberfläche .....	35
2.2.4 pH-Sensitivität – gezielte intrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes .....	37
2.3 Methoden der Gentherapie .....	39
2.3.1 Physikalische Methoden .....	40
2.3.2. Chemische Methoden .....	40
2.3.3 Vektor-vermittelte Transportsysteme für eine optimale Gentherapie .....	41
2.3.3.1 Virale Vektoren .....	42

2.3.3.2 Nicht-virale Gentherapie mittels chemischer Vektoren .....	43
2.4 Ziel der Arbeit .....	48
3. Materialien und Methoden .....	50
3.1 Verwendete Chemikalien und Materialien .....	50
3.1.1 Zellkultur .....	50
3.1.2 Chemikalien und Materialien .....	51
3.1.3 Geräte .....	53
3.2 Liposomenpräparation .....	55
3.2.1 Hydratationsmethode .....	56
3.2.2 Detergenzmethode .....	56
3.3 Kopplung von Liganden an die Oberfläche von Liposomen .....	58
3.3.1 Präparative Darstellung des Lipid-Ankers Cyanur-PEG <sub>2000</sub> -PE (Cyanur-PEG <sub>2000</sub> -DSPE) .....	58
3.3.2 Verwendung des Lipid-Ankers N-Glut-PE (N-Glutaryl-DPPE) .....	60
3.4 Charakterisierung der Liposomen .....	60
3.4.1 Größenbestimmung .....	60
3.4.2 Proteinquantifizierung .....	61
3.4.3 Phosphatquantifizierung .....	62
3.4.4 Serumstabilität .....	63
3.5 GFP-Transfektionsexperimente .....	64
3.5.1 Transformation kompetenter E. coli DH5 $\alpha$ .....	64
3.5.2 Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA .....	65
3.5.3 DNA-Quantifizierung .....	66
3.6 Zellkultur .....	67
3.6.1 Kultivierung der bEnd3-Zellen .....	67
3.6.2 Kultivierung der Th1F12-Zellen .....	68
3.6.3 Kultivierung der A2780s-Zellen .....	68
3.6.4 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen .....	69
3.6.5 Ermittlung der Zellzahlen und Zellgrößen mittels CASY <sup>®</sup> 1 Modell TT .....	69
3.6.6 Bestimmung der Wachstumsraten der Endothel- und Ovariakarzinomzellen .....	70

3.7	Liposomales E-Selektin-Targeting .....	71
3.7.1	E-Selektin-Targeting <i>in vitro</i> unter statischen Bedingungen .....	71
3.7.2	E-Selektin-Targeting <i>in vitro</i> unter dynamische Bedingungen .....	72
3.7.3	E-Selektin-Targetierung <i>in vivo</i> .....	73
3.8	Optimierung des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus .....	73
3.8.1	Präparation der Kunststoffpartikel als künstliche Targetzellen .....	73
3.8.2	Target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes unter statischen Bedingungen .....	74
3.8.3	Dynamische Untersuchungen der target-sensitiven Freisetzung des liposomalen Inhaltes .....	75
3.9	Beeinflussung des Adhäsionsverhalten der Th1-Lymphozyten an bEnd3 .....	76
3.9.1	Einfluss target-sensitiver IL auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten .....	78
3.9.2	Einfluss von vMIP-II und SDF-1 auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten .....	79
3.10	Durchflusszytometrische Analysen .....	81
3.10.1	Expression von E-Selektin auf bEnd3-Zellen .....	81
3.10.2	<i>In vitro</i> -Transfektionsversuche an A2780s und bEnd3 .....	82
3.11	<i>In vivo</i> -Transfektionsversuche .....	83
3.12	Statistik .....	84
4	Ergebnisse und Diskussion .....	85
4.1	Bindungsuntersuchungen an murinen Endothelzellen (bEnd3) .....	85
4.1.1	Expression des E-Selektins auf bEnd3 .....	85
4.1.2	Darstellung der Liposomen .....	86
4.1.3	E-Selektin-Targeting muriner Endothelzellen unter statischen Bedingungen .....	87
4.1.4	E-Selektin-Targeting <i>in vivo</i> .....	89
4.2	Extrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes durch target-sensitive IL ....	93
4.2.1	Abhängigkeit der target-sensitiven Freisetzung von der mPEG-PE-Konzentration .....	95
4.2.2	Aufklärung des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus .....	98
4.2.3	Stabilitätsuntersuchungen der target-sensitiven Liposomen .....	101

4.2.4	Target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes in Abhängigkeit des Mediums .....	103
4.2.5	Bindungs- und Freisetzungsuntersuchungen target-sensitiver IL an Endothelzellen unter statischen Bedingungen .....	104
4.2.6	Dynamische Bindungs- und Freisetzungsuntersuchungen target-sensitiver IL .....	107
4.2.6.1	Target-sensitive Freisetzungsuntersuchungen an Modellmembranen ...	108
4.2.6.2	Dynamische Bindungs- und Freisetzungsversuche an bEnd3 .....	110
4.3	Einfluss target-sensitiver Liposomen auf die Adhäsionskaskade von Th1-Lymphozyten .....	113
4.3.1	Liposomaler Einfluss target-sensitiver Liposomen auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten .....	116
4.3.2	Effekte der Chemokine SDF-1 und vMIP-II auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten .....	118
4.3.2.1	Einfluss von freiem vMIP-II und SDF-1 auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten .....	119
4.3.2.2	Einfluss leerer und vMIP-II-gefüllter, konventioneller Liposomen auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten in Abhängigkeit der Targetierung .....	120
4.3.2.3	Einfluss vMIP-II-gefüllter, target-sensitiver Liposomen auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten in Anwesenheit von SDF-1 ...	122
4.3.3	Zusammenfassung der Untersuchungen .....	124
4.4	Intrazellulärer Eingriff in das Entzündungsgeschehen auf genetischer Ebene .....	124
4.4.1	Herstellung und Charakterisierung der SPLP .....	126
4.4.1.1	Herstellung der Gentransfervesikel .....	127
4.4.1.2	Charakterisierungen der SPLP .....	127
4.4.2	Optimierende Transfektionsversuche an Ovarialkarzinomzellen A2780s .....	130
4.4.2.1	Transfektionsfähigkeit pH- <i>insensitiver</i> SPLP modifiziert nach Wheeler ..	130
4.4.2.2	Einfluss der Targetierung und der pH-Sensitivität der SPLP auf die Transfektion .....	131
4.4.2.3	Einfluss des kationischen Lipids auf das Ausmaß der Transfektion .....	134
4.4.2.4	Transfektionsraten der Ovarialkarzinomzellen .....	136
4.4.3	Transfektionsversuche an bEnd3 .....	137
4.4.3.1	Ausmaß der Transfektion von Endothelzellen in Abhängigkeit des kationischen Lipids und der Spezifität der SPLP .....	139

---

4.4.3.2	Untersuchungen pH-sensitiver DC30-SPLP in Abhängigkeit des Stimulus der Endothelzellen .....	142
4.4.4	Transfektionsversuche <i>in vivo</i> .....	143
5	Zusammenfassung .....	147
6	Literaturverzeichnis .....	149
7	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	161
8	Danksagung .....	164
9	Verfassungserklärung .....	165
10	Lebenslauf .....	166
11	Veröffentlichungen .....	167



## Abkürzungsverzeichnis

### B

---

bEnd3	murine brain microvascular endothelial cells/Murine Gehirnkapillarendothelzellen
BSA	bovine serum Albumine

### C

---

CD	cluster of differentiation
6-CF	6-Carboxyfluoreszein
CHEMS	Cholesteryl Hemisuccinat Morpholino Salz
Chol	Cholesterol
Cyanur-PEG-PE	N-[3-Chlor-5-( $\omega$ -(3,5-dichloro-2,4,6-triazoxyl)-poly(ethylen-glykol)- $\alpha$ -amino)-2,4,6-triazyl]-DSPE

### D

---

DC30	DC-Cholesterol/Dioleoylphosphoethanolamin (30:70, w/w)
DC-Chol	3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyaninperchlorat
D-MEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DNA	desoxyribonucleic acid
DNFB	2,4-Dinitro-1-fluorobenzen
DODAC	N,N-Dioleoyl-N,N-dimethylammoniumchlorid
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DSPE	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin

### E

---

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
et al.	et alii (und andere)

**F**


---

FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum

**G**


---

GFP	green fluorescent protein
-----	---------------------------

**H**


---

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
-------	---

**I**


---

ICAM	intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Immunoliposomen
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
INF	Interferon

**L**


---

LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LMVEC	lung microvascular endothelial cells
LPLL	Lipopolylysin
LPS	Lipopolysaccharide
LUV	large unilamellar vesicle

**M**


---

mAb	monoclonal antibody
MLV	multilamellar vesicle
mPEG-PE	Methoxypolyethylenglykol-phosphatidylethanolamin

**N**


---

NEA	nicht essentielle Aminosäuren
N-Glut-PE/NGPE	N-Glutaryl-phosphatidylethanolamin

**O**


---

OG	n-Octyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid/Oktylglucosid
----	---

**P**


---

PBS	phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylenglykol

**R**


---

RES	Retikoendotheliales System
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

---

**S**

SCR	short consensus repeat
SDF-1	stromal derived factor-1
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPLP	stabilized plasmid lipid particles
SUV	small unilamellar vesicle

---

**T**

TCA	trichloroacetic acid
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TRIS	2-Amino-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
ts	target-sensitiv

---

**V**

vMIP-II	viral macrophage inhibitory protein-II (vCCL2)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
vgl	vergleiche/verglichen



## 1 Einleitung

Die Entwicklung neuartiger antiinflammatorischer Pharmaka im letzten Jahrzehnt spiegelt den großen Bedarf an wirksamen Arzneistoffen für die Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie z. B. der Psoriasis oder der Rheumatoiden Arthritis (RA) wider. So wurden u. a. der Dehydroorotatdehydrogenasehemmer Leflunomid sowie die Biologicals Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Golimumab und Ustekinumab für die Entzündungstherapie zugelassen und ergänzen somit die NSAR (nichtsteroidalen Antirheumatika), Glucocorticoiden und die DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) entscheidend.

Bei den Biologicals handelt es sich um eine neue Generation von Medikamenten von verschiedenartig gentechnisch hergestellten Proteinen, welche die Aktivität natürlich vorkommender Substanzen fördern oder inhibieren, die bspw. bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Wichtige Angriffspunkte sind z. B. die CD11a-Untereinheit des LFA-1 von T-Lymphozyten (Efalizumab [Li et al. (2009)], die Botenstoffe TNF- $\alpha$  (Golimumab [Reisdorf (2008)], Etanercept [Campanati et al. (2007)]) oder Vertreter aus der Familie der Interleukine. So richtet sich bspw. das Ustekinumab gegen IL-12 und IL-23 [Leonardi et al. (2008), Papp et al. (2008)] und bei dem Tocilizumab handelt es sich um einen Inhibitor sowohl des löslichen als auch des membrangebundenen IL-6-Rezeptors [Ohsugi (2007), Plushner (2008)]. Für beide wurde im Jahr 2008 die Zulassung zur Behandlung der RA beantragt. Ein Vorteil dieser Wirkstoffe sind ihre großen Applikationsintervalle, jedoch ergeben sich auch Nachteile, da die Zielstrukturen der Biologicals vielfältige physiologische Prozesse steuern [Patel et al. (2009)]. IL-12 und IL-23 spielen bspw. eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen sowie bei der Tumorabwehr, sodass die Gefahr eines erhöhten Infektions- und Krebsrisikos unter der Anwendung des Inhibitors Ustekinumab besteht.

Darüber hinaus erfordert der chronische Verlauf der Entzündungserkrankungen einen langfristigen Einsatz, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens schwerwiegender, systemischer Nebenwirkungen bei der Anwendung der meisten Pharmaka zusätzlich steigt. Sogenannte Drug Delivery Systeme, mit denen eine gezielter Transport eingeschlossener Wirkstoffe an den Ort des Krankheitsgeschehen ermöglicht wird, stellen eine vielversprechende Option für den Einsatz bei chronischen Entzündungskrankheiten dar, um die unerwünschten Nebeneffekte an gesunden Zellen und Geweben zu minimieren.

Die in den 80er Jahren entwickelten Immunliposomen (IL) haben sich als erfolgversprechende Drug Delivery Systeme herauskristallisiert. Bei den IL handelt es sich um Liposomen, welche durch die Kopplung von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Zelloberflächenstrukturen eine Zielspezifität für Zellen oder Gewebe erhalten. Durch Einsatz dieser spezifischen liposomalen Systeme wird ein zielgerichteter Arzneistofftransport durch die

hohe Spezifität sowie Affinität der Antikörper ermöglicht. Allerdings wird die Effizienz der IL auch entscheidend durch die Art und Zugänglichkeit der Zielstrukturen geprägt.

Mit einem tieferen Einblick in die molekularen Grundlagen und Mechanismen der zellulären Immunabwehr werden die Prozesse des chronischen Entzündungsgeschehens heute besser verstanden. Dabei treten Leukozyten in initialen Kontakt mit dem Gefäßendothel, binden im weiteren Verlauf an den Endothelzellen und emigrieren anschließend in das umliegende Gewebe. Die Familie der Selektine spielt hierbei eine entscheidende Rolle, sodass die Identifizierung dieser Adhäsionsrezeptorgruppe einen bedeutenden Schritt für das Verständnis der Entzündungsreaktionen darstellte [Springer (1995)]. Die Selektine sind darüberhinaus aufgrund ihrer zeitlich und lokal begrenzten Expressierung im Rahmen des Entzündungsgeschehens eine vielversprechende Zielstruktur für eine zielgerichtete Anreicherung antiinflammatorischer Wirkstoffe im entzündeten Gewebe.

E-Selektin-gerichtete IL, welche durch die Kopplung von E-Selektin-Antikörpern auf der Liposomenoberfläche erhalten wurden, sollten im Rahmen dieser Arbeit als Transportvehikel zur Targetierung von Endothelzellen dienen. Allerdings garantiert ein erfolgreicher, zielgerichteter Transport in das entzündete Gewebe noch keinen therapeutischen Effekt. Die Wirkung der eingeschlossenen Substanzen kann sich erst nach der Freisetzung aus diesen IL therapeutisch entfalten. Durch die Variation der liposomalen Zusammensetzung kann dafür eine extrazelluläre oder intrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes erreicht werden, was zu einer Intervention in pathologische Prozesse auf der Endothelzelloberfläche oder zu einer Regulation von pathologischen Veränderungen intrazellulär bspw. auf genetischer Ebene führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten E-Selektin-gerichtete IL dargestellt und in geeigneten zellulären Systemen hinsichtlich ihrer Targetbindungsfähigkeit charakterisiert werden. Dabei sollte die Lipidzusammensetzung so variiert werden, dass einerseits durch eine extrazelluläre Freisetzung von Chemokinrezeptorantagonisten mittels target-sensitiver IL und andererseits durch den Transport und die intrazelluläre Freisetzung von genetischem Material durch pH-sensitive SPLP eine Regulation potentieller inflammatorischer Prozesse ermöglicht wird. Die Nutzung dieser beiden sensitiven Drug Delivery Systeme könnte neue Möglichkeiten einer antiinflammatorischen Therapie eröffnen.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Die Entzündung

Die Entzündungsreaktion ist ein sichtbares Kennzeichen einer örtlich begrenzten Immunantwort des Organismus auf exogene und endogene Noxen, wie z. B. eindringende Mikroorganismen oder Fremdpartikel aber auch entartete körpereigene Zellen. Es handelt sich bei einer Entzündung um eine Mobilisierung und Aktivierung verschiedener Zellen des Immunsystems und deren Infiltration des betroffenen Gewebes. Während bei einer akuten Reaktion insbesondere Granulozyten infiltrieren, setzt sich in chronischen Entzündungen das Infiltrat vorwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten zusammen.

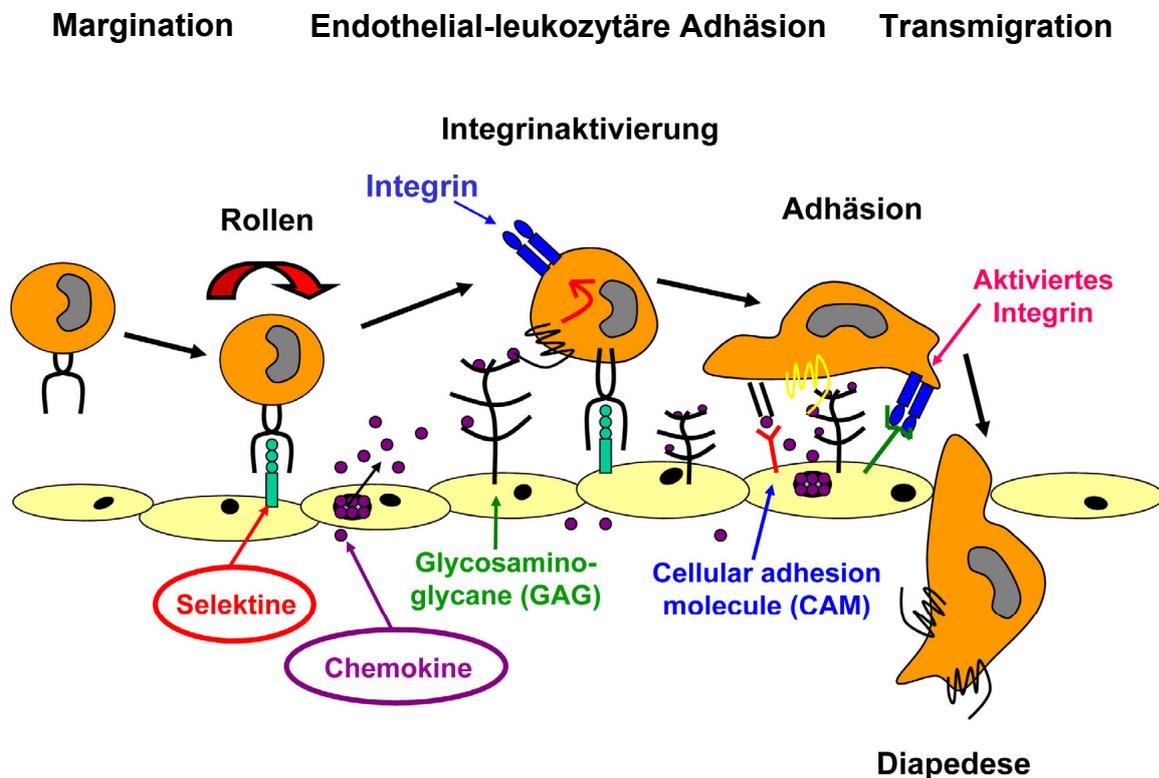
Bei einer akuten Entzündung werden nach dem Einwirken einer Noxe Mediatorstoffe (Histamin, Serotonin, Kinine etc.) durch körpereigene und körperfremde Zellen ausgeschüttet, was zu einer Dilatation und Permeabilitätserhöhung von Gefäßen führt. Darüber hinaus ziehen andere Substanzen, wie Leukotriene, bakterielle Peptide, der Komplementfaktor 5a oder TNF, Immunzellen chemotaktisch an. Es folgt die Emigration dieser aus der Blutbahn ins umliegende Gewebe zum Ort der Schädigung. Dieser Vorgang erfolgt sowohl bei den meisten akuten und bakteriellen Entzündungen als auch bei chronischen Entzündungsprozessen, jedoch in unterschiedlichem zeitlichem Ausmaß. Als Folge des anhaltenden Ausströmens von Leukozyten bei chronischen Entzündungen kommt es zu irreversiblen Schäden des Gewebes bis hin zum Absterben der gewebusbildenden Zellen (siehe Kapitel 2.1.3.4).

An dem mehrstufigen Prozess der Emigration sind mehrere Klassen von Adhäsionsmolekülen beteiligt. Deren Expression beeinflusst sowohl die zeitliche als auch die räumliche Ausdehnung und Intensität des gesamten Entzündungsprozesses.

#### 2.1.1 Die Adhäsionskaskade als zentraler Schritt der Entzündungsreaktion

Die Margination stellt den vorbereitenden Schritt für die Adhäsion der Leukozyten am Endothel dar. Bei diesem Prozess verlagern sich Leukozyten aus dem axialen Strom des Blutgefäßes in den Randstrom im Zuge von Migrationsstörungen, da sich Erythrozyten aufgrund ihrer größeren Verformbarkeit in der Strommitte aufhalten (Axialmigration) und somit die Leukozyten an den Gefäßrand verdrängen [Schmidt-Schönbein et al. (1980)]. Durch die Annäherung der Leukozyten nimmt die Fließgeschwindigkeit aufgrund des paraboloiden Geschwindigkeitsprofil der Blutströmung ab [Goldmann et al. (1967)]. Beides führt dazu, dass es nun zu vermehrten endothelial-leukozytären Interaktionen kommt und somit die Rekrutie-

zung der Leukozyten erfolgen kann. Sie ist entscheidend für die Entzündungsreaktion und wird über eine Reihe von sog. Adhäsionsmolekülen gesteuert (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Adhäsionskaskade**

Über endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle erfolgt nach der Margination die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen. Durch Bildung weiterer Entzündungsmediatoren und der Affinität von Adhäsionsmolekülen resultiert eine feste Bindung der Leukozyten als Voraussetzung für die anschließende Transmigration durch das Endothel ins umliegende Gewebe.

Durch Bindung der Selektine an die Kohlenhydratreste (Sialyl-Lewis<sup>x</sup>) von Glykoproteinen wird der erste Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel hergestellt. Die Bindung zwischen den Selektinen mit ihren Liganden unterliegt einer sehr schnellen Bindungskinetik, so dass es zunächst zu einer ständigen Abfolge von Adhäsion und Dissoziation der Bindung und daraus resultierend zu einer rollenden und sich weiter verlangsamenen Bewegung (Rolling) der Zellen entlang des Endothels kommt. Die folgende Aktivierung von Integrinen durch chemotaktische Mediatoren bewirken Interaktionen zwischen diesen und Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie, den *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM's), welche zu starken Wechselwirkungen und schließlich zu einer festen Adhäsion führen. Diese chemotaktischen Mediatoren (Chemotaxine) sind vor allem Chemokine, die auf Glykosaminglycanen des Endothels präsentiert werden. Gleichzeitig werden schwächer bindende Selektine abgespalten. Somit kontrollieren die Chemokine die Adhäsionskaskade, da sie durch eine Erhöhung der Integrinaktivität den Übergang der Leukozyten vom rollenden Zustand in die feste Bindung fördern. Darüber hinaus wird durch einen lokalen Chemokingradienten die

transendotheliale Migration ins Gewebe gesteuert [Wang et al. (2005), Parish (2005), Peled et al. (1999)].

Im letzten Schritt folgt die Transmigration (Diapedese) der Leukozyten durch das Endothel in das umliegende Gewebe. Zwei Möglichkeiten gibt es für den Durchtritt der Zellen durch das Endothel. Einerseits die Wanderung der Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch, andererseits aber auch das direkte Durchdringen der Zellen des Endothels. Es wird angenommen, dass der Leukozyt-Subtyp, die Stimulusart, der Gewebetyp und die Spezies des Organismus ausschlaggebend dafür sind, welcher Mechanismus des Diapedese bevorzugt wird [Middelton et al. (2002)].

### 2.1.2 Die Familie der Selektine

Selektine sind Lektin-artige Adhäsionsmoleküle (kohlenhydratbindende Glykoproteine – Lektine) und werden ebenso wie ihre spezifischen Liganden oberflächlich auf Leukozyten (L-Selektin, CD62L), Blutplättchen (P-Selektin, CD62P) und dem Endothel (E-Selektin, CD62E) exprimiert.

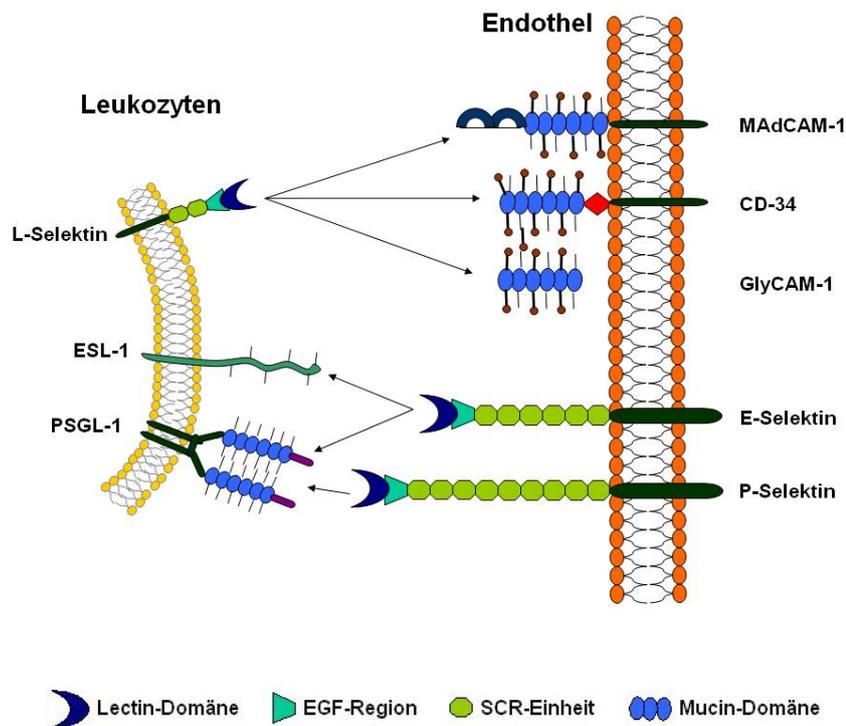
Strukturell handelt es sich um drei monomere, transmembranäre Glykoproteine. Die für die Ligandbindung essentielle Lektin-Domäne befindet sich am extrazellulären N-Terminus. An diese schließen sich eine EGF (epidermal growth factor)-analoge Region sowie ein Abschnitt mit zwei bis neun sog. SCR (short consensus repeat)-Domänen, deren Sequenzen homolog zu denen in Komplement-regulatorischen Proteinen sind und die jeweils aus ungefähr 60 Aminosäuren bestehen. Diese beiden Abschnitte scheinen als Kofaktoren für die Lektin-vermittelte Bindung zu fungieren [Bradford et al. (1994), Varki (1997)], da durch die große räumliche Ausdehnung die Lektin-Domäne weiter von der Zelloberfläche entfernt exponiert und somit eine bessere Zugänglichkeit für die Selektin-Liganden ermöglicht wird. Es folgt der transmembranäre Teil und daran abschließend eine kurze zytoplasmatische Domäne.

Leukozyten gelingt es, vermittelt über Selektin-Ligand-Bindung aus der Blutbahn am Endothel anzudocken. Daraufhin folgt ein langsames Rollen entlang des Endothels währenddessen Chemokin-vermittelt eine Integrinaktivierung erfolgt, was schließlich zu einer festen Anheftung der Leukozyten und zum Eindringen dieser in das umliegende Gewebe führt. Für die Schritte der festen Adhäsion und Transmigration der Leukozyten ins Gewebe ist die Selektin-Ligand-Bindung somit die essentielle Voraussetzung.

Nicht nur bei der Leukozytenrekrutierung im Rahmen entzündlicher Prozesse spielen die Selektine eine entscheidende Rolle, sondern sie fungieren auch bei der Steuerung der Lymphozytenrezirkulation als sog. homing receptors und Adressine [Dal Canton (1995)].

### 2.1.2.1 Liganden der Selektine

Alle drei Selektine erkennen als minimales Bindungsepitop das Tetrasaccharid Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) sowie dessen Isomer Sialyl Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>). Allerdings bilden diese Saccharide nur einen kleinen Teil der natürlich vorkommenden Selektinliganden, die mucinähnliche Glykoproteine mit einem bis zu 70%igen Kohlenhydratanteil darstellen. Die Bindungsepitope bilden in den Ligandmolekülen die Kohlenhydratseitenketten, die über O- oder N-glykosidische Bindungen an den Serin- oder Threonin-reichen Proteingrundgrüsten geknüpft sind. Die Bindung der Selektine über ihre Lektindomäne an die Bindungsepitope ist Calcium-abhängig. Die deutlich höhere Bindungsaffinität zum Mucinliganden gegenüber der nur geringen Affinität zu den Bindungsepitopen (millimolarer Bereich) wird durch die Beteiligung anderer struktureller Areale an der Bindung diskutiert.



**Abbildung 2:** Struktur der Selektine und ihrer Liganden [modifiziert nach Vestweber et al. (1999)]

### 2.1.2.2 L-Selektin

L-Selektin wird konstitutiv von den meisten zirkulierenden Leukozyten exprimiert. Es besitzt nur zwei SCR-Domänen und ist somit das kleinste Selektin. Allerdings findet es sich v.a. auf den Mikrovilli-Spitzen von Leukozyten, was die Bindung dieser aus dem Blutfluss durch die räumlich herausstehende Anordnung erleichtert [von Adrian et al. (1995)]. Durch schnelle Ligandenbindungen kann L-Selektin die initiale Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutfluss an das Endothel („capture“) initiieren, wobei die L-Selektin-Bindung sehr schnell wieder dissoziiert. Gemeinsam mit P-Selektin ist L-Selektin somit für die Rekrutierung von Leukozyten an das Endothel verantwortlich.

Als „homing receptor“ spielt L-Selektin darüber hinaus an der Transmigration von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten eine wichtige Rolle.

Zu den L-Selektin-Liganden zählen CD34, GlyCAM-1 (Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1), MadCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) aber auch der P-Selektin-Ligand PSGL-1 (P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1) (siehe Abbildung 2).

Der L-Selektin-Ligand MadCAM-1 mit seinen Immunglobulin- und Mucin-artigen Domänen zeigt allerdings auch Interaktionen mit dem Integrinrezeptor  $\alpha_4\beta_7$ . Er befähigt somit Lymphozyten sowohl zum Selektin-vermittelten Rollen, als auch zur Integrin-vermittelten festen Adhäsion.

### 2.1.2.3 E-Selektin

Die Expression des E-Selektins ist nur auf Endothelzellen beschränkt und erfolgt erst nach Stimulation durch Mediatoren wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 oder LPS auf transkriptioneller Ebene [Yao et al. (1999), Lowe (2002), Unger (2001)]. Aufgrund dieser verzögerten Expressionskinetik wird E-Selektin erst nach einigen Stunden auf der Endothelzelloberfläche präsentiert. Der zeitliche Verlauf zeigt ein Maximum der E-Selektin-Konzentration nach vier bis acht Stunden nach dem Stimulationsreiz [Bevilacqua et al. (1989)]. Danach wird es langsam durch Endozytose wieder von der Oberfläche entfernt und in Lysosomen abgebaut, bis die Konzentration nach 24 Stunden wieder ihren Ausgangswert erreicht.

Durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird die Expression des E-Selektins gesteuert. Freie Sauerstoffradikale, die normalerweise durch Radikalfänger abgebaut werden, aktivieren u. a. diesen Transkriptionsfaktor. Daher führt ein gestörter Radikalabbau zu vermehrtem oxidativen Stress und somit auch zu einer verstärkten Expression von E-Selektin.

Der für E-Selektin spezifische Ligand ist ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) (siehe Abbildung 2), ein aus 1148 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein (Größe 150 kDa), in welchem die Zu-

ckerketten im Gegensatz zu den anderen Liganden N-glykosidisch an das Proteingrundgerüst geknüpft sind.

Zu L- oder P-Selektin zeigt ESL-1 keine Affinitäten. Die Expression von ESL-1 erfolgt im Randbereich der Mikrovilli. Das spricht für eine spätere Funktion des E-Selektins und seines Liganden in der Adhäsionskaskade im Gegensatz zu P- und L-Selektin und deren Liganden, welche über langgestreckte gut zugängliche Strukturen verfügen und somit das Tethering und Rollen der Leukozyten vermitteln.

#### 2.1.2.4 P-Selektin

Durch eine größere Anzahl an SCR-Domänen ist P-Selektin im Vergleich zu den anderen beiden der räumlich ausgedehnteste Vertreter der Selektine (siehe Abbildung 2). Es findet sich in Endothelzellen, gespeichert in den Weibel-Palade-Körperchen, und in Thrombozyten, gespeichert in den  $\alpha$ -Granula (Granulosomen).

Nach Stimulation durch Signalstoffe wie Histamin, Thrombin, Peroxidradikale u. a. wird P-Selektin vermehrt und schnell, innerhalb weniger Minuten, aus den Speicherreservoirs auf der Endothelzelloberfläche präsentiert und steht somit für initiale Interaktionen zwischen dem Endothel und annähernden Leukozyten zur Verfügung [Lowe (2003), Yao et al. (1999)].

PSGL-1 (P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1) ist der natürliche Ligand, strukturell gesehen ein Disulfid-verbrücktes Homodimer einer Molekülmasse von 240 kDa (siehe Abbildung 2). Es verfügt über zahlreiche O-glykosidisch aber auch bis zu drei N-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate. Es findet sich an den Spitzen der membranären Mikrovilli zirkulierender Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten. PSGL-1 bindet auch schwach an E-Selektin, was die Vermutung zulässt, dass E-Selektin im späteren Entzündungsverlauf zum Teil die Aufgaben des P-Selektins übernimmt [Vestweber et al. (1999)].

Aus verschiedenen Untersuchungen konnte durch Blockade von P- oder E-Selektin eine Überlagerung der Funktionen beider endothelialer Selektine abgeleitet werden. Als Vermittler des Leukozytenrollens können sich die beiden gegenseitig ersetzen, jedoch resultiert aus den Interaktionen mit P-Selektin ein schnelleres Rollen (20 bis 50  $\mu\text{m/s}$ ) als mit E-Selektin (<10  $\mu\text{m/s}$ ) [Kunckel et al. (1996a+b)].

### 2.1.3 Chemokine und ihre Bedeutung

Chemokine (chemotaktisch wirkende Zytokine; „chemoattractant cytokines“) wirken am Entzündungsort über spezifische Rezeptoren modellierend auf das Verhalten der Leukozyten. Sie induzieren die gezielte Wanderung dieser, indem sie indirekt über Signaltransduktionswege Integrine aktivieren und gleichzeitig die Abspaltung schwächer bindender Selektine induzieren [Worthylake et al. (2001), Kishimoto et al. (1989)]. Dies spielt im Rahmen der Entzündung eine entscheidende Rolle, da die Integrin-vermittelte feste Adhäsion die Voraussetzung für die Transmigration (Diapedese) der Leukozyten durch das Endothel in das betreffende Gewebe darstellt.

Nicht nur bei der Steuerung von Immunantworten übernehmen Chemokine entscheidende Funktionen, sie sind ebenfalls im Hinblick auf z. B. Wachstumsregulierung [Luster (1998)], Entwicklung von Th1/Th2-Lymphozyten und lymphoiden Organen, T-Zell-Aktivierung [Hasegawa et al. (2001)], Angiogenese [Broxmeyer (2001), Romagnani et al. (2004)], Hämatopoese [Horuk (2001)], der Wundheilung [Singer (1999)] u.v.m. regulatorisch tätig.

#### 2.1.3.1 Klassifizierung der Chemokine

Ursprünglich den Zytokinen untergeordnet, stellen die Chemokine heute eine eigene komplexe Superfamilie von kleinen, meist sekretierten Polypeptiden einer Länge von 67 bis 127 Aminosäuren dar [Moser et al. (2004)], da sie spezifischere Eigenschaften im Hinblick auf die Aktivierung der Zielzellen aufweisen als Zytokine. Die Einteilung der Chemokine kann sowohl strukturell als auch funktionell erfolgen (siehe Abbildung 3). In Abhängigkeit der charakteristischen Anordnung der ersten bzw. ersten beiden N-terminalen Cystein(C)-Aminosäurereste in der Chemokindomäne lassen sich die Chemokine strukturell in vier Gruppen klassifizieren. Die Gruppe der CXC-Chemokine ( $\alpha$ -Chemokine) bilden die Chemokine, bei denen die beiden Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt sind. Liegen die Cysteinreste jedoch direkt nebeneinander, werden sie der Gruppe der CC-Chemokine ( $\beta$ -Chemokine) zugeordnet. Diese beiden Hauptgruppen werden ergänzt durch die Gruppe der C-Chemokine ( $\gamma$ -Chemokine), aus welcher bisher nur zwei Vertreter, das Lymphotactin  $\alpha$  und  $\beta$ , bekannt sind, und abschließend durch das einzige CXXXC-Chemokin ( $\delta$ -Chemokine), dem Fraktalkin. Eine Standardisierung der Nomenklatur war unausweichlich, da die Familie der Chemokine stetig wächst und beim Menschen z. B. inzwischen aus über 50 Chemokinliganden und mindestens 18 Chemokinrezeptoren besteht (siehe Tabelle 1).

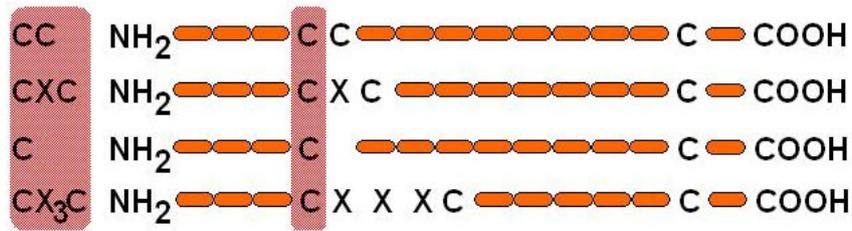


Abbildung 3: Struktur der Chemokine [Zlotnik et al. (2000)]

An den physiologischen Eigenschaften der Chemokine orientiert sich die zweite mögliche Unterteilung in *homing Chemokine* und *inflammatorische Chemokine* [Baggiolini (2001)], welche gleichzeitig Ort und ihre Produktionsbedingungen genauso wie die zelluläre Verteilung ihrer Rezeptoren berücksichtigt.

Am homöostatischen Wandern von Zellen zum Lymphsystem beteiligte Chemokine (sog. *homing chemokines*) werden konstitutiv von Zellen des lymphatischen Gewebes exprimiert. Sie sind an der Erhaltung und Direktion der Chemotaxis von Zellen beteiligt. Sie kontrollieren somit die Wanderung und das Homing von Lymphozyten und dendritischen Zellen bezüglich ihrer Reifung, Differenzierung und Aktivierung. Außerdem ist dies ein wesentlicher Bestandteil der erworbenen Immunität, der Hämatopoese, der Antigenerkennung in sekundären lymphatischen Organen sowie der Überwachung des Immunsystems [Broxmeyer (2001)].

(Pro-)inflammatorische Chemokine werden dagegen nur unter spezifischen Bedingungen und kurzzeitig von verschiedenen Geweben und migrierenden Leukozyten gebildet. Dies geschieht bspw. als Reaktion auf inflammatorische Zytokine oder auf bakterielle Toxine. In das Entzündungsgebiet infiltrierte Zellen induzieren die Expression von Chemokinen, nachdem sie durch (pro-)inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$  oder Interferone aktiviert wurden.

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass es auch Chemokine gibt, denen die Funktionen nicht eindeutig zuzuordnen sind, da sie Kennzeichen beider Gruppen aufweisen. Diese Chemokine besitzen duale Funktionen z. B. IP10, ITAC, MIP 3 $\alpha$  [Moser et al. (2004)], die einerseits z. B. bei Entzündungen verstärkt exprimiert werden und somit an der Immunabwehr beteiligt sind, andererseits jedoch eine Rolle bei der Reifung von Leukozyten sowie bei der Immunüberwachung spielen.

Chemokin	Chemokin-Rezeptor	Humaner Ligand	Expression	Vorkommen
<b>C-Chemokine / Rezeptor-Familie</b>				
XCL1	XCR1	Lymphotactin / ATAC		
XCL2	XCR2	SCM-1 $\alpha$		
<b>CC-Chemokine / Rezeptor-Familie</b>				
CCL1	CCR8	I-309	induzierbar	Th2-vermittelte Entzündungen
CCL2	CCR2	MCP-1/MCAF	Induzierbar	Th1-vermittelte Entzündungen; Leber, ZNS; Allergische Lungenentzündungen; Atherosklerotische Läsionen

Chemokin	Chemokin-Rezeptor	Humaner Ligand	Expression	Vorkommen
CCL3	CCR1, CCR5	MCP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	Induzierbar	Th1-vermittelte Entzündungen; Lunge, ZNS; Atherosklerotische Gefäßschäden
CCL4	CCR5	MIP-1 $\alpha$	Induzierbar	
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	RANTES	Induzierbar	Th1-, Th2-vermittelte Entzündungen; Lunge, ZNS; Hautverletzungen; Atherosklerotische Läsionen
(CCL6)	Unbekannt	Unbekannt	Induzierbar	
CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	MCP-3	Induzierbar	Th1-, Th2- vermittelte Entzündungen; ZNS; Lungenentzündung
CCL8	CCR3	MCP-2	Induzierbar	
(CCL8/10)	Unbekannt	Unbekannt	Induzierbar	
CCL11	CCR3	Eotaxin	Induzierbar	Th2-vermittelte Entzündungen; allergische Lungenerkrankungen; Hauterkrankungen
CCL12	CCR2	Unbekannt	Induzierbar	Th1-, Th2-vermittelte Entzündungen;
CCL13	CCR2, CCR3	MCP-4	Induzierbar	Allergische Lungenerkrankungen
CCL14	CCR1	HCC-1		
CCL15	CCR1, CCR3	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 $\delta$		
CCL16	CCR1	HCC-4/LEC		
CCL17	CCR4	TARC	Induzierbar	Th2-vermittelte Entzündungen der Haut
CCL18	Unbekannt	DC-CK1/PARC AMAC-1	Konstitutiv	T-Lymphozyten
CCL19	CCR7	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	Konstitutiv	T-Lymphozyten
CCL20	CCR6	MIP-3 $\alpha$ /LARC/ exodus-1	Konstitutiv	Darmvilli, Haut
CCL21	CCR7	6CKine/SLC/exodus-3	Konstitutiv	Organe des Lymphsystem, Hepatitis-E-Virus
CCL22	CCR4	MDC/STCP-1	konst./ind.	Th2-vermittelte Entzündungen; Thymus; Allergische Lungenerkrankungen
CCL23	CCR1	MPIF-1		
CCL24	CCR3	MPIF-2/Eotaxin-2	Induzierbar	Th2-vermittelte Entzündungen; Dünndarm, Thymus
CCL25	CCR9	TECK	Konstitutiv	
CCL26	CCR3	Eotaxin-3	Induzierbar	Th2-vermittelte Entzündungen
CCL27	CCR10	CTACK/ILC/Eskine	Konstitutiv	Haut
<b>CXC-Chemokine/Rezeptor-Familie</b>				
CXCL1	CXCR2 > CXCR1	GRO $\alpha$ /MGSA- $\alpha$	Induzierbar	Neutrophilen-vermittelte Entzündungen;
CXCL2	CXCR2	GRO $\beta$ /MGSA- $\beta$	Induzierbar	Atherosklerotische Läsionen
CXCL3	CXCR2	GRO $\gamma$ /MGSA- $\gamma$	Induzierbar	
CXCL4	Unbekannt	PF4		
CXCL5	CXCR2	ENA-78	Induzierbar	Neutrophilen-vermittelte Entzündungen
CXCL6	CXCR1, CXCR2	GCP-2	Induzierbar	Neutrophilen-vermittelte Entzündungen
CXCL7	CXCR2	NAP-2	Induzierbar	Neutrophilen-vermittelte Entzündungen
CXCL8	CXCR1, CXCR2	IL-8	Induzierbar	Neutrophilen-vermittelte Entzündungen; Leber; Akute Lungenerkrankungen; Atherosklerotische Läsionen
CXCL9	CXCR3	Mig	Induzierbar	Th1-vermittelte Entzündungen; ZNS;
CXCL10	CXCR3	IP-10	Induzierbar	Darmverletzungen
CXCL11	CXCR3	I-TAC	Induzierbar	Th1-vermittelte Entzündungen
CXCL12	CXCR4	SDF-1 $\alpha$ / $\beta$	Konstitutiv	Knochenmark; Thymus; Lunge;
CXCL13	CXCR5	BLC/BCA-1	Konstitutiv	Lymphorgane; Lymphknoten

Chemokin	Chemokin-Rezeptor	Humaner Ligand	Expression	Vorkommen
CXCL14	Unbekannt	BRAK/Bolekine		
(CXCL15)	Unbekannt	Unbekannt		
CXCL16	CXCR6	CXCL16		Th1-vermittelte Entzündungen
<b>CX3C-Chemokine/Rezeptor-Familie</b>				
CX3CL1	CX3CR1	Fractalkine	konst./ind.	ubiquitär

**Tabelle 1:** Einteilung der Chemokine und ihrer Rezeptoren [modifiziert nach Zlotnik et al. (2000) und Olsen et al. (2002)]

### 2.1.3.2 Bindungspartner der Chemokine – Chemokinrezeptoren und Glykosaminoglycane (GAG)

Die Rezeptoren der Chemokine gehören zu der großen Familie der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die sieben transmembranären Helices sind abwechselnd über extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. In Anlehnung an die Chemokin-spezifität werden sie in die vier Gruppen der CXC-, CC-, C- und CXXC-Rezeptoren eingeteilt (Tabelle 1). Die meisten von ihnen erkennen jedoch mehr als nur ein Chemokin innerhalb ihrer Klasse, so wie ein Chemokin ebenfalls an mehrere Rezeptoren innerhalb der Rezeptorfamilie binden kann. Beispielsweise zeigt MIP 1 $\alpha$  hohe Affinitäten zu CCR1, CCR3 und CCR5 [Horuk (2001)]. Allerdings gilt diese bindende Vielfalt nur für die Rezeptoren, die zu den inflammatorischen Chemokinen gehören. Die Rezeptoren der Homing-Chemokine besitzen dagegen hauptsächlich nur einen Bindungspartner [Baggiolini (2001)]. Darüber hinaus kann die Wirkung der Chemokine auch nicht klar als agonistisch oder antagonistisch eingeteilt werden. Viele lösen sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte an verschiedenen Rezeptoren aus [Loetscher (2001)].

Allerdings unterscheiden sich die Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren von Granulozyten und T-Lymphozyten. Die Granulozyten zeigen nur eine geringe Auswahl an Chemokinrezeptoren und exprimieren vorwiegend CXC-Rezeptoren, wogegen bei den T-Lymphozyten vornehmlich CC-Rezeptoren zu finden sind, diese aber auch fast alle anderen Rezeptoren zumindest in geringerem Maße aufweisen. Durch diese mögliche Vielfalt passt sich die Expression der Chemokinrezeptoren der T-Lymphozyten dem funktionellen Zustand an und wird als Ausdruck der Reife, Differenzierung und Aktivität angesehen [Baggiolini (2001)].

Nach Bindung der Chemokine an ihren Rezeptor folgt die Transduktion verschiedener G-Protein-gekoppelter Signalwege. Diese Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege hat eine Affinitätserhöhung der Integrine sowie eine Neuorientierung des Zytoskeletts zur Folge, was schließlich die feste Bindung und die nachfolgende Transmigration/Diapedese

dese der Zelle möglich macht [Olson et al. (2002)]. Auf diese Weise sind Chemokine entscheidend an den Wanderungsmechanismen der Leukozyten beteiligt.

Die hauptsächlich basischen Chemokine interagieren darüber hinaus ebenfalls mit löslichen oder auf Zelloberflächen und auf der extrazellulären Matrix (ECM) immobilisierten Glukosaminoglykanen (GAG), wie z. B. Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratinsulfat und Hyaluronsäure [Lortat-Jacob et al. (2002), Wagner et al. (1998), Ali et al. (2005)]. Die Interaktion der Chemokine mit diesen immobilisierten GAGs führt zu einer Erhöhung der Chemokinkonzentration am Produktionsort und der Bildung eines lokalen Chemokingradienten [Wang et al. (2005), Parish (2005)]. Durch die selektive Bindung von Chemokinen an verschiedenen GAGs und deren Isoformen stellt diese Interaktion eine erweiterte Form der Spezifität und Kontrolle der Migration über die Rezeptor-definierte Wirkung hinaus dar [Kuschert et al. (1999), Laudanna et al. (2002), Middleton et al. (2002)].

### **2.1.3.3 Expression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren auf Th-Zellen**

Die Polarisierung und somit die Differenzierung zu Th1- oder Th2-Zellen ist die Folge der Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Nach der Differenzierung unterscheiden sich beide Th-Zelltypen in ihrer Zytokin- und Chemokinrezeptorproduktion. Th1-Zellen sezernieren vor allem IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und tragen vorwiegend CCR5 und CXCR3 [Bonecchi et al. (1998), Sallusto et al. (1998)]. Sie führen über Makrophagen-Aktivierung vor allem zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen [Abbas et al. (1996)]. Th2-Zellen zeichnet die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 und die Expression von CCR3, CCR4 und CCR8 aus. Diese Chemokinrezeptoren sind vor allem an der T-Zell-Differenzierung und Steuerung der Th2-Zellen beteiligt [Bonecchi et al. (1998)].

Durch ihre eigenen Zytokine gelingt es beiden Th-Zelltypen, die Entwicklung und Aktivierung der jeweils anderen Population zu inhibieren. Daraus resultiert ein Gleichgewicht zwischen Th1- oder Th2-Zellen, durch dessen Verschiebung die Immunantwort modelliert wird [Luther et al. (2001)]. Darüber hinaus ermöglicht das unterschiedliche Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren eine selektive Rekrutierung ins Gewebe [Baggiolini (2001), Laudanna et al. (2002)].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der T-Helfer 1-Lymphozytenklon IF12 (Th1IF12) als Modellzelle genutzt, um die Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Th-Zellen am Endothel zu untersuchen. Nach Stimulation sezernieren diese Th1IF12-Zellen INF- $\gamma$  und IL-2 und weisen somit das typische Th1-Zytokinprofil auf. Darüber hinaus konnten die Th1-charakteristischen Chemokinrezeptoren CCR2, CCR3, CCR6, CCR7 und CXCR3 nachgewiesen werden [Rubant (2005)].

#### 2.1.3.4 Dysregulationen im Rahmen pathologischer Entzündungsreaktionen

Bei vielen Autoimmunerkrankungen und anderen Formen von pathologischen Entzündungsreaktionen bildet nicht nur eine gestörte Selektinregulation sondern auch eine Dysregulation des Chemokinnetzwerkes eine zentrale Rolle. Die aus beiden resultierende überschießende oder dauerhaft persistierende Emigration von Leukozyten in spezifische Gewebe prägen den Krankheitsverlauf pathologischer Entzündungen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis, der Atherosklerose, Multiplen Sklerose, Psoriasis, Colitis ulcerosa u.v.m. [Marshall et al. (2002)]. Oftmals finden sich bei diesen krankhaften Veränderungen nicht nur erhöhte Serumkonzentrationen von P- und E-Selektin, sondern es treten auch Chemokine im entzündlich veränderten Gewebe auf.

Die häufigste chronisch entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes ist die *rheumatoide Arthritis*, bei der eine starke Anreicherung von E-Selektin im rheumatoiden Gewebe eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese spielt [Marshall et al. (2002)]. Durch gebildete Immunkomplexe aus autoimmunen Rheumafaktoren mit Antikörpern kommt es zu einer starken Infiltration von phagozytierenden Leukozyten in die Synovialis, wobei der chronische Entzündungsprozess durch ständige Freisetzung von Entzündungsmediatoren aufrecht gehalten wird.

Ebenso wie bei der rheumatoiden Arthritis spielen auch bei der *Atherosklerose* die Selektine und Chemokine eine entscheidende Rolle [Bursill et al. (2004)]. Sie ist die Folge einer Anreicherung von cholesterolreichen Lipoproteinen in der Gefäßwand und der dadurch ausgelösten lokalen Entzündungsreaktion, was zu einer Invasion von Monozyten ins umgebende Gewebe führt. Oxidiertes Low Density Lipoprotein (ox. LDL) verursacht eine stärkere Expression von P-Selektin, sodass die Gewebeinvasion hauptsächlich durch dieses vermittelt wird. Verschiedene Untersuchungen konnten eine verstärkte Bildung von P-Selektin und anderen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) unter erhöhten ox. LDL-Mengen nachweisen.

Oxidativer Stress spielt ebenso bei der Entstehung *diabetischer Gefäßschäden* (Angiopathie) eine entscheidende Rolle. Dieser entsteht durch dauerhaft erhöhte Glucosekonzentrationen, führt zu lokalen Entzündungen und somit zu einer Schädigung der Gefäße. Aufgrund des oxidierten Stresses exprimieren die Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle, wodurch die Bindung und Transmigration von Monozyten ins Gewebe resultiert und begünstigt wird.

Die *Psoriasis* ist die häufigste chronisch entzündliche Hauterkrankung, welche primär T-Zell-vermittelt als Ursache eines reaktiven Autoimmunprozesses stattfindet. Durch Freisetzung von Zytokinen durch aktivierte T-Zellen kommt es zu einer starken Proliferation der Keratinozyten und einer raschen Wanderung dieser aus dem Stratum basale, was zu einer Parakeratose an der Oberfläche führt. Dabei werden die Keratinozyten zusätzlich von Ent-

zündungszellen begleitet, die über Zytokine (IL-2, -3, -5, -6, -8 und INF- $\gamma$ ) und Chemokine (CTACK, CCL27) die Entzündung steuern [Campanati et al. (2007)].

Bei der *atopischen Dermatitis* spielen hautinfiltrierende T-Zellen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese. Dabei unterscheidet sich das Zytokinprofil je nach Art der Dermatitis – bei akuten Läsionen dominieren die Th2-zugeordneten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 während bei chronischen Läsionen vorrangig das Th1-Zytokin INF- $\gamma$  zu finden ist [Grewe et al. (1995)]. Darüber hinaus exprimieren dermale Endothelzellen in Bereichen atopischer Läsionen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 [Leung et al. (2003)]

Auch bei infektiösen Erkrankungen spielen Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle. Viele Viren entwickelten Strategien, um durch Neutralisation jeweils ausgeschütteter Chemokine durch Bildung von Chemokin-bindenden Proteinen, Chemokinrezeptoren und Chemokinantagonisten die Chemokin-vermittelte Abwehrreaktion des Wirtes zu stören [Luster (1998)].

### 2.1.3.5 Antiinflammatorische Strategien

Die Dysregulation der Selektine und Chemokine liegt vielen entzündlichen Erkrankungen zugrunde. Für die Intervention und somit zur Behandlung von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen gibt es verschiedene molekulare Ansatzmöglichkeiten. Zum einen kann schon auf transkriptioneller Ebene in die übermäßige Expression von Selektinen sowie wichtiger Chemokine durch den Organismus eingegriffen werden. Dies wurde z. B. durch den Einsatz der siRNA (small-interfering RNA) [Kawakami et al (2007)] oder TFO (Triple-Helix-forming Oligonucleotides)-Technik erreicht [Kautz et al. (2005)].

Andererseits führt eine Inhibierung der Aktivierung und Rekrutierung der Immunzellen auf Proteinebene durch spezifische Antikörper, kleine nichtpeptidische Moleküle oder spezifische Rezeptor-Antagonisten zu einer Störung der Adhäsionskaskade und somit zu einer verminderten Immunreaktion am Entzündungsort. In der Vergangenheit wurden Effekte von Antikörpern zur Hemmung sowohl der Selektin- als auch der Zytokinfunktion *in vitro* und *in vivo* bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen untersucht. Durch Blockierung der L-Selektin-Funktion mittels monoklonaler Antikörper in einem Ischämie- und Reperusionsmodell des Kaninchenohres wurde eine Abschwächung der Schäden erreicht [Winn et al. (1993)]. An einem Ischämiemodell des Katzenohres konnte mit der Gabe von L-, E- und P-Selektin-Antikörpern eine Reduktion der Größe des nekrotisierten Myokardareals gezeigt werden [Weyrich et al. (1993), Ma et al. (1993)].

Inhibitorische Effekte auf Selektine zeigen darüber hinaus Oligosaccharide wie das Sialyl-Lewis<sup>x</sup> oder ähnliche, sialysierte und fucosylierte als auch sulfatierte Kohlenhydrate, wie z. B. Dextransulfat oder Heparinabkömmlinge. Ihre breite Wirkung konnte in verschiedenen Entzündungsmodellen gezeigt werden [Nelson et al. (1993)].

Für die Behandlung der chronischen Polyarthrit (rheumatoiden Arthritis) sind mittlerweile mehrere Biologicals zugelassen, so z. B. der TNF- $\alpha$ -Rezeptor-Antagonist Infliximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper, der mit großem Erfolg eingesetzt wird [Paleolog (2003), Braun et al. (2003)]. Mit dem löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptor Etanercept gibt es eine weitere Möglichkeit der Behandlung, welcher auch bei der Psoriasis gute Erfolge erzielt, wobei er nicht nur als löslicher Rezeptor eine Wirkung ausübt, sondern ebenfalls regulatorischen Einfluss auf die Expression bestimmter Chemokine (dem CCL27/CTACK) zeigt [Campanati et al. (2007)]. Darüber hinaus bildet Efalizumab eine weitere Therapieoption der Behandlung. Dieser monoklonale Antikörper richtet sich gegen die CD11a-Untereinheit des LFA-1 von T-Lymphozyten (Efalizumab [Ortonne et al. (2005), Li et al. (2009)]). Mit der Zulassung des Ustekinumab steht ein monoklonaler, humanisierter IgG-1-Antikörper gegen die Interleukine IL-12 und IL-23 zur Verfügung stehen, welcher eine Therapieoption zur Behandlung der mittelschweren bis schweren Plaque-Psoriasis darstellt [Leonardi et al. (2008), Papp et al. (2008)]. Und mit dem Tocilizumab steht ein weiterer Zytokin-Inhibitor zu Behandlung der rheumatoiden Arthritis vor der Zulassung. Bei ihm handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen Antikörper sowohl des löslichen als auch des membrangebundenen IL-6-Rezeptors [Plushner (2008)].

Durch den Einsatz von Chemokin-Antagonisten wird eine Beeinflussung der Chemokinregulation erreicht. Da Chemokine und ihre Rezeptoren spezifisch für bestimmte Zelltypen, immunologische Funktionen und auch physiologische Kompartimente sind, scheint die Antagonisierung von Chemokinrezeptoren ein vielversprechender Ansatz zu sein, um selektiv (immun)regulatorisch in das Entzündungsgeschehen einzugreifen. Virale Proteine stellen dabei eine wichtige Gruppe natürlich vorkommender Chemokinrezeptor-Antagonisten dar. Ein Beispiel eines solchen Antagonisten ist virales MIP-II (vCCL2). Unter natürlichen Bedingungen ist vMIP-II ein Chemokin des Karposi's-Sarkom-assoziierten Herpesvirus KSH/HHV-8. Es weist am Chemokinrezeptor CCR3 agonistische (Zellen anlockende) und an den Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CXCR4 und XCR1 antagonistische Eigenschaften (Rezeptorblockade) auf [Lindow et al. (2003), Lüttichau (2008)]. In Untersuchungen stellte sich heraus, dass vMIP-II die höchste Affinität zu CCR2 zeigt, gefolgt von CCR5 und CXCR4 [Kledal et al. (1997)]. Aufgrund seiner vielfältigen Bindungseigenschaften wird vMIP-II auch als Breitband-Antagonist bezeichnet [Kledal et al. (1997), Rubant et al. (2006), Lüttichau et al. (2007)]. vMIP-II ist in der Lage, die Th1-Zellmigration zu inhibieren und somit einen negativen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Zellen auszuüben [Lindow et al. (2003)].

Dies führt zur Verschiebung der von der Th1- zur Th2-vermittelten Immunantwort [Weber et al. (2001)].

## 2.2 Liposomales Targeting

Die Entwicklung von sogenannten zielgerichteten Drug Delivery Systemen wird stetig durch verschiedene medizinische und pharmazeutische Herausforderungen vorangetrieben. Dabei handelt es sich um Systeme, die den Arzneistoff direkt an den gewünschten Zielort (Zellen, Gewebe, Organ) „liefern“. So soll eine gleichzeitige Beeinflussung gesunder Zellen vermieden werden, da dies die häufigste Ursache der unerwünschten Nebenwirkungen ist.

Vor allem bei der Therapie von chronisch entzündlichen Erkrankungen, bei denen durch eine hohe Dosierung und langzeitige, systemische Anwendung von antiinflammatorischen Wirkstoffen negative Nebeneffekte auftreten, könnte man von zielgerichteten Drug Delivery Systemen profitieren.

Für ein optimales Delivery System können folgende Kriterien formuliert werden: Es garantiert einen direkten Arzneistofftransport zum Wirkort, für gesunde Zellen und Organe treten bei der Anwendung minimale toxische Effekte auf, es treten keine gravierenden Biokompatibilitäten auf und nach erfolgter Transportfunktion ist es metabolisier- und aus der Zirkulation eliminierbar [Forsen et al. (1998)]. Da Liposomen im Vergleich zu anderen Carrier Systemen meist aus natürlichen oder halbsynthetischen Lipiden hergestellt werden, entsprechen liposomale Drug Delivery Systeme diesen Anforderungen [Gregoriadis (1976a+b)]

### 2.2.1 Probleme bei der Applikation von Liposomen

Durch ihre große Variabilität der physikalischen Eigenschaften (z. B. Größe, Lipidzusammensetzung und Membranfluidität, Oberflächenladung) zeichnen sich Liposomen für die Anwendung als *in vivo*-Transportvesikel besonders aus. Die Hauptkomponenten der Liposomen (Phospholipide, Cholesterol) entsprechen den natürlichen Bestandteilen der Säugetierzellmembranen. Daraus resultierend zeigen sie eine normale Metabolisierung, geringe Toxizität sowie Immunogenität und eine gute Biokompatibilität bei der systemischen Applikation.

Zahlreiche, mit Erfolg durchgeführte *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen sprechen für den Nutzen der Liposomen. So können bspw. die Toxizität und somit unerwünschte Nebenwirkungen durch die Einkapselung von Wirkstoffe in Liposomen reduziert werden [Hermann et al. (1983), Bendas (2001)].

Die systemische Applikation der Liposomen ist trotz aller günstigen Eigenschaften für ihren Einsatz als Arzneistoffvehikel mit zahlreichen Problemen behaftet. Ein entscheidendes Kriterium stellt die Seruminstabilität dar, denn es gibt eine Vielzahl möglicher Interaktionen zwischen den Liposomen und Blutbestandteilen (z. B. Immunglobulinen, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren), welche einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Liposomen ausüben [Bonte et al. (1986)]. Darüber hinaus werden konventionelle Liposomen kurze Zeit nach intravasaler Applikation zum größten Teil in den Organen des Retikuloendotheliales System (RES), der Leber, Lymphknoten und Milz, wiedergefunden [Ellens et al. (1981)]. Dies geschieht durch Adsorption verschiedener Serumproteine, sog. Opsonine, an die Oberfläche der Liposomen. Die Folge davon ist die Aufnahme durch Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Makrophagen). Diese erkennen Liposomen und andere Partikel aufgrund des Opsonisierungsmusters als fremd und eliminieren sie. Zur gezielten Ansteuerung anderer Gewebe wie peripherer Organe oder Tumoren muss zunächst diese RES-Aufnahme unterdrückt werden, um die Verweilzeit der Liposomen im Blut zu verlängern.

Weiterhin sind Interaktionen der Liposomen mit den Serumlipoproteinen bekannt, die die Liposomenstabilität reduzieren. HDL ist in der Lage nach Anlagerung aus der Liposomenbilayer bspw. Phospholipide zu extrahieren, woraufhin die Freisetzung (leakage) des eingeschlossenen Materials durch die gestörte Membran folgt [Tümer et al. (1983), Scherphof et al. (1978)].

Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Liposomen und den Serumkomponenten wird von den physikochemischen Eigenschaften der Vesikel, z. B. Größe, Lipidzusammensetzung, Oberflächenladung und Lipidreinheit bestimmt [Yan et al. (2005)]. Der Einbau von 30 bis 50 mol% Cholesterol in die Liposomenmembran kann die Serumstabilität erhöhen, da sich dadurch die Packungsdichte der Lipide erhöht und die Interaktionen mit den Serumproteinen reduziert werden [Kirby et al. (1980), Ellens et al. (1981), Tümer et al. (1983)]. Dies wurde in dem Präparat DaunoXome<sup>®</sup> umgesetzt, bei dem es sich um Daunorubicin-gefüllte Liposomen handelt [Petre et al. (2007)].

Weitere Eigenschaften, die Einfluss auf die Serumstabilität haben, sind die Lipidreinheit und die Liposomengröße. SUV besitzen aufgrund ihrer geringen Größe einen kleineren Krümmungsradius im Vergleich zu LUV. Der dadurch bedingte negative Einfluss auf die Lipidpackungsdichte führt zu einer erhöhten Instabilität kleiner Liposomen im Serum [Allen et al. (1985)]. Durch die Verwendung verunreinigter Lipide, ungesättigter Fettsäuren oder ungleiche Fettsäurekettenlängen innerhalb einer Liposomenpräparation kommt es zu vermehrten Membrandestabilisierungen oder verstärkter Opsonisierung und somit ebenfalls zu einer verringerten Stabilität dieser Vesikel gegenüber Serumbestandteilen.

Die schnelle Aufnahme der Liposomen durch Makrophagen kann durch Modifizierung der Liposomenzusammensetzung unterbunden werden. Die Hydrophilisierung der Liposomeno-

berfläche durch den Einbau von Monosialylgangliosid (*GM1*) oder Polyethylenglykol (PEG) zur Vermeidung der Aufnahme durch phagozytierende Zellen führte Ende der 80er Jahre zur Entwicklung sterisch stabilisierten, RES-vermeidender Liposomen, sog. Stealth-Liposomen, mit längerer Zirkulationsdauer im Blutkreislauf [Maruyama (2002)] (siehe Abbildung 4). Es bildet sich eine hydrophile Schutzschicht mit einer Schichtdicke von 4 bis 5 nm auf der Liposomenoberfläche, wodurch elektrostatische als auch hydrophobe Interaktionen sterisch unterbunden werden [Woodle et al. (1994)]. In verschiedenen Studien wurden dabei die besten Ergebnisse mit PEG-Kettenlängen von 2 kDa (45 Ethylenoxid-Einheiten) und einem Anteil von 5 mol% PEG-PE erreicht [Maruyama et al. (1991), Klivanov et al. (1991), Woodle et al. (1994)]. Am häufigsten werden mittlerweile PEG-Derivate gesättigter Phosphatidylethanolamine (PEG-PE) verwendet, wie z. B. das mPEG<sub>2000-5000</sub>-DSPE [Papahadjopoulos (1990)]. Diese Liposomen weisen eine Halbwertszeit der Blutverweildauer bis zu 24 Stunden auf [Woodle (1993)]. Therapeutisch wurde dieses System im Präparat Caelyx<sup>®</sup>, bei dem es sich um Doxorubicin-gefüllte, mPEG<sub>2000</sub>-DSPE-haltige Stealth-Liposomen handelt [Gabizon et al. (2003), Soloman (2008)] umgesetzt.

Trotz langer Verweildauer der Liposomen in der Blutzirkulation wird die Wirksamkeit der Liposomen durch die limitierte Extravasation bestimmt. Endothelzellen und die Basalmembran fungieren als physiologische Barrieren, da sie einer ungehinderten Vesikelextravasation entgegenstehen. Ausnahmen sind jedoch bestimmte pathologische Bedingungen (erhöhte Endothelpermeabilität in Tumorgeweben und Entzündungsgebieten) sowie die morphologischen Situationen in einigen Organen z. B. der diskontinuierliche, sinusoidale Kapillartyp und das Endothel ohne Basalmembran in der Leber.

### 2.2.2 Modifizierungen der Liposomen

Im pharmazeutischen Bereich werden Liposomen als Wirkstoffträger eingesetzt. Dabei können sie als Hilfsstoffe zur verbesserten Aufnahme von Wirkstoffen in bestimmte Zellen, als Depot mit kontrollierter Freisetzung oder als Trägersysteme zur gezielten Organverteilung (Targeting) dienen.

Sie besitzen gegenüber anderen Systemen, wie z. B. Nanopartikeln, eine höhere Akzeptanz durch ihre natürlichen und untoxischen Bausteine. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind die parenterale und topische Applikation. Für eine ideale Therapie ist es jedoch wichtig, die Wirksubstanz selektiv zu den erkrankten Organen zu transportieren.

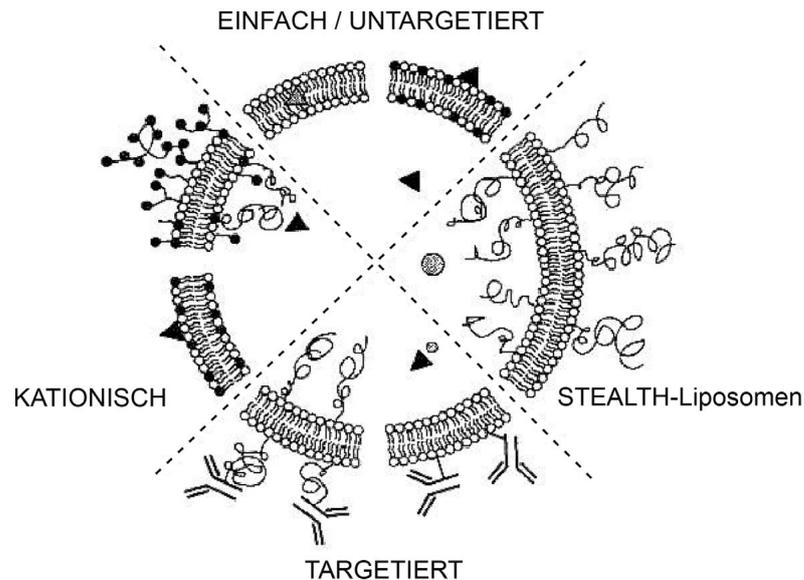
Bei der Anwendung von Liposomen als Arzneistoffvehikel kann zwischen einem indirekten (*passiven*) und einem direkten (*aktiven*) Targeting unterschieden werden. Aus der Natur der Liposomen als körperfremde Strukturen ergibt sich die Hauptvariante des *passiven Targe-*

*tings*, da sich diese in den Zellen des mononukleares phagozytäres System (MPS) anreichern, was man z. B. bei der Anwendung von Anti-Leishmaniose-Wirkstoffen bei einer schwerwiegenden Infektion mit Befall von Leber und Milz [Gilbreath et al. (1985)] sowie zur Aktivierung von Makrophagen in der Antitumorthherapie [Fidler (1990)] ausnutzt. Weiterhin ist ein passives Targeting durch das Kapillarbett der Lunge sowie das permeable Gefäßsystem einiger solider Tumore möglich [Roberts et al. (1997)], da die meisten soliden Tumore ein Gefäßsystem entwickeln, das ähnlich wie bei den RES-Organen Lücken aufweist (Lücken zwischen den Endothelzellen, fehlende Basalmembran, fehlendes umliegendes Muskelgewebe). Durch diese können Zytostatika-haltige Liposomen aus den Blutgefäßen ins Tumorgewebe aufgenommen werden, was eine lokale Akkumulation der Liposomen in diesen Bereichen begünstigt [Maruyama (2002)]. Die erhöhte Permeabilität der Gefäße während einer Entzündungsantwort trägt ebenfalls zu einer solchen Anreicherung der Liposomen in entzündeten Bereichen bei, so dass dies für die gezielte Anwendung antiinflammatorischer Arzneistoffe genutzt werden kann.

Dagegen bildet beim *aktiven* (direkten) *Targeting* die Funktionalisierung der Liposomen mit spezifischen Liganden die Voraussetzung, sodass eine Anreicherung der Liposomen am Wirkort über eine Bindung an Oberflächenstrukturen erfolgt. Durch Modifizierung der Eigenschaften der Liposomenmembran und der Beschaffung der Oberfläche wird versucht, die eingekapselten Substanzen zum Ziel zu bringen und sie direkt am Ort des Geschehens freizusetzen. Durch die Kopplung einer Zielvorrichtung oder eines Homingligand an die Oberfläche der Liposomen kann eine erhöhte Spezifität für die Zielzellen erhalten (siehe Abbildung 4) und somit ein höherer therapeutischer Effekt erzielt werden [Allen et al. (2002)]. Neben der Verwendung von verschiedenen Ligandstrukturen stellt die Nutzung von Antikörpern die aussichtsreichste Strategie dar, da sie sich durch ihre hohe Spezifität und Affinität zur entsprechenden Zielstruktur und Biokompatibilität auszeichnen. Diese Liposomen werden als IL bezeichnet und seit den 80er Jahren intensiv erforscht.

Voraussetzung für ein erfolgreiches Antikörper- oder Ligand-vermitteltes Drug Targeting ist, Oberflächendeterminanten auf den Zielzellen zu finden. Diese Zielstrukturen sollten sich qualitativ und quantitativ vom umliegenden Gewebe unterscheiden und ihre Expression idealerweise nur unter pathologischen Bedingungen erfolgen, wie dies z. B. bei bestimmten Adhäsionsmolekülen in Entzündungsgebieten der Fall ist [Erhardt et al. (2004)].

Im Rahmen dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf dem E-Selektin als Zielstruktur auf Endothelzellen, welches eine zeitliche sowie lokal beschränkte endotheliale Expression in Entzündungsgebieten aufweist.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der möglichen Modifizierungen der Liposomenoberfläche für ein optimales Drug Targeting und zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und Zielorientiertheit (aus [Molema et al. (2001)])

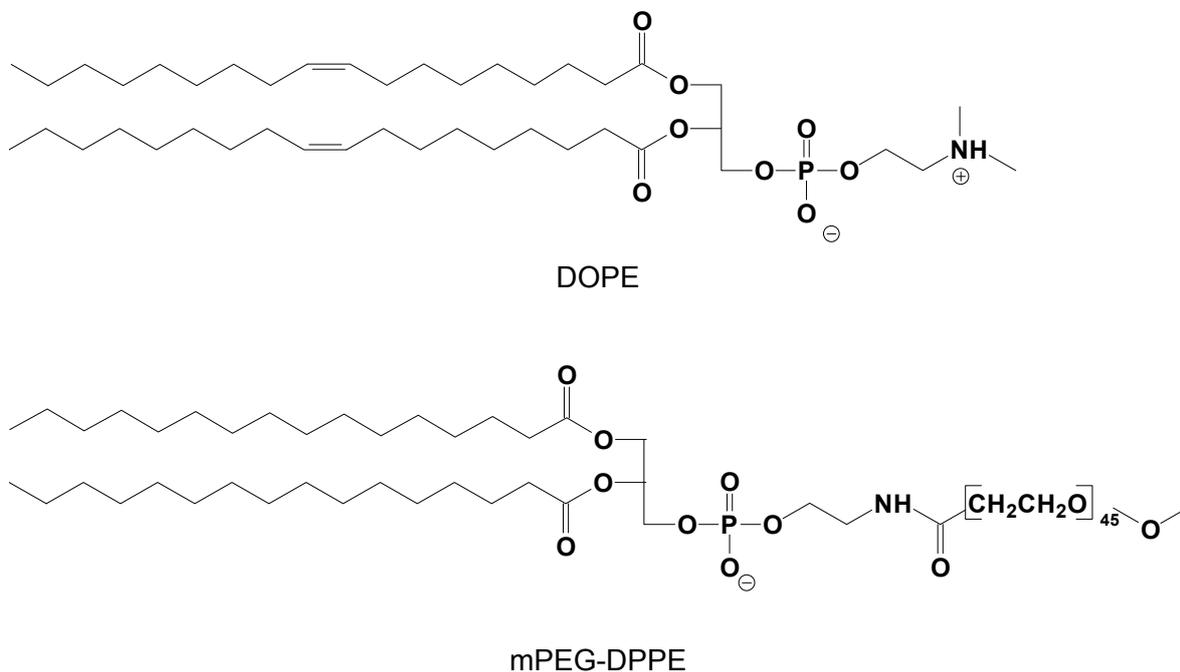
Ein erfolgreiches Targetieren der IL bedingt jedoch nicht automatisch einen therapeutischen Effekt. Dafür ist die gezielte Freisetzung des liposomalen Wirkstoffes direkt am Bindungsort z. B. mittels target-sensitiver Liposomen oder die Internalisierung der intakten Liposomen und anschließende Freisetzung des liposomalen Inhaltes in der Zielzelle erforderlich, was z. B. durch die Verwendung pH-sensitiver Liposomen erfolgen kann.

### 2.2.3 Target-Sensitivität – gezielte Wirkstofffreisetzung an der Zelloberfläche

Ende der 80er Jahre wurden von Ho et al. die sogenannten target-sensitiven IL entwickelt, die zu einer gezielten Wirkstofffreisetzung nach bzw. durch Bindung an der Zielstruktur der Zelloberfläche führen [Ho et. al. (1986), Ho et al. (1987)]. Die spezielle Mischung der Phospholipide ermöglicht dabei eine ausreichende Stabilität der Liposomen für das Targeting sowie eine gezielte Destabilisierung der Bilayer ausgelöst durch die Bindung der IL an der Zielstruktur, was zur Freisetzung des liposomalen Wirkstoffes direkt am Bindungsort führt. Diese Liposomenpräparation besteht aus einem ungesättigtem Phospholipid, z. B. Dioleoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin DOPE als Hauptkomponente (siehe Abbildung 5), welches allein die Tendenz zur Ausbildung inverser, hexagonaler Phasen ( $H_{II}$ ) zeigt und somit keine Fähigkeit zur Bilayerausbildung besitzt [Lasic (1998), Ng et al. (2000), Funari et al. (2003)]. Wird diesem ungesättigtem Phospholipid ein stabilisierendes Amphiphil zugesetzt, z. B. in Form Lipid-assoziiertes Antikörper, formen sich bei der Präparation targetierbare IL. Durch laterale

Diffusion der Stabilisatoren innerhalb der Phospholipid-Bilayer und durch konzentrationsabhängige Aggregation benachbarter Liposomen findet nach der Bindung dieser target-sensitiven IL an der Zielzelle eine schnelle Destabilisierung und die Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen an der Oberfläche statt [Ho et al. (1988), Pinnaduwege et al. (1992), Lasic (1998)]. Die therapeutische *in vivo*-Applikation dieser target-sensitiven IL ist allerdings durch die schnelle Eliminierung aus dem Blutkreislauf limitiert. Wie normale Liposomen werden auch diese durch Opsonisierung sehr schnell durch das RES aus der Zirkulation entfernt und erreichen somit nicht in genügendem Ausmaß den Zielort. Eine Abschirmung durch den Einsatz eines gewissen Anteils von mPEG-DPPE (siehe Abbildung 5) ist somit essentiell, um den zielgerichteten Transport einer ausreichenden Menge an Wirkstoff bis zum Ziel zu gewährleisten. Dieser PEG-Anteil fungiert gleichzeitig als zusätzliche stabilisierende Komponente auf die Liposomenbilayer [Ng et al. (2000)].

Target-sensitive IL stellen nicht nur ein effektives Transportsystem für antiinflammatorische Substanzen dar, sondern kombinieren gleichzeitig eine zielgerichtete Akkumulation dieser am gewünschten Wirkort. Für die zielgerichtete Freisetzung an der Oberfläche der Zelle ist allerdings eine Ausgewogenheit zwischen ausreichender Serumstabilität und möglicher target-sensitiver Destabilisierung der Liposomen essentiell.



**Abbildung 5:** Chemische Strukturen des fusogenen DOPE und des stabilisierenden mPEG-DPPE

### 2.2.4 pH-Sensitivität – gezielte intrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes

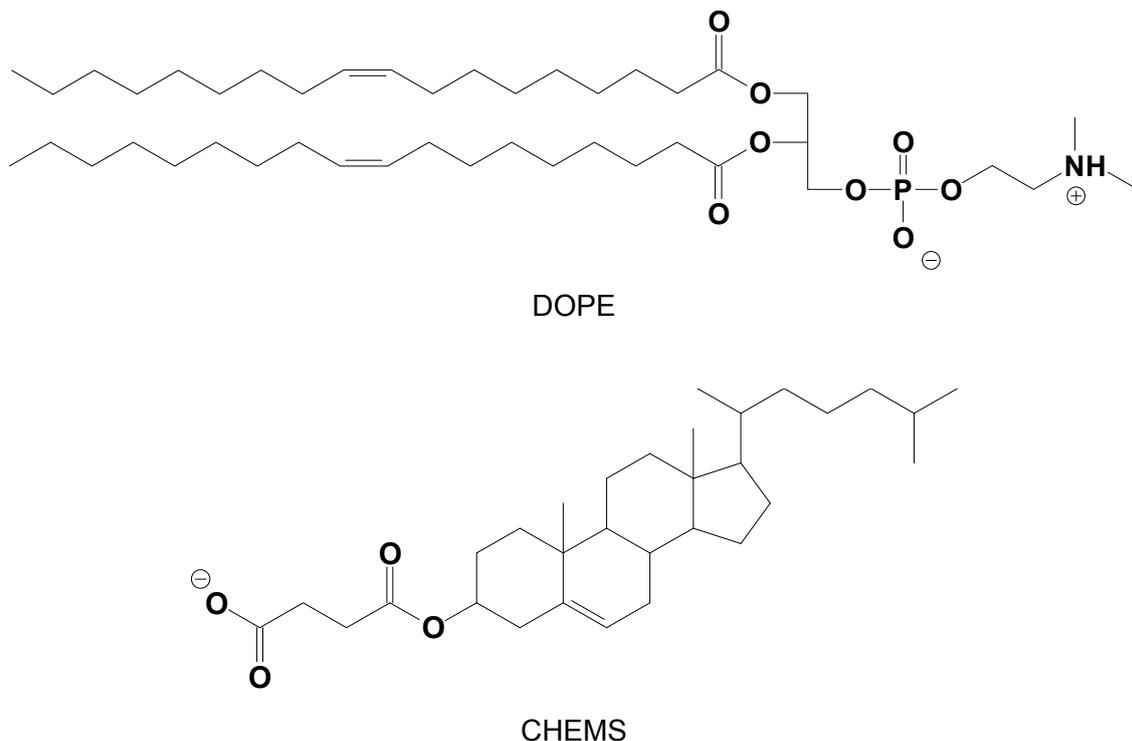
Die erfolgreiche Freisetzung des liposomalen Inhaltes nach Internalisierung in der Zelle unterliegt ebenfalls bestimmten Voraussetzungen. Liposomen werden hauptsächlich über Endozytose in die Zellen aufgenommen, wobei Bereiche der Plasmamembran als Endosomen abgeschnürt werden. Diese transportieren die darin eingeschlossenen Liposomen ins Zellinnere. Im weiteren Verlauf des endosomalen Kreislaufs wären stabile Liposomen und ihr Inhalt der Gefahr des Abbaus in den Lysosomen ausgesetzt, wodurch ihre gewünschte, intrazelluläre Wirkung verloren geht. Um diese lysosomale Degradierung zu verhindern, muss eine rechtzeitige intrazelluläre Freisetzung der liposomalen Wirkstoffe garantiert werden, was zur Entwicklung sogenannter pH-sensitiver Liposomen führte [Connor et al. (1984)], Ellens et al. (1984)].

Diese Liposomen sind bei neutralem pH-Wert stabil, reagieren allerdings mit einer Destabilisierung der liposomalen Membran beim Absinken des pH-Wertes, wie dies bei der Azidifizierung innerhalb der Endosomen als initialen Schritt der Degradierung des endosomalen Inhaltes der Fall ist. Durch Fusion der Liposomen mit der Endosomenmembran setzen sie ihren Inhalt vor Erreichen der späten Endosomen bzw. der Lysosomen in das Zytosol frei [Düzgünes et al. (1985)]. Diese Destabilisierung findet ebenfalls in aziden Umgebungen in Tumorgewebe oder Entzündungsherden statt, in denen eine passive Anreicherung der Liposomen durch das RES stattfindet, sodass auch auf derartige Weise ein unspezifisches Drug Targeting in diese Gewebe erfolgen kann [Nayar et al. (1985)].

Für die Herstellung pH-sensitiver Liposomen können verschiedene Lipide genutzt werden, jedoch haben alle Mischungen die Gemeinsamkeit, sich bei physiologischen pH-Bedingungen von 7,4 in einer lamellaren Phase anzuordnen und bei Senkung des pH-Wertes auf 5,5 bis 6,0 durch ladungsinduzierte Änderung der Molekülanordnung zu destabilisieren. Bei den meisten Untersuchungen bestehen die genutzten pH-sensitiven Mischungen hauptsächlich aus dem fusogenen, zwitterionischen Phosphatidylethanolamin (DOPE) als Grundlipid und einem variablen, sauren Amphiphil, welches durch seine im neutralen pH-Bereich vorhandene Ladung die Bildung von stabilen DOPE-Liposomen fördert (siehe Abbildung 6). Da DOPE im neutralen und sauren pH-Bereich eine konische Form besitzt und eher zur Ausbildung inverser, hexagonaler Phasen neigt, ist der Zusatz dieser amphiphilen Komponenten mit schwach sauren Eigenschaften als Stabilisatoren der Phospholipid-Bilayer notwendig.

In den Anfängen der pH-sensitiven Liposomen wurden als Amphiphile z. B. Palmitoyl-homocystein [Connor et al. (1984)], Ölsäure [Düzgünes et al. (1985), Connor et al. (1986a)] als auch das noch heute genutzte Cholesterol-Hemisuccinat (CHEMS) [Ellens et al. (1984), Sudimack et al. (2002), Júnior et al. [2007]] eingesetzt. Die unzureichende Serumstabilität bildete einen erheblichen Nachteil der ölsäurehaltigen Vesikel. Innerhalb von Minuten trat bei

diesen in Gegenwart von Serum ein Großteil des Liposomeninhalts aus, sodass sie *in vitro* unter physiologischen Bedingungen nicht für den Transport von Wirkstoffen geeignet waren [Connor et al. (1986b), Collins et al. (1989)]. Bei CHEMS hingegen zeigten sich diese Stabilitätsprobleme in Gegenwart von Serum nicht. Im physiologischen pH-Bereich von 7,4 besitzt es durch seine negative Ladung eine große Kopfgruppe (siehe Abbildung 6) und festigt somit die lamellare Anordnung der DOPE-Moleküle durch Reduktion der intermolekularen Abstoßungen der DOPE-Kopfgruppen. Durch Absinken des pH-Wertes unter 5,5 liegt CHEMS allerdings im protonierten Zustand vor und verliert damit seine Ladung, wodurch die Hydratisierung der hydrophilen Kopfgruppe entfällt. Es fällt in seine invers-konische Form, dadurch geht die stabilisierende Fähigkeit auf die DOPE-Bilayer [Ellens et al. (1984)] verloren und die DOPE-Moleküle ordnen sich in ihrer inversen, hexagonalen ( $H_{II}$ ) Phase an. Der Destabilisierung der Liposomenmembran folgt abschließend die Fusion mit der endosomalen Membran, wodurch der liposomale Inhalt freigesetzt wird [Lasic (1998), Peschka-Süss et al. (2003)]



**Abbildung 6:** Chemische Strukturen des fusogenen DOPE und des pH-sensitiven CHEMS, welches nach Protonierung zur Destabilisierung der Liposomenbilayer führt

Durch Abschirmung gegenüber dem Immunsystem mittels PEG-Ketten und die Kopplung monoklonaler Antikörper an diese Liposomen erhält man ein System, welches die Vorteile der IL mit der pH-sensitiven Freisetzung vereint. Somit zeigen sterisch stabilisierte pH-sensitiven IL eine Anreicherung am Wirkort sowie eine Wirkstofffreigabe im Zellinneren nach erfolg-

ter Internalisierung, ohne dass der liposomale Inhalt der Gefahr der lysosomalen Degradation ausgesetzt ist.

Die Kombination aus sterischer Stabilisierung der Liposomen durch den Zusatz von PEG, der Target-Sensitivität oder pH-Sensitivität durch entsprechende Modifizierung der Lipidzusammensetzung und die Nutzung geeigneter Zielsteuerungsmotive sind die grundlegenden Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz von Liposomen als Drug Carrier Systeme. Eine neue Herausforderung für das liposomale Drug Targeting ist die liposomale Gentherapie, bei der Plasmide, Antisensenukleotide oder Gene in Zielzellen eingeschleust werden sollen. Neben den genannten Aspekten kommt hierbei noch die ausreichende Beladung der Liposomen mit den genetischen Materialien als kritischer Faktor zum Tragen.

### 2.3 Methoden der Gentherapie

Die Bekämpfung der Ursachen von Erkrankungen und nicht nur deren Symptome ist ein entscheidendes Ziel der pharmazeutischen Forschung. Seit Ende der 80er Jahre werden große Erwartungen in die Gentherapie als Behandlungsmethode schwerster Erkrankungen gesetzt. Vielen Erkrankungen liegen genetische Defekte zugrunde, die entweder vererbt werden (z. B. Enzymdefekte) oder im Laufe des Lebens durch Veränderungen im genetischen Material entstehen (Tumore, AIDS).

Bei der somatischen Gentherapie versucht man, durch die genetische Veränderung ausdifferenzierter Gewebezellen (Körperzellen = somatische Zellen) des Patienten, diese Krankheiten zu heilen. Dies kann durch das Hinzufügen von genetischem Material erfolgen, welches ein defektes Gen ersetzt, korrigiert oder inaktiviert oder sogar eine neue therapeutische Funktion besitzt. Dabei werden nur erkrankte Zellen genetisch verändert [Morgan et al. (1993)]. Es findet kein Eingriff in die Keimbahn statt, sodass Zellen, die an der Reproduktion des Lebewesens beteiligt sind, nicht betroffen sind. Die Effekte der somatischen Gentherapie bleiben somit auf den behandelten Organismus beschränkt, da die in die Zellen eingebrachten Gene nicht vererbt werden. Die Therapie kann entweder *in vivo* durch Injektion des therapeutischen Gens oder nach Isolation der Patientenzellen *ex vivo* erfolgen, wobei die Zellen nach der Isolation kultiviert, *in vitro* transfiziert und diese modifizierten Zellen dem Patienten wieder injiziert werden.

Anwendung findet die somatische Gentherapie in der Heilung von klassischen Erbkrankheiten, z. B. der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) [Fuloria et al. (2000)], ADA-Defizienz (Adenosin-Desaminase-Mangel) [Meier-Abt et al. (1996), Urmoneit (2001)], erworbenen genetischen Erkrankungen (z. B. chronische Infektionskrankheiten [Blaese et al. (1992)], sowie

multifaktoriellen genetischen Erkrankungen (Tumore, Herz-Kreislaufkrankungen [Meier-Abt et al. (1996)]).

Eine direkte Applikation von Plasmiden als hochmolekulare und polyanionische Moleküle war bisher jedoch nur in wenige Gewebe (Muskelgewebe [Budker et al. (1998)], Leber [Hickman et al. (1994)], Melanome [Yang et al. (1996)] erfolgreich. Die Aufnahme der DNA in die Zelle ist auf direktem Wege kaum möglich, da die äußere Zellmembran ebenso wie die DNA meist negativ geladen ist, was die Abstoßung des applizierten genetischen Materials zur Folge hat [Bally et al. (1999)]. Daher wurden mehrere Methoden entwickelt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA auf diesem Wege zu ermöglichen. Diese lassen sich in physikalische und chemische Methoden sowie den Vektor-vermittelten Gentransport unterteilen.

### 2.3.1 Physikalische Methoden

Die meisten dieser Methoden sind nur unter *in vitro*-Bedingungen möglich. Dazu zählen die ballistische Injektion mit Hilfe einer sog. „gene gun“, wobei 1 bis 3 µm große, mit DNA beschichtete Gold- oder Wolframpartikel auf die Zelle geschossen werden. Weitere physikalische Verfahren sind die Elektroporation sowie die Mikroinjektion. Bei der Elektroporation wird die zu übertragende DNA dem Nährmedium zugefügt, welche die Zellen umgibt. Über kurze Stromstöße werden die Zellmembranen destabilisiert, wodurch die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht wird [Ahlén et al. (2007)]. Bei der Mikroinjektion erfolgt eine direkte Injektion der DNA mittels einer Mikropipette in einzelne Zellen. Dabei werden gute Transfektionsraten erreicht [Davis et al. (2000)]. Die starke Beschädigung des DNA bei der Elektroporation sowie der hohe Aufwand der Mikroinjektion limitieren allerdings diese beiden Methoden.

Bei dem *in vivo*-Verfahren der direkten Injektion wird mit einer Injektionsnadel die nackte DNA direkt in das Zielgewebe, v.a. Muskel und Haut, zur Produktion des gewünschten Proteins appliziert. Allerdings ist noch nicht geklärt, wie die DNA trotz Abstoßung oder möglicher Immunreaktionen in die Zellen gelangt. Von Nachteil ist bei dieser Methode die schlechte Steuerbarkeit der Integration und Expression [Nabel et al. (1993)].

### 2.3.2. Chemische Methoden

Ziel der chemischen Methoden der Gentransfektion ist es, negativ geladene DNA durch den Zusatz positiv geladener Verbindungen zu neutralisieren und zu kondensieren, um somit die Aufnahme in die Zelle zu erleichtern. Sowohl die Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextran- als

auch die Calciumphosphat-Methode kommen nur *in vitro* zur Anwendung [Pari et al. (1997)]. Dabei handelt es sich bei DEAE-Dextran um ein Kohlenhydratpolymer mit positiv geladenen Diethylaminoethylgruppen. Der feine Niederschlag, der nach dem Zusammenfügen der DNA mit DEAE-Dextran oder Calciumphosphat entsteht, wird in das Nährmedium wachsender Zellen gegeben. Über Phagozytose gelangen diese Kondensate schließlich ins Zellinnere [Loyter et al. (1982)].

Im weitesten Sinne kann auch die Transfektion mit Lipiden (Lipoplexe) oder Polymeren (Polyplexe) zu dieser Gruppe gezählt werden, jedoch werden diese in Kapitel 2.3.3.2 näher erläutert.

### 2.3.3 Vektor-vermittelte Transportsysteme für eine optimale Gentherapie

Oftmals bedarf es entsprechender Hilfsmittel, damit das genetische Material in die entsprechenden Zellen gelangt. Dafür ist der Einsatz geeigneter Carrier-Systeme nötig, um die betroffenen Gewebe für eine erfolgreiche systemische Gentherapie in effizientem Maße zu erreichen,

An die genutzten Vektoren werden verschiedene Anforderungen gestellt. Einen idealen Vektor zeichnen folgende Eigenschaften aus: Er sollte für die Zelle (ausgenommen Tumor) nicht toxisch, nicht immunogen und nach Möglichkeit bioabbaubar sein. Desweiteren muss er die DNA vor dem Abbau schützen, stabil während der Lagerung und nach der Applikation sein, sowie eine Zellspezifität besitzen, um nur von den Zielzellen aufgenommen zu werden und somit eine effiziente Genexpression zu erreichen [Huang et al. (1999)].

Nach der intravenösen Applikation erfolgt eine rasche Inaktivierung der Vektoren durch Blutbestandteile, wie z. B. Serumproteine, Lipoproteine [Zelphati et al. (1998)], Opsonine [Roerdink et al. (1983)], das Komplementsystem [Plank et al. (1996)], sowie Nukleasen und durch Aufnahme der Liposomen durch das RES (siehe Kapitel 2.2.1) [Allen et al. (1991)]. Anionische Substanzen adsorbieren an der Oberfläche kationischer Vektoren, wodurch sich Aggregate bilden, die anschließend in ihre Bestandteile zerfallen und abgebaut werden [Li et al. (1998), Li et al. (1999b)]. Bei der Behandlung von Krankheiten des retikuloendothelialen Systems (RES; Leber, Milz, Lunge) kann man sich diesen Sachverhalt zu Nutze machen. Bei den meisten anderen Indikationen ist dies jedoch eher ein Nachteil, da die Plasmide somit den gewünschten Wirkort nicht in genügenden Konzentrationen erreichen, sodass zahlreiche Hindernisse nach der intravenösen Applikation überwunden werden müssen. Durch den Einbau in geeignete Vehikelsysteme (Vektoren), welche möglichst gezielt und effizient über zelleigene Transportmechanismen, wie Endozytose, in die Zielzellen aufgenommen werden, können diese Hindernisse überwunden werden.

Durch die Kopplung von PEG wird eine längere Zirkulationsdauer [Orgis et al. (1999), Li et al. (2005)] erreicht, woraus eine höhere Bioverfügbarkeit und Transfektionseffizienz resultiert. Darüber hinaus sind eine ausreichende Serumstabilität sowie eine quantitative Aufnahme in die Zielzelle Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie. Durch die Ladung, ihre Zusammensetzung und eventuell vorhandene Zielsteuerungsmotive, welche eine Rezeptor-vermittelte Endozytose ermöglichen, wird die Aufnahme der Vektoren beeinflusst.

Die genutzten Carrier-Systeme für die Verabreichung des genetischen Materials können je nach Ursprung in virale und nicht-virale Vektoren eingeteilt werden.

### 2.3.3.1 Virale Vektoren

Die virale Gentherapie, bei denen Gene mit Hilfe rekombinanter Viruspartikel appliziert werden, gehört zu den biologischen Vektorsystemen. Viren können als natürliche Genfähren bezeichnet werden, die die Applikation von Genen im Laufe der Evolution immer weiter optimiert haben [Seet et al. (2002), Rosenkilde et al. (2008)]. Sie schleusen sich in die Wirtszellen ein, um sich in ihnen zu vermehren. Es liegt nahe, sich diese Fähigkeit für die Gentherapie zu Nutze zu machen, wobei modifizierte Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Pockenviren Einsatz finden. Die zur Replikation benötigten viralen Plasmide werden durch das therapeutische Gen ausgetauscht. Neben dem retroviralen Gentransfer, welcher den Großteil der klinischen Studien ausmacht (ca. 50%), wird der adenovirale Gentransport nur in etwa 20% der Studien betrachtet. Dabei können Adenoviren größere DNA-Fragmente (ca. 20 kb) aufnehmen, verglichen mit retroviralen Systemen. Darüber hinaus zeigen adenovirale Vektoren höhere Gentransfereffizienzen und besitzen die Fähigkeit, auch sich nicht-teilende Zellen zu infizieren [Edelstein et al. (2004)].

Bei der cystischen Fibrose wurden bspw. Versuche der Gentherapie mit einem Aerosol durchgeführt. Dabei wurde das sog. Cystis Fibrosis Transport Regulation (CFTR)-Gen, welches für einen Ionenkanal codiert, in einen Adenovirus verpackt und anschließend als Aerosol pulmonal appliziert. Das CFTR-Gen reguliert in der Lunge sowie im Gastrointestinaltrakt den Transport von Chloridionen durch die Zellmembran von Schleimhautepithelzellen. Durch den Gendefekt kommt es zur Eindickung des Sekrets in den Atemwegen. Allerdings wird die Gentherapie durch den zähflüssigen Schleim, der die zu transfizierenden Zellen der Atemwegsepithelien bedeckt, stark limitiert. Darüber hinaus ist nur ein geringer Teil (ca. 2%) der Zellen teilungsaktiv und somit fähig, das zugeführte Gen in ihrem Zellkern aufzunehmen, was die Therapie zusätzlich stark erschwert [Fuloria M et al. (2000)].

Trotz guter Effizienz finden virale Vektoren *in vivo* eher selten Anwendung. Nachteile dieser Vektoren bestehen in der unzureichenden Sicherheit bei der Herstellung und Anwen-

dung, die limitierende Größe der therapeutischen Gene sowie der starken Gefahr von Entzündungsreaktionen und der hohen Immunogenität nach Applikation [Yang et al. (1994)]. Eine wiederholte Applikation kann aufgrund der primär verursachten Immunreaktion des Körpers auf die abgeschwächten Viren zu Komplikationen führen [Fenske et al. (2002), Breunig et al. (2008)]. Hinzu kommen die Möglichkeit der zufälligen Integration viraler Gene in das Gastgenom oder die Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene, die Gefahr der Mutagenese sowie die mögliche Rekombination mit endogenen Viren und die daraus resultierende Entstehung von genetisch veränderten replikationsfähigen Tochterviren [Sadelain (2004)]. Diese Einschränkungen der viralen Gentransportsysteme hinsichtlich Immunogenität und Toxizität limitieren eine wiederholte *in vivo*-Applikation und macht sie zum Teil unmöglich.

Der Einsatz nicht-viraler Vektoren könnte aufgrund des Fehlens dieser Gefahren eine aussichtsreichere Alternative für die Gentherapie darstellen [Felgner et al. (1987), Hyde et al. (2000)].

### 2.3.3.2 Nicht-virale Gentherapie mittels chemischer Vektoren

Nicht-virale Vektoren besitzen längst nicht so gute Gentransfereffizienzen, dagegen sind sie sicherer und einfacher in der Handhabung. Das Grundprinzip beruht bei diesen Systemen zumeist auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativen Ladung der (Plasmid-)DNA sowie der kationischen Ladungen der Transporter (Nanopartikel, Polymere, Lipide), wodurch sich Komplexe ausbilden [Felgner et al. (1997)]. Durch die Kondensation der polyanionischen DNA mit den kationischen Substanzen bilden sich kompakte Strukturen [Kabanov et al. (1995)], sodass durch diese Komplexierung der DNA-Fragmente eine systemische Applikation möglich wird. Je nachdem, welche Substanzen dafür verwendet werden, bezeichnet man die daraus resultierenden Komplexe als: Lipoplexe (DNA/kationische Lipide), Polyplexe (DNA/kationisches Polymer), Lipopolyplexe (DNA/Liposom/Polymer). Anschließend kann die kondensierte DNA mit weiteren (z. B. anionischen) Molekülen wie z. B. Lipiden (SPLP, AVE) umhüllt werden, wobei die verwendeten Lipide i. d. R. als Liposomen eingesetzt werden. Durch diese Modifizierungen, wie z. B. dem Einschluss in eine liposomale Hülle oder auch durch Kopplung von Antikörpern, können diese Komplexe spezifiziert werden, um einen optimalen Transport mit Schutz des genetischen Materials und eine zielgerichtete Freisetzung am Ort des Geschehens zu erreichen. Dies führt zur Steigerung der Effizienz des nicht-viralen Gentransfers.

Der Anteil der Studien zum liposomalen Gentransfer ist allerdings im Vergleich zu den viralen Vektorsystemen mit 15% eher gering [Boulikas (1998)]. Neben Lipoplexen und Polyplexen [Duncan et al. (2006)] kamen in unterschiedlichen Untersuchungen auch sog.

„solid lipid nanoparticles“ (SLN) [Li et al. (2005), Rudolph et al. (2004), Zwiorek et al. (2005), Pedersen et al. (2006)], sowie kationische Liposomen [Gao et al. (1992)] und komplexere liposomale Transfersysteme, wie z. B. die sog. „stabilized plasmid lipid particles“ (SPLP) zum Einsatz [Wheeler et al. (1999), Zhang et al. (1999)].

### *Komplexe aus kationischen Lipiden und genetischem Material (Lipoplexe)*

Forscher nutzen seit den späten 70er Jahren Liposomen für den Gentransfer [Fraleley et al. (1982)]. Nach der Einführung der kationischen Lipiden, welche mit DNA Komplexe bilden, sah man in diesen eine Möglichkeit für eine leichte und effiziente liposomale Genfreisetzung und somit eine Alternative zu den viralen Vektoren [Felgner et al. (1987)]. Durch ihre positive Ladung sind diese Lipide fähig, mit Plasmiden effizient Komplexe zu bilden und darüber hinaus die Bindung an Zellen mit einer negativen Oberflächenladung (Bsp. Endothelzellen) über elektrostatischen Wechselwirkungen zu fördern [Matsui et al. (1997)]. Anschließend werden diese Komplexe hauptsächlich durch Adsorptions-vermittelte Endozytose aufgenommen und das genetische Material freigesetzt, wobei es bei den kationischen Lipiden zu einer Destabilisierung der endosomalen Membran kommt. Weiterhin induzieren sie einen Austausch anionischer Lipide, so dass es zu einem Wechsel der Lipide zwischen den Lipiddoppelschichten (von einer in die andere) kommt. Dabei wird die DNA durch Ionenpaarbildung aus kationischem und anionischem Lipid in das Zytoplasma freigesetzt [Xu et al. (1996)].

Im Zytoplasma besteht jedoch die Gefahr, dass ungeschützte DNA durch Nukleasen (zytosolische Nukleasen; HWZ 50 bis 90 Minuten) abgebaut wird, sodass sie auch nach der Freisetzung aus dem Endosom geschützt werden muss. Dies ist aber für die Aufnahme der DNA in den Nukleus wieder von Nachteil, da sie für diesen Prozess wahrscheinlich frei vorliegen muss [Zabner et al. (1995)]. Eine Variante die DNA sowohl vor zytosolischen Nukleasen zu schützen als auch den Weg in den Kern zu „ebnen“, kann z. B. durch die Verwendung von PEI ermöglicht werden, welches eine gewisse puffernde Wirkung ausüben kann, sodass Nukleasen aufgrund des nicht erreichten, optimalen sauren pH-Wertes inaktiv bleiben [Breunig et al. (2008), Sonawane et al. (2003)].

Man nimmt an, dass die DNA über spezielle Transportprozesse [Ledley et al. (1995)] in den Kern aufgenommen wird, da die Kernporen eine sehr geringe Größe (< 24 nm) aufweisen. Diese speziellen Transportmechanismen (über Kernlokalisationssequenzen (Nuclear Localizing Sequences, NLS) gesteuert) könnte man auch für einen verbesserten Transport in den Zellkern ausnutzen.

DOTMA wurde als erstes kationisches Lipid 1987 von Felgner hergestellt und seine Transfektionseffizienz beschrieben [Felgner et al. (1987)]. Seit dem wurden immer wieder

neue kationische Verbindungen synthetisiert, um auch Probleme wie Toxizität, Seruminstabilität und Bioabbaubarkeit zu lösen. Dabei erhielt man folgende kationische Strukturen:

- Cholesterolderivate, wie DC-CHOL
- Quartäre Ammoniumverbindungen, wie DOTMA, DOTAP, DDAB, DODAC, DOGS, LPLL

Der Aufbau dieser Lipide ist gekennzeichnet durch eine positiv geladene Kopfgruppe, welche meist eine quartäre Ammoniumfunktion darstellt, und einem hydrophoben Molekülteil. Dabei sind der hydrophile und hydrophobe Teil über einen Linker miteinander verbunden, der je nach Verbindung unterschiedlich ist. Im DOTMA besteht dieser Linker bspw. aus Ethergruppen, im DDAB findet man eine Verlinkung über Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen und im DOTAP ist es eine Esterfunktion [Chesnoy et al. (2000)]. Diese Unterschiede in der Verlinkung führen auch zu Unterschieden in der chemischen Stabilität, was sich allerdings in einer besseren Bioabbaubarkeit sowie einer verringerten Toxizität bemerkbar macht.

Um den DNA-Lipidkomplex (Lipoplexe) zu erhalten, wird das kationische Lipid meist im Überschuss eingesetzt. Der positive Ladungsüberschuss sowie die resultierenden Strukturen konnten durch verschiedene analytische Methoden aufgeklärt werden. Es erfolgt die Ausbildung von heterogenen Komplexen, mit hochgeordneten, multilamellaren Strukturen aus Lipiddoppelschichten und DNA-Einzelschichten [Rädler et al. (1997)]. Die räumliche Struktur der Lipoplexe gibt Anlass für viel Diskussion. Bei der Strukturaufklärung wurden zylindrische sowie flache lamellare Konstruktionen gefunden, es wurden aber auch Hexagonalstrukturen [Koltover et al. (1998)] oder inhomogene Strukturen aus DNA, überzogen mit einer Lipiddoppelschicht, sowie Liposom/DNA Aggregate gezeigt [Sternberg et al. (1994)].

Bei der Herstellung der Lipoplexe müssen mehrere kritische Momente überwunden werden, die Einfluss auf die Struktur der erhaltenen Lipoplexe haben, z. B. das optimale DNA-Lipidverhältnis [Xu et al. (1999)] oder die Reifung des Komplexes. Darüber hinaus spielen die Auswahl der eingesetzten Lipide und der Zelllinie [Birchall et al. (1999)], die gewählte Konzentrationen und Inkubationszeiten der Komplexe auf die Zellen eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Versuche [Caplen et al. (1995)].

Bei Versuchen mit Lipoplexen zeigte sich jedoch eine schlechtere Transfektionseffizienz verglichen mit viralen Vektoren. Es stellte sich heraus, dass diese durch die Zugabe von sogenannten Helferlipiden, wie DOPE, DOPC, Cholesterol oder einer Kombination aus diesen erhöht werden konnte. Jedoch gibt es keinen einheitlichen Zusammenhang, da dieser Effekt auch von anderen Faktoren wie der gewählten Zelllinie oder den Versuchsbedingungen (Medium, Serumzugabe, *in vivo*- oder *in vitro*-Versuche) überlagert ist [Jarnagin et al. (1992)].

Das käufliche Lipofectin® (Fa. Invitrogen) ist ein Beispiel für solch eine Ready-To-Use-Mischung, welche aus DOTMA und DOPE besteht. Weitere Kombinationen, die als getrockneter Lipidfilm oder als Lyophilisat verfügbar sind, wären LipofectAMINE® (Fa. Invitrogen), Trojene® (Fa. Avanti Polar Lipids) sowie Transfectam® und TransFast™ (beide von der Firma Promega).

Trotz der jahrelangen Forschungen im Bereich der kationischen Lipide ist es noch nicht gelungen, Verbindungen zu synthetisieren, die eine höhere Transfektionseffizienz aufweisen als virale Systeme [Gaucheron et al. (2007)]. Aufgrund ihrer Ladung und Größe werden die Lipoplexe sehr schnell aus dem Blutkreislauf eliminiert, so dass auch dieser Faktor dazu führt, dass nur ein Teil der applizierten Lipoplexe den Zielort erreicht [Fenske et al. (2002)]. Als Folge muss mehr Substanz appliziert werden, um eine therapeutische Wirksamkeit zu erreichen. Dabei erweist sich jedoch die dosisabhängige Toxizität der großen, positiv geladenen Komplexe aus DNA und Lipid als ein deutliches Problem, was sich in Gewebeschädigungen und Entzündungsreaktionen im Zielgewebe äußert. Charakteristisch sind Infiltrate neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, erhöhte Werte der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Die Zytokinaktivierung führt im weiteren Verlauf durch Transkriptionshemmung oder Apoptoseauslösung zu einer Inaktivierung der applizierten Gene, wobei jedoch eine spezifische Immunantwort oder die Komplementaktivierung ausbleiben [Scheule et al. (1997)]. Diese Erscheinungen treten nach der Applikation der Komplexe auf. Werden die Komponenten separat injiziert, kommt es nicht zu diesen Toxizitätsreaktionen [Li et al. (1999a)].

Neben der Synthese neuer und besser verträglicherer, kationischer Lipide ist weiterhin die Entwicklung von effizienten Vektoren ein Ziel, um das Problem der Toxizität zu lösen. Einen neueren Ansatz bildet die Anwendung von multivalenten kationischen Lipiden oder bioabbaubaren, kationischen Polymeren (z. B. PEI), welche die Toxizität minimieren und die Transfektionseffizienz steigern können [Gaucheron et al. (2007), Breunig et al. (2008), Breunig et al. (2007)].

#### *Stabilized plasmid lipid particles – SPLP*

Durch die Kombination der positiven Transfektionseigenschaften von Lipoplexen und der Variabilität von Liposomen gelangte man Ende der 90er Jahre zu den sog. SPLP, den „stabilized plasmid lipid particles“ [Wheeler et al. (1999), Mortimer et al. (1999)]. SPLP bestehen aus einem Lipoplex-Kern, der von einer liposomalen Hülle umgeben wird. Sie kombinieren die Eigenschaften der Liposomen mit der Transfektionswirkung der Lipoplexe und bieten somit eine sichere und effektivere Möglichkeit des Gentransportes an. Gleichzeitig werden die toxischen Eigenschaften der kationischen DNA-Lipid-Komplexe reduziert. Wheeler et

al. gaben ihren Präparationen neben dem fusogenen DOPE zusätzlich noch ein PEG-Ceramid als Grundlipid hinzu, um gleichzeitig eine Abschirmung gegenüber immunogenen Angriffen nach der Applikation und somit eine Verlängerung der Zirkulationshalbwertszeit zu erreichen. Darüber hinaus schützt die liposomale Hülle das eingeschlossene Plasmid vor einem Abbau durch Serumnukleasen.

Aufgrund der Aggregationsneigung des negativ geladenen PEG-PE, welches in vielen liposomalen Systemen der sterischen Abschirmung dient, musste bei diesem System im Gegensatz zu normalen, einfachen Liposomen ein PEG-Ceramid anstelle des PEG-PE eingesetzt werden. Während der Herstellung der SPLP würde sich das Ladungsverhältnis zwischen DOTAP und der Plasmid-DNA durch das negative PEG-PE stark verändern. Die Neigung von PEG-PE sich an DOTAP anzulagern stört die Bildung der Lipoplexe, sodass das konventionelle PEG-PE einen entscheidenden, negativen Einfluss auf die Transfektionseffizienz des entstehenden Systems zeigt [Hong et al. (1997)].

Allerdings wurde auch mit dem PEG-Ceramid-haltigen SPLP von Wheeler et al. nur ein unzufriedenes Transfektionsergebnis erreicht, sodass weitere Verbesserungen nötig waren. Es stellte sich heraus, dass das Transfektionspotential der SPLP entscheidend von der Länge des PEG-Ceramids abhängig war. PEG-Ceramide mit kürzeren hydrophoben Ketten neigen schneller dazu, durch Dissoziation von der liposomalen Oberfläche die Bilayer der SPLP zu destabilisieren, wodurch eine bessere Aufnahme der eingeschlossenen Plasmid-DNA in die Zielzelle ermöglicht wird [Zhang et al. (1999), Mok et al. (1999)]. Der Einsatz kurzkettiger Ceramide kann allerdings wiederum zu einer unzureichenden Stabilität führen, was die Transfektionseffizienz wiederum minimiert. Weitere Untersuchungen wurden mit PEG-Derivaten unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge durchgeführt [Ambegia et al. (2005)]. Dabei stellte sich heraus, dass auch bei diesen PEG-Derivaten mit zunehmender Kettenlänge eine steigende Stabilität und daraus resultierend eine längere Zirkulationshalbwertszeit sowie letztendlich eine bessere Genexpression verbunden ist. Der Zusatz eines geeigneten PEG-Derivates bildet somit eine grundlegende Voraussetzung für einen erfolgreichen Transport der eingeschlossenen Plasmid-DNA in das gewünschte Zielgewebe wie z. B. Entzündungsgebiete, Tumore oder Metastasen.

Die Genexpression erreichte im Falle von konventionellen, PEG-stabilisierten SPLP stets höhere Ausmaße verglichen mit nackter DNA oder Komplexen, allerdings ist sie für einen therapeutischen Erfolg immer noch zu gering [Tam et al. (2000)]. Ein Grund für diese unzureichende Transfektionsergebnisse ist die schlechte, intrazelluläre Freisetzung des DNA-Lipid-Komplexes aus den Endosomen [Sandhu et al. (2005)]. Durch die Aktivität von Protonenpumpen sinkt der pH-Wert innerhalb des Kompartiments auf einen pH von 5. Bei diesem pH-Wert erreichen die Enzyme des Lysosoms ihr Optimum. Nach dem Zusammenschmelzen beider intrazellulärer Kompartimente erfolgt die Degradation des Vesikelinhaltes (z. B.

Abbau der DNA durch Nukleasen) [Zabner et al. (1995)]. Idealerweise sollte die DNA vor der Azidifizierung und der lysosomalen Degradation aus dem Vehikel sowie dem Endosom freigesetzt werden. In initialen Pilotexperimenten gelangte S. Kessner die Variation der Liposomenhülle unter Einsatz des Cholesterol-Hemisuccinat (CHEMS) zu pH-sensitiven SPLP ohne Einfluss auf den einzuschließenden DNA-Lipid-Komplex [Kessner (2004)] (siehe Kapitel 2.2.4). Als Helferlipid für die Fusion mit der Endosomenmembran diente, wie auch in anderen Studien, das DOPE [Litzinger et al. (1992), Farhood et al. (1995)]. Diese SPLP mit sterisch stabilisierter, pH-sensitiver Liposomenhülle sollten den liposomalen Inhalt effektiv vor der lysosomalen Degradation bewahren. Durch Ladungsänderung des CHEMS bei absinkendem pH-Wert sowie der Fusionsneigung des DOPE mit der Endosomenmembran sollten die liposomal verpackten Lipoplexe verstärkt in das Zytoplasma gelangen.

Durch die Kombination der positiven Internalisierungseigenschaften liposomaler Systeme gekoppelt mit geeigneten Zielsteuerungsmotiven [Weeke-Klump et al. (2007)] und der Modifikation der Liposomenzusammensetzung, welche eine pH-sensitive Freisetzung der Plasmid-Lipid-Komplexe aus dem Endosom in das Zytoplasma zulässt, konnte eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden [Kessner (2004)].

All diese Betrachtungen zeigen, wie umfangreich sich die Probleme bei der Entwicklung eines optimalen, nicht-viralen Vektors gestalten, um solche „Trojanischen Pferde“ noch transfektionseffizienter und verträglicher für die Zielzellen zu machen. Von einer klinischen Anwendung sind diese nicht-viralen Systeme jedoch noch weit entfernt.

## 2.4 Ziel der Arbeit

Die Expression der endothelialen Selektine ist eng an das Entzündungsgeschehen gekoppelt. Daher stellt E-Selektin ein ideales Targetmolekül für eine gezielte Akkumulation von sog. zielgerichteten Drug Delivery Systemen im Gefäßsystem des Entzündungsgebietes dar. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, E-Selektin-gerichtete IL herzustellen und hinsichtlich ihrer Targetbindungsfähigkeit unter geeigneten *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen.

Da eine alleinige Akkumulation von IL am Ort des Entzündungsgeschehens noch keinen therapeutischen Effekt garantiert, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Entwicklung und Optimierung E-Selektin-gerichteter target-sensitiver IL. Diese sollten durch die extrazelluläre Freisetzung eines Chemokinantagonisten an der Endothelzelloberfläche eine Akkumulation dieses Antagonisten erreichen, wodurch die Abfolge der einzelnen Teilprozesse der Adhäsionskaskade von Leukozyten beeinträchtigt werden sollte. Hierfür war es notwendig,

geeignete Zellsysteme für die Wirkung des Chemokinantagonisten zu etablieren, um dann die Effekte einer liposomalen Freisetzung zu quantifizieren.

In einem weiteren Ansatz sollten aufbauend auf dem vaskulären Targeting der Liposomen am E-Selektin neue Prinzipien des Gentransports untersucht werden. Ausgehend von konventionellen SPLP sollten diese durch Antikörperkopplung zur Targetierung des E-Selektins befähigt werden. Weiterhin sollte durch die Modifikation der Lipidzusammensetzung eine pH-Sensitivität erreicht werden, die eine verbesserte Plasmidfreisetzung nach der zellulären Aufnahme gewährleisten sollte.

Als Basis für die Anwendung von E-Selektin-gerichteten Drug Delivery Systemen mussten Voruntersuchungen zur Stimulierbarkeit, zum Ausmaß der E-Selektin-Expression und zur Targetierbarkeit des E-Selektins an Endothelzellen (bEnd3) durchgeführt werden.

Aufgrund der perspektivischen Anwendung der target-sensitiven Drug Delivery Systeme *in vivo* wurde die Targetierung der Liposomenpräparationen sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter dynamischen Scherflussbedingungen charakterisiert.

Die pH-sensitiven SPLP sollten dagegen primär an einem statischen Zellsystem näher untersucht werden, wobei in initialen Untersuchungen gut zu transfizierende Karzinomzellen für die Optimierungsversuche zum Einsatz kamen, bevor das Potential dieser SPLP zur genetischen Intervention an den schwer zu transfizierenden murinen Endothelzellen getestet wurde. Nach diesen *in vitro*-Untersuchungen, sollten abschließende *in vivo*-Versuche am Modell des entzündeten Mausohr die Transfektionsfähigkeit der pH-sensitiven SPLP unter physiologischen Bedingungen klären.

Durch Untersuchung dieser beiden sensitiven, liposomalen Systeme sollten zwei unterschiedliche Wege aufgezeigt werden, welche potentielle Ansatzpunkte für die antiinflammatorische Therapie darstellen könnten.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

##### 3.1.1 Zellkultur

###### A

anti-biotin IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-mouse CD62E IgG	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD62E IgG (PE-gelabelt)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

###### C

CASY-Ton <sup>®</sup> -Lösung	Schärfer System GmbH, Reutlingen
Casy <sup>®</sup> cups	Schärfer System GmbH, Reutlingen
Cellstar <sup>®</sup> Gewebekulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
Cellstar <sup>®</sup> TC-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
Cellstar <sup>®</sup> Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International, Hereford, U.K.

###### D

D-MEM („high glucose“)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen, rund	Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost, Leipzig
Dimethylsulfoxid	ACROS Organics, Geel, Belgien

###### E

EDTA-Lösung 0,2 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Einmalspritzen Injekt 10ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

###### F

FACS Clean <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon <sup>®</sup> 2054 Röhrchen	Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FITC goat anti-rat IgG	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

###### G

L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------------	--------------------------------------

###### H

hIL2 (rekombinant)	Fa. Boehringer
Holotransferrin (human)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**I**


---

IL-1 $\beta$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Immunglobulin G (human)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**K**


---

Kryoröhrchen PP	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
-----------------	-----------------------------------

**M**


---

Monovette <sup>®</sup> -Serumröhrchen	Sarstedt AG&Co, Nürnbrecht
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**N**


---

NEA	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
-----	---

**P**


---

PBS (mit Ca und Mg)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**R**


---

RPMI 1640-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
------------------	--

**S**


---

Sterilfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
$\mu$ -Slide I	ibidi <sup>®</sup> , München

**T**


---

TNF- $\alpha$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

**W**


---

6-Well-Platten (farblos)	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
96-Well-Mikrotiter-Platten (schwarz)	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
96-Well-Mikrotiter-Platten (farblos)	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen

**3.1.2 Chemikalien und Materialien****A**


---

Ammoniaklösung (26%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amino-PEG <sub>2000</sub> -DSPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

**B**


---

Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biotinylated-DPPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

**C**


---

Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
6-Carboxyfluoreszein	ACROS Organics, Geel, Belgien
Chloroform	Riedel-de H�en, Seelze
Cholesterol	Serva, Heidelberg
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien

**D**


---

DC-Chol/DOPE (DC30)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DiO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNFB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
DOPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland
DOTAP	Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland ACROS Organics, Geel, Belgien

**E**


---

EDC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
-----	--------------------------------------

**F**


---

Folin-Ciocalteu`s Phenol-Reagens	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
----------------------------------	--------------------------------------

**H**


---

HEPES (99,5%)	Merck KGaA, Darmstadt
HOECHST 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HOECHST 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
hP-Selektin	R&D Systems, Minneapolis, USA

**I**


---

IgG (from human serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------------------------	--------------------------------------

**K**


---

Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kunststoffpartikel	AERES GmbH, Berlin
Kupfersulfat	ACROS Organics, Geel, Belgien

**M**


---

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methoxy-PEG <sub>2000</sub> -DPPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

**N**


---

Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	Janssen CHIMICA, Beerse, Belgien
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumtetraborat	Merck KGaA, Darmstadt

**O**


---

Oktylglucosid	Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland
---------------	--

**P**


---

Phosphatstandard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------------------	--------------------------------------

**S**


---

Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum
Schwefelsäure (95 bis 97 %)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Sepharose <sup>®</sup> 4B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Servapor <sup>®</sup> Dialysiermembran	Serva Electrophoresis, Heidelberg
SPC	Lipoid GmbH, Ludwigshafen

**T**


---

Trichloessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
-------------------	--------------------------------------

**V**


---

vMIP-II	Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland
---------	--

**3.1.3 Geräte****A**


---

Analysenwaage Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Autosizer	Malvern Instruments 2c
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen

**C**


---

Casy <sup>®</sup> 1 Modell TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
-------------------------------	---------------------------------



### 3.2 Liposomenpräparation

Die Liposomen für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden nach zwei verschiedenen Präparationsmethoden hergestellt, wobei der jeweilige Gesamtlipidgehalt und die Lipidzusammensetzung je nach Fragestellung variierten.

Für die target-sensitiven und target-*insensitiven* Liposomen wurde die Hydratationsmethode angewandt, für die Herstellung der sogenannten stabilized plasmid lipid particles (SPLP) wurde die Detergenzmethode unter Verwendung einer Dialyseapparatur genutzt.

Zusammensetzungen der untersuchten Liposomen

target-sensitiv

DOPE	96 bis 98 mol%
mPEG-PE	1 bis 3 mol%
Ankerlipid	1 mol%
Farbstoff	0,5 mol%

target-*insensitiv*

SPC	60 mol%
Chol	29,5 mol%
mPEG-PE	5 mol%
Ankerlipid	5 mol%
Farbstoff	0,5 mol%

Stabilized plasmid lipid particles (SPLP)

pH-sensitiv

DOPE	57 mol%
CHEMS	38 mol%
Cyanur-PEG-PE	4,75 mol%
Farbstoff	0,25 mol%

pH-*insensitiv*

DOPC oder DPPC	57 mol%
CHEMS	38 mol%
Cyanur-PEG-PE	4,75 mol%
Farbstoff	0,25 mol%

### 3.2.1 Hydratationsmethode

Für die Herstellung der Liposomen nach der Hydratationsmethode wurden die benötigten Mengen der in Chloroform gelösten Lipide in einem Rundkolben vermischt und anschließend das Lösungsmittel bei 35 bis 40°C am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Dabei bildete sich ein Lipidfilm an der Glaswand, welcher für eine weitere Stunde unter Vakuum getrocknet wurde. Nun folgte die Hydratation des Filmes mit der entsprechenden Menge des relevanten wässrigen Dispersionsmediums, wobei die Verwendung von Glasperlen und mehrmaliges Vortexen die Dispergierung des Lipidfilmes unterstützten.

Da sich die target-sensitiven Liposomen unter diesen Bedingungen nur ungenügend formten, wurde die Mischung einer Ultraschallbehandlung von drei Zyklen à 10 Sekunden unterzogen.

Nach Bildung einer homogenen Dispersion wurde die weitere Liposomenbildung durch eine maschinelle Schüttelprozedur (100 bis 150 Schüttelbewegungen pro Minute) über einen Zeitraum von 24 bis 36 h bei Raumtemperatur unterstützt, wobei sich vorrangig multilamellare Vesikel (MLV) ausbildeten

Je nach Hydratationsmedium erfolgte im Anschluss eine Extrusion durch verschiedene Polycarbonatmembranen definierter Porengröße oder eine erneute Ultraschallbehandlung, um aus den gebildeten multilamellaren Vesikel Liposomen einer Größe von 80 bis 150 nm zu erhalten.

Die target-*insensitiven* Liposomen ohne fluoreszierenden Inhalt wurden jeweils zehnmal durch Polycarbonatmembranen absteigender Porengröße extrudiert (Hand-Extruder). Es wurde mit einer 200 nm-Membran begonnen, darauf folgten 100 nm und 50 nm-Membranen, woraus Liposomenmischungen einer sehr engen Größenverteilung resultierten.

Im Gegensatz dazu wurden die target-*insensitiven* mit fluoreszierendem, wässrigem Dispersionsmedium unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt, um Liposomen der gewünschten Größe zu erhalten. In ähnlicher Weise, jedoch nicht unter Eiskühlung, wurden die target-sensitiven Liposomen homogenisiert, um eine gleichmäßigere Verteilung der Vesikel zu erhalten. Die so behandelten Liposomen zeigten allerdings keine so feine Größenverteilung, wie die extrudierten Präparationen.

### 3.2.2 Detergenzmethode

Da mit der Hydratationsmethode nur geringe Einschlusseffizienzen erzielt werden und sich diese Methode weniger für temperaturempfindliche Stoffe (Bsp. DNA) eignet, kam für den Einschluss der Plasmide die Detergenzmethode zur Anwendung.

Bei dieser Methode wird der Lipidfilm mittels einer Detergenzlösung in Mizellen aufgenommen. In einer Konzentration von 0,2M wurde Oktylglucosid als Detergenz genutzt, welches anschließend durch Dialysieren aus der Lipidlösung entzogen wurde, wodurch sich die liposomale Hülle um den Lipid-Plasmid-Komplex legte und diesen einschloss. Die genutzte Dialysiermembran Servapor<sup>®</sup> besaß eine Porengröße von 25Å, was nur den Durchtritt von Stoffen mit einem maximalen Molekulargewicht von 14.000g/mol zuließ. In die Dialysekammer eingespannt, kam es durch kontinuierliches Umspülen mit Puffer (150mM NaCl, 5mM HEPES, pH 7,8) zum allmählichen Auswaschen des Oktylglucosids aus der Lipidlösung. Diese Prozedur verlief über einen Zeitraum von 48 Stunden, wobei nach 9 bis 12 Stunden sowie nach weiteren 12 Stunden der Puffer durch frische Dialysierlösung ersetzt wurde. Die Geschwindigkeit des umströmenden Puffers (250ml/h), sowie die Dauer der Dialyse waren für die Einschlussmenge und die Liposomengröße von entscheidender Bedeutung.

Im Vorfeld der Detergenzdialyse wurde das GFP-Plasmid mit einem kationischen Lipid komplexiert. Zum Einsatz kamen das DOTAP und das DC-Chol, welches in einer Mischung mit DOPE im Verhältnis 30: 70mol% (DC30) genutzt wurde. Für eine Gesamtlipidkonzentration von 20µmol/ml wurden 200µg GFP-Plasmid mit 1,2mg kationischem Lipid (DOTAP oder DC-Chol (DC30)), entsprechend 1,94µmol, vereint. Nach einer einstündigen Inkubation in der sich der Komplex quantitativ bildete, wurde die Lösung mit den in 0,2M Oktylglucosid-Lösung gelösten Lipiden (Konzentration 20µmol/ml) vereint und in die Dialyseapparatur pipettiert. Durch das kontinuierliche Umspülen des HEPES-Puffers über 48 Stunden wurde das Detergenz aus der Lipid-Komplex-Mischung entfernt.

Im Anschluss wurden die gefüllten SPLP direkt, d.h. ohne die von Wheeler praktizierte Trennung der nichteingeschlossenen Plasmide durch eine anionische DEAE-Sepharose, mittels Dichtegradientenzentrifugation von leeren Vesikeln abgetrennt. Während die leeren SPLP zwischen der 1%igen und 2,5%igen Saccharoseschicht zu finden waren, sammelten sich in der Regel 90% bis 95% der aufgetragenen SPLP-Menge zwischen den Schichten der 10%igen und 2,5%igen Saccharoselösungen an. Die voneinander getrennten Fraktionen wurden anschließend vorsichtig mit einer feinen Pasteurpipette aus dem Zentrifugengefäß entnommen. Es folgte eine erneute Dialyse der gefüllten SPLP über 12 Stunden, um die Saccharose aus dieser Fraktion zu entfernen, die leeren SPLP wurden verworfen. Nur die Plasmid-enthaltenden Liposomen kamen zum Einsatz, welche durch nachfolgende Kopplung mit entsprechenden Liganden versehen wurden.

Die Dichtegradientenzentrifugation kam allerdings nicht bei der Präparation der SPLP für die Transfektionsversuche an den bEnd3 zum Einsatz. Die SPLP-Ansatzmengen waren sehr gering und dieser Zwischenschritt hätte zu einer zu großen Verdünnung im weiteren Präparationsablauf geführt, woraufhin der Versuch an den Zellen mit einem zu großen, für die Zellen nicht verträglichen Volumen hätte durchgeführt werden müssen. Da die Erfahrung zeigte,

dass 90 bis 95% der Vesikel gefüllt vorlagen, wurde auf die Dichtegradientenzentrifugation verzichtet und der Anteil in der Berechnung der zum Einsatz kommenden Konzentrationen berücksichtigt.

### 3.3 Kopplung von Liganden an die Oberfläche von Liposomen

Zwei verschiedene Kopplungsmethoden kamen zum Einsatz, bei denen der verwendete Ligand durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an die Oberfläche der Liposomen angeheftet wurde.

Beim Einsatz des Ankers N-Glut-PE erfolgte die Kopplung unter Ausbildung einer Carbonsäureamid-Bindung nach Carbodiimid-Aktivierung bei neutralem pH-Wert, während die Anbindung über den Cyanur-Anker ohne zusätzliches Aktivierungsreagenz im basischen Bereich, pH 8,8 durchgeführt wurde.

Unabhängig vom jeweils verwendeten Lipid-Anker wurde für die Kopplung der Liposomen ein molares Ausgangsverhältnis Protein:Lipid von 1:1.000 gewählt.

#### 3.3.1 Präparative Darstellung des Lipid-Ankers Cyanur-PEG<sub>2000</sub>-PE (Cyanur-PEG<sub>2000</sub>-DSPE)

Die Herstellungsmethode von Bendas et al. diente als Grundlage für die Darstellung des Cyanur-PEG<sub>2000</sub>-PE, wobei die Synthese etwas modifiziert wurde [Bendas et al. (1999)]. Als Ausgangssubstanz diente das Amino-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>), welches nur noch in einem letzten Schritt mit Cyanurchlorid in Anwesenheit von N,N-Diisopropylethylamin als Hilfsbase umgesetzt wurde. Über diesen Cyanurchloridrest wurden die entsprechenden verwendeten Proteine in einer Kopplungsreaktion durch nukleophile Substitution an den Lipid-Anker gebunden.

Für die Synthese wurde ein Molverhältnis der Ausgangssubstanzen Amino-PEG<sub>2000</sub>-DSPE, Cyanurchlorid und Hilfsbase von 1:1,5:1 gewählt. Dafür wurden 50 mg Amino-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (1 mM) in 18 ml trockenem Chloroform gelöst und daraufhin 5 mg Cyanurchlorid (1,5 mM) sowie 2,3 mg N,N-Diisopropylethylamin hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 72 h bei Raumtemperatur unter Rühren wurde die quantitative Umsetzung dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-DC-Platten F<sub>254</sub> mit dem Fließmittelgemisch Chloroform/Methanol/Wasser (64,5/35/0,5) unter den Bedingungen einer Kammersättigung überprüft. Die Detektion erfolgte mittels Bromthymolblau und Molybdänlösung, wobei nach dem Besprühen mit Bromthymolblau ein Trocknungsschritt der Platte nötig war, bevor zum spezifi-

schen Nachweis der Phospholipide, sowie aller Phosphorsäurediester und Phosphorsäuretriester die Platte mit Molybdänlösung imprägniert wurde. Nach dieser Sprühreihenfolge wurden die Verbindungen als dunkelblaue Flecke sichtbar. Nach quantitativer Umsetzung wurde das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt und der entstandene Lipidfilm mehrfach gewaschen, bis die Hilfsbase vollständig aus dem Reaktionsansatz verschwunden war. Der trockene Lipidfilm des Cyanur-PEG<sub>2000</sub>-PE wurde abschließend in einer entsprechenden Menge trockenem Chloroform gelöst, sodass eine Stammlösung der Konzentration von 1 µmol/ml resultierte.

Dieser in die Liposomen eingebaute Lipid-Anker wurde vor der Proteinkopplung durch eine pH-Wert-Erhöhung durch Gelchromatographie der Liposomen über eine Sepharose 4B-Säule gegen einen Boratpuffer pH 8,8 als Waschpuffer aktiviert. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Protein bzw. Antikörper hinzugegeben und über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert [Bendas et al. (1999)].

Im Anschluss daran wurde der nicht gebundene Antikörper durch eine erneute gelchromatographische Trennung aus der Liposomendispersion entfernt. Bei diesem chromatographischen Schritt wurde ein Puffer mit neutralem pH-Wert (pH 7,4) verwendet.

#### Zusammensetzungen der Sprühreagenzien

##### Bromthymolblau-Sprühreagenz

200 mg	Bromthymolblau
400 mg	Kaliumhydroxid
ad 1.000 ml	Wasser

Das Bromthymolblau wurde in wenigen Millilitern Ethanol gelöst, das Kaliumhydroxid hinzugegeben und alles in 1.000 ml Wasser gelöst.

##### Molybdänspray-Lösung

###### Lösung 1

312 g	konz. Schwefelsäure
10 g	Molybdäntrioxid (MoO <sub>3</sub> )
ad 250 ml	Wasser

Die konzentrierte Schwefelsäure wurde auf 250 ml Wasser verdünnt, das Molybdäntrioxid hinzugefügt und das Gemisch bis zum vollständigen Auflösen des Molybdäntrioxid gekocht.

## Lösung 2

125 ml

450 mg

Lösung 1

Molybdänpulver

Das Molybdänpulver wurde der Lösung 1 hinzugefügt und das Gemisch 15 Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert und der Bodensatz abgetrennt.

Je 5 ml der Lösung 1 und Lösung 2 wurden vermischt und mit 10 ml Wasser verdünnt. Dieses Gemisch war nach dem Abkühlen als Spray einsatzfähig.

### 3.3.2 Verwendung des Lipid-Ankers N-Glut-PE (N-Glutaryl-DPPE)

Das Ankerlipid wurde von der Firma Avanti Polar Lipids bezogen und für die Stammlösung in Chloroform ebenfalls in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/ml}$  gelöst.

Bei der Herstellung der Liposomen wurden Pufferlösungen mit einem pH-Werten von 7,4 genutzt. Vor der Kopplung fand eine vierstündige Aktivierung dieses Ankers bei Raumtemperatur durch EDC (6  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{mol}$  Lipid) bei einem pH-Wert von 7,4 statt, wobei für eine Konzentration von 1  $\mu\text{mol}$  N-Glut-PE 6 mg des EDC eingesetzt wurde. Nach Zugabe des Aktivierungsreagenz wurde die Liposomenmischung für sechs Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die entsprechende Menge des zu koppelnden Proteins in Form einer Lösung dazugegeben und für weitere 12 bis 16 Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene Protein wurde durch Gelchromatographie mit einer Sepharose<sup>®</sup> 4B-Säule abgetrennt und dabei die Liposomen mit einem Puffer eines pH-Wertes um 7,4 eluiert.

## 3.4 Charakterisierung der Liposomen

### 3.4.1 Größenbestimmung

Die Größe der Liposomen wurde mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) während sowie nach der Liposomenpräparation kontrolliert. Dieses dynamische Streulichtverfahren ermöglicht die qualitative als auch quantitative Bestimmung der Partikelgrößen und ihrer Verteilung. Für die Bestimmung der Vesikelgröße wurden je nach Konzentration der Liposomen 15  $\mu\text{l}$  bis 30  $\mu\text{l}$  in einer Küvette in 3 ml sterilfiltriertem Puffer aufgenommen und anschließend vermessen.

In drei Zyklen mit jeweils 10 Einzelmessungen wurde die dynamische Lichtstreuung durch Erfassen der Intensitätsverteilung am Malvern Autosizer 2c gemessen. Dabei gilt der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung. Diese lag bei den Liposomenproben je nach Zusammensetzung zwischen 0,100 und 0,250 lag, wonach die Liposomen dispersionen als monodispers bewertet werden konnten.

### 3.4.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der an der Liposomenoberfläche gekoppelten Proteinmenge wurde mit einem modifizierten Peterson-Lowry-Assay durchgeführt, welcher auf einer Verknüpfung der Biuretreaktion mit der Folin-Reaktion beruht [Peterson (1977)]. Diese Kombination führte zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit, da sich der unspezifischen Biuretreaktion eine Indikatorreaktion anschloss. Desweiteren wurde der Proteinanteil bei dieser Methode direkt bestimmt, wobei die anwesenden Phospholipide zu keiner weiteren Störung führten. Dabei bildete sich im Alkalischen aus dem Kupfer-haltigem Biuretreaenz in Verbindung mit vorhandenem Eiweiß ein rot-blauer Komplex. In der anschließenden Reaktion wurde nach Zugabe des Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz durch das im Protein enthaltene Tyrosin die Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure reduziert.

Zuerst wurde eine BSA-Stammlösung hergestellt, welche durch Verdünnung auf einen Bereich von 1 bis 12 µg/ml für die Erstellung einer Kalibriergerade diente. In Eppendorfgefäßen wurden die BSA-Standard- und die Liposomenproben mit destilliertem Wasser ad 1 ml aufgefüllt und anschließend mit 50 µl einer 0,3%igen Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und vermischt, was zu einer Lyse der Liposomen führte. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 µl 70%ige Trichloressigsäure hinzugefügt und erneut gut durchmischt. Bei 4 °C wurden die Proben 20 Minuten bei 11.000 RPM zentrifugiert und anschließend der Überstand schnell dekantiert. Das Pellet wurde in 1 ml der Lösung D resuspendiert und erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz und eine Farbentwicklung des blaugefärbten Komplexes bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Lichtausschluss. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte durch Absorptionsmessung in einem UV-VIS-Spektrophotometer bei 750nm gegen die BSA-Standard-Reihe im Konzentrationsbereich von 0 bis 12 µg Protein. Eine Mehrfachbestimmung wurde durchgeführt.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

Lösung A

0,5g	Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )
1g	Natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )
ad 100ml	Wasser

Lösung B

20g	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
4g	NaOH
ad 1.000ml	Wasser

Lösung C

Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz

Lösung D

49 Teile der Lösung B und 1 Teil der Lösung A

BSA-Standard-Lösung 200  $\mu\text{g}$  BSA/ml

Natriumdesoxycholat-Lösung 0,3%ig

Trichloressigsäure 70%ig

Lagerung der Lösungen bei 4°C.

### 3.4.3 Phosphatquantifizierung

Der Gesamtlipidgehalt einer Liposomenprobe wurde über den Phosphatgehalt mit Hilfe des Bartlett-Assays bestimmt [Bartlett (1959)]. Für die Bestimmung in der Probe war es essentiell, die Phosphorsäureesterbindung vor der Messung zu spalten, wofür das entsprechende Kohlenstoffgrundgerüst zerstört werden musste. Durch Zugabe von Perchlorsäure wurde das Phosphat der Phospholipide zu Phosphorsäure oxidiert. Dieses Phosphat war nun in der Lage, in dieser stark sauren Lösung in Gegenwart von Ammoniumionen mit Molybdänsäure einen Komplex zu bilden, welcher sich bei niedrigen Phosphatkonzentrationen löste. Anschließend wurde ein Reduktionsmittel hinzugegeben, wodurch sich das Molybdänblau bildete, welches wiederum photometrisch quantifiziert werden konnte. Als Kalibriergerade diente eine Verdünnungsreihe einer Phosphat-Standard-Lösung im Konzentrationsbereich von 2 bis 65nM Phosphat. Die Standard- sowie die Liposomenproben wurden in den entsprechenden Mengen in Mikroreagenzgläser pipettiert. Daraufhin wurden 200  $\mu\text{l}$  70%ige

Perchlorsäure hinzugefügt, die Gläser mit Aluminiumfolie verschlossen und die Proben 30 Minuten in einem Heizblock auf 180 bis 190 °C erhitzt. Nach einer Abkühlphase von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2 ml Molybdatsäurelösung dazugegeben. Es folgte die Zugabe von 250 µl einer 10%igen frisch hergestellten Ascorbinsäurelösung und die Farbentwicklung durch ein erneutes Erwärmen der Proben für 10 Minuten im siedenden Wasser. Nach dem Abkühlen der Proben unter fließendem Wasser wurden sie in Küvetten überführt und die Quantifizierung durch Absorptionsmessung bei 812 nm als Mehrfachbestimmung durchgeführt.

#### Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen

##### Molybdat-Reagenz

2,2g	Ammoniummolybdat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)
14,3ml	konzentrierte Schwefelsäure
ad 100ml	Wasser

Phosphat-Standard-Lösung 0,65 mM (mmol/ml)

Ascorbinsäure-Lösung 10 %ig

Perchlorsäure 70 %ig

Lagerung der Lösungen bei 4 °C.

#### 3.4.4 Serumstabilität

Die Untersuchungen der Serumstabilität wurden mit frischem, humanem Serum durchgeführt. Für die Gewinnung des Serum wurden Monovette<sup>®</sup>-Röhrchen der Firma Sarstedt genutzt. Durch Zentrifugation wurden die geronnenen festen Blutbestandteile abgetrennt und anschließend das überstehende Serum abgetrennt und bis zum Versuch im Kühlschrank gelagert.

Die Liposomen wurden entsprechend des Kapitel 3.2 hergestellt, wobei als Fluoreszenzmarker 6-CF eingeschlossen und seine Freisetzung durch Messung der Fluoreszenz im Polarstar (Em. 485 nm, Ex. 520 nm) verfolgt wurde.

Es wurden verschiedene Serumkonzentrationen (15 %ig, 75 %ig, 100 %ig) sowie der Einfluss der gekoppelten Antikörper untersucht. Als Referenzmedium diente PBS.

In die entsprechenden Wells einer schwarzen Greiner 96-Well-Platte wurden 100 µl des Serums gewünschter Konzentration oder PBS vorgelegt, anschließend mit Hilfe einer Multiwellpipette die Liposomen in mehrere Wells einer Reihe gleichzeitig hinzugegeben und die

Platte sofort der Messung zugeführt. Der Freisetzungsverlauf von 6-CF als Marker der Stabilität wurde über 24 Stunden fluoreszenzspektroskopisch verfolgt.

### 3.5 GFP-Transfektionsexperimente

#### 3.5.1 Transformation kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$

Als Transformation wird die Übertragung von freier, löslicher Plasmid-DNA auf ein Empfänger-Bakterium (*E. coli*) bezeichnet. Allerdings besitzen *E. coli* keine natürliche Transformationskompetenz und müssen somit durch chemische oder physikalische Methoden künstlich kompetent gemacht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten *E. coli* DH5 $\alpha$  erhielten ihre Transformationskompetenz mit Hilfe eines chemischen Verfahren, bei dem eine Suspension von *E. coli* bei 4°C mit Calciumchlorid-Lösung behandelt wurde. Danach konnten die kompetenten *E. coli* bei –80°C gelagert werden, ohne ihre Transformationskompetenz zu verlieren.

Im Vorfeld wurden die Agar-Platten hergestellt, indem der nach dem Autoklavieren auf 45 bis 50°C abgekühlte LB-Agar mit einer Ampicillinlösung (50 mg/ml) auf eine Konzentration von 50  $\mu$ g/ml eingestellt wurde. Nach dem Ausgießen lagerten sie bis zur Verwendung im Kühlschrank.

Nach dem Auftauen der kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte die Transformation mit dem Plasmid pcDNA3-GFP (pcDNA3-pMCV1,4-GFP) durch ein Hitzeschockverfahren. Dafür wurden 100  $\mu$ l der *E. coli*-Suspension mit 1  $\mu$ l einer Plasmidlösung (1 ng/ $\mu$ l) versetzt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach unverzüglich 45 Sekunden lang in ein Wasserbad mit 45°C gehalten, wodurch die Transformation begann. Anschließend lagerte der Ansatz erneut zwei Minuten auf Eis, woraufhin 0,5 ml 42°C warmes SOC-Medium in das Eppendorfcap pipettiert wurden. Durch die nun folgende einstündige Inkubation bei 37°C und 225 bis 250 RPM wurde die Bildung von  $\beta$ -Lactamasen angestoßen, die für das Überleben der *E. coli* auf dem ampicillinhaltigen Agar unentbehrlich waren. Danach wurden mit einem Drigalskispatel jeweils 150  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf einer Agar-Platte mit Hilfe eines Drehfußes kreisförmig verteilt. Die behandelten Platten wurden abschließend über Nacht (16 bis 18 Stunden) bei 37°C inkubiert und bei Bedarf am nächsten Morgen zur weiteren Lagerung in den Kühlschrank gelegt.

Für die Weiterkultivierung wurden die Kolonien ausgewählt, die eine gleichmäßig runde Optik aufwiesen. Pro Platte wurden jeweils zwei Kolonien in ein Falconröhrchen mit 12 ml sterilem LB-Medium und 12  $\mu$ l Ampicillin (50 mg/ml) durch Auspicken mit Hilfe einer Impföse aus dem Agarboden überführt. Mit schräg befestigten Deckeln wurden die Falconröhrchen

acht Stunden bei 37°C und 200 RPM geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterienkulturen in je einen sterilisierten 2-Liter-Erlenmeyerkolben gefüllt mit 250ml sterilem LB-Medium und 250µl Ampicillin geschüttet und diese für weitere 16 Stunden bei 37°C und 200 RPM kultiviert. Am folgenden Tag konnte die transformierte bakterielle DNA in ausreichender Menge isoliert werden.

### 3.5.2 Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA

Vor der Zentrifugation der Bakterienkultur als Vorbereitungsschritt für die Isolierung der DNA wurde bei der ersten Präparation ein Glycerolstock angelegt, aus dem für die folgenden Präparationen geringe Mengen für den Ansatz der Kulturen entnommen wurden, sodass die Transformation der *E. coli* nur einmal durchgeführt werden musste. Für die Herstellung eines Glycerolstocks wurden 0,9ml der im 2-Liter-Erlenmeyerkolben befindlichen Lösung entnommen und mit 300µl einer sterilen Glycerollösung 60% versetzt. Diese 1,2ml Lösung wurden in ein Eppendorfcap gegeben und in flüssigem Stickstoff gelagert. Es wurden mehrere Glycerolstocks angefertigt.

Nach der Herstellung des Glycerolstocks wurde die verbliebene Menge der Bakterienkultur 15 Minuten bei 4°C und 6.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 10ml RNase-haltigem Resuspensionspuffer aufgenommen, bis zur Homogenität vermischt und in ein kleines 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte die Zugabe von 10ml des Lysispuffer, woraufhin durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Gefäßes gut gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Parallel dazu wurden die Säulen durch Aufgabe und Durchfließen von 30ml des entsprechenden Puffers für den eigentlichen Isolierungsschritt vorbereitet.

Nach der fünfminütigen Inkubation wurde die Mischung mit 10ml Präzipitationspuffer versetzt, erneut gut geschüttelt und 10 Minuten bei 15.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig aus dem Zentrifugengefäß entnommen und auf die vorbereitete Säule pipettiert. Nachdem die Flüssigkeit vollständig durchgelaufen war, wurde die nun mit der DNA beladene Säule mit 60ml Waschpuffer gespült. Danach erfolgte die Elution der DNA mittels des Elutionspuffers. Das DNA-haltige Eluat wurde in einen kleinen Zentrifugenröhrchen aufgefangen, anschließend mit 10,5ml Isopropanol (100%ig) versetzt und die Mischung 30 Minuten bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet mit 5ml Ethanol gewaschen. Eine abschließende fünfminütige Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C schloss sich an. Der Ethanol wurde verworfen, das reine DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 500

bis 1.000 µl Puffer aufgenommen (je nach Größe des Pellets) und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Mittels UV-Absorptionsmessung bei 260nm wurde nach jeder Isolierung die Konzentration gemessen, wobei die Reinheit der Plasmidlösung durch den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt wurde. Dieser Quotient musste dabei einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben, um die DNA-Lösung als rein zu bezeichnen.

### 3.5.3 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der eingeschlossenen DNA-Menge konnte mit Hilfe des Farbstoffs HOECHST durchgeführt werden. HOECHST lagert sich dabei spezifisch an den Basen Adenin und Thymin innerhalb der Desoxyribonucleinsäure an [Latt et al. (1976)].

Es standen zwei verschiedene HOECHST-Farbstoffe (33342, 33258) zu Verfügung, die in Einganguntersuchungen miteinander verglichen wurden, um das für dieses System empfindlichere Reagenz zu bestimmen. Zusätzlich wurde der Einfluss des ausgewählten Detergenz Oktylglucosids auf die Messung untersucht. Aufgrund der zusätzlichen Ethoxygruppe im Molekül des HOECHST 33342 besitzt dieses lipophilere Eigenschaften und kann so bei einer Versuchsdurchführung ohne Detergenzzugabe besser durch die liposomale Membran in das Vesikelinnere hindurch diffundieren.

Für die Untersuchungen wurde eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 1 bis 100 µg/ml hergestellt. Von jeder Konzentration wurden je 100 µl pro Well einer schwarzen 96-well-Platte pipettiert. Die gewählten Proben wurden ebenfalls in den entsprechenden Konzentrationen ad 100 µl in die Wells gegeben. Anschließend wurde jedes Well entweder mit 100 µl einer 0,2M OG-Lösung (in HEPES-Puffer, 5mM) oder reinem HEPES-Puffer versetzt. Die Zugabe der Oktylglucosidlösung lysierte die in den entsprechenden Wells enthaltenen Vesikel, während sie in den mit reinem HEPES behandelten Wells intakt blieben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden in die Wells entweder 100 µl einer HOECHST 33342- oder 100 µl einer HOECHST 33258-Lösung pipettieren. Die Konzentrationen der beiden HOECHST-Lösungen betrug jeweils 10mM. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten wurde die Fluoreszenz am Polarstar bestimmt (Ex. 355 nm, Em. 460 nm)

### 3.6 Zellkultur

In Anlehnung an das murine *in vivo*-Entzündungsmodell (inflamed mice ear model) wurden für die statischen und dynamischen *in vitro*-Untersuchungen zur Optimierung der Target-sensitivität die murine Gehirnkapillar-Endothelzelllinie (bEnd3) sowie murine Th1-Zellen ausgewählt.

Zur Optimierung der Transfektionsversuche kamen darüber hinaus Zellen einer Ovarialkarzinomzelllinie (A2780s – cisplatinsensitiv) zur Anwendung.

#### 3.6.1 Kultivierung der bEnd3-Zellen

Für die Kultivierung der murinen Gehirnkapillar-Endothelzellen wurde D-MEM („high glucose“) verwendet, welchem folgende Substanzen zugesetzt wurden:

- 10% inaktiviertes, fetales Kälberserum
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärent wachsende Endothelzellen, welche bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert wurden. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt, wodurch nicht mehr adhärente, tote Zellen entfernt wurden.

Nach konfluentem Wachstum wurden die Zellen gesplittet, wobei die Zellen keine vollständige Konfluenz erreichen durften, da sonst der Anteil an abgestorbenen Zellen zu groß wurde. Die optimale Dichte der Zellen lag bei 80 bis 90%. Um die Zellen zu splitten wurde das Medium aus den Gewebekulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit einer geringen Menge 0,2%iger EDTA-Lösung benetzt und vierminütig bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus der Kulturflasche herausgelöst und die Zellsuspension bei 4 °C und 1.200 RPM für vier Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Casy-Ton<sup>®</sup> bestimmt und daraufhin die entsprechende Menge an Zellen entnommen. Je nachdem, ob es sich um eine Weiterzuchtung handelte oder ein Zellversuch durchgeführt werden sollte, wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension entweder auf neue Kulturflaschen oder auf 96-Well-Mikrotiter-Platten verteilt.

### 3.6.2 Kultivierung der Th1F12-Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, die in RPMI 1640-Medium mit folgenden Zusätzen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit stehend kultiviert wurden:

- 10% inaktiviertes, fetales Kälberserum
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% nicht-essentielle Aminosäuren

Darüber hinaus benötigten diese Zellen rekombinantes humanes IL-2 als Wachstumsfaktor, welcher in einer finalen Konzentration von 5ng/ml dem Medium hinzugesetzt wurde. In regelmäßigen Abständen von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen in neue, mittlere Kulturflaschen umgesetzt. Dazu wurden sie in 50ml Falcon-Röhrchen überführt, bei 1.000 RPM für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend nach der Zellzahlbestimmung  $7,5 \times 10^6$  Zellen in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und weiter kultiviert.

### 3.6.3 Kultivierung der A2780s-Zellen

Die Zelllinie A2780 wurde aus einem humanen epithelialen Ovarialkarzinom gewonnen. Bei den A2780s handelt es sich um die Cisplatin-sensitive Ovarialkarzinomzelllinie. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit folgenden Zusätzen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert:

- 10% inaktiviertes, fetales Kälberserum
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin

Bei diesen Ovarialkarzinomzellen handelt es sich ebenfalls um adhärent wachsende Zellen, bei denen der Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage stattfand. Bei Erreichen einer ungefähr 90%igen Dichte des Zellrasens wurden die Zellen in ähnlicher Weise wie die bEnd3 gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit einer geringen Menge 0,2%iger EDTA-Lösung behandelt und nach einer kurzen Inkubationsdauer von vier Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> aus den Gewebekulturflaschen herausgelöst. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl mittels Casy-Ton<sup>®</sup> bestimmt wurde, konnten die gewünschten Zellmengen aus der Suspension entnommen werden und je nach weiterer Verwendung in neue Gewebekulturflaschen oder in 96-Well-Platten umgesetzt werden.

### 3.6.4 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Um Zellen dauerhaft aufzubewahren, wurden sie in einem Einfriermedium bestehend aus 10% (V/V) DMSO und 90% (V/V) FKS in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das FKS wurde dafür im Vorfeld durch Erwärmen auf  $56^{\circ}\text{C}$  für die Dauer von 30 Minuten inaktiviert.

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen gelöst in Falconröhrchen überführt, zentrifugiert und das Pellet anschließend in einer entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml resultierte. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels CASY<sup>®</sup>1 Modell TT. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Kryoröhrchen aufgeteilt, wobei in jedes Röhrchen 1 ml eingefüllt wurde. Durch kontrollierte Kühlung um  $-1^{\circ}\text{C}$  pro Minute durch Verwendung des Cryo  $1^{\circ}\text{C}$  Freezing Containers wurden die Kryoröhrchen über einen Zeitraum von vier Stunden langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  temperiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in den Stickstofftank.

Zur Revitalisierung wurde der Inhalt der Kryoröhrchen bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad kurz erwärmt. Der noch nicht vollständig aufgetaute Inhalt des Cryoröhrchens wurde anschließend rasch in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt, um eine schnelle Verdünnung des toxischen DMSO zu erreichen und in 1 ml frischem Medium aufgenommen. Es schloss sich die Zentrifugation von vier Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und die Aufnahme des Zellpellets in 1 ml frischem Medium an. Nach einer Zellzahlbestimmung mittels CASY<sup>®</sup>1 Modell TT erfolgte die Verteilung der Zellsuspension auf Kulturflaschen, gefüllt mit frischem Nährmedium.

Im Gegensatz zu den bEnd3- und A2780s-Zellen, bei welchem kein weiterer Zusatz zum Nährmedium nötig war, wurde das Zellpellet der Th1F12-Zellen nach dem Zentrifugationsschritt bei  $1.000 \times g$  für fünf Minuten in frischem Medium unter Zugabe von  $10 \mu\text{l}/10 \text{ml}$  IL-2 als Wachstumsfaktor aufgenommen und in eine mittlere Zellkulturflasche überführt wurde.

### 3.6.5 Ermittlung der Zellzahlen und Zellgrößen mittels CASY<sup>®</sup>1 Modell TT

Die Ermittlung der Zellzahl und der Zellgröße erfolgte nach der Zentrifugation mit Hilfe des Gerätes CASY<sup>®</sup>1 Modell TT. Nach Aufnahme des Pellets in 2 ml frischem Nährmedium wurden  $20 \mu\text{l}$  der Zellsuspension in 10 ml sterilfiltrierter CASY<sup>®</sup>ton-Lösung pipettiert. Pro Probe wurden zwei Messzyklen durchgeführt, wobei die Zellsuspension mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt wurde.

Durch Anlegen einer Spannung über zwei Platinelektroden an der Kapillare handelt es sich aufgrund der Füllung mit Elektrolytlösung um einen elektrischen Leiter mit konstantem Stromfluss. Dieser besitzt darüber hinaus einen definierten Widerstand. Über die Änderung des Widerstandes erfolgt während der Messung die Ermittlung der Zellgröße. Dabei fungie-

ren intakte Zellen als Isolatoren, welche beim Durchtritt durch die Kapillare deren Querschnittsfläche minimieren und somit zu einem Anstieg des elektrischen Widerstandes führen. Als Maß des Zellvolumens dient dabei die Höhe der Widerstandsänderung.

### 3.6.6 Bestimmung der Wachstumsraten der Endothel- und Ovarialkarzinomzellen

Die Bestimmung der Wachstumsraten der Zellen bildete einen wichtigen Schritt als Grundlage für die Durchführung der Transfektionsversuche. Dafür kam ein modifizierter SRB-Assay zum Einsatz [Papazis et. al (1997)]. Dieser Assay stellte eine einfach durchzuführende und dennoch sehr empfindliche kolorimetrische Methode dar, wobei der Gesamtproteingehalt von Zellen mit Hilfe des Farbstoffs Sulforhodamin B bestimmt wurde. Dabei lagert sich dieser Farbstoff an die Zellproteine und kann nach einem abschließenden Waschschritt durch die Absorptionsmessung bei 595nm quantifiziert werden, wobei zwischen der Zellzahl und der Absorption ein linearer Zusammenhang besteht [Skehan et. al. (1990)]. Die Wachstumsraten wurden sowohl für die bEnd3 als auch für die A2780s über einen Zeitraum von sechs Tagen bestimmt. Die Zellen wurden dafür in sechs transparente 96-well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei die Zellzahlen pro Reihe variierten. Die Belegung der Platten pro Reihe (A-G) pro Well betrug 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 15.000 und 20.000 Zellen in 200µl Medium. Die Belegung der sechs Platten jeder Zelllinie war gleich. Während der Kultivierung fand jeden Tag ein Mediumwechsel statt. Pro Tag wurde je eine Platte pro Zelllinie weiterbehandelt, wobei am ersten Tag eine Wartezeit von drei Stunden sowohl für die bEnd3 als auch für die A2780s eingehalten werden musste, um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen einer weiteren bEnd3-Platte wurden nach 12 Stunden fixiert. Danach folgte die weitere Platten-Präparation der Zellen beider Linien in Abständen von 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach dem Aussetzen der Zellen in die Platten. Dafür wurde das Medium entfernt und jedes Well mit 100µl PBS gespült. Es schloss sich die Zellfixierung an, wofür in jedes Well vorsichtig 50µl einer 10%igen TCA pipettiert wurden. Nach einer einstündigen Inkubation der Platten bei 4°C wurde die TCA entfernt und daraufhin jedes Well fünfmal mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend trockneten die Platten über Nacht an der Luft und wurden bis zur Färbung im Kühlschrank zwischengelagert. Diese Prozedur wiederholte sich jeden Tag für eine weitere Platte. Nachdem alle Platten vorbereitet wurden, erfolgte die Färbung. Dafür wurde in jedes Well 100µl einer 0,4%igen SRB-Lösung (in 1%iger Essigsäure) pipettiert. Nach einem Einwirkungszeitraum von 20 Minuten bei 20°C wurde dieser Farbstoff entfernt und anschließend jedes Well fünfmal mit 100µl 1%iger Essigsäure gespült. Abschließend erfolgte das Herauslösen des Farbstoffes aus dem Zellrasen durch 30-minütiges Schütteln in 200µl 10mM TRIS und die Absorptionsmessung bei 590nm am

Polarstar. Eine zusätzliche Messung bei 695nm wurde durchgeführt (Hintergrundrauschen) und dieser Wert anschließend von den erhaltenden Messwerten bei 590nm abgezogen.

### 3.7 Liposomales E-Selektin-Targeting

#### 3.7.1 E-Selektin-Targeting *in vitro* unter statischen Bedingungen

Bei diesen Experimenten wurde das Targeting von anti-E-Selektin-gekoppelten IL untersucht. Es wurden zum einen normale SPC-Liposomen verwendet, die mit unterschiedlichen Ankern zur Antikörperkopplung versehen wurden. Zum anderen wurde die Bindungsfähigkeit der target-sensitiven Liposomen untersucht, da die Bindung der initiale Schritt der Freisetzung des Liposomeninhaltes an der Zelloberfläche darstellt.

Die Liposomen wurden dafür nach der Hydratationsmethode hergestellt, wobei die normalen SPC-Liposomen mit DiO und die target-sensitiven Liposomen mit Rhodamin-PE als lipophilen Farbstoff versehen wurden. Der Einbau der Farbstoffe in die Phospholipidbilayer erlaubt die Quantifizierung der Bindung der Liposomen an der Zelloberfläche.

Die Liposomen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben hergestellt. Um den Liposomen ihre Spezifität für E-Selektin zu verleihen, wurde ein Teil der Liposomen mit einem anti-E-Selektin-mAb gekoppelt, der andere Teil mit einem unspezifischen Protein versehen. So sollten auch unspezifische Effekte beobachtet und berücksichtigt werden.

Die bEnd3 wurden zwei Tage vor dem Versuch in schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten umgesetzt und kultiviert. Dafür wurden die Zellen mit EDTA aus den Kulturflaschen herausgelöst und in einer Menge von 26.000 bis 27.000 Zellen in 200µl pro Well auf die Platten verteilt. Nach 6, 18 und 30 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das Medium vorsichtig aus den Wells entfernt wurde und durch 200µl frisches Medium ersetzt wurde.

Am Tag des Versuches erfolgte zunächst eine vierstündige Stimulation der Zellen mit IL-1β (10ng/ml) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das IL-1β-haltige Medium entfernt und neues Medium hinzugegeben, woraufhin die Liposomenzugabe in den entsprechenden Mengen ad 200µl erfolgte. Eine Inkubation von einer Stunde bei 4°C schloss sich an. Danach wurde die Liposomen-Medium-Mischung vorsichtig abgesaugt, jedes Well mit 100µl sterilem PBS-Puffer gewaschen, erneut mit frischem Medium gefüllt und abschließend der Messung am Polarstar (DiO: Ex. 485nm, Em. 520nm; Rhodamin: Ex. 520nm, Em. 590nm) zugeführt.

### 3.7.2 E-Selektin-Targeting *in vitro* unter dynamische Bedingungen

Um Wechselwirkungen der target-sensitiven Liposomen mit den Zellen unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurden Experimente mit Hilfe einer Durchflussapparatur durchgeführt. Diese bestand aus zwei Kammern, die durch zellbewachsene Glasplättchen verschlossen werden konnten. So war das laminare Überströmen einer Zellschicht mit Liposomenmedium unter gleichzeitiger mikroskopischer Auswertung möglich.

Die Zellen wurden zwei Tage vor dem Beginn des Kammerversuches auf Glasplättchen umgesetzt und bis zum Versuch auf diesen kultiviert. Dafür kam eine 6-Well-Platte zum Einsatz. Pro Well wurde mittels eines Mediumtropfens je ein Plättchen fixiert und dieses mit 50.000 Zellen/50  $\mu$ l Medium versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig mit weiteren 100  $\mu$ l Medium direkt auf dem Plättchen verdünnt und vorsichtig kreisförmig verteilt, sodass das Plättchen flächendeckend mit der Zellsuspension benetzt wurde. Diese Prozedur wiederholte sich für alle Plättchen, woraufhin die Platte verschlossen und vorsichtig in den Inkubator gestellt wurde, um ein Herunterlaufen der Zellsuspension und anschließendem Unterlaufen der Plättchen zu vermeiden. Die Plättchen wurden nun zwei Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei nach sechs Stunden in jedes Well vorsichtig 3 ml frisches Medium pipettiert wurde. Ein weiterer Mediumwechsel folgte nach 12 und 24 Stunden, wobei das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 3 ml neues ersetzt wurde.

Am Tage des Versuches erfolgte vier Stunden vor Beginn die Stimulation der ausgewählten Plättchen. Dafür wurde das Medium aus den Wells entfernt und anschließend mit 3 ml IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  haltigem Medium (je 10 ng/ml) gefüllt. Die unstimulierten Zellen wurden dagegen nur mit frischem Medium versetzt. Eine Inkubation von vier Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> schloss sich an. Nach dieser Zeit wurde das Stimulationsmedium entfernt, die Plättchen einmal mit Medium gespült und anschließend vorsichtig in die Kammern eingespannt. Bei den unstimulierten Plättchen war dieser Spülvorgang nicht nötig.

Die Liposomen wurden nun in einer Konzentration von 0,25  $\mu$ mol/ml Medium mittels einer Walzenpumpe (Durchflussgeschwindigkeit 0,4 ml/min) in einem geschlossenen Kreislauf ununterbrochen über einen Zeitraum von 60 Minuten über die Zellen geführt, sodass sie in direkten und kontinuierlichen Kontakt mit diesen treten konnten. Nach 15, 30 und 60 Minuten wurde der Kreislauf für einige Minuten unterbrochen, die Kammern mit Medium gespült und die Bindung der Liposomen an den Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop festgehalten. Ein initiales Bild vor dem Versuch diente als Blindwert.

### 3.7.3 E-Selektin-Targetierung *in vivo*

Diese Versuche wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. W. H. Boehncke in der Dermatologie des Klinikum der Johann-Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt von Dr. Ralf Ludwig durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen wurde das entzündungsspezifische E-Selektin-Targeting von anti-E-Selektin-gekoppelten SPC-Liposomen in einem geeigneten Mausmodell untersucht.

Die Liposomen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben hergestellt. DiO diente als Fluoreszenzlabel. Die Kopplung des anti-E-Selektin-mAbs erfolgte gemäß Kapitel 3.2., die Kopplung von Albumin diente zur Herstellung von Blindliposomen, um unspezifische Effekte auswerten zu können.

Für die Versuche wurden männliche, 6 bis 10 Wochen alte Mäuse verwendet (Charles River, Sulzfeld (Deutschland)) und wie folgt behandelt: Um eine allergene Kontaktdermatitis (CHS – DNFB-induced contact hypersensitivity) zu erzeugen, wurde am ersten Tag 75 µl einer 0,5%igen DNFB-Lösung (2,4-Dinitro-1-fluorobenzen) auf den Rücken der Mäuse aufgetragen, wobei das DNFB in einer Mischung aus vier Volumenteilen Aceton und einem Volumenteil Olivenöl gelöst wurde. Durch diese Behandlung wurden sie gegenüber DNFB sensibilisiert und reagierten nach weiteren vier Tagen durch erneutes Auftragen von 20 µl einer 0,25%igen Lösung dieser Substanz auf das rechte Ohr in Form einer allergischen Kontaktdermatitis. Das Ohr zeigte eine Entzündung, welche von einer Schwellung begleitet wurde. Das linke Ohr wurde mit dem gleichen Lösungsmittel ohne DNFB behandelt und entwickelte daraufhin keine Entzündung. Es diente somit als Kontrolle. Nach 24 Stunden wurden die Ohrdicken an beiden Ohren und somit die Stärke der Schwellungen am rechten Ohr vermessen. Danach erfolgte die i.v. Injektion von 100 µl Liposomen (Konzentration 20 µmol/ml) in die Schwanzvene. Am darauffolgenden Tag wurde eine erneute Messung der Ohrdicken durchgeführt, bevor die Mäuse getötet wurden. Die Ohren wurden abgetrennt und anschließend sämtliches Gewebe einer Kryokonservierung in Tissue Tec bei –80 °C unterworfen.

Um die Lokalisation der Liposomen zu untersuchen, wurde das Ohr- und Milzgewebe geschnitten und anschließend fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

## 3.8 Optimierung des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus

### 3.8.1 Präparation der Kunststoffpartikel als künstliche Targetzellen

Als künstliche Targetzellen für die initialen Untersuchungen des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus dienten Feststoffpartikel aus Melamin in den Größe 0,25 µm, 0,83 µm

und 7  $\mu\text{m}$ . Um den Liposomen auf der Oberfläche dieser Partikel ein Target präsentieren zu können, wurden diese Partikel mit einer Bilayer überzogen, in welche Biotin-PE als Bindungsziel für die Liposomen verankert wurde. Neutralpartikel ohne Biotin an der Oberfläche wurden dabei als Vergleich genutzt, um unspezifische Adhäsionsereignisse berücksichtigen zu können. Um die Partikel mit einer Bilayer überziehen zu können, mussten sie zuvor durch kovalente Kopplung eines Lipidmonolayers hydrophobisiert werden. Dafür wurde die entsprechende Menge der Partikelsuspension zentrifugiert, der wässrige Überstand verworfen und das Partikelpellet anschließend in Methanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich. Danach wurden die Partikel zwei weitere Male mit wasserfreiem Chloroform gewaschen, woraufhin sie funktionalisiert werden konnten. Dafür wurden sie bei Raumtemperatur in trockenem Chloroform für ca. 16 Stunden unter Rühren mit Cyanurchlorid und N,N-Diisopropylamin aktiviert. Durch Zentrifugation wurde anschließend das überschüssige Cyanurchlorid entfernt. Das Partikelpellet wurde in trockenem Chloroform resuspendiert, mit DPPE und N,N-Diisopropylamin als Hilfsbase versetzt und über weitere 48 Stunden geschüttelt, woraufhin eine selektive Kopplung der DPPE-Aminogruppe an Cyanurchlorid stattfand. Somit wiesen die Alkylreste nach außen, wodurch sie den Partikeln die hydrophoben Eigenschaften verliehen. Durch erneute Zentrifugation wurde überschüssiges DPPE und N,N-Diisopropylamin abgetrennt. Das Partikelpellet wurde zweimal in Methanol gewaschen, bevor es in wässriges Medium überführt wurde. Diese Suspension hydrophobisierter Partikel konnte anschließend mit einer weiteren lipophilen Schicht überzogen werden: Um Biotin-haltige Partikel zu erhalten wurden die hydrophobisierten Partikel mit einem ca. 10- bis 50-fachen Überschuss (bzgl. der DPPE-Menge, die bei der Hydrophobisierung genutzt wurde) an ca. 100nm großen Liposomen der Zusammensetzung SPC/Chol/Biotin-DPPE (60/30/10mol%) versetzt und 48 Stunden geschüttelt, wodurch ein Teil dieser Liposomen zu einer dichten Bilayer auf den Partikeln fusionierten. Für die Neutralpartikel wurden Biotin-DPPE-freie Liposomen der Zusammensetzung SPC/Chol (70/30mol%) genutzt.

Abschließend wurden die Partikel erneut zentrifugiert, um sie vom Liposomenüberschuss abzutrennen. In isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert standen sie für die Versuche zur Verfügung.

### **3.8.2 Target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes unter statischen Bedingungen**

Die Liposomen für diese Versuche wurden mittels Hydratationsmethode hergestellt. Es kamen target-sensitive Liposomen (DOPE/mPEG-PE/NGPE) mit unterschiedlichen mPEG-PE-Anteilen (1mol%, 2mol%, 3mol%) zum Einsatz. Als Hydratationsmedium wurde eine

0,02M 6-CF-Lösung verwandt, wobei im weiteren Präparationsverlauf die Liposomen einer Ultraschallbehandlung zur Homogenisierung unter Eiskühlung unterzogen wurden. Anschließend wurden die Ansätze geteilt und jeweils mit anti-Biotin oder IgG gekoppelt, um wiederum unspezifische Effekte in die Betrachtungen mit einbeziehen zu können.

Die Versuche wurden in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Basis pro Well bildeten 100 µl PBS-Puffer oder 100 µl Serum (unterschiedlicher Konzentration: 15 %, 75 % oder 100 %). Anschließend wurden in jedes Well die Partikel und nachfolgend die Liposomen mit Hilfe einer Multi-Well-Pipette gegeben. Die Platte wurde unverzüglich der Messung am Polarstar zugeführt. Durch Detektion der Fluoreszenz des 6-CF (Ex. 485nm, Em. 520nm) im Medium wurde die Freisetzung in Abhängigkeit der Zeit über 24 Stunden beobachtet. Blindversuche wurden durchgeführt.

### **3.8.3 Dynamische Untersuchungen der target-sensitiven Freisetzung des liposomalen Inhaltes**

In Ergänzung der statischen Freisetzungsversuche wurden Untersuchungen unter physiologischen Flussbedingungen durchgeführt, wobei die Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit stimulierten bEnd3 verfolgt wurde. Diese Versuche wurden erneut mit Hilfe der Doppelkammer-Durchflussapparatur durchgeführt, wobei die Erfassung der zunehmenden Fluoreszenz des freigesetzten 6-CF wiederum aus dem Medium heraus spektrometrisch über einen Zeitraum von 24 Stunden erfolgte.

In Anlehnung an die Bindungsversuche unter physiologischen Bedingungen wurden die Zellplättchen für diese Experimente vorbereitet.

Als Hydratationsmedium bei der Liposomenherstellung diente wiederum eine 6-CF-Lösung. Nach Homogenisierung der Liposomen wurde der Ansatz geteilt und je ein Teil mit anti-E-Selektin oder IgG gekoppelt.

In einer Konzentration von 0,25 µmol/ml Medium wurden die target-sensitiven Liposomen mittels einer Walzenpumpe (Durchflussgeschwindigkeit 0,4ml/min) in einem geschlossenen Kreislauf ununterbrochen über einen Zeitraum von 24 Stunden über die Zellen geführt, so dass sie in direkten und kontinuierlichen Kontakt mit diesen treten konnten. Nach 30, 60, 90, 120 Minuten sowie nach 12 Stunden wurde der Kreislauf kurz unterbrochen und mit einer Pipette zwei Mal 100 µl der Liposomen-Medium-Mischung aus dem jeweiligen Vorratsgefäß der Kammern entnommen, diese in zwei Wells einer schwarzen Mikrotiterplatte gefüllt und die Fluoreszenz des freien 6-CF am Polarstar gemessen. Nach der Messung wurde die Mischung wieder in das Vorratsgefäß zurückgegeben und der Kreislauf wieder in Gang gesetzt.

Zusätzliche Messungen wurden vor Beginn des Versuches (Start- bzw. Blindwert) sowie abschließend nach 24 Stunden durchgeführt.

### 3.9 Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens der Th1-Lymphozyten an bEnd3

Bei weiterführenden dynamischen Experimenten wurde die Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Th1F12-Zellen an bEnd3 durch Freisetzung des vMIP-II-haltigen Inhaltes aus target-sensitiven Liposomen untersucht.

Diese dynamischen Freisetzungsuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. H. H. Radeke des *pharmazentrums frankfurt* (Immunologie) durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche kamen  $\mu$ -Slides der Firma ibidi® zu Anwendung. Dabei handelt es sich um Einmal-Durchflussskammern aus gasdurchlässigem, biokompatiblen und v. a. optisch hochwertigem Kunststoff [Horn (2006)], die sich ideal zur Funktionsanalyse lebender Zellen eignen. Dieses System ermöglicht während des Versuches eine hochaufgelöste Betrachtung des Verhaltens der kultivierten Endothelzellen mit einem inversen Mikroskop. In den Kunststoffträger ist ein 400  $\mu$ m hoher und 5 mm breiter Kanal eingebettet, an dessen Seiten sich zwei Reservoirs befinden.

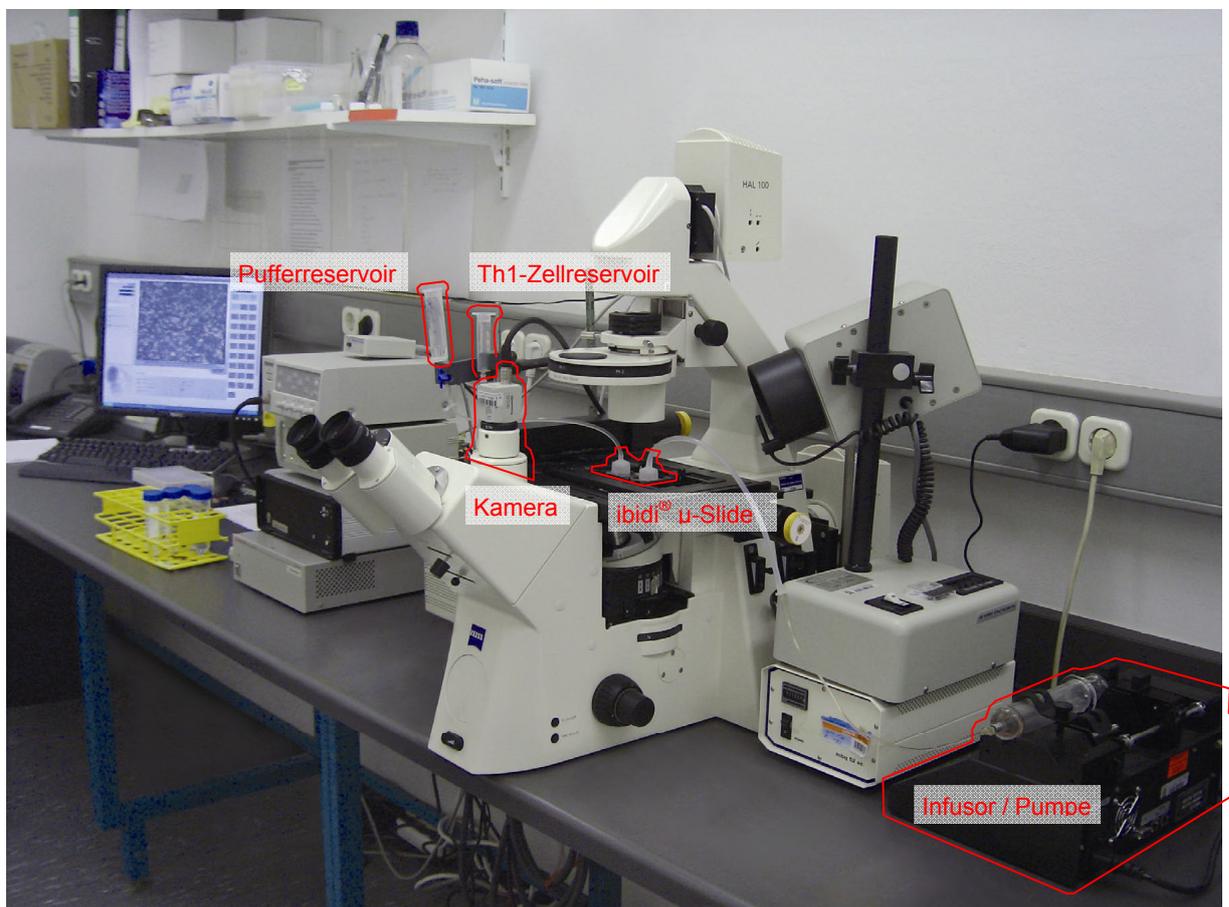
Zur Kultivierung wurde die Endothelzellsuspension in die  $\mu$ -Slides eingefüllt, woraufhin die Zellen auf der Oberfläche im Kanal adhärten. Nach Erreichen des konfluenten Wachstums wurden sie direkt in diesem Kultivierungssystem stimuliert und anschließend die Versuche direkt in den Slides durchgeführt. Durch das Anschließen einer Pumpe konnten auch bei diesem System definierte Flüsse erzeugt werden, was die Untersuchung von Effekten zwischen Liposomen und Endothelzellen unter physiologischen Scherflussbedingungen ermöglichte [Rädler et al. (2005)]. Ein Infusor übernahm dabei die Aufgabe der Pumpe, in welchem das Puffer-Reservoir in Form einer Glasspritze eingespannt wurde (siehe Abbildung 7). Durch die Entleerung der Spritze mit kontinuierlichem Druck wurde eine physiologische Scherflusgeschwindigkeit erzeugt, mit welcher die Th1-Lymphozyten über die Endothelzellen flossen.

Aufgrund der geringen Größe des Kanals wurden nur geringe Volumina benötigt. Der Einsatz geringer Stimulations- sowie Liposomen-Medium-Gemischmengen für die Versuche erwies sich hinsichtlich der Kostenintensivität der Antikörper (anti-E-Selektin) und der Peptide (vMIP-II, SDF-1) als sehr vorteilhaft.

Die digitale Aufnahme der Versuche und somit eine genaue Software-gestützte Auswertung von Roll- und Adhäsionsereignissen der Th1-Zellen an den Endothelzellen wurde durch eine Kamera realisiert, welche sich am Mikroskop befand (siehe Abbildung 7).

Die Erfassung der Anzahl an durchlaufenden, rollenden, adhärierenden und migrierenden Zellen erfolgte mit der Software CellFlow 1.7 der Firma Mediquant. Diese ermöglichte com-

putergestützt die Auswertung der Rollgeschwindigkeiten und der Anzahl an rollenden (Geschwindigkeiten von  $5\mu\text{m/s}$  bis  $50\mu\text{m/s}$ ) sowie adhätierenden (Geschwindigkeiten  $0\mu\text{m/s}$  bis  $5\mu\text{m/s}$ ) Zellen. Um Effekte zu verschiedenen Versuchszeitpunkten und mit unterschiedlichen Zellmengen erfassen zu können, wurden während des Versuches zu unterschiedlichen Zeitpunkten drei Filme aufgenommen. Die Auswertung der Filme wurde mit Hilfe des Programms Imagoquant<sup>®</sup> durchgeführt. Dafür wurden aus jedem der drei Videos pro Slide je drei Filmausschnitte ausgewählt und diese nach Einstellung durch das Programm zahlenmäßig charakterisiert wurden. Diese drei Filmausschnitte pro Videos wurden jeweils zu einem Mittelwert zusammengefasst. So konnten Veränderungen in der Anzahl der adhätierenden oder rollenden Leukozyten an den Endothelzellen erfasst werden.



**Abbildung 7:** Apparaturaufbau für die dynamischen Untersuchungen der Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Th1-Lymphozyten in den Laboren des *pharmazentrums frankfurt*

### 3.9.1 Einfluss target-sensitiver IL auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten

In diesen Untersuchungen sollte die Bindung von Th1-Lymphozyten an Endothelzellen sowie deren Beeinflussung durch die Freisetzung von Chemokinantagonisten aus target-sensitiven Liposomen untersucht werden.

Initiale Untersuchungen sollten den Einfluss leerer, spezifisch gekoppelter, target-sensitiver Liposomen auf das Adhäsionsverhalten der Th1F12-Zellen klären, um den reinen Lipid-effekt auf das Verhalten der Th1F12-Zellen zu beobachten. Diese Versuche dienten als Basis für die nachfolgenden Experimente.

Am Vortag wurden die bEnd3-Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung für fünf Minuten bei 37°C behandelt, anschließend aus den Kulturflaschen herausgelöst und in einer Konzentration von 150.000 Zellen in 200 µl Medium pro µ-Slide angesetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurden links und rechts in jedes Reservoir 500 µl frisches Medium gegeben und für 24 Stunden bei 37°C belassen. Am darauffolgenden Tag waren die Zellen in den µ-Slides hinreichend konfluent und konnten für die Versuche verwendet werden.

Zunächst erfolgte eine vierstündige Stimulation der Endothelzellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Dafür wurde das Medium aus den µ-Slides entfernt und durch 1 ml frisches, IL-1β/TNF-α (je 10 ng/ml) enthaltendes Medium ersetzt, welches unter Schräghaltung der µ-Slides in das obere Reservoir gegeben wurde und so durch den zellbesetzten Kanal fließen konnte. Anschließend wurden sie erneut für vier Stunden in den Inkubator gestellt.

Nach der Stimulation wurde das Medium erneut gewechselt. Das Stimulationsmedium wurde nun durch 2 ml frisches Liposomen-haltiges (0,25 µmol/ml) Medium ausgetauscht. Bei den Liposomen handelte es sich um leere target-sensitive Liposomen der Zusammensetzung DOPE/mPEG-PE/NGPE/Rhodamin (97,5/1/1/0,5 mol%) (siehe Kapitel 3.2.1).

Mit Hilfe einer Walzenpumpe wurde ein Kreislauf (0,4 ml/min) und damit ein künstlicher Scherfluss in den µ-Slides erzeugt, was die physiologischen Verhältnisse in postkapillaren Blutgefäßen simulieren sollte. Das Liposomen-haltige Medium rotierte eine Stunde über die Endothelzellen.

Im Anschluss daran wurde die Liposomen-Medium-Mischung entfernt und frisches Medium eingefüllt. Daraufhin wurden die µ-Slides jeweils einzeln in den Objektisch des Mikroskops eingespannt. In die Reservoirkappen wurden Verbindungsstücke eingeführt und an diese Schläuche angeschlossen, wodurch eine Verbindung der Kammer einerseits mit dem Puffer- sowie dem Th1-Zellvorratsgefäß und andererseits mit einer Pumpe hergestellt werden konnte (siehe Abbildung 7). Im ersten Schritt wurde nun das System durch Einschalten der Pumpe und Zuschaltung des Puffervorratsgefäßes (PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), auf Dichtigkeit geprüft, wobei das µ-Slide gleichzeitig mit ca. 1 ml Puffer durchspült wurde.

Die Th1-Zellen wurden im Vorfeld gezählt und zu je vier Millionen Zellen in 50 ml Falconröhrchen aliquotiert. Unmittelbar vor dem Versuch wurde je ein Röhrchen zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert, sodass eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml resultierte. Diese Zellsuspension wurde in das Zellvorratsgefäß der Durchflussapparatur gefüllt und ein Zufluss der Th1-Zellen erfolgte. Im gleichen Moment startete die Zeitmessung von 16 Minuten abwärts, wobei zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten die Videoaufnahme gestartet wurde. Nach drei Minuten wurde ein fünfminütiges, nach 10 sowie 14 Minuten ein zweiminütiges Video mit der Ulead-Video-Studio Software aufgenommen, wobei nach Ende des ersten Filmes die Zellenzufuhr durch Umlegen eines Schalter unterbrochen und dadurch der Zufluss des Puffers wieder gestartet wurde. Da die Schläuche zwischen den Vorratsgefäßen bis zum  $\mu$ -Slide eine gewisse Länge besaßen, befanden sich noch genügend Zellen im Zulaufsystem, die jedoch zum Ende hin abnahmen. Auf diese Weise konnten zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches unterschiedliche Effekte beobachtet werden, da am Anfang eher eine Überladung des  $\mu$ -Slides mit Th1-Zellen erfolgte, was allerdings durch Abschaltung des Zellnachflusses kontinuierlich abnahm.

Nach Ende des Versuches wurde das  $\mu$ -Slide noch einige Minuten mit Puffer gespült, bis keine Th1-Zellen mehr im Fluss zu beobachten waren. Das  $\mu$ -Slide wurde gewechselt und ein neuer Versuch konnte gestartet werden.

Die Auswertung der Filme wurde mit Hilfe des Programms Imagoquant<sup>®</sup> durchgeführt, wobei aus jedem der drei Videos pro  $\mu$ -Slide je drei Filmausschnitte ausgewählt und diese nach Einstellung durch dieses Programm zahlenmäßig charakterisiert wurden.

### **3.9.2 Einfluss von vMIP-II und SDF-1 auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten**

Nach Untersuchung des reinen Lipideinflusses wurden in weiteren Versuchen die Effekte der Chemokine vMIP-II und SDF-1 auf die Adhäsion der Th1F12-Zellen an stimulierten und unstimulierten bEnd3 durchgeführt, wobei vMIP-II sowohl in freier als auch liposomal verkapselter Form zum Einsatz kam. Bei letzterem handelte es sich um vMIP-II-haltige target-sensitive Liposomen. Darüber hinaus sollte der Einfluss gleichzeitig zugesetzten SDF-1 auf den Effekt von vMIP-II (frei vorliegend oder liposomal freigesetzt) verfolgt werden.

Die Kultivierung der Zellen und Vorbereitung sowie die Versuchsdurchführung erfolgten in Analogie zu den Untersuchungen wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben. Bei den Versuchen ohne SDF-1 erfolgte die übliche Stimulation der Endothelzellen mit einem Gemisch aus IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  (je 10 ng/ml) für vier Stunden. Bei den Untersuchungen in Anwesenheit von

SDF-1 wurde dieses 30 Minuten vor dem Ende der Aktivierung in einer Konzentration von 5nM dem Stimulationsmedium hinzugefügt.

Bei den Versuchen des Einflusses des freien vMIP-II wurde dieses nach dem Entfernen des Stimulationsmediums in 1 ml Medium in einer Konzentration von 5nM in Kontakt mit den Endothelzellen gebracht. Mit Hilfe einer Walzenpumpe wurde ein physiologischer Scherfluss erzeugt, sodass dieses Medium eine Stunde lang über die Endothelzellen floss. Danach wurde das Mediumgemisch aus der ibidi®-Kammer entfernt und in diesem die Th1-Zellen aufgenommen. Dadurch kamen auch diese Zellen in den Kontakt mit dem vMIP-II. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte eine Verdünnung der Th1-Zellen mit 3ml PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und BSA), um eine Konzentration der Zellen von 1 x 10<sup>6</sup>/ml zu erhalten. Anschließend wurden die verdünnten Th1-Zellen dem Versuch zugeführt.

Im Gegensatz dazu wurde bei den Untersuchungen mit den vMIP-II-haltigen target-sensitiven Liposomen nach der Stimulation das IL-1β/TNF-α bzw. IL-1β/TNF-α/SDF-1-haltige Medium entfernt und durch die Liposomen-Medium-Mischung ersetzt. Die Konzentration der Liposomen betrug bei diesen Versuchen ebenfalls 0,25 μmol/ml.

Während der Liposomenpräparation wurde der Lipidfilm der Zusammensetzung DOPE/mPEG-PE/NGPE/Rhodamin (97,5/1/1/0,5 mol%; 30 μmol/ml) mit einer wässrigen vMIP-II-haltigen Lösung (2mg/ml) hydratisiert. Nach der Homogenisierung der target-sensitiven Liposomen wurde überschüssiges, nicht eingeschlossenes vMIP-II durch Gelfiltration abgetrennt. Der Ansatz wurde geteilt und wiederum der eine Teil mit anti-E-Selektin, der andere mit IgG gekoppelt.

Nach dem Einbringen der Liposomen-Medium-Mischung in das μ-Slide wurden die target-sensitiven Vesikel eine Stunde mittels Walzenpumpe kontinuierlich über die Zellen geleitet, wobei das eingeschlossene vMIP-II nach spezifischer Bindung an der bEnd3-Oberfläche freigesetzt wurde, um direkt vor Ort seine Wirkung zu entfalten. Nach Ablauf der Stunde wurde das Gemisch aus dem μ-Slide entfernt, einmal vorsichtig mit 500 μl Medium gewaschen und danach frisches Medium eingefüllt. Anschließend wurde es in die Durchflussapparatur (siehe Abbildung 7) eingespannt und der Versuchsablauf analog Kapitel 3.9.1 durchgeführt, wobei wiederum Th1-Zellen aus einem Vorratsgefäß direkt über die bEnd3 im Zellkanal geleitet wurden.

Versuche mit SPC-Liposomen, in welche ebenfalls vMIP-II eingeschlossen wurde, dienten dem Vergleich, um nicht target-sensitive Effekte beurteilen zu können.

Die Menge des jeweils eingeschlossenen vMIP-II wurde durch einen Peterson-Lowry-Proteinassay bestimmt.

### 3.10 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen gezählt sowie ihre Beschaffenheit in einem Flüssigkeitsstrom untersucht und analysiert werden. Eine der häufigsten Anwendungen ist die Untersuchung bestimmter Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Reagenzien (z.B. Antikörper, Proteinen). Dabei handelt es nicht nur um ein qualitatives Verfahren. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse ermöglicht ebenfalls die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Die dafür eingesetzten Geräte tragen die Bezeichnung *fluorescence activated cell sorter* (FACS).

Bei dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse zum einen für die Bestimmung der E-Selektin-Expression mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper, zum anderen zur Analyse und Quantifizierung der Transfektion an A2780s sowie bEnd3 genutzt.

#### 3.10.1 Expression von E-Selektin auf bEnd3-Zellen

Da E-Selektin als Adhäsionsmolekül erst im Verlauf von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielt und somit nicht konstitutiv auf der Oberfläche der Endothelzellen vorhanden ist, mussten die bEnd3-Zellen zum Nachweis des E-Selektins im Vorfeld stimuliert werden. Unter Standardbedingungen kultivierte bEnd3-Zellen wurden dafür vier Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) oder einer Mischung aus beiden in einer jeweiligen Konzentration von 10 ng/ml in ihrem Kulturmedium bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach vier Stunden wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen mit EDTA behandelt, dieses vier Minuten bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit einwirken gelassen. Anschließend wurden die Zellen aus den Kulturflaschen herausgelöst und in Falconröhrchen überführt. Es folgte eine vierminütige Zentrifugation bei 1.200 RPM und 4 °C, woraufhin das überstehende Medium verworfen und das Zellpellet in 5 ml des FACS-Puffer 1 gewaschen wurde. Eine erneute Zentrifugation (1.200 RPM/4 °C) schloss sich an. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml FACS-Puffer 2 aufgenommen, daraufhin die Zellzahl bestimmt und eine Aufteilung der Zellsuspension auf die Probengefäße vorgenommen, wobei pro Probe 500.000 bzw. 1.000.000 Zellen resultierten. Eine Zentrifugation (1.200 RPM/4 °C) der für den ersten Schritt bestimmten Proben folgte, wonach das Pellet in 1 ml FACS-Puffer 2 aufgenommen, anschließend die Zellsuspension mit der entsprechenden Menge des primären Antikörpers versetzt und vermischt wurde. Diese Mischung wurde 30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt der Proben, woraufhin die Zellen einmal je 1 ml FACS-Puffer 2 gewa-

schen und anschließend erneut in FACS-Puffer 2 resuspendiert wurden. Eine entsprechende Menge des sekundären FITC-gelabelten Antikörpers wurde in die Probengefäße pipettiert und nach dem Mischen erneut 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer 2 wurden die Zellen abschließend wieder in FACS-Puffer 1 aufgenommen und der Messung am FACS-Calibur Durchflusszytometer zugeführt.

Bei den Versuchen mit einem PE-gelabelten primären Antikörper entfiel der Schritt der Zugabe des sekundären Antikörpers, sodass nach dem ersten Inkubationsschritt die Zellen einmal gewaschen und anschließend gleich nach Resuspension in Puffer 1 der Messung am FACS-Calibur Durchflusszytometers zugeführt werden konnten.

Bei allen Versuchen wurden Blindproben durchgeführt.

Zusammensetzungen der verwendeten Pufferlösungen

FACS-Puffer 1:

0,5% BSA gelöst in PBS  
sterilfiltriert  
Lagerung im Kühlschrank

FACS-Puffer 2:

0,5% BSA und 0,1% Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) gelöst in PBS  
sterilfiltriert  
Lagerung bei Raumtemperatur

### 3.10.2 *In vitro*-Transfektionversuche an A2780s und bEnd3

Für die Transfektionsversuche wurden sowohl die A2780s-Zellen als auch die bEnd3 zwei Tage zuvor in 96-Well-Platten umgesetzt. Dafür wurden die Zellen jeweils mit 0,2%iger EDTA-Lösung aus den Kulturflaschen herausgelöst und anschließend 12.000 bis 15.000 der A2780s-Zellen bzw. 2.500 bis 5.000 der bEnd3-Zellen in je 200  $\mu\text{l}$  pro Well ausgesetzt. Nach sechs Stunden bei 37°C/5%  $\text{CO}_2$  wurden aus jedem Well 100  $\mu\text{l}$  des Mediums entfernt und durch 200  $\mu\text{l}$  frisches Medium ersetzt. Dies wurde nach weiteren 12 und 24 Stunden wiederholt. Nach zwei Tagen erreichten die beiden Zelllinien hinreichende Konfluenz und waren für die Versuche einsetzbar.

Die bEnd3 wurden für die Versuche unter Entzündungsbedingungen im Vorfeld einer Stimulation mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  (je 10 ng/ml) für vier Stunden unterzogen. Nach dieser Zeit wurde das Stimulationsmedium entfernt und nach einem Spülvorgang die SPLP in den entspre-

chenden Konzentrationen ad 100  $\mu$ l Medium auf die Endothelzellen pipettiert und anschließend für zwei, vier oder acht Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Während der Versuche an den A2780s-Zellen wurden die SPLP oder freies GFP in den entsprechenden Konzentrationen ad 100  $\mu$ l in die Wells pipettiert und anschließend für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiträumen wurde das Medium mit den darin enthaltenen, nicht gebundenen oder aufgenommenen Liposomen bzw. freiem GFP von den Zellen entfernt, einmal mit 100  $\mu$ l Medium gespült, anschließend diese mit je 300  $\mu$ l frischem Medium versetzt und für weitere 24 Stunden (A2780s-Zellen) bzw. für 48, 72 oder 96 Stunden (bEnd3) im Inkubator belassen. Während dieser Zeit wurde das Medium nach jeweils 12 Stunden in den Wells gewechselt, wobei 200  $\mu$ l entfernt wurden und durch 200  $\mu$ l frisches Medium ersetzt wurden. Nach den 24 bzw. 48 Stunden wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit je 100  $\mu$ l 0,2%iger EDTA-Lösung pro Well versetzt, um sie vom Plattenboden abzulösen. Die Platte wurde vier Minuten bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend jedes Well mit weiteren 150  $\mu$ l sterilfiltrierten PBS gefüllt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in der Puffermischung resuspendiert und der Messung mittels Autosampler des FACS-Calibur-Durchflusszytometers zugeführt.

### 3.11 *In vivo*-Transfektionversuche

Diese Untersuchungen wurden erneut in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. H.H. Boehncke in der Dermatologie des Klinikum der Johann-Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt durch Dr. Ralf Ludwig durchgeführt.

Diese Versuche sollten die Transfektionsfähigkeiten pH-sensitiver SPLP in Abhängigkeit der Spezifität sowie der Füllung der SPLP zeigen. Die SPLP wurden dafür entsprechend Kapitel 3.2.2 hergestellt, wobei in diesen Versuchen nur Liposomen gefüllt mit dem Komplex aus GFP und DC30 oder leer zur Anwendung kamen. Um die SPLP *in vivo* lokalisieren zu können, diente Rhodamin als Fluoreszenzlabel. Nach der Herstellung erfolgte die Kopplung der pH-sensitiven SPLP mit anti-E-Selektin-mAb oder Albumin gemäß Kapitel 3.3.1.

Analog den *in vivo*-Targetierungsversuchen kamen männliche, 6 bis 10 Wochen alte Mäuse (Charles River, Sulzfeld (Deutschland)) zum Einsatz, welche im Vorfeld wie im Kapitel 3.7.3 behandelt wurden, um eine allergische Kontaktdermatitis an den jeweiligen rechten Mausohren auszulösen. Die linken Ohren der Mäuse galten dem Vergleich. Es erfolgte die i.v. Injektion von 100  $\mu$ l der SPLP (Konzentration 20  $\mu$ mol/ml) in die Schwanzvene. 48 Stunden nach der Applikation wurden die Mäuse getötet, die Ohren abgetrennt und anschließend sämtliches Gewebe einer Cryokonservierung in Tissue Tec bei –80 °C unterworfen.

Um die Lokalisation der Liposomen zu untersuchen und die Transfektionereignisse zu detektieren, wurde das Ohr- und Milzgewebe geschnitten und anschließend fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

### **3.12 Statistik**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mehrfach durchgeführt und jeweils mehrere Proben und Blindproben vermessen und sichergestellt, dass der Umfang der Stichproben  $n \geq 3$  beträgt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit graphisch genutzten Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bindungsuntersuchungen an murinen Endothelzellen (bEnd3)

Die Selektine als Gruppe von Adhäsionsmolekülen spielen im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine besondere Rolle. Insbesondere das E-Selektin bietet sich als Zielstruktur für ein vaskuläres Targeting von Liposomen an, da es nicht konstitutiv, sondern nur im Laufe des Entzündungsgeschehens von Endothelzellen exprimiert wird.

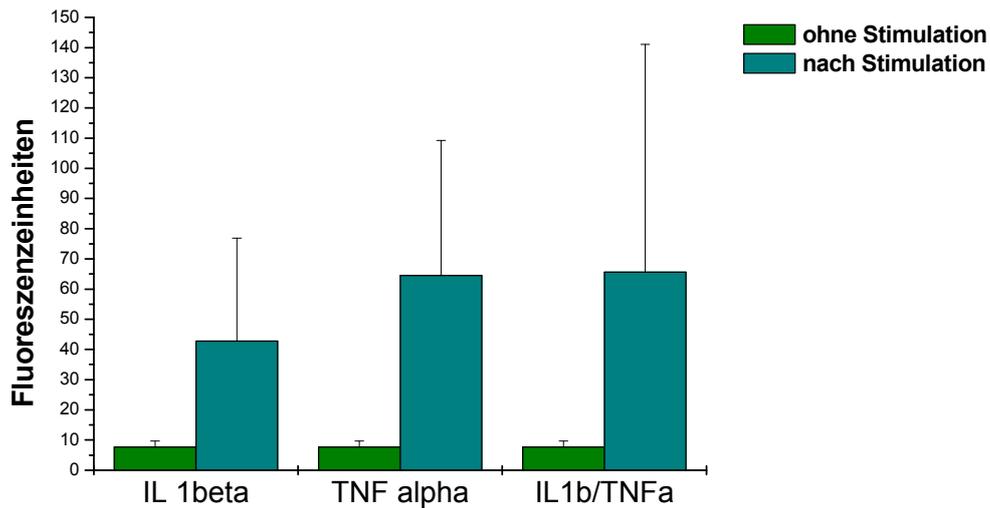
In initialen Untersuchungen wurde die Expression des E-Selektins auf stimulierten bEnd3 sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen. Darauf folgende Experimente sollten die Interaktionen zwischen Liposomen und Zellen durch erste Bindungsuntersuchungen an murinen Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* charakterisieren.

#### 4.1.1 Expression des E-Selektins auf bEnd3

Die Voraussetzung für die spezifische Internalisierung der Liposomen durch die Endothelzellen stellt die Bindungsbildung zwischen den Liganden auf der Liposomenoberfläche und den spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar. Aufgrund der zeitlich und lokal limitierten Expressionsbildung bildet das E-Selektin eine optimale Zielstruktur für ein liposomales Targeting in Entzündungsgebieten als Basis für eine extrazelluläre oder intrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes aus E-Selektin-gerichteten IL.

*In vitro* kann die Expression des E-Selektins durch die Stimulation der Endothelzellen mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder einer Kombination beider erreicht werden. Um diese Expression zu verdeutlichen und das Ausmaß und somit den optimalen Stimulus zu erhalten, wurden Versuche zur Detektion der E-Selektin-Expression durchgeführt. Dafür wurden die Zellen dem entsprechenden Zytokinstimulus durch Zugabe von IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) oder einer Mischung aus beiden (je 10 ng/ml) ausgesetzt. Da die Konzentration des E-Selektins erst nach vier bis acht Stunden ein Maximum auf der Endothelzelle erreicht [Bevilacqua et al. (1989)], erfolgte im Vorfeld der Versuche eine vierstündige Inkubation mit dem jeweiligen Zytokinen. Längere Stimulationszeiten hatten in diesem Testsystem einen negativen Einfluss auf die Qualität der Zellen, sodass der Zeitraum von vier Stunden nicht überschritten wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Fluoreszenzmarkierung des oberflächlichen E-Selektins, um das Ausmaß der Expression mittels FACS-Analyse quantifizieren zu können.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse dieser E-Selektin-Detektion auf den bEnd3 graphisch dargestellt.



**Abbildung 8:** Graphische Darstellung der Detektion des E-Selektins auf murinen Endothelzellen (bEnd3) in Abhängigkeit des Stimulus

Die Daten verdeutlichen die Abhängigkeit der E-Selektin-Expression von einem vorhandenen Entzündungsstimulus, wobei die Kombination aus beiden Zytokinen die besten Ergebnisse zeigen. Allerdings fand keine Addition der Werte für die IL-1 $\beta$ - und die TNF- $\alpha$ -Stimulierung statt. Es besteht scheinbar nur ein synergistischer Effekt bei der Kombination von beiden, welcher nur eine geringfügige, absolute Erhöhung der Expression gegenüber dem TNF- $\alpha$  mit sich bringt.

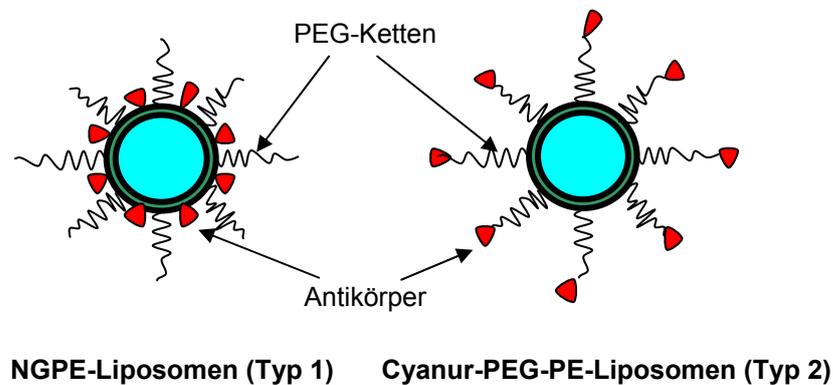
Diese Ergebnisse belegen die E-Selektin-Expression der bEnd3-Zellen nach einer geeigneten Zytokinstimulation. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  so beibehalten.

#### 4.1.2 Darstellung der Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Bei allen verwendeten IL handelte es sich um sterisch stabilisierte Liposomen. Die Verwendung dieser sog. Stealth-Liposomen ist essentiell für eine *in vivo*-Applikation, da diese IL durch die Einarbeitung des PEG-Lipides eine Abschirmung gegenüber Serumbestandteilen erfahren und somit der Erkennung und Elimination durch Zellen und Organe des RES (u. a. Makrophagen, Leber, Milz) entgehen. Für die Untersuchungen wurden Mengen von 5 mol% mPEG<sub>2000</sub>-DPPE genutzt, für die in zahlreichen Studien die besten Ergebnisse erreicht wurden [Maruyama et al. (1991), Klivanov et al. (1991), Woodle (1994)].

Die Funktionalisierung der Liposomen erfolgte durch Kopplung von murinen E-Selektin-Antikörpern oder unspezifischem Albumin an die Liposomenoberfläche. Es kamen zwei unterschiedliche Anker zum Einsatz, um zusätzlich den Einfluss der Position des Proteins auf das Ausmaß der Bindungsereignisse zu untersuchen. Für die Kopplung wurden die Anker

N-Glutaryl-PE (NGPE) und Cyanur-PEG-PE genutzt, womit die Proteine durch kovalente Bindungen an die Anker gebunden wurden. Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich ist, resultiert aus der Verwendung dieser Anker eine unterschiedliche Anordnung der Antikörper an der Liposomenoberfläche.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Antikörperposition nach Kopplung an unterschiedliche Lipid-Anker in der Liposomenbilayer

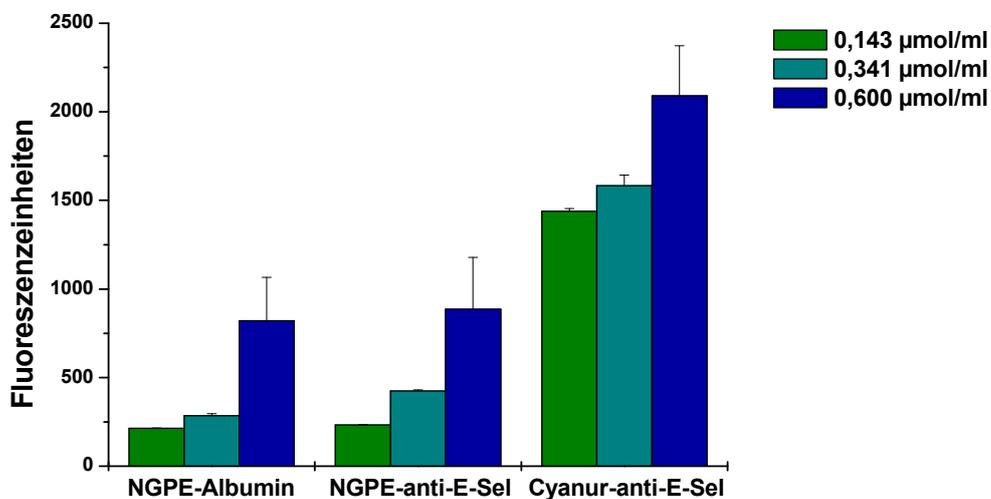
Bei den NGPE-Liposomen, den IL vom sog. Typ 1, befinden sich die Antikörper direkt auf der Liposomenoberfläche und erfahren durch den notwendigen Einsatz von Polyethylenglykol eine räumlich Abschirmung, sodass die voluminösen und flexiblen PEG-Ketten eine möglichen Bindung beeinträchtigen können. Im Gegensatz dazu kombiniert die Bindung der Antikörper an die Enden von Polymerketten eine effektive Bindungsfähigkeit mit einer verlängerten Zirkulationszeit der IL [Blume et al. (1993)]. Die Cyanur-PEG-PE-Liposomen, sog. Typ 2-IL, zeichnen sich durch eine exponierten Lage der Antikörper aus, was zusätzlich durch eine erhöhte Flexibilität der Antikörper gekennzeichnet ist [Zalipsky (1993)]. Der Einfluss der unterschiedlichen Lage der Antikörper auf die Bindungsereignisse wurde sowohl *in vitro* an einem statischen murinen Zellsystem als auch *in vivo*, am Modell des entzündeten Mausohres, untersucht und gegenübergestellt.

#### 4.1.3 E-Selektin-Targetierung muriner Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Bei der Wechselwirkung von Liposomen mit Zellen können neben der angestrebten Targetierung durch spezifische Bindung eines Targets auch unspezifische Prozesse einer oberflächlichen Liposomenadsorption oder unspezifischer Rezeptor-vermittelter Bindung auftreten. Um dies zu untersuchen und die Bindungsarten zu differenzieren, wurden nachfolgend Zellbindungsversuche unter Variation verschiedener Parameter durchgeführt. Dafür wurden die Endothelzellen bei diesen Targetingversuchen einer vierstündigen Zytokininkubation unterzogen, um Entzündungsbedingungen zu simulieren und eine E-Selektin-Exprimierung

auszulösen. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die einstündige Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten IL (DiO-gelabelt) in unterschiedlichen Konzentrationen bei 4 °C im Kühlschrank, um nur die Bindungsereignisse zu erfassen. Durch diese Temperaturwahl wurde die Energieunabhängigkeit der Bindungsbildung ausgenutzt [Huang et al. (1983)], wodurch das Ausmaß der Bindungsereignisse klar von nachfolgenden Aufnahmeprozessen differenziert werden konnte.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Bindungsereignissen von IL in Abhängigkeit der Spezifität der Liposomen, des genutzten Lipid-Ankers als auch der Liposomenkonzentration an den stimulierten bEnd3-Zellen unter statischen Bedingungen dargestellt.



**Abbildung 10:** Bindungsereignisse zwischen Liposomen und stimulierten bEnd3 in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Lipid-Ankers, des Antikörpers und der Konzentration der IL

Aus diesen Ergebnissen können mehrere Aussagen getroffen werden. Das Ausmaß der Bindung innerhalb der untersuchten Typ 1-IL unterscheidet sich nicht merklich in Abhängigkeit der Spezifität. Die spezifisch gekoppelten NGPE-Liposomen zeigen in allen drei betrachteten Konzentrationen ein vergleichbares Bindungsprofil wie die Albumin-gekoppelten NGPE-Liposomen an den stimulierten Endothelzellen.

Erfolgt jedoch eine Veränderung der Position des Antikörpers durch Verwendung der Cyanur-PEG-PE-IL, kann das Ausmaß der Bindung in allen drei betrachteten Konzentrationsbereichen gesteigert werden. Dabei erfolgt bei der niedrigsten Konzentration eine Zunahme der Bindung um das Sechsfache, bei der mittleren um das Vierfache und bei der höchsten eingesetzten Konzentration nur noch um das Zweifache. Schon die geringste Konzentration an Cyanur-IL übersteigt das Ausmaß der Bindungsereignisse der höchsten eingesetzten NGPE-Liposomenmenge. Allerdings konnte innerhalb der Cyanur-Liposomen keine so ausgeprägte Zunahme der Bindungsereignisse in Korrelation mit der deutlichen Erhöhung

der Liposomenmenge beobachtet werden. Dies kann auf eine Rezeptorsättigung hinweisen, sodass die geringen Steigerungen der Liposomenbindung insbesondere auf unspezifische Adsorptionseffekte zurückzuführen sind. In Abhängigkeit der Konzentration erfolgt zwar eine Steigerung der Bindungsereignisse, jedoch steht dies nicht mit der erforderlichen Liposomenmenge im Verhältnis [Mastrobattista et al. (1999)].

Die schlechte Bindungsfähigkeit der spezifisch gekoppelten NGPE-IL wurde schon in verschiedenen Studien beschrieben [Vertut-Doi et al. (1996), Spragg et al. (1997)] und kann eindeutig auf die Anwesenheit des PEGs zurückgeführt werden. Die Struktur der Liposomenoberfläche wird durch die Ausbildung der Schutzschicht um die Liposomen durch die vorhandenen PEG-Ketten in ihrer Spezifität gegenüber der Zielstruktur minimiert, da die Antikörper direkt auf der Liposomenoberfläche räumlich durch die herausragenden hydrophilen PEG-Ketten abgetrennt werden, was zu einem verminderten Kontakt zur Zelloberfläche durch die verhinderte Ausbildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes führt. Durch diesen erschwerten Erkennungsprozess kommt es zu einer Reduktion der Bindungsereignisse.

Für die Abschirmung durch die PEG-Ketten sprechen auch die geringeren Antikörperkopplungsausbeuten der NGPE-Liposomen von  $32 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ . Bedingt durch die bessere Zugänglichkeit der Antikörper-bindenden Struktur fallen die Kopplungsausbeuten des Cyanur-Ankers höher aus. Sie zeigen mit  $37 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$  um 15% höhere Werte im Vergleich zu den PEG-haltigen NGPE-Liposomenpräparationen. Kombiniert mit der exponierten Stellung und einer erhöhten Flexibilität der gekoppelten Antikörper bestehen eindeutig Bindungsvorteile im Vergleich zu den NGPE-PEG-IL. Das führt zu einer stärkeren spezifischen Anreicherung der Cyanur-PEG-Liposomen auf der Endothelzelloberfläche. Durch die Verwendung des Cyanur-PEG-PE-Ankers können die Kopplungsprobleme aufgrund sterischer Interferenzen durch die langen PEG-Ketten gelöst werden. Damit vereinen diese Typ 2-IL effektiv die Parameter Stabilität und Targetierungsfähigkeit.

#### 4.1.4 E-Selektin-Targetierung *in vivo*

Nachdem eine spezifische Akkumulation der sterisch stabilisierten IL an aktivierten Endothelzellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollten weiterführende Untersuchungen deren Verhalten *in vivo* zeigen. Um die Targetierungsfähigkeiten der Liposomen im Hinblick auf eine perspektivisch therapeutische Anwendung zu analysieren, wurden die IL am Modell des entzündeten Mausohres getestet. Für die Anreicherung der Liposomen im Gewebe kamen im Gegensatz zum *in vitro*-Versuch jedoch Bindungs- und Internalisierungsprozesse zum Tragen, da bei physiologischen Temperaturen sowohl energieunabhängige Bindungsereignisse als auch energieabhängige aktive zelluläre Aufnahmeprozesse stattfinden. Eine Diffe-

renzung und somit eine separate Betrachtung beider Prozesse konnte nicht unternommen werden. Wird allerdings eine intrazelluläre Intervention als Therapieziel angestrebt, so ist der Internalisierungsschritt essentiell für eine potentielle therapeutische Wirkung, sodass auf Grundlage dieser Untersuchungen Rückschlüsse auf das therapeutische Potential der getesteten IL gezogen werden können. Unter dieser Maßgabe ist E-Selektin als Target eine ideale Wahl, da es als internalisierender Rezeptor gilt und die an ihn spezifisch gebundenen Vesikel schnell über sog. clathrin coated pits in die Zellen aufgenommen werden [Setiadi et al. (2008)].

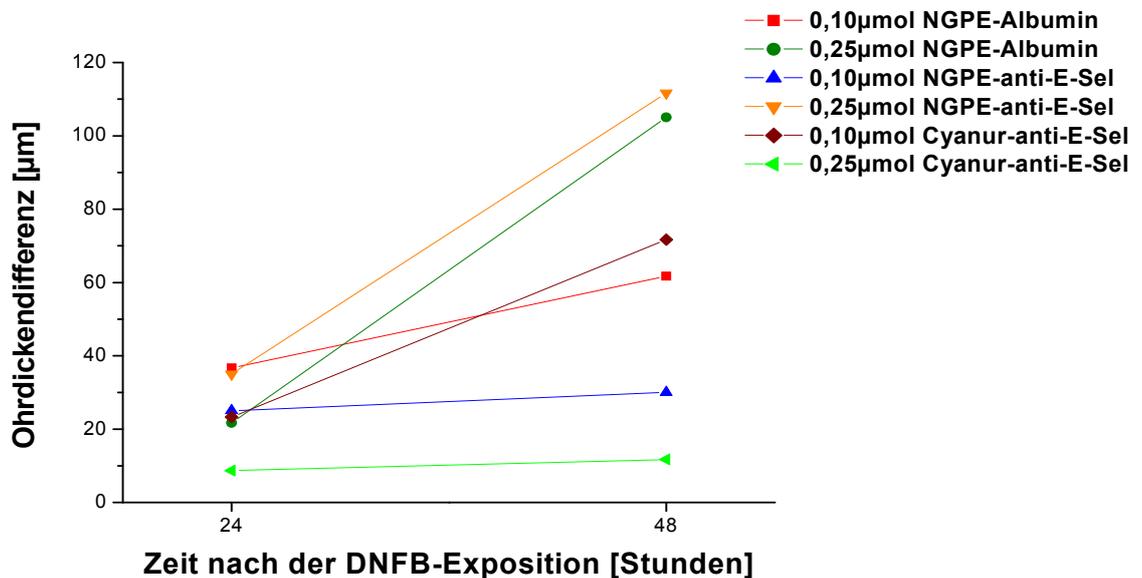
Für die *in vivo*-Versuche kamen Liposomen der gleichen Zusammensetzung wie bei den statischen *in vitro*-Targetierungsexperimenten zur Anwendung. Dabei wurde auch hier der eingesetzte Lipid-Anker, sowie das zu koppelnde Protein (Albumin oder E-Selektin-Antikörper) variiert. Die Liposomen wurden mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert, um ihr Schicksal *in vivo* nach Applikation fluoreszenzmikroskopisch verfolgen zu können.

Die ausgewählten Mäuse wurden mit einer DNFB-Lösung sensibilisiert. Durch erneutes Auftragen der DNFB-Lösung nach vier Tagen am rechten Ohr wurde eine allergische Kontaktdermatitis ausgelöst, wodurch sowohl eine Entzündung und somit auch eine Schwellung hervorgerufen wurden. Eine Schwellung entsteht im Rahmen einer Entzündungsreaktion durch Austritt von Plasma und höhermolekularen Stoffen, wie Proteinen in das Interstitium durch entstandene Lücken (gaps). Diese bilden sich durch die entzündungsbedingte Kontraktion der Endothelzellen. Zum Vergleich wurde das jeweilige linke Ohr nur mit dem Lösungsmittel ohne DNFB behandelt, woraufhin keine Entzündung folgte. Somit konnten zwei Parameter für die Auswirkungen der IL herangezogen werden. Einerseits konnte das Ausmaß der Veränderungen der Ohrschwellungen als Indiz für eine Akkumulation der IL dienen, andererseits sollten die Bindungsereignisse im entzündeten Gewebe sichtbar gemacht werden. Dafür wurde das Mausohrgewebe 24 Stunden nach der Applikation für die mikroskopischen Untersuchungen sichergestellt. Das Ohrgewebe wurde geschnitten und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet, als Indiz des immunologischen Verhaltens der Liposomen wurde ebenfalls die Milz der Tiere analysiert.

Durch die Bindung der IL am E-Selektin könnte eine Unterbindung der Einwanderung von Leukozyten ins Entzündungsgebietes resultieren, was eine Reduktion der Entzündungsreaktion zur Folge hätte und sich daraufhin auch in einer Veränderung der Schwellung zeigen könnte. Dies würde einen indirekten Beweis der schnellen Einflussnahme allein schon durch die applizierten, wirkstofffreien IL auf das Entzündungsgeschehen erbringen.

Die Schwellungen der verschiedenen entzündeten Mausohren wurde vor der Applikation der IL vermessen (24 Stunden nach dem Auslösen der Kontaktdermatitis) und mit den Werten, die 24 Stunden danach ermittelt wurden, verglichen.

In Abbildung 11 ist der Einfluss der IL auf die Veränderungen der Ohrdicken und somit auf das Ausmaß der Schwellung graphisch dargestellt.

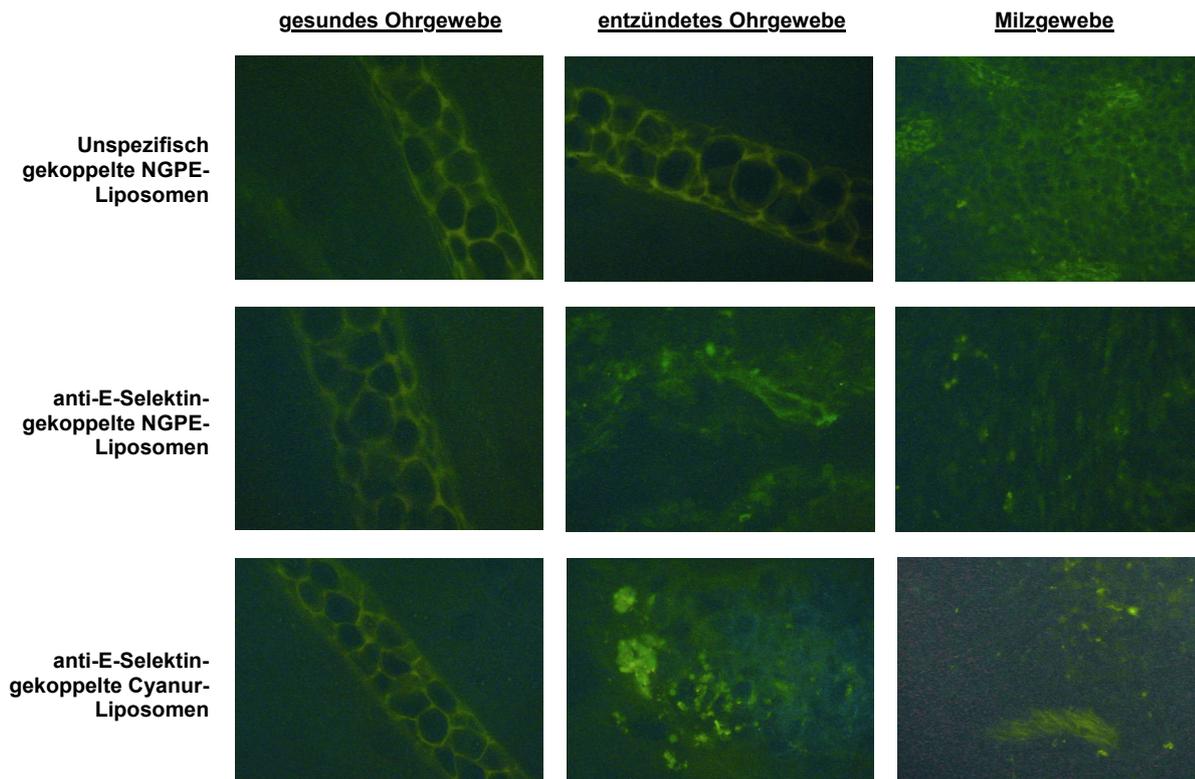


**Abbildung 11:** Einfluss der IL auf das Ausmaß der Ohrschwellung 24 Stunden nach der Applikation

Die Ergebnisse zeigten allerdings keine Abnahme der Ohrdicken im Verlaufe des Versuches. Es kam bei allen eingesetzten Proben zu einer Zunahme der Schwellung nach der Applikation, sodass auf keinen schnellen entzündungshemmenden Effekt der leeren IL in den eingesetzten Konzentrationen im Untersuchungszeitraum geschlossen werden kann.

Bezüglich der Albumin-gekoppelten Liposomen konnte eine Zunahme erwartet werden, da sie keine spezifische Bindung im Entzündungsgebiet zeigen können. Allerdings trifft dies auch für die beiden spezifisch gekoppelten Liposomenpräparationen zu. Auf die Bindung der spezifischen NGPE-Liposomen könnte sich auch *in vivo* die Abschirmung der oberflächlich gebundenen Antikörper durch die PEG-Ketten negativ auswirken, sodass mit der verminderten E-Selektin-Bindung auch die entzündungshemmenden Effekte reduziert sind. Betrachtet man die Ergebnisse der spezifisch gekoppelten Cyanur-Liposomen, so wird deutlich, dass sich nur bei der höheren Konzentration der Cyanur-Liposomen zumindest ein gleichbleibendes Ausmaß der Schwellung verzeichnen lässt. Prinzipiell deutet dies zwar auf einen primär entzündungshemmenden Effekt durch stärkere Bindung am Endothel der Liposomen hin, die Daten sollten aber kein klares und mit der Bindung korrelierendes Indiz sein.

Um die Liposomenbindung direkt zu analysieren, wurden die Gewebe nach Targetierung fluoreszenzmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 12). Die Bilder der gesunden Mausohren bilden die Kontrolle (grün: selbstfluoreszierender Knorpel), sowie die nicht vorhandene Anreicherung der unspezifisch gekoppelten IL im entzündeten Gewebe.



**Abbildung 12:** Erfolgreiches E-Selektin-Targeting *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Akkumulation der IL in entzündetem Mausohrgehör in Abhängigkeit vom Lipid-Anker und des gekoppelten Proteins

Bei Betrachtung der Bilder wird die stärkere Akkumulation der spezifischen Typ-II-Liposomen im Entzündungsgebiet im Vergleich zu den beiden anderen Typ-I-IL deutlich. Während die Albumin-NGPE-Liposomen nur eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz neben dem autofluoreszierenden Knorpelgewebe des Ohres aufzeichnen, sind die anti-E-Sel-NGPE-Liposomen deutlich stärker angereichert. So wird deutlich, dass auch die NGPE-Liposomen trotz sterischer Abschirmung der Antikörper durch PEG ein Bindungspotential unter Entzündungsbedingungen aufweisen. Dies ist allerdings nicht so ausgeprägt, wie es bei der Verwendung des Cyanur-Ankers beobachtet werden kann. Durch diese Bilder wird auch *in vivo* der Vorteil der herausragenden räumlichen Anordnung der Antikörper direkt an den PEG-Ketten und somit außerhalb der PEG-Schutzschicht um die Liposomenbilayer deutlich.

Die Bilder des Milzgewebes verdeutlichen jedoch den limitierenden Effekt einer systemischen Liposomenanwendung. Nach intravenöser Applikation der IL werden diese von Zellen des RES, z. B. der Milz, aus der Zirkulation eliminiert. Die Bilder zeigen für jede Liposomenpräparation eine Akkumulation im untersuchten Milzgewebe. Dabei spielt die Anwesenheit und die Position sowie die Menge des liposomal gebundenen Antikörpers für das Ausmaß der Anreicherung eine entscheidende Rolle. Dabei kann im Falle der Cyanur-PEG-IL aufgrund der exponierten Lage des Antikörpers außerhalb der PEG-Schutzschicht die stärkste Akkumulation beobachtet werden. Im Vergleich dazu wirkt sich bei den NGPE-PEG-IL die Abschirmung des Liganden durch die PEG-Ketten minimierend auf die Antigenität aus. Aller-

dings geht diese schützende Abschirmung zu Lasten der Targetspezifität. Da bekanntermaßen Antikörperkopplungsmengen über 70 µg/ml eine schnelle Eliminierung der applizierten IL aus der Blutzirkulation induzieren [Allen et al. (1995)], stellen die bei diesen Präparationen erreichten Kopplungsmengen von 30 bis 40 µg/ml einen guten Kompromiss von Targeterkennung verbunden mit akzeptablen Zirkulationshalbwertszeiten dar.

Durch die Akkumulation von E-Selektin-gerichteten IL im entzündeten Gewebe stellen sie ein potentielles Drug Targeting-System dar, um Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen zu erreichen. Dabei ist jedoch das Ausmaß der Anreicherung im Entzündungsgebiet nach intravenöser Applikation von der Auswahl des jeweiligen Kopplungsankers abhängig.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden zahlreiche Optimierungen in Angriff genommen, um durch liposomale Modifizierungen eine gezielte, extrazelluläre oder intrazelluläre Freisetzung von Substanzen aus den Liposomen zu ermöglichen.

#### **4.2 Extrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhaltes durch target-sensitive IL**

Die erfolgreiche Akkumulation der Liposomen am Wirkort ist zwar eine Voraussetzung, kann allerdings einen therapeutischen Effekt der eingeschlossenen Wirkstoffe nicht garantieren. Diese müssen in freier Form am Wirkort vorliegen, um regulativ auf das Krankheitsgeschehen wirken zu können. Die Anwendung von Liposomen mit sog. controlled-release-Mechanismen bietet dafür eine Möglichkeit, um die liposomal eingeschlossenen Substanzen gezielt entweder extrazellulär oder intrazellulär freizusetzen. Diese Liposomen sind so modifiziert, dass sie durch definierte Stimuli eine Destabilisierung der Liposomenbilayer erfahren und zu einer kontrollierten Inhaltsfreisetzung am Zielort führen.

In den folgenden Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf einer extrazellulären Freisetzung des liposomalen Inhaltes. Die Liposomen wurden in ihrer Zusammensetzung so verändert, dass durch die Bindung der IL an ihre Zielstruktur eine Kontaktfreisetzung stattfand. Bei der Verwendung dieser target-sensitiven Liposomen bildet die Bindung der Liposomen den Auslöser für die Freisetzung, welche einer Destabilisierung und Permeabilitäts-erhöhung der Liposomenmembran folgt.

Bei den target-sensitiven Liposomen stellt DOPE die Hauptlipidkomponente dar, welches nur durch den Zusatz von Stabilisatoren intakte Vesikel ausbilden kann. Zur Stabilisation eignen sich u. a. auch Antikörper-Lipidkonjugate, die gleichzeitig die Voraussetzung für eine gezielte Anreicherung und Freisetzung durch Destabilisierung der liposomalen Membran aufgrund der Bildung von Ligand-Rezeptoren-Komplexen an der Zelloberfläche sind.

Als Lipid-Anker für diese Untersuchungen wurde N-Glutary-PE genutzt, da nur durch diesen Anker eine oberflächennahe Kopplung der Antikörper garantiert werden konnte. Aufgrund der Fluidität der Vesikelmembran kommt es nach Bindung der Liposomen an die Zellzielstruktur zu einer Wanderung der Antikörper-Lipidkonjugate. Es folgt eine Destabilisierung der Liposomenmembran, da an der zellabgewandten Seite eine Verarmung der Stabilisatoren resultiert und dadurch die Permeabilität der Membran bis hin zum Zerfall steigt. Ein weiterer, zusätzlicher Destabilisierungsprozess ist die Aggregation benachbarter Liposomen. Dafür ist es wichtig, dass die Liposomen relativ starr an die Zelloberfläche gebunden und fixiert werden und somit der Aggregation nicht ausweichen können. Diese Starrheit ist ebenfalls für die Wanderung der Antikörper-Lipid-Konjugate essentiell. Dadurch müssen sie den Weg innerhalb der Liposomenmembran zurücklegen, um ihren Bindungspartner zu erreichen. Diese Effekte würden durch die Verwendung des Cyanur-PEG-Lipid-Ankers, aufgrund der Flexibilität der Antikörper durch die exponierte Lage an den Polymerenden, nicht erreicht.

In der alleinigen Zusammensetzung aus DOPE und Antikörper-Lipidkonjugat wären die target-sensitiven Liposomen allerdings für eine perspektivische *in vivo*-Applikation nicht einsetzbar, da sie innerhalb kürzester Zeit aus der Blutzirkulation eliminiert würden. Ein Zusatz des schützenden mPEG-PE ist somit unerlässlich. Wie die vorausgehenden Stabilitäts- [Kessner (2004)] und Targetierungsergebnisse (siehe Kapitel 4.1) jedoch verdeutlichen, führt eine Konzentration von 5 mol% PEG zu einem starken stabilisierenden Effekt auf die Vesikel sowie zu einer zu großen Abschirmung der oberflächlich gekoppelten Antikörper. Da diese sterische Stabilisierung durch PEG einen Verlust der Targetspezifität verursacht, musste eine Anpassung der PEG-Konzentration erfolgen, um einen optimalen Kompromiss aus quantitativer Bindung, kontrollierter Freisetzung und ausreichender Abschirmung gegenüber Blutbestandteilen zu finden. Versuche mit PEG-Mengen in den Bereichen von 1 mol% bis 3 mol% sollten Erkenntnisse über das Ausmaß des PEG-Konzentrationseinfluss auf die Bindung verdeutlichen.

In den darauffolgenden Stabilitätsuntersuchungen wurde die optimierte target-sensitive Lipidzusammensetzung auf ihre Stabilität im Serum getestet, welche die Grundlage der Durchführbarkeit von Bindungs- und Freisetzungsversuche an Zellen *in vitro* und *in vivo* bildet.

Um das Ausmaß der Freisetzung des liposomalen Inhaltes zu verfolgen, wurde sowohl für die Freisetzungs- als auch die Stabilitätsversuche 6-CF in die Liposomen eingeschlossen. 6-CF zeigt in hohen Konzentrationen einen self-quenching-Effekt. Solange der Farbstoff in den Liposomen eingeschlossen ist, zeigt er aufgrund dieses Effektes keine Fluoreszenz. Durch Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes aus den target-sensitiven Liposomen nach Bindung oder durch Membranstabilitäten der Vesikel führt die Freisetzung zu einer Verdünnung des Farbstoffes im umgebenden Medium und somit zu einer Zunahme der Fluores-

zenz. Die quantitative Erfassung des freigesetzten 6-CF wurde an einem Mikroplatten-Reader durchgeführt

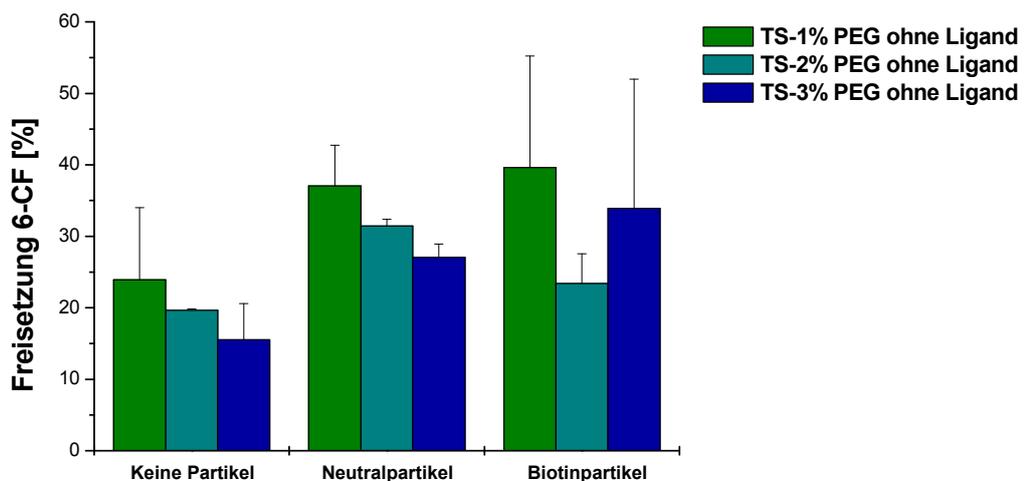
Als Bezugswert wurde die Fluoreszenz der Liposomen nach Zugabe von Triton X-100 festgelegt, da durch diese Tensidlösung eine vollständige Zerstörung der Liposomen erfolgte und der Farbstoff komplett in das Versuchsmedium freigesetzt wurde. Dieser Wert konnte als die maximal erreichbare Fluoreszenz angesehen werden.

#### 4.2.1 Abhängigkeit der target-sensitiven Freisetzung von der mPEG-PE-Konzentration

Aus Kostengründen wurde für die Optimierungsversuche auf ein partikuläres Modellsystem zurückgegriffen. Als künstliche Targetzellen dienten Feststoffpartikel aus Melamin einer Größe von 7  $\mu\text{m}$ . Diese wurden mit einer Bilayer überzogen, in welche Biotin-PE als Bindungsziel für die Liposomen verankert wurde. Neutralpartikel ohne Biotin an der Oberfläche dienten dem Vergleich, um unspezifische Adhäsionsereignisse berücksichtigen zu können.

Die zu untersuchenden target-sensitiven Vesikel wurden mit Biotin-Antikörpern versehen, um die spezifische Bindung der IL an Biotin zu gewährleisten. Für die Optimierung der PEG-Konzentration wurden target-sensitive Liposomenpräparationen mit einem Zusatz von 1 mol%, 2 mol% und 3 mol% mPEG<sub>2000</sub>-PE untersucht.

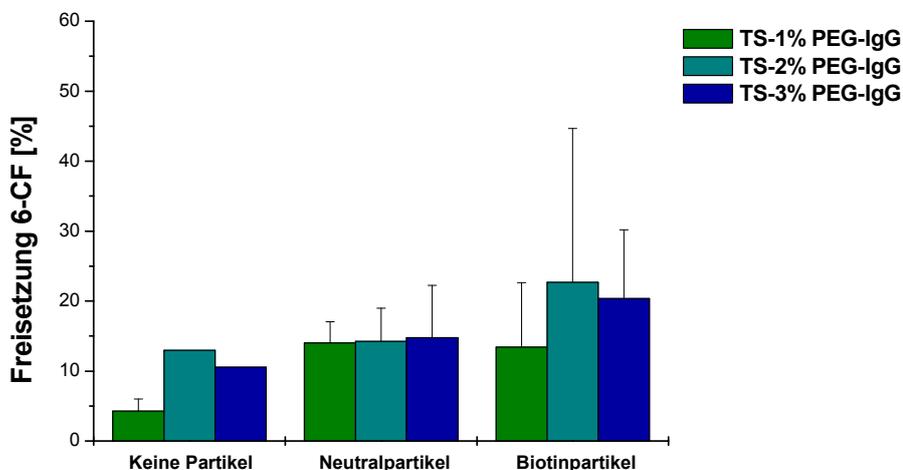
Abbildung 13 zeigt den prozentualen Anteil an freigesetztem 6-CF nach 120 Minuten aus target-sensitiven Liposomen ohne gekoppelten Liganden mit PEG-Konzentrationen von 1 mol%, 2 mol% und 3 mol% nach Kontakt mit Neutral- und Biotinpartikel.



**Abbildung 13:** Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus ungekoppelten Liposomen nach 120 Minuten

Von allen drei Liposomenspezies zeigen die Vesikel mit 1 mol% mPEG-PE in allen Bereichen (ohne Partikel, Neutralpartikel, Biotinpartikel) die höchste Freisetzung. Werden die Ergebnisse der Versuche ohne Partikel und der Neutralpartikel betrachtet, ist mit zunehmender PEG-Konzentration eine fallende Freisetzung von 6-CF zu verzeichnen. Das spricht für einen zunehmenden stabilisierenden und abschirmenden Effekt allein durch Erhöhung des PEG-Anteils. Die Liposomenmembran wird mit zunehmender PEG-Konzentration stabiler und unempfindlicher gegenüber spontanen Destabilisierungen aufgrund des Liposomenkontaktes untereinander oder des Kontaktes mit den Partikeln. Diese Versuche verdeutlichen den stabilisierenden Effekt, welcher allein durch die Zugabe von mPEG-PE verursacht wird. Da keine Zielspezifität der Liposomen vorhanden ist, kann auch die Freisetzung aus den target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit den Biotinpartikeln auf eine unspezifische Wechselwirkung der Liposomen mit der Partikeloberfläche sowie der Vesikel untereinander zurückgeführt werden.

Abbildung 14 zeigt den Einfluss der PEG-Konzentration aus target-sensitiven Liposomen gekoppelt mit unspezifischem IgG. Dargestellt ist die prozentuale Freisetzung des 6-CF nach Kontakt der Liposomen mit Neutral- und Biotinpartikeln nach 120 Minuten.



**Abbildung 14:** Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus unspezifisch gekoppelten Liposomen nach 120 Minuten

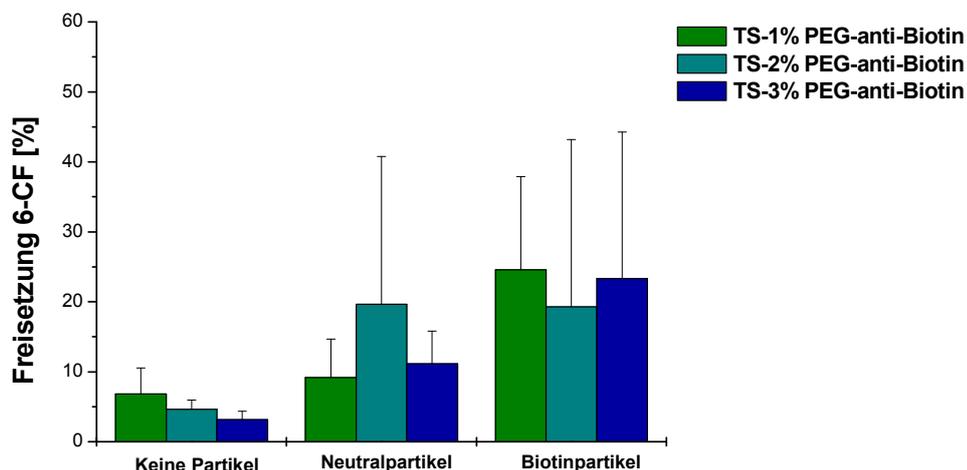
Verglichen mit den Versuchen der ungekoppelten Liposomen (siehe Abbildung 13) sind für die IgG-gekoppelten IL in allen drei Versuchsbedingungen (keine Partikel, Neutral- und Biotinpartikel) geringere Freisetzungen zu verzeichnen. Dies gilt ebenfalls für die verschiedenen eingesetzten PEG-Konzentrationen. Die deutlich geringeren Fluoreszenzen verdeutlichen den stabilisierenden Effekt des IgG auf die Liposomenbilayer, welcher hier neben der Anwesenheit des PEGs stark zum Tragen kommt. Dieser starke stabilisierende Effekt des vorhandenen Liganden wird besonders beim Vergleich der Versuche ohne Partikel aller drei Liposomenpräparationen (ungekoppelt, IgG-, anti-Biotin-gekoppelt) deutlich. In Anwesenheit

eines Liganden reicht schon eine Konzentration von 1 mol% mPEG-PE aus, um die Stabilität der target-sensitiven IL enorm zu steigern.

Da bei diesen Versuchen aufgrund der fehlenden Targetspezifität eine spezifische Bindung an den Biotinpartikeln auszuschließen ist, kann die zunehmende Fluoreszenz bei Betrachtung des spezifischen Systems ebenfalls nur auf unspezifische Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche zurückgeführt werden.

Werden die unterschiedlichen PEG-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Versuche betrachtet, können jedoch keine so eindeutigen Aussagen wie bei den ungekoppelten Liposomen getroffen werden.

Die Abbildung 15 zeigt die prozentuale Freisetzung von 6-CF aus anti-Biotin-gekoppelten, target-sensitiven Liposomen nach 120 Minuten ohne Anwesenheit von Partikel sowie nach Kontakt mit Neutral- und Biotinpartikeln.



**Abbildung 15:** Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus anti-Biotin-gekoppelten Liposomen nach 120 Minuten

Durch die stabilisierende Wirkung des Antikörpers kommt es auch hier im Vergleich zu den Liposomen ohne Ligand (siehe Abbildung 13) zu geringerer Freisetzung, allerdings sind hier die Unterschiede bei den Versuchen ohne Partikel besonders stark ausgeprägt.

Bei den Versuchen mit den Neutralpartikeln spielen unspezifische Adsorptionsvorgänge an der Partikeloberfläche eine entscheidende Rolle, durch die eine Zunahme der Freisetzung des liposomal eingeschlossenen Farbstoffes im Vergleich zu den partikelfreien Versuchen resultiert. Beim Wechsel von den Neutral- zu den Biotinpartikeln resultiert eine deutliche Erhöhung der Freisetzung, was durch die spezifische Bindung der anti-Biotin-gekoppelten Liposomen an das Biotin der Partikeloberfläche bedingt ist. Durch die Ausbildung spezifischer Bindungen zwischen Liganden auf der Liposomenoberfläche und Zielstrukturen auf der Membran kann das Ausmaß der Adsorption weiter gesteigert werden. Allerdings ist im Ver-

gleich der Liposomen hinsichtlich der PEG-PE-Menge nur ein marginaler Unterschied in der Freisetzung zu verzeichnen.

Werden die Liposomenpräparationen (IgG-, anti-Biotin-gekoppelt) mit 1 mol% PEG bzgl. ihrer Freisetzung an den Biotinpartikeln miteinander verglichen, so ist bei dieser PEG-Konzentration die höchste Zunahme des freigesetzten 6-CF im Vergleich von unspezifischen und spezifischen Bindungen zu verzeichnen.

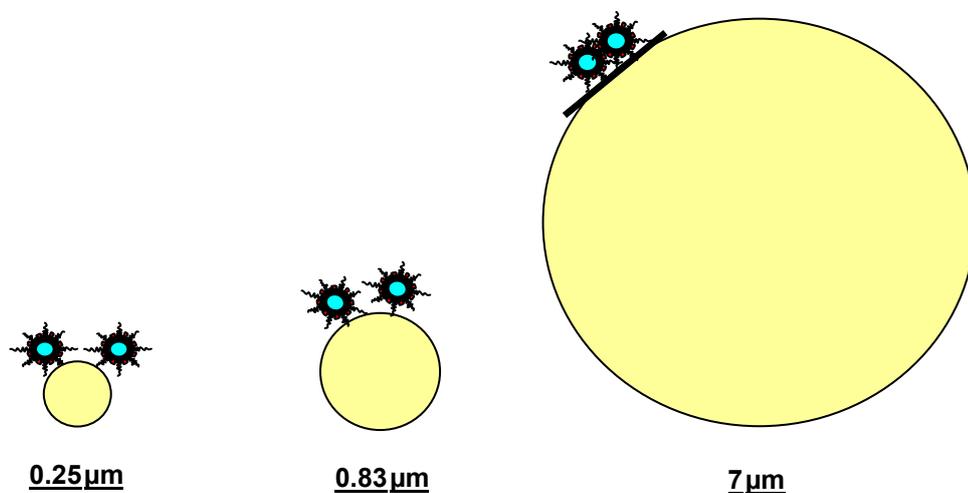
Da die Ergebnisse der unterschiedlichen PEG-Konzentrationen bezüglich Stabilität (ersichtlich in den Ergebnissen der Versuche ohne Partikel) nicht so stark voneinander abweichen und die Präparationen mit 1 mol% PEG den höchsten Anteil an freigesetztem 6-CF aufgrund der spezifischen Bindung an Biotinpartikeln zeigten, wurde diese mPEG-PE-Konzentration für die Herstellung der target-sensitiven Liposomen ausgewählt.

#### 4.2.2 Aufklärung des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus

Nachdem der Einfluss die PEG-Konzentration untersucht und eine Konzentration von 1 mol% für die target-sensitiven Liposomen festgelegt wurde, sollten weitere Versuche zur Optimierung und zur Bestätigung des target-sensitiven Freisetzungsmechanismus folgen.

Dafür wurde wiederum ein partikuläres Testsystem genutzt, wobei nun Melaminpartikel unterschiedlicher Größe als Modellzellen dienten. Es kamen Partikel der Größen 0,25  $\mu\text{m}$ , 0,83  $\mu\text{m}$  und 7  $\mu\text{m}$  zum Einsatz. Durch diese variierenden Größen standen für die Bindung unterschiedliche Bindungsflächen zur Verfügung.

In Abbildung 16 sind der Vergleich der drei Partikelgrößen und die Relation zu Liposomen graphisch dargestellt.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der Partikelgrößen und Anordnung der Liposomen nach Bindung an der Partikeloberfläche

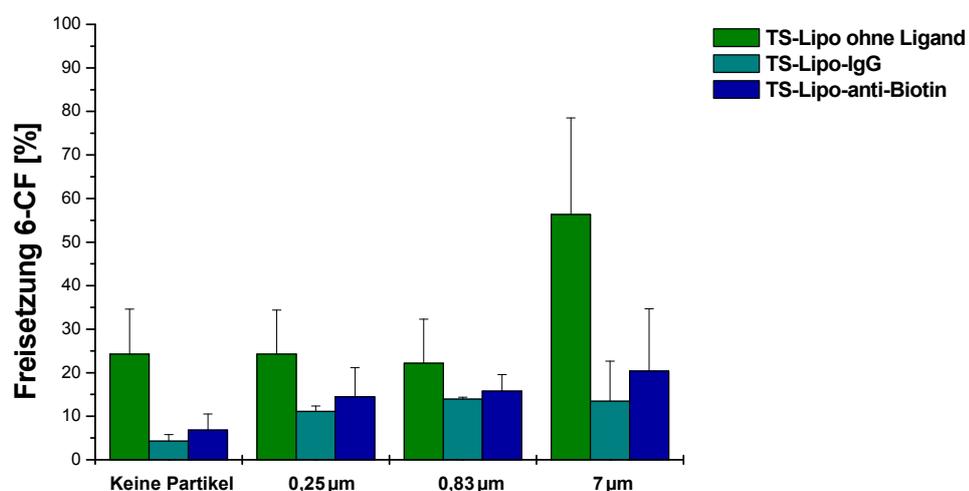
Bei den  $0,25\mu\text{m}$  und  $0,83\mu\text{m}$  großen Partikeln ist durch die deutlich stärkere Krümmung eine Aggregation benachbarter Liposomen und eine dadurch eingeleitete Freisetzung des liposomalen Inhaltes im Bindungsprozess deutlich erschwert. Im Vergleich dazu findet sich auf den größtmäßig zellanalogen  $7\mu\text{m}$ -Partikeln eine planare Bindungsfläche. Benachbarte Liposomen können aufgrund der räumlichen Nähe nach der Bindung verstärkt in Kontakt miteinander treten. Es folgt die Aggregation und Destabilisierung der Liposomenmembran und die Freisetzung eingeschlossener Substanzen an der Membranoberfläche.

Durch diese Versuche sollte die Notwendigkeit einer Aggregation benachbarter Liposomen verdeutlicht werden. Die Ergebnisse sollten einen indirekten Beweis liefern, dass der Kontakt bindender Liposomen untereinander direkt an der Zieloberfläche für die Freisetzung notwendig ist und somit die Aggregation benachbarter Vesikel den Hauptmechanismus der target-sensitiven Freisetzung darstellt.

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurden die Partikel mit biotinylierten Bilayern überzogen und die Wechselwirkungen mit 6-CF gefüllten Liposomen in Abhängigkeit der Biotinerkennung untersucht.

Die quantitative Erfassung des freigesetzten 6-CF an einem Mikroplatten-Reader ermöglichte eine parallele Versuchsdurchführung mehrerer Einzelproben in Mikrotiterplatten. Zu Beginn der Versuche wurden die Partikel unterschiedlicher Größe in die einzelnen Wells pipettiert und in einer entsprechenden Menge Versuchsmedium verdünnt. Nach Zugabe der Liposomen wurden die Platten sofort der Messung zugeführt und die Freisetzung über 120 Minuten fluorimetrisch verfolgt.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Freisetzung durch Interaktionen der target-sensitiven Liposomen mit biotinylierten Partikeln unterschiedlicher Größe nach 120 Minuten in Abhängigkeit des Liganden graphisch dargestellt.



**Abbildung 17:** Prozentuale Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen in Abhängigkeit der Partikelgröße und des Liganden nach 120 Minuten

Die ungekoppelten Liposomen zeigen erneut die höchste Freisetzung. Wie aus den Versuchen ohne Partikel erkennbar, ist diese hohe Freisetzung auf den fehlenden stabilisierenden Effekt eines Liganden an der Liposomenoberfläche zurückzuführen. Diese Instabilität ist auch im Kontakt mit allen drei Partikelarten dominierend.

Für die unspezifisch gekoppelten Liposomen ist ebenso wenig eine Abhängigkeit von der Partikelgröße zu erkennen. Sie zeigen allerdings eine deutlich bessere Stabilität unter diesen Versuchsbedingungen, was aus dem Vergleich mit den Ligand-freien Liposomen bei den Versuchen ohne Partikel deutlich wird. Da jedoch eine Steigerung der Fluoreszenz nach Kontakt mit Partikeln stattfindet, spielen bei dieser Liposomenpräparation unspezifische Wechselwirkungen und Adsorptionsvorgänge an der Partikeloberfläche eine Rolle für die Freisetzung. Auch unspezifischen Adsorptionsprozessen an der Partikeloberfläche können Aggregationen folgen, wodurch eine höhere Destabilisierung und vermehrte Freisetzung aus diesen Liposomen begünstigt wird.

Wie postuliert, fehlt den Liposomen an den  $0,25\mu\text{m}$  und  $0,83\mu\text{m}$  großen Partikeln die räumliche Nähe zueinander, sodass eine Aggregation benachbarter Liposomen unter diesen Voraussetzungen kaum erfolgen kann. Somit entfällt der destabilisierende Schritt der Aggregation und die Freisetzung muss allein durch die Destabilisierung aufgrund der lateralen Diffusion der Ligand-Ankerlipid-Komplexe in der Liposomenmembran erfolgen. Diese Diffusion reicht allerdings nicht für eine verstärkte Freisetzung des liposomalen Inhaltes aus. Im Gegensatz dazu findet sich auf den Zellgrößen-entsprechenden  $7\mu\text{m}$ -Partikeln eine planare Bindungsfläche, sodass benachbarte Liposomen nach Bindung sehr schnell in Kontakt miteinander treten können. Dies führt durch Aggregation und die dadurch bedingte Destabilisierung der Liposomenmembran, unterstützt durch die Diffusion der Ligand-Ankerlipid-Komplexe in Richtung Targetmembran zur verstärkten Freisetzung des liposomalen Inhaltes.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass mit zunehmender Partikelgröße eine größere Kontaktfläche und somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Kontaktes der Liposomen miteinander resultiert. Aggregationen zwischen den bindenden Liposomen werden möglich. Daraus resultiert eine vermehrte Freisetzung des eingeschlossenen Farbstoffes. Die Ergebnisse bestätigen den Mechanismus der multivalenten Bindung an der Zielmembran und der Aggregation benachbarter Liposomen. Die Voraussetzungen des target-sensitiven Mechanismus für eine quantitative Freisetzung des liposomalen Inhaltes sind somit die Aggregation benachbarter Liposomen und die folgende Destabilisierung der Bilayer.

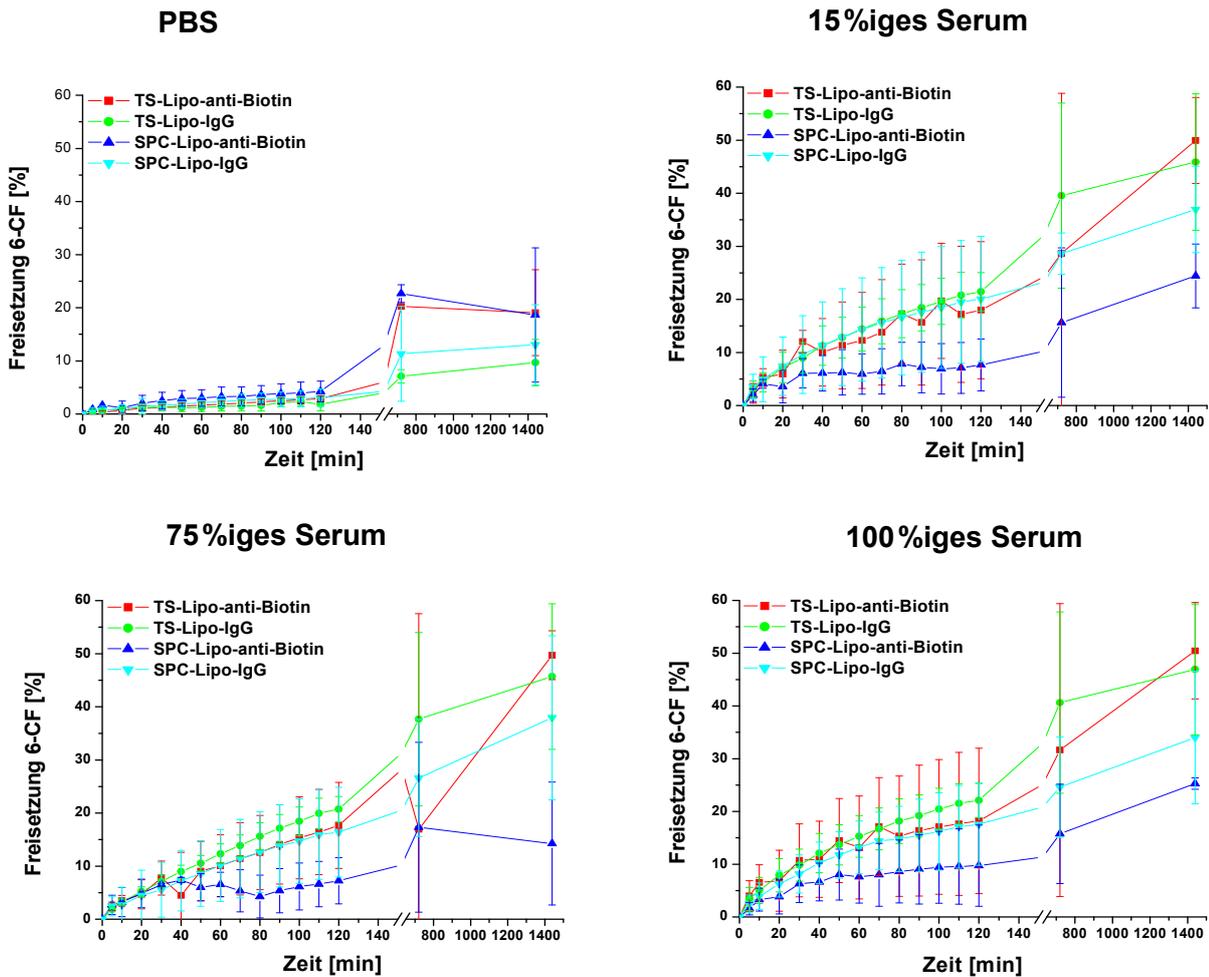
### 4.2.3 Stabilitätsuntersuchungen der target-sensitiven Liposomen

Um einen Vergleich von *in vitro*- und *in vivo*-Verhalten von Liposomen anstellen zu können, muss der mitunter destabilisierende Effekt von Serumproteinen auf Liposomen berücksichtigt werden. Interaktionen zwischen Liposomen und Blutbestandteilen, wie z. B. Immunglobulinen, Komplementfaktoren, haben großen Einfluss auf die Membranintegrität [Bonte et al. (1986)]. Durch Wechselwirkung mit Serumlipoproteinen, bspw. dem HDL, kommt es zu einer Extraktion von Phospholipiden [Scherphof et al. (1978), Tümer et al. (1983)]. Ein Ausfluss des liposomalen Inhaltes durch die gestörte Membran und somit ein Verlust des gewünschten therapeutischen Effekts des applizierten Drug Delivery Systems sind die Folge. Darüber hinaus erhöht die Anwesenheit von Antikörpern an der liposomalen Oberfläche zusätzlich die Anfälligkeit einer komplementinduzierten Lyse [Alving (1992)].

Aus diesem Grund wurden alle *in vitro*-Zellversuche dieser Arbeit unter Zugabe von FKS zum jeweiligen Versuchsmedium durchgeführt. Dies ist insbesondere für die Stabilität der target-sensitiven IL mit ihrer Balance von Stabilisierung und Destabilisierung nach Triggermechanismus von größter Bedeutung.

Um die Effekte der Serumbestandteile auf die Stabilität der target-sensitiven IL zu erfassen, wurde das Verhalten der Liposomen in frischem 15%igem, 75%igem und 100%igem humanem Serum untersucht. Die Ergebnisse der Stabilität der IL in PBS bilden dabei die Basis für die Untersuchungen im Serum.

Abbildung 18 zeigt die Zunahme der prozentualen Freisetzung des 6-CF aus den IL während eines Zeitraumes von 24 Stunden in PBS und verschieden konzentriertem Serum.



**Abbildung 18:** Graphische Darstellung der Zunahme der Fluoreszenz durch freigesetztes 6-CF aus den Liposomen in Anwesenheit von PBS und Serum verschiedener Konzentrationen

**PBS:** Alle Präparationen zeigen zu Beginn einen flachen Kurvenverlauf, was auf eine gleichbleibende Stabilität der Liposomen hindeutet. Mit zunehmender Versuchsdauer steigt die Fluoreszenz recht gleichmäßig, wobei geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen sichtbar werden. Dabei ist jedoch erkennbar, dass sich die Anwesenheit des Biotin-Antikörpers negativ auf die Stabilität der betreffenden Liposomen in PBS im Vergleich zu den jeweiligen IgG-gekoppelten Präparationen auswirkt. Mit zunehmender Versuchszeit zeigen somit die IgG-gekoppelten Liposomen die höhere Stabilität.

**Serum:** Betrachtet man das gesamte Stabilitätsverhalten aller Liposomen im Serum, so verschlechtert sich dieses deutlich gegenüber PBS. Die Anwesenheit des Serums verringert die Stabilität sowohl der konventionellen als auch der target-sensitiven IL. Beim Vergleich der verschiedenen Serumkonzentrationen zeigen sich jedoch kaum Unterschiede. Eine Konzentrationssteigerung des Serums führt zu keiner weiteren Abnahme der Stabilitäten der Liposomen. Die Freisetzungen der einzelnen Liposomen-Präparationen ähneln sich bei allen Serumkonzentrationen sehr stark.

Darüber hinaus wird bei allen Serumkonzentrationen gleichermaßen deutlich, dass Cholesterol einen positiven Einfluss auf die Stabilität entfaltet. Die konventionellen Cholesterolhaltigen SPC-Liposomen zeigen bei allen verwendeten Serumkonzentrationen die bessere Stabilität gegenüber den target-sensitiven Liposomen. Cholesterol steigert die Rigidität der Liposomenmembran. Es folgen eine geringer Interaktionen mit Komponenten des Serum und somit eine höheren Stabilität, was sich in einer verminderten Freisetzung von 6-CF niederschlägt.

Die schlechtere Stabilität der target-sensitiven kann auf das Vorhandensein des fusogenen, zu Destabilisierungen neigenden DOPE zurückgeführt werden. Schon allein die Adsorption von Plasmaproteinen an die target-sensitive Liposomenbilayer kann zu einer Kontaktfreisetzung führen. Darüber hinaus kommt es bei den Interaktionen von PE-haltigen Liposomen mit Lipoproteinen, v. a. dem HDL, zu einem Lipidaustausch und somit zu einer Störung der Membranintegrität.

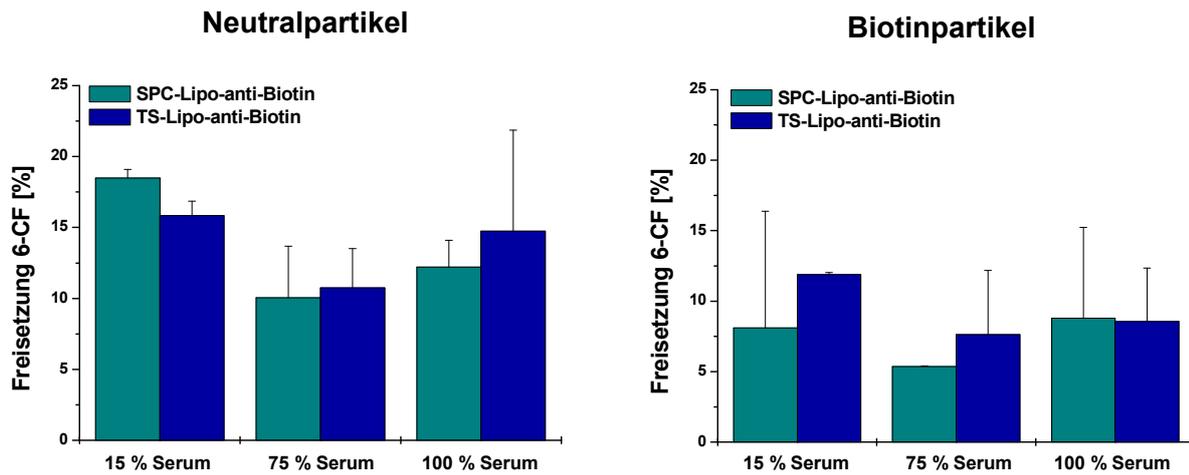
Wird die Spezies des Antikörpers betrachtet, so kann für die IgG-Liposomen innerhalb der einzelnen Liposomenpräparationen eine bessere Stabilität im Vergleich zu den jeweiligen anti-Biotin-gekoppelten Vesikel beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass diese, allerdings nicht signifikanten, Unterschiede auf die Speziesunterschiede der verwendeten Antikörper zurückzuführen sind.

Da jedoch alle Liposomen gerade in den ersten 12 Stunden eine ausreichende Stabilität zeigen, ist damit die Voraussetzung für die Targetierungs- und Freisetzungsversuche sowohl im *in vitro*-Zellsystem als auch prinzipiell im *in vivo*-Mausmodell gegeben.

#### **4.2.4 Target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes in Abhängigkeit des Mediums**

Nachdem die Stabilität der target-sensitiven Liposomen in Serum gezeigt werden konnte, sollten die folgenden Untersuchungen das Freisetzungsverhalten der Liposomen in Anwesenheit von Serumbestandteilen verdeutlichen. Diese Versuche wurden ebenfalls mittels des partikulären Modellsystems durchgeführt, wobei biotinylierte und nicht-biotinylierte Partikel miteinander verglichen worden. Das Freisetzungsverhalten der target-sensitiven Liposomen an 6-CF innerhalb der Versuchszeit von 120 Minuten wurde mit konventionellen Liposomen verglichen, wobei beide durch Funktionalisierung mit anti-Biotin ihre Spezifität erhielten.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Versuche in Abhängigkeit der Spezifität der Targetmembran, der Liposomenpräparation und der Konzentration des Serums dargestellt.



**Abbildung 19:** Prozentuale Freisetzungen von 6-CF nach Kontakt der Liposomen mit Biotin-präsentierenden Partikeln und Neutralpartikeln in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung der Liposomen und der Konzentration des Serums

Bei den Biotinpartikeln zeigen sich für 15%iges und 75%iges Serum höhere Freisetzungsraten der target-sensitiven Liposomen, wobei sich die Unterschiede zu den konventionellen Liposomen im 100%igen Serum relativieren. Diese Unterschiede sind bei den Neutralpartikeln nicht zu finden. Offensichtlich ist durch die fehlende Targetbindung der kleine Vorteil der target-sensitiven Liposomen nivelliert. Dies unterstreicht die Rolle der Targetbindung für den Freisetzungsmechanismus, der so auch in Maßen in Anwesenheit von Serumkomponenten gegeben ist.

#### 4.2.5 Bindungs- und Freisetzungsforschungen target-sensitiver IL an Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Die folgenden Targetierungs- und Freisetzungsforschungen wurden wiederum an stimulierten bEnd3 durchgeführt, um eine E-Selektin-Präsentation auf den Zelloberflächen für die Liposomen zu erreichen. Durch Funktionalisierung der target-sensitiven Liposomen mit anti-E-Selektin-Antikörpern erhielten diese ihre Zielspezifität. In den Versuchen wurde jeweils parallel dazu das Verhalten von unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen untersucht, um Rückschlüsse auf die zielgerichtete Bindung und Freisetzung ziehen und somit die Abhängigkeit der spezifische Zell-Liposomen-Wechselwirkung darstellen zu können.

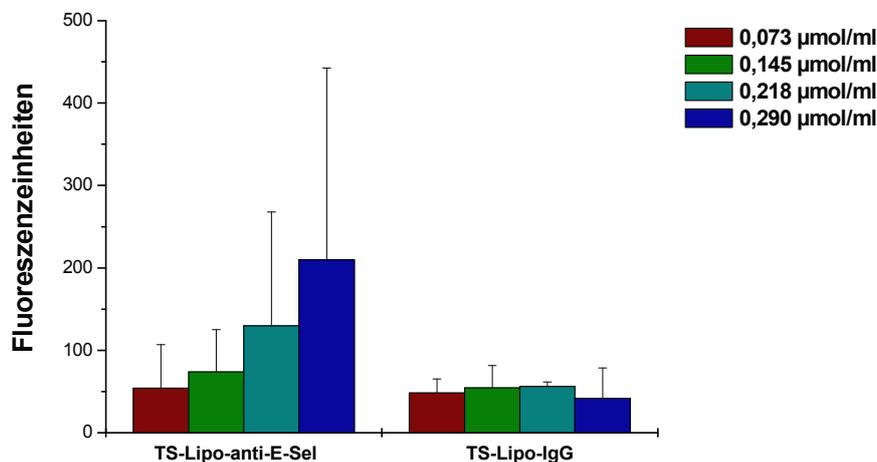
##### *E-Selektin-Targeting der target-sensitiven Liposomen*

Die erfolgreiche Bindung der target-sensitiven Liposomen an die Endothelzelloberfläche ist die Voraussetzung, um eine gezielte Freisetzung potentieller entzündungshemmender

Substanzen an der Endothelzelloberfläche im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie zu erzielen.

Diese Bindungsuntersuchungen wurden unter analogen Bedingungen wie bei den E-Selektin-Targetierungsversuchen der konventionellen IL in Kapitel 4.1.3 durchgeführt. Um die Bindungsereignisse fluorimetrisch detektieren zu können, wurden die Liposomen mit dem lipophilen Farbstoff Rhodamin (Ex. 520 nm; Em. 590 nm) versehen. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die einstündige Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten target-sensitiven IL in unterschiedlichen Konzentrationen bei 4 °C im Kühlschrank, um nur die Bindungsereignisse und keine Internalisierungsvorgänge erfassen zu können.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Bindungsereignissen der target-sensitiven IL in Abhängigkeit der Spezifität der Liposomen an den stimulierten Endothelzellen (bEnd3) unter statischen Bedingungen dargestellt.



**Abbildung 20:** Graphische Darstellung der Bindungsereignisse von target-sensitiven Liposomen an stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit der Spezifität des Liganden

Verglichen mit den unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen zeigen die E-Selektin-gerichteten Vesikel eine deutlich höhere Bindung. Darüber hinaus ist nur bei den spezifisch gekoppelten Liposomen eine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Mit zunehmender Liposomenmenge folgt eine Steigerung der Bindungsereignisse.

Die vergleichsweise relativ geringe Bindung der IgG-Liposomen gegenüber den anti-E-Selektin-Liposomen ist erstaunlich, werden die recht hohen unspezifischen Wechselwirkungen der vorausgegangenen E-Selektin-Targetierungsversuche mit konventionellen Liposomen betrachtet. Überraschend war auch die sehr hohe Kopplungsausbeute des IgG trotz der Abschirmung der Liposomenoberfläche durch mPEG-PE von 119 µg/µmol gegenüber der Kopplung der anti-E-Selektin-Antikörper von 79 µg/µmol.

Die veränderte Bindungsmenge bzw. Adsorption auf den Endothelzellen könnte auf die veränderte Lipidzusammensetzung zurückzuführen sein, wobei die target-sensitive Lipidmischung zu deutlich geringeren unspezifischen Wechselwirkungen neigt. Darüber hin-

aus zeigt sich auch der bindungssteigernde Effekt des verringerten mPEG-PE-Anteils von 5 mol% bei den zuvor durchgeführten E-Selektin-Targetierungsversuchen mittels konventioneller SPC-Liposomen auf 1 mol% mPEG-PE bei den hier angewandten target-sensitiven Liposomen.

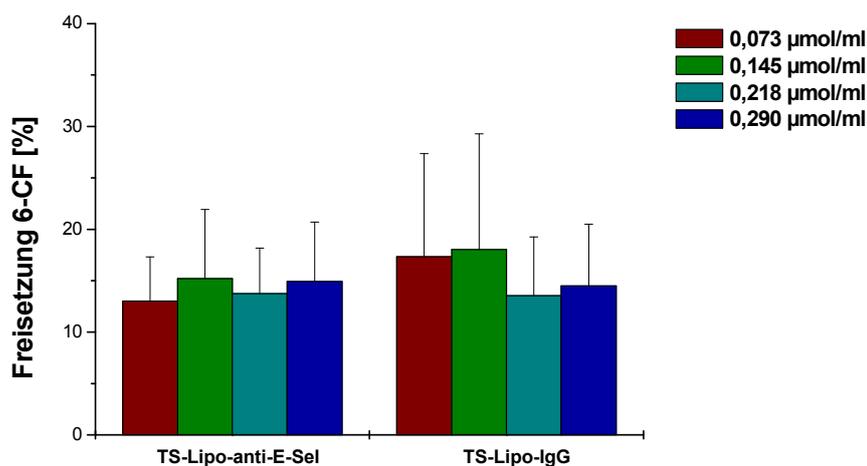
Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Bindungsfähigkeit der Liposomen direkt an das Vorhandensein des E-Selektins auf der Zelloberfläche geknüpft ist. Sie zeigen, dass das E-Selektin auf den Endothelzelloberflächen eine zwingende Voraussetzung für ein zielgerichtetes Drug-Release mittels target-sensitiver Liposomen ist.

#### *Target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes an der Endothelzelloberfläche*

Nachdem die Bindungsereignisse der target-sensitiven Liposomen an Endothelzellen betrachtet wurden, sollten in den folgenden Untersuchungen das Ausmaß der Freisetzung des liposomalen Inhaltes an der Zelloberfläche unter statischen Versuchsbedingungen gezeigt werden.

Im Vorfeld wurden die Zellen vier Stunden aktiviert, um die E-Selektin-Exprimierung zu stimulieren. Nach einer einstündigen Inkubation der stimulierten Zellen mit den spezifisch oder unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen wurde die Freisetzung des 6-CF fluorimetrisch detektiert.

In Abbildung 21 ist die prozentuale Freisetzung des 6-CF nach Kontakt mit den stimulierten Endothelzellen dargestellt.



**Abbildung 21:** Prozentuale Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit des Liganden

Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede zwischen den spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen. Ebenso wenig ist eine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Da die unspezifischen target-sensitiven Liposomen jedoch geringere Bindungsfähigkeiten zeigen (vgl. Abbildung 20), scheint die Freisetzung des liposomalen Inhaltes bei diesen auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Liposomen zurückzuführen sein.

Trotz der analogen Freisetzungsergebnisse der spezifischen, target-sensitiven Liposomen sollte die enorm bessere spezifische Bindung an den Endothelzellen (vgl. Abbildung 20) zu einer höheren, effektiveren Freisetzung des liposomalen Inhaltes an der Zelloberfläche führen.

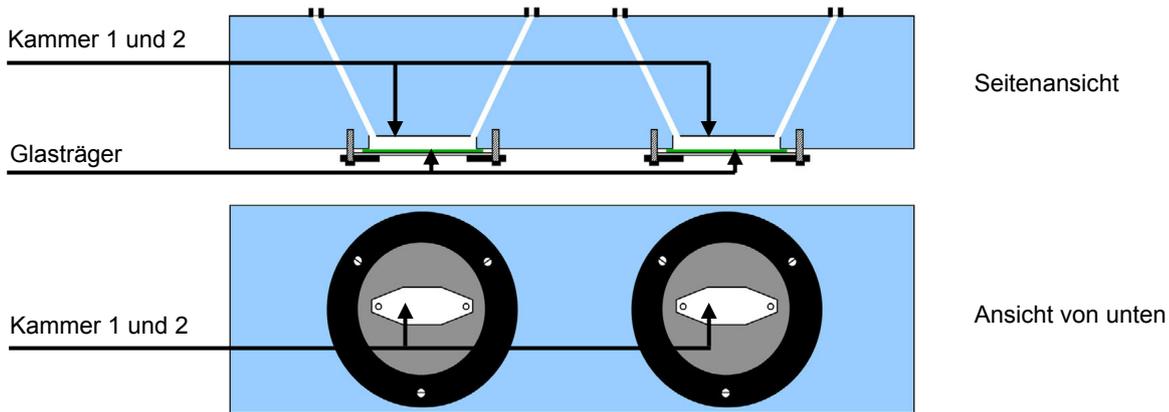
Da diese Untersuchungen den Vorteil der spezifischen target-sensitiven IL nur unter statischen Bedingungen darstellen, sollten in den folgenden Versuchen die Targetierungsfähigkeiten sowie das target-sensitive Freisetzungsverhalten dieser IL unter physiologischen Scherflussbedingungen analysiert werden.

#### 4.2.6 Dynamische Bindungs- und Freisetzungsuntersuchungen target-sensitiver IL

Beim Bindungsprozess in ihrer physiologischen Umgebung sind die Selektine dem Scherstress der Blutzirkulation ausgesetzt. E-Selektin-gerichtete IL müssen somit nach einer systemischen Applikation aus dem strömenden Blut heraus an E-Selektin der Endothelzellen binden.

Die Anpassung der Versuchsbedingungen an die physiologischen Gegebenheiten und Untersuchung der Wechselwirkungen von Liposomen mit aktivierten E-Selektin-exprimierenden Endothelzellen unter physiologischen Scherflussbedingungen sollte den *in vitro*-Untersuchungen eine größere Relevanz im Hinblick auf eine perspektivische *in vivo*-Applikation verleihen.

Für die Analyse der Interaktionen der Liposomen mit Modellmembranen oder Endothelzellen unter simulierten Scherflussbedingungen des Blutstromes wurde eine Durchflussapparatur aus Polycarbonat verwendet. Diese bestand aus zwei hintereinander angeordneten Durchflussskammern, wodurch eine parallele Betrachtung zweier unterschiedlicher Parameter ermöglicht wurde. Abbildung 22 zeigt schematisch den Aufbau dieser Apparatur.



**Abbildung 22:** Schematische Ansicht der verwendeten Durchflussapparatur mit zwei Durchflusskammern

Um Inhomogenitäten der Strömung auszuschließen, wurden die inneren Randbereiche der Kammern abgerundet. Durch jeweils zwei Bohrungen pro Kammer von der Oberseite in die Kammerräume wurde der Zu- bzw. Ausstrom des Testmediums ermöglicht. Außerhalb der Apparatur wurden diese Bohrungen mittels Schlauchverbindungen, welche durch eine Walzenpumpe geleitet wurden, mit dem Testmediumreservoir verbunden.

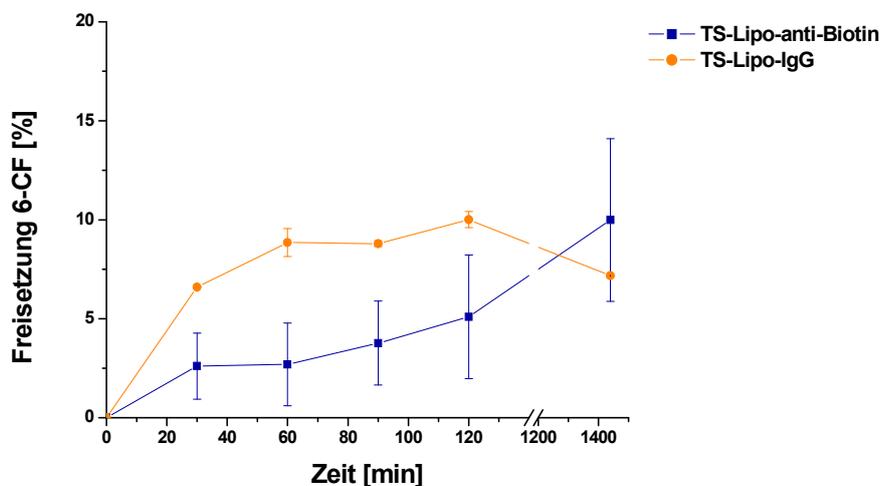
Die auf einem Glasträger ( $d=18\text{mm}$ ) fixierte Modellmembran oder kultivierte Endothelzellschicht bildeten das Kernstück dieses Testsystems. Diese beschichteten Glasplättchen wurden an der Unterseite der einzelnen Kammern eingespannt. Die beiden Kammern konnten einerseits getrennt mittels Zu- und Ableitungen bedient werden, was eine separate Betrachtung pro Kammer zuließ. So konnten bspw. gleichzeitig spezifisch und unspezifisch gekoppelte Liposomen analysiert werden. Andererseits ermöglichte die Verbindung beider Kammern miteinander die Durchführung von Untersuchungen an stimulierten und unstimulierten Zellen mit ein und derselben Liposomendispersion. Um Bindungsereignisse fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurde die Apparatur im Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops fixiert. Durch diese Variabilität der Durchflussapparatur konnten mehrere Fragestellungen gleichzeitig untersucht werden.

#### 4.2.6.1 Target-sensitive Freisetzungsuntersuchungen an Modellmembranen

Initiale Freisetzungsuntersuchungen wurden unter serumfreien Bedingungen an einer Biotin-präsentierenden Modellmembran durchgeführt. Bei diesen Betrachtungen lag das Hauptaugenmerk auf dem Freisetzungsverhalten der target-sensitiven Liposomen unter Flussbedingungen ohne Beeinflussung durch zusätzliche Komponenten, wie sie im Medium und Serum vorhanden sind. Dafür wurden die Glasplättchen mit der Biotin-präsentierenden Modellmembran überzogen und die Liposomen mit anti-Biotin-mAbs funktionalisiert. Als Kontrol-

le dienten IgG-gekoppelte, target-sensitive Liposomen. Durch den Einsatz der Durchflusskammer konnten die spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen parallel beobachtet werden. Durch Einschluss von 6-CF in die Liposomen konnte dessen Freisetzung während des Versuchszeitraumes von 24 Stunden fluorimetrisch verfolgt werden. Dafür wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten eine gleichbleibende Menge des Versuchsmedium (PBS) vermessen. Am Versuchsende wurde das Versuchsmedium mit Triton X-100 zur vollständigen Lysis der Liposomen versetzt, dieser Wert diente als Bezugswert.

In Abbildung 23 ist die Freisetzung von 6-CF aus spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen über einen Zeitraum von 24 Stunden dargestellt.



**Abbildung 23:** Graphische Darstellung der prozentualen Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen unter physiologischen Scherflussbedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit der Spezifität der Liposomen.

Die Ergebnisse zeigen für die unspezifisch gekoppelten Liposomen eine schnelle Freisetzung von 6-CF an der biotinylierten Modellmembran unter physiologischen Scherflussbedingungen gegenüber den Biotin-gerichteten IL, die wiederum einen stetig zunehmenden Freisetzungsverlauf in Abhängigkeit der Versuchsdauer aufweisen. Dies spricht für hohe unspezifische Wechselwirkungen und eine schnelle Adsorption der IgG-gekoppelten Liposomen. Innerhalb kürzester Zeit erreichen die unspezifisch gekoppelten Liposomen mehr als doppelt so hohe Freisetzungswerte. Die spezifischen target-sensitiven Liposomen zeigen dagegen einen flacheren, jedoch stetig zunehmenden Freisetzungsverlauf in Abhängigkeit der Versuchsdauer.

In Analogie zu den statischen Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass trotz der geringen Freisetzung des Wirkstoffs aus den spezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen gegenüber den ungerichteten Liposomen durch die deutlich höhere Targetbindung insgesamt Vorteile für die Freisetzung resultieren.

#### 4.2.6.2 Dynamische Bindungs- und Freisetzungsversuche an bEnd3

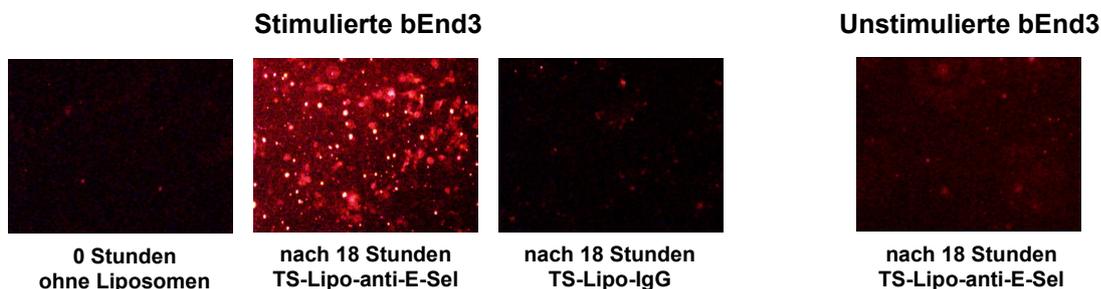
Für die folgenden *in vitro*-Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf der Expression des E-Selektin als Zielstruktur für das liposomale Targeting. Durch die Kopplung von anti-E-Selektin-Antikörpern an die Oberfläche der target-sensitiven Liposomen erhielten diese ihre Zielspezifität und wurden mit den IgG-target-sensitiven Liposomen verglichen. Dabei fand eine gleichzeitige, aber separate Betrachtung der jeweiligen Liposomenspezies sowohl an stimulierten als auch an unstimulierten Zellen statt.

##### *E-Selektin-Targeting an Endothelzellen unter dynamischen Bedingungen*

Der Einsatz der Doppelkammer ließ eine parallele Betrachtung von stimulierten und unstimulierten Zellen zu. Dafür wurde in die eine Kammer der Durchflussapparatur ein Glästräger mit aktivierten und in die andere ein Plättchen mit unstimulierten Endothelzellen eingespannt. Die Stimulation der konfluenten Endothelschichten erfolgte aus praktischen Gründen außerhalb der Apparatur in einer 6-Well-Platte, wo die Plättchen mit dem IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -haltigem Medium umspült wurden.

Der lipophile Farbstoff Rhodamin wurde in die Bilayer inkorporiert und ließ eine fluoreszenzmikroskopische Detektion der Bindungsereignisse an den Endothelzellen zu. Dafür wurde die Apparatur in den Objektisch des Fluoreszenzmikroskops eingespannt.

Abbildung 24 zeigt das Ausmaß der E-Selektin-Targetierung der spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen unter physiologischen Scherflussbedingungen an stimulierten und unstimulierten Endothelzellen.



**Abbildung 24:** Ausmaß der E-Selektin-Targetierung durch target-sensitive Liposomen in Abhängigkeit der Spezifität und des Aktivierungsstatus der Endothelzellen

Die mikroskopischen Bilder verdeutlichen, dass ein erfolgreiches E-Selektin-Targeting der target-sensitiven Liposomen an stimulierten Endothelzellen unter physiologischen Scherflussbedingungen stattfindet. Sie zeigen sehr deutlich, dass nach 18 Stunden die E-Selektin-gerichteten IL im überzeugenden Ausmaß an die Endothelzellen binden, während die un-

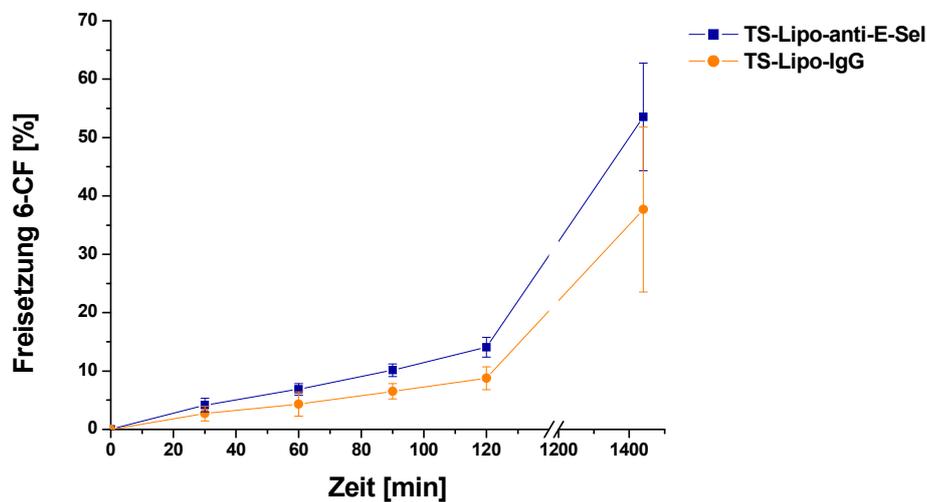
spezifischen IL eine sehr viel schwächer Zellbindung aufweisen. Dieses geringe Bindungsmaß stimmt auffallend mit den Bindungen der spezifischen Liposomen an den nicht-aktivierten Endothelzellen überein. Daraus wird deutlich, dass unspezifische Wechselwirkungen unter Flussbedingungen stark zurückgedrängt werden.

#### *Target-sensitive Freisetzung an Endothelzellen unter dynamischen Bedingungen*

Bei diesen Versuchen wurde das Freisetzungsverhalten beider Liposomenarten parallel an stimulierten Endothelzellen verfolgt. Dafür wurden in beide Kammern Glasplättchen mit stimulierten Zellen eingespannt. Die Aktivierung erfolgte mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wiederum außerhalb der Apparatur.

Mittels Schlauchverbindungen wurden die einzelnen Kammern mit dem jeweiligen Liposomen-Medium-Reservoir verbunden. Die Freisetzung des Fluoreszenzmarkers wurde über den Versuchszeitraum durch Detektion aus dem Medium heraus verfolgt. Am Ende des Versuches wurde durch Zugabe von Triton X-100 der maximale Fluoreszenzwert des Mediums ermittelt, um diesen als Bezugswert einsetzen zu können.

In Abbildung 25 sind die Freisetzungsläufe der beiden Liposomenarten über einen Zeitraum von 24 Stunden graphisch dargestellt.



**Abbildung 25:** Graphische Darstellung der prozentualen Freisetzung des 6-CF aus target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit des gekoppelten Liganden über einen Zeitraum von 24 Stunden

Wie die graphische Darstellung zeigt, setzen die spezifisch gekoppelten Liposomen nach Kontakt mit stimulierten Endothelzellen über den gesamten Versuchszeitraum mehr 6-CF frei als die unspezifisch gekoppelten, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ausgeprägt.

Die unter Flussbedingungen zurückgedrängten unspezifischen Wechselwirkungen der IgG-Liposomen an Endothelzellen kommen auch in diesen Freisetzungsversuchen zum Ausdruck, da das Ausmaß der Freisetzung aus diesen Vesikeln geringer ausfällt, verglichen mit den Versuchen unter statischen Bedingungen (vgl. Abbildung 21). Aufgrund der gezeigten unspezifischen Bindung der IgG-Liposomen an der stimulierten Endothelzelloberfläche zuvor unter diesen dynamischen Versuchsbedingungen ist die Freisetzung wiederum eher auf den Scherstress und das Vorhandensein von Medium- und Serumbestandteilen zurückzuführen.

Die Differenz der Freisetzung der spezifisch und unspezifisch gekoppelten Liposomen kann als Mindestfreisetzunganteil nach E-Selektin-Bindung angesehen werden. Wird zusätzlich noch die etwas schlechtere Stabilität der IgG-gekoppelten Liposomen in Anwesenheit von Serum in die Betrachtungen mit einbezogen, so erhöht sich der Anteil des freigesetzten liposomalen Inhaltes nach spezifischer Bindung.

Werden die Verläufe bis zum Ende des Versuches betrachtet, so fallen die höheren Endfreisetzungswerte verglichen mit den dynamischen Versuchen an den Biotinplättchen auf. Unter den hier herrschenden Versuchsbedingungen spielen nicht nur Bindungspartner auf den Endothelzellen und die Scherflussbedingungen eine Rolle, sondern auch die Anwesenheit von Komponenten des Zellmediums und des zugesetzten Serums. Hier können Parallelen zu den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen gezogen werden, bei denen die freigesetzten Mengen in PBS ebenfalls geringer ausfielen als in Anwesenheit von Serum, dessen Komponenten einen destabilisierenden Effekt auf die liposomale Membran ausüben.

Entscheidend für die Betrachtung der spezifischen Bindung ist demnach der Versuchszeitraum von null bis zwei Stunden nach dem Versuchsstart, welcher vier bis sechs Stunden nach Beginn der Stimulation entspricht, da erst nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mit dem Versuch und der Inkubation mit den Liposomen begonnen wurde. Somit wurden die stimulierten Endothelzellen erst nach vier Stunden (im Zustand der maximalen E-Selektin-Expression) in Kontakt mit den target-sensitiven Liposomen gebracht.

Die Kombination der Destabilisierungen durch Anwesenheit von Serumkomponenten und dem permanenten Scherstress führt demnach zu den hohen Endfreisetzungswerten nach 24 Stunden (verglichen mit Versuchen an Biotinplättchen in PBS). Dies ist auch hinsichtlich der abnehmenden E-Selektin-Expression nach dem Maximum von 4 Stunden nach Stimulierung zu betrachten.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen verdeutlichen die Fähigkeit der target-sensitiven IL eine extrazelluläre Freisetzung der eingeschlossenen Substanzen an der Endothelzelloberfläche zu erzielen. Target-sensitive IL stellen somit nicht nur ein potentielles Transportsystem für antiinflammatorische Substanzen dar, sondern kombinieren damit gleichzeitig eine zielgerichtete und effektive Akkumulation dieser am gewünschten Wirkort.

### 4.3 Einfluss target-sensitiver Liposomen auf die Adhäsionskaskade von Th1-Lymphozyten

Nach den Untersuchungen und Optimierungen der target-sensitiven Eigenschaften der Liposomen sollte nun die Freisetzung des liposomalen Inhaltes in einem komplexerem *in vitro*-Testsystem erfolgen. Dafür wurde der Einfluss des aus target-sensitiven Liposomen freigesetzten vMIP-II auf das Th1-Zellverhalten entlang unstimulierter und stimulierter Endothelzellen unter dynamischen Bedingungen untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der Immunpharmakologie um Herrn Prof. Radeke des *pharmazentrums* in Frankfurt (Main) durchgeführt.

Bei vMIP-II (vCCL2) handelt es sich um einen natürlich vorkommenden, viralen Chemokinrezeptor-Antagonisten, der durch das Genom des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus-8 (KSHV/HHV-8) kodiert ist. Kledal et al. konnten für vMIP-II eine Bindung an verschiedenen CC- und CXC-Chemokinrezeptoren beobachten. Aufgrund dieser breiten Bindungsfähigkeit an die humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR8, CXCR4, XCR1 und CX3R1 wird vMIP-II auch als Breitband-Antagonist bezeichnet [Kledal et al. (1997), Rubant et al. (2006), Lüttichau et al. (2007)]. An CCR3 entfaltet vMIP-II darüber hinaus auch agonistische Wirkungen. Durch diese unterschiedlichen antagonistischen und agonistischen Aktivitäten an verschiedenen Chemokinrezeptoren kann vMIP-II an der Modulation der Immunantwort beteiligt sein, was zu einer Verschiebung von der Th1- zu Th2-vermittelten Reaktionen führt [Weber et al. (2001); Lindow et al. (2003)]. So kann mit dem Einsatz von vMIP-II die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsort und die darauf folgende Verstärkung der Th1-vermittelten Immunantwort unterbunden werden. Verschiedene *in vivo*-Studien zeigten einen erfolgreichen Einsatz des vMIP-II als Antagonist, was sich z. B. in einer Reduktion entzündlicher Symptome einer Ischämie im Gehirn bei Mäusen [Takami et al. (2001)], der Minimierung der Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation [Holzknecht et al. (2000)] oder in einer reduzierten Zellinfiltration nach einer Rückenmarksverletzung in Raten [Ghirnikar et al. (2000)] äußerte.

Aufgrund der breiten antagonistischen Aktivität stellt vMIP-II ein ideales Peptid für die Intervention in einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen dar, die auf eine lokale Akkumulation infiltrierender Leukozyten zurückzuführen sind.

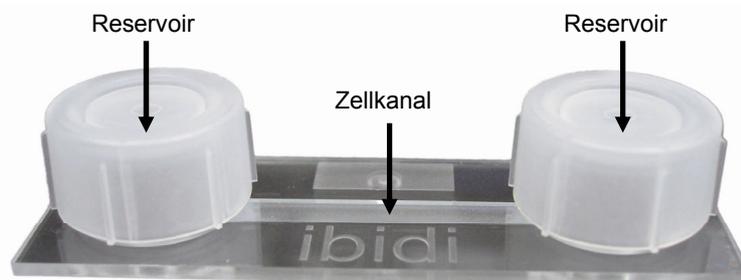
In den folgenden Untersuchungen sollten die veränderten Zell-Zell-Wechselwirkungen durch freigesetztes vMIP-II aus Liposomen mit target-sensitiven Freisetzungsprinzip detektiert werden.

Da chronische Entzündungserkrankungen wie die Psoriasis, die rheumatoide Arthritis, die multiple Sklerose u. a. neben mononukleären Infiltraten, den Monozyten und Lymphozyten,

auch durch eine Th1-getriebene Immunopathogenese gekennzeichnet sind, diente der Th1-Lymphozytenklon IF12 als Modellzelle bei den Untersuchungen des Rollverhaltens der Th1-Zellen an aktivierten Endothelzellen. S. Rubant charakterisierte diesen Th1IF12-Zellklon hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand [Rubant (2005)]. Diese Charakterisierung war für das Verständnis des Verhaltens dieses Th1-Zellklons essentiell, da die Chemokinrezeptorexpression je nach Stimulierungs- und Differenzierungszustand der verschiedenen Zelltypen variieren kann [Salusto et al. (1998)]

Bei den Th1-Zellen findet eine vermehrte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 statt. Diese beiden Rezeptoren wurden auf Th1-Zellen in Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose gefunden [Qin et al. (1998)]. S. Rubant konnte auf dem Zellklon Th1IF12 die typischen Th1-Chemokinrezeptoren wie CCR5 und CXCR3 und darüber hinaus CCR2, CCR6, CCR7 sowie CXCR4 nachweisen [Rubant (2005)]. Darüber hinaus findet bei diesen eine Expression verschiedener Selektinliganden, wie PSGL-1, ESL-1, CD24 statt, welche für das Rollen und die Migration der Th1-Zellen in das entzündete Gewebe von Bedeutung sind.

Bei den durchgeführten Versuchen kamen  $\mu$ -Slides I der Firma ibidi<sup>®</sup> zum Einsatz, welche ein neues Kultivierungssystem aus gasdurchlässigem, biokompatiblen und v. a. optisch hochwertigem Kunststoff darstellen (siehe Abbildung 26) [Horn (2006)].



**Abbildung 26:**  $\mu$ -Slide der Firma ibidi<sup>®</sup>

Sie vereinen ein geschlossenes Testsystem für Zellkulturen mit einer durchgehend planaren Oberfläche aus geeignetem Kunststoff, welcher einen ausreichenden Gasaustausch und eine mikroskopische Beobachtung aufgrund der optischen Eigenschaften während der Versuche ermöglicht.

Dieses System ermöglicht während des Versuches eine hochaufgelöste Betrachtung des Verhaltens der kultivierten Endothelzellen mit einem inversen Mikroskop. Aufgrund der geringen Größe des Kanals werden nur geringe Volumina zum Überspülen der adhären den Zellen benötigt. Darüber hinaus sind auch nur geringe Stimulations- sowie Liposomen-Medium-Gemischmengen für die Versuche nötig, was hinsichtlich der Kostenintensivität der Peptide (vMIP-II, SDF-1) vorteilhaft war.

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte durch Zusatz von IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  und einer Inkubationszeit von vier Stunden, wobei das IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -haltige Medium direkt in das  $\mu$ -Slides gefüllt wurde. Nach der Aktivierung der Endothelzellen wurde das  $\mu$ -Slide in den Objektisch des Mikroskops eingespannt, mit Schlauchverbindungen an das Pufferreservoir und die Pumpe angeschlossen sowie mit dem Th1-Zell-Vorratsgefäß verbunden.

Die Th1-Zellen wurden im Gegensatz zu den Endothelzellen nur durch 15-minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank aktiviert, anschließend zentrifugiert und in ihr Vorratsgefäß an der Apparatur gefüllt, welches mittels eines 3-Wege-Hahns einen Zufluss der Zellen in das Kammersystem ermöglichte.

Da das Mikroskop mit einer Kamera versehen war, ermöglichte dies die digitale Aufnahme der Versuche und somit eine genaue Software-gestützte Auswertung von Roll- und Adhäsionsereignissen der Th1-Zellen an den Endothelzellen.

Die Erfassung der Anzahl an durchlaufenden, rollenden, adhärierenden und migrierenden Zellen erfolgte mit der Software „CellFlow 1.7“ der Firma Mediquant. In einem festgelegten, ausgewählten Zeitraum konnte mit dieser Software die Gesamtzahl an Zellen sowie deren Geschwindigkeiten ermittelt werden, mit denen sich die Th1-Zellen über die Endothelzellen bewegten. Somit erfolgte computergestützt die Auswertung der Rollgeschwindigkeiten und der Anzahl an rollenden (Geschwindigkeiten von 5  $\mu$ m/s bis 50  $\mu$ m/s) sowie adhärierenden (Geschwindigkeiten 0  $\mu$ m/s bis 5  $\mu$ m/s) Zellen. Während des Versuches wurden dafür zu unterschiedlichen Zeitpunkten drei Filme aufgenommen, um Effekte zu verschiedenen Versuchszeitpunkten und mit unterschiedlichen Zellmengen erfassen zu können. Drei Filmausschnitte pro Videos wurden jeweils zu einem Mittelwert zusammengefasst, wobei die Auswertung der Filme mit Hilfe des Programms Imagoquant<sup>®</sup> durchgeführt wurde.

Da aber nach Ende des ersten Filmes die Th1-Zellzufuhr durch Umlegen eines Schalters unterbrochen und dadurch der Zufluss des Puffers wieder gestartet wurde, ergaben sich Unterschiede in der Anzahl der durchlaufenden Th1-Zellen bei den drei Videos. Im Zulaufsystem befanden sich jedoch noch genügend Zellen, sodass zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches unterschiedliche Effekte beobachtet wurden, da am Anfang eher eine Überladung der  $\mu$ -Slides mit Th1-Zellen erfolgte, was durch Abschaltung des Zellnachflusses kontinuierlich abnahm. Am Anfang des Versuches war somit eine negative Beeinflussung der Th1-Zell-Endothelzell-Wechselwirkungen durch übermäßig viele Th1-Zellen möglich, wohingegen die geringe Th1-Zellanzahl zum Ende den Wechsel auf eine störungsfreie Betrachtung der Interaktionen und Effekte auf das Roll- und Adhäsionsvermögen Th1-Lymphozyten ermöglichte.

Bei den Liposomen handelte es sich einerseits um die zuvor gut charakterisierten target-sensitiven Liposomen der Zusammensetzung DOPE/NGPE/mPEG-PE als auch andererseits um konventionelle Liposomen präpariert aus SPC/Chol/mPEG-PE/NGPE als Kontrolle.

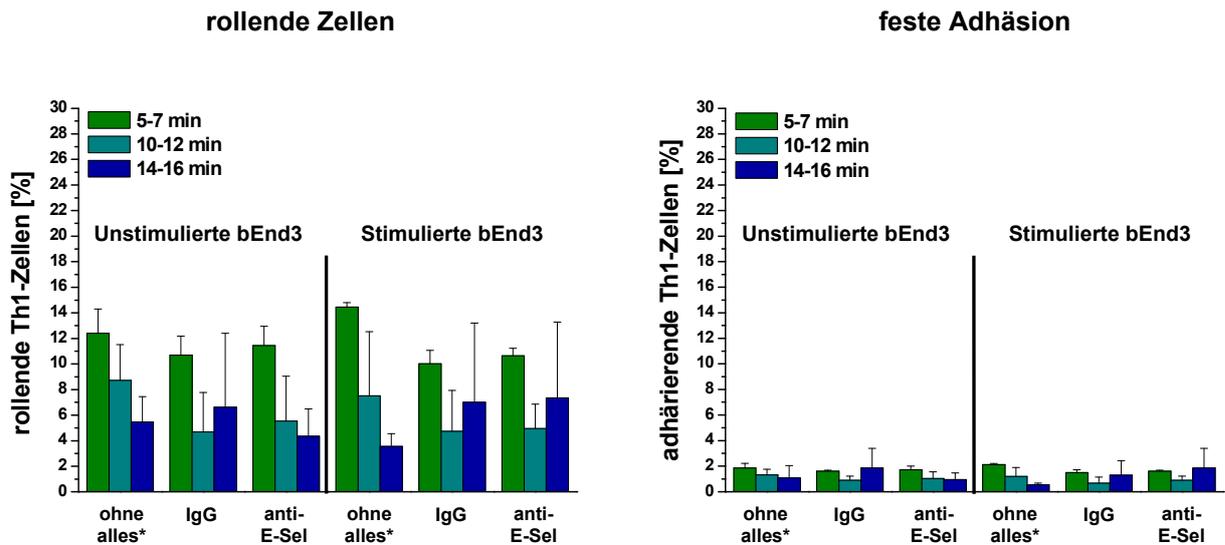
Das Rollen der Lymphozyten als initialer Schritt der Chemotaxis wird hauptsächlich durch die Selektine vermittelt (siehe Kapitel 2.1.1). Aufgrund des Targetierungspotentials von anti-E-Selektin-gekoppelten, target-sensitiven Liposomen (siehe Kapitel 4.2.6.2) wurde auch bei diesen Untersuchungen das E-Selektin als Target für eine spezifische Akkumulation der Liposomen an den Endothelzellen ausgenutzt. Um den Einfluss der Targetierung zu untersuchen wurden ebenfalls die E-Selektin-gerichteten target-sensitiven IL mit IgG-gekoppelten, target-sensitiven IL verglichen.

#### **4.3.1 Liposomaler Einfluss target-sensitiver Liposomen auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten**

Initiale Untersuchungen sollten den Einfluss leerer, E-Selektin-gerichteter target-sensitiver Liposomen auf das Adhäsionsverhalten der Th1F12-Zellen klären, um den reinen Targetingeffekt auf das Verhalten der Th1F12-Zellen zu beobachten. Diese Versuche dienten als Basis für die nachfolgenden Experimente.

Nachdem die Zellen in den Kammern vier Stunden mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  inkubiert wurden, erfolgte die Applikation der Liposomen. Diese wurden über einen festgelegten Zeitraum von einer Stunde über die Endothelzellen gespült, wodurch physiologische Bedingungen simuliert wurden. Im Anschluss daran wurde das  $\mu$ -Slide in den Objektisch des Mikroskops eingespannt und über Schlauchverbindungen mit dem Th1-Zell-Reservoir sowie dem Puffervorratsgefäß in der Pumpe verbunden und der Versuch gestartet. Als Kontrolle dienten  $\mu$ -Slides mit unstimulierten Endothelzellen.

Abbildung 27 zeigt den prozentualen Anteil der rollenden und adhärierenden Th1-Zellen in Anwesenheit von target-sensitiven Liposomen in Abhängigkeit von der Spezifität des gekoppelten Liganden und der Stimulation der Endothelzellen.



**Abbildung 27:** Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an Endothelzellen in Abhängigkeit des Stimulus nach einstündiger Inkubation mit spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen (\*bezugnehmend auf andere Versuchstage)

Wider Erwarten wird das Roll- und Bindungsverhalten der Th1-Zellen durch Stimulation der Endothelzellen kaum verändert. Werden die Versuche in Anwesenheit der Liposomen in Abhängigkeit des Stimulus miteinander verglichen, so zeigen sich sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Endothelzellen gleichartige Ergebnisse. Die erhöhte Expression von E-Selektin bei den stimulierten Zellen könnte in Anwesenheit der Liposomen allerdings durch einen abschirmenden Effekt der Vesikel nivelliert werden, welche im Falle der IgG-gekoppelten Liposomen auf unspezifische Wechselwirkungen und bei den anti-E-Selektin-gekoppelten Liposomen durch spezifische E-Selektin-Blockierung zurückzuführen wäre. Das würde das gleichartige Verhalten und die sehr ähnlichen Ergebnisse in den ersten beiden Beobachtungsabschnitten erklären. Lediglich im 3. Beobachtungsabschnitt ist eine deutliche Zunahme des Rollings als auch der Adhäsion bei den stimulierten bEnd3 trotz Anwesenheit der Liposomen zu erkennen.

Die hohe Anzahl der rollenden und adhärenenden Zellen zu Beginn kann auf die Überladung des Zellkanals in den  $\mu$ -Slides mit Th1-Zellen zurückzuführen sein. Die Effekte nehmen aufgrund der abnehmenden Zellzahl zum zweiten Abschnitt immer ab, da die Zellzufuhr acht Minuten nach dem Versuchsstart gestoppt wurde. Im dritten Zeitabschnitt (14 bis 16 Minuten) sind vermutlich die eigentlichen qualitativen Effekte zu sehen, da kein Überangebot an Th1-Zellen mehr besteht, sondern die Zellen einzeln betrachtet werden konnten.

Mit diesen Untersuchungen sollte das Hauptaugenmerk auf der Fragestellung liegen, ob die Anwesenheit der Liposomen bzw. der Lipide einen Einfluss auf das Rolling und die Adhäsion der Th1-Zellen haben. Werden die Versuche ohne Liposomen als Basis herangezogen (bezugnehmend auf die Untersuchungen des Roll- und Adhäsionsverhalten der Th1-Lymphozyten ohne Liposomen an einem anderen Versuchstag), so ist bei den unstimulierten

Zellen in Anwesenheit der Liposomen kaum ein Einfluss erkennbar. Werden jedoch die Ergebnisse der stimulierten Endothelzellen mit den Basiswerten verglichen, so kann, zumindest bei Betrachtung des 1. und 2. Auswertungsabschnittes, ein Targetingeffekt sowohl auf das Rolling als auch die Adhäsion beobachtet werden. Diese Beeinflussung gilt es bei den folgenden Untersuchungen zu berücksichtigen.

#### **4.3.2 Effekte der Chemokine SDF-1 und vMIP-II auf das Adhäsionsverhalten von Th1-Lymphozyten**

Nachdem gezeigt wurde, dass die Liposomen keinen direkten Einfluss auf das Roll- und Adhäsionsverhalten der Th1-Zellen nehmen, sollten Untersuchungen unter Anwendung von vMIP-II als Chemokinantagonist in An- und Abwesenheit von SDF-1 als stimulierendes Chemokin erfolgen.

Bei SDF-1 (stromal cell derived factor 1) handelt es sich um ein CXC-Chemokin (CXCL12) mit Wirksamkeiten an den Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 [Burns et al. (2006), Levoye et al. (2009)]. An CXCR4 ist SDF-1( $\alpha$ ) der einzige Ligand [Olson et al. (2002)], wobei die Bindung an den N-terminalen Rezeptorteil sowie an die ersten zwei extrazellulären Schleifen des CXCR4-Rezeptors erfolgt [Gerlach et al. (2001), Huang et al. (2003)]. Diese Bindung initiiert anschließend die Signaltransduktion des CXCR4-Rezeptors [Crump et al. (1997)]. Für die Aktivierung und Migration sowohl von Leukozyten als auch hämatopoetischer Stammzellen ist SDF-1 ein wichtiger Regulator.

SDF-1 wird als chemotaktischer Faktor für T-Zellen und Monozyten beschrieben [Radeke et al. (2005)], da es ähnlich wie MIP 3 $\beta$  und 6C-kine die schnelle und feste Adhäsion von zirkulierenden Lymphozyten binnen Sekunden an VCAM-1 induziert. Bereits nach einer Sekunde werden zirkulierende Lymphozyten durch SDF-1 aktiviert [Campbell et al. (1998)]. J. Calderwood aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Radeke konnte bei Versuchen an LMEC eine Verschiebung des Rollings hin zu einer schnelleren Adhäsion von Th1-Zellen in Anwesenheit von SDF-1 zeigen, wobei allerdings das Ausmaß der Transmigration durch die Endothelzellschicht unverändert blieb.

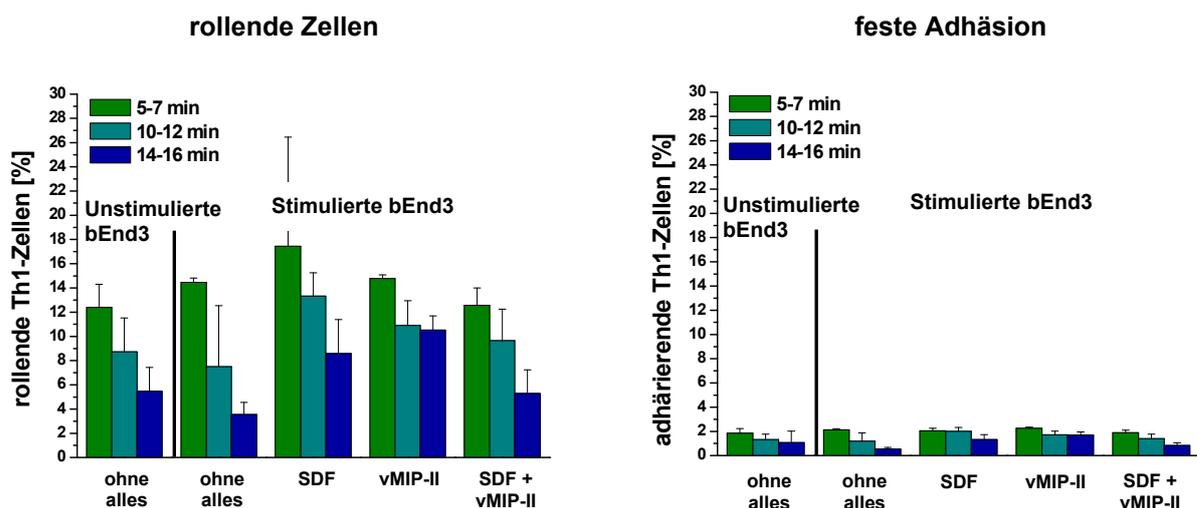
Um die Effekte von SDF-1 und vMIP-II auf das Roll- und Adhäsionsverhalten der Th1-Lymphozyten an den im Rahmen dieser Arbeit genutzten bEnd3 zu erfassen, wurden initiale Untersuchungen ohne Liposomen durchgeführt.

#### 4.3.2.1 Einfluss von freiem vMIP-II und SDF-1 auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten

Diese Untersuchungen dienten der Aufklärung der Effekte von vMIP-II und SDF-1 auf das Roll- und Adhäsionsvermögen der Th1-Zellen an stimulierten Endothelzellen. Einerseits wurden beide Substanzen getrennt voneinander betrachtet, andererseits sollte die Applikation beider Proteine klären, wie sich beide zusammen auf das Rolling und die Adhäsion der Th1-Lymphozyten auswirken.

Dem Stimulationsmedium der Endothelzellen wurde dafür eine halbe Stunde vor Aktivierungsende das SDF-1 zugesetzt, sodass eine Inkubation der stimulierten Endothelzellen von 30 Minuten unter Flussbedingungen folgte. Unter physiologischen Bedingungen wird lösliches SDF-1 auf der Endothelzelloberfläche gebunden und den Th1-Lymphozyten präsentiert. Diese Anreicherung sollte durch diese Inkubationsbedingungen simuliert werden. Nach der Aktivierung mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  und der Inkubation mit SDF-1 erfolgte die Zugabe von vMIP-II in reinem Medium. Einerseits sollte durch den Kontakt des vMIP-II mit den Endothelzellen ebenfalls eine Anreicherung an der Endothelzelloberfläche erreicht werden, andererseits sollte durch eine anschließende Inkubation der Th1-Zellen eine „Rezeptorblockierung“ an deren Oberfläche erfolgen, was ein vermindertes Rolling und eine geringere Adhäsion zur Folge hätte.

In Abbildung 28 sind die Effekte von freiem vMIP-II und SDF-1 auf das Roll- und Adhäsionsvermögen der Th1-Zellen an stimulierten Endothelzellen graphisch dargestellt.



**Abbildung 28:** Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an stimulierten Endothelzellen nach Inkubation mit vMIP-II und/oder SDF-1

*Keine Vorbehandlung („ohne alles“):* Das Roll- und Adhäsionsverhalten der Th1-Lymphozyten wird durch Stimulierung der Endothelzellen kaum verändert. Es findet keine Zunahme des Rollings und der Adhäsion bei den stimulierten Endothelzellen im Vergleich zu

den unstimulierten Zellen statt. Es kann angenommen werden, dass die Stimulation der Th1-Lymphozyten durch alleinige Inkubation im Brutschrank und Zentrifugation nicht ausreicht, da die Stimulation der bEnd3 mit einer E-Selektin-Expression durch positive FACS-Ergebnisse bewiesen wurde (siehe Kapitel 4.1.1).

*SDF-1*: Bei den stimulierten Zellen zeigt sich unter SDF-1-Behandlung im Vergleich zu den Versuchen ohne alles sowohl eine vermehrte Anzahl rollender Zellen als auch ein geringfügig erhöhtes Ausmaß an adhärierenden Zellen.

*VMIP-II*: Eine Zunahme des Rollens und der Adhäsion der Zellen im Vergleich zu den Versuchen ohne Stimulation ist zu verzeichnen, allerdings ist der Effekt im Abschnitt 14 bis 16 Minuten sogar durch ein noch stärkeres Rolling und Adhäsion als bei SDF-1 gekennzeichnet.

*SDF-1 und vMIP-II*: Im Vergleich des Versuches mit SDF-1 und vMIP-II alleine zeigt sich, dass vMIP-II in seiner antagonistischen Wirksamkeit besonders nach Aktivierung durch SDF-1 hervortritt. Der Effekt des erhöhten Rollings und der geringfügig erhöhten Adhäsion unter der Einwirkung von SDF-1 wird durch vMIP-II antagonisiert, was zu einer Abnahme des Rollings und der Adhäsion führt. Dies wird insbesondere im dritten Beobachtungsabschnitt (14 bis 16 Minuten) deutlich.

Zusammenfassend kann für diese Versuche gesagt werden, dass die erwartete deutlich stärkere Zunahme des Rollings und der Adhäsion der Th1-Zellen sowohl allein durch Stimulation der Endothelzellen, noch ausgeprägter jedoch in Anwesenheit von SDF-1 in der Deutlichkeit nicht gezeigt werden konnte. Einzig eine leichte Zunahme des Roll- und Adhäsionsvermögen durch SDF-1 war detektierbar. Dieser Effekt konnte durch die Anwesenheit von vMIP-II antagonisiert werden, was zu einer Senkung des SDF-1-Effektes auf das Rolling und die Adhäsion führte. Im Unterschied zu vorangegangenen Befunden konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass das SDF-1 nur einen erhöhenden Effekt auf die Adhäsion auf Kosten des Anteils der rollenden Zellen hat. An bEnd3 führt SDF-1 zu einem höheren Anteil rollenden Th1-Zellen, die Adhäsion nimmt dagegen nur geringfügig zu.

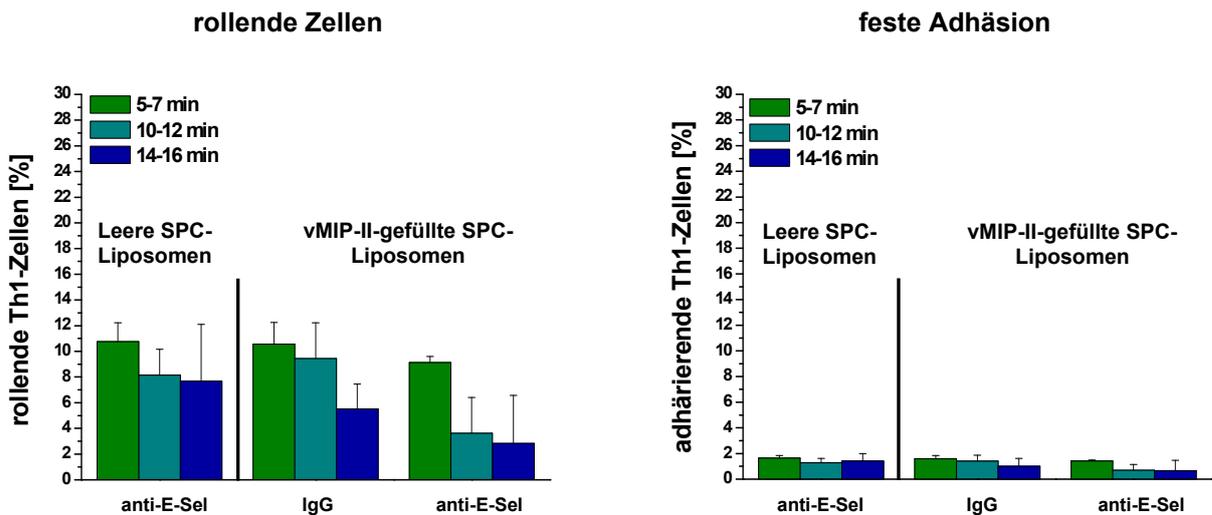
#### **4.3.2.2 Einfluss leerer und vMIP-II-gefüllter, konventioneller Liposomen auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten in Abhängigkeit der Targetierung**

In diesen Untersuchungen wurde vMIP-II in SPC-Liposomen eingeschlossen. Durch die limitierte Freisetzung aus diesen konventionellen Liposomen sollte vMIP-II nur eingeschränkt in der Lage sein, einen antagonistischen Effekt auf das Th1-Rolling und die Adhäsion auszuüben. Diese Untersuchungen sollten als Basis für die Detektion des target-sensitiven Frei-

setzungsmechanismus der DOPE/mPEG-PE-Liposomen (vMIP-II-gefüllt) in weiteren Versuchen dienen.

Nach der Stimulation der Endothelzellen wurden diese eine Stunde mit den leeren und vMIP-II-gefüllten SPC-Liposomen unter Flussbedingungen inkubiert und anschließend in der Durchflussapparatur dem Kontakt stimulierter Th1-Lymphozyten ausgesetzt.

In Abbildung 29 ist der Einfluss des eingeschlossenen vMIP-II auf das Rolling und die Adhäsion der Th1-Zellen in Abhängigkeit der Spezifität der Liposomen graphisch dargestellt.



**Abbildung 29:** Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an Endothelzellen nach Inkubation mit spezifisch und unspezifisch gekoppelten, konventionellen SPC-Liposomen

Die Ergebnisse zeigen ein ähnliches Ausmaß des Rolling und der Adhäsion der Th1-Zellen nach der Inkubation mit den IgG-gekoppelten, vMIP-II-gefüllten SPC-Liposomen im ersten Beobachtungsabschnitt im Vergleich zu den E-Selektin-gerichteten leeren SPC-Liposomen. Dies könnte an der Überladung des Kanals mit Th1-Zellen zu Beginn des Versuches liegen. Im Zeitabschnitt 2 und 3 zeigen sich dagegen differenzierende Ergebnisse. Einerseits steigt das Ausmaß des Rollens bei den IgG-gekoppelten Liposomen in Abschnitt 2, während sich die Adhäsion kaum verändert. Und im dritten Beobachtungszeitraum (14 bis 16 Minuten) sinkt sowohl das Rolling als auch die Adhäsion bei den stimulierten bEnd3 nach Inkubation mit diesen IgG-gekoppelten, vMIP-II-gefüllten Liposomen. Die Senkung kann dabei auf eine Freisetzung und Wirkung von vMIP-II nach unspezifischer Bindung der Liposomen an den Endothelzellen zurückzuführen sein. Diese Abnahme des Rollings und der Adhäsion durch freigesetztes vMIP-II ist im Falle der spezifisch gekoppelten SPC-Liposomen noch ausgeprägter, was bei diesen Vesikeln auch schon im zweiten Beobachtungsabschnitt deutlich wird. Es kann eine weitere Senkung des Rolling und Adhäsion bei den E-Selektin-gerichteten, vMIP-II-enthaltenden SPC-Liposomen im Vergleich zu den unspezifisch gekoppelten Liposomen beobachtet werden. Dies spricht für einen vMIP-II-Effekt, da diese Senkung nicht

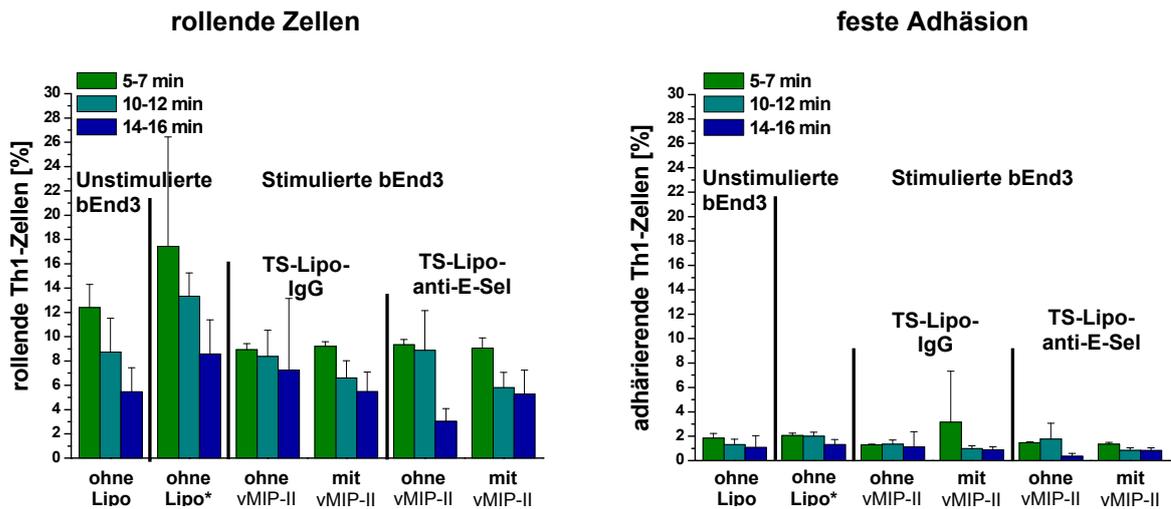
auf das Besetzen der E-Selektine allein durch die gebundenen Liposomen erklärbar ist, da die leeren SPC-Liposomen ein höheres Ausmaß an Rolling und Adhäsion zeigen.

In diesen Versuchen zeigen auch die konventionellen SPC-Liposomen eine freisetzende Wirkung von vMIP-II. Ob diese auf die spezifische Bindung, unspezifische Wechselwirkungen der Liposomen mit den Zellen, aus Release-Eigenschaften des Proteins oder auf den Scherstress unter diesen Versuchsbedingungen zurückzuführen ist, kann nicht differenziert werden.

#### **4.3.2.3 Einfluss vMIP-II-gefüllter, target-sensitiver Liposomen auf das Bindungsverhalten der Th1-Lymphozyten in Anwesenheit von SDF-1**

In diesen Versuchen sollten die Effekte von freigesetztem vMIP-II aus target-sensitiven Liposomen auf das Verhalten der Th1-Lymphozyten an stimulierten Endothelzellen untersucht werden. Da SDF-1 nach den vorherigen Ergebnissen einen verstärkenden Effekt auf das Rolling und die Adhäsion ausübt, wurde eine Vorinkubation mit SDF-1 bei allen Versuchen durchgeführt. Dafür wurde das SDF-1 am Ende der Endothelzellstimulation dem Aktivierungsmedium hinzugefügt und eine 30-minütige SDF-1-Inkubation der stimulierten Endothelzellen durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die Applikation der Liposomen und eine einstündige Inkubation dieser unter Flussbedingungen, was eine Bindung der target-sensitiven Liposomen und eine Freisetzung des liposomal eingeschlossenen vMIP-II ermöglichte.

Abbildung 30 zeigt graphisch den Einfluss von leeren und vMIP-II-gefüllten, target-sensitiven Liposomen auf das Roll- und Adhäsionsvermögen der Th1-Zellen an stimulierten, SDF-1 vorbehandelten Endothelzellen.



**Abbildung 30:** Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an stimulierten, SDF-1-behandelten Endothelzellen nach der Inkubation mit vMIP-II-gefüllten, target-sensitiven Liposomen in Abhängigkeit der Spezifität des Liganden (\*bezugnehmend auf einen anderen Versuchstag)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation und die Anwesenheit des SDF-1 zu einer deutlichen Zunahme des Rollings und zu einer geringfügigen Steigerung der Adhäsion führten. Sowohl auf das gesteigerte Rolling als auch die erhöhte Adhäsion wirkt sich die Anwesenheit der target-sensitiven Liposomen minimierend aus. Der Effekt fällt jedoch in Abhängigkeit der Füllung und der Spezifität des Liganden unterschiedlich aus.

*Ohne vMIP-II:* Besonders im 3. Beobachtungsabschnitt führt die Anwesenheit sowohl der IgG- als auch der anti-E-Sel-gekoppelten, target-sensitiven Liposomen zu einer deutlichen Senkung des Rolling und der Adhäsion, wobei das Ausmaß bei den spezifisch gekoppelten Liposomen stärker ausgeprägt ist. Bei den IgG-gekoppelten Liposomen wird dieser Effekt auf unspezifische Interaktionen und Adsorptionsvorgänge und den dadurch verursachten abschirmenden Effekt verursacht. Im Falle der anti-E-Sel-Liposomen kann die Senkung des Rollings und der Adhäsion auf die Blockierung der E-Selektine an der Zelloberfläche zurückzuführen sein. Gleichzeitig spielen auch bei den spezifischen Liposomen abschirmende Effekte der an der Zelloberfläche angereicherten Vesikel eine Rolle. Auf den Endothelzelloberflächen vorhandenes E-Selektin steht somit nicht mehr für die Bindung der Th1-Zellen zur Verfügung. Diese starke Abnahme des Rollings und der Adhäsion bei den anti-E-Sel-Liposomen im Vergleich zu den IgG-Liposomen spricht für eine Involvierung des E-Selektins.

*Mit vMIP-II:* In Anwesenheit des vMIP-II kann ein eindeutiger SDF-1-antagonisierender Effekt nur im 3. Beobachtungsabschnitt bei Betrachtung des Rollings als auch der Adhäsion der E-Selektin-gerichteten target-sensitiven Liposomen festgestellt werden. Da dieser Effekt bei den unspezifisch gekoppelten Liposomen nicht zu verzeichnen ist, spricht dies für die extrazelluläre Freisetzung des vMIP-II an der Zelloberfläche aus den spezifisch gekoppelten Liposomen nach E-Selektin-Bindung. Bei den IgG-gekoppelten Liposomen kann eine weitere

Senkung sowohl des Rollings als auch der Adhäsion im Vergleich zu den leeren Vesikeln beobachtet werden. Ein antagonisierender Effekt durch das vMIP-II auf das Roll- und Adhäsionsverhalten der Th1-Lymphozyten bleibt im Falle der gefüllten IgG-Liposomen aus.

### 4.3.3 Zusammenfassung der Untersuchungen

Unter den hier vorherrschenden Versuchsbedingungen konnten die target-sensitiven Liposomen ihren Vorteil, wie er in den zuvor durchgeführten Untersuchungen deutlich wurde, nicht in erwartetem Maße ausspielen. Im Gegenteil, selbst die konventionellen SPC-Liposomen zeigen in diesen Versuchen freisetzende Eigenschaften, sodass sich das System der target-sensitiven Liposomen im Zusammenspiel mit Th1-Lymphozyten nicht bewährt hat.

Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen lassen viel Raum für Spekulationen, da es sich bei beiden um zwei verschiedene Testsysteme mit u.U. zu stark differenzierenden Grundvoraussetzungen handelt. Jedoch war eine andere parallele Durchführung der Versuche nicht möglich, da die Versuche in unterschiedlichen Laboratorien durchgeführt wurden. Darüber hinaus konnten die Liposomen bei diesen Versuchen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe in Frankfurt erst nach einem gewissen Lagerungszeitraum den Untersuchungen zugeführt werden, was bei den Freisetzungsexperimenten zuvor (siehe Kapitel 4.2) nicht der Fall war.

## 4.4 Intrazellulärer Eingriff in das Entzündungsgeschehen auf genetischer Ebene

Aufgrund der genannten, nicht vollständig überzeugenden Eigenschaften der target-sensitiven Liposomen in Kombination mit den Chemokinantagonisten sollte ein weiterer Weg der Beeinflussung von Zell-Zell-Wechselwirkungen in der Adhäsionskaskade durch Verwendung eines liposomalen Systems untersucht werden. Ziel der folgenden Versuche war der liposomale Transport von genetischem Material in die Endothelzellen. Dieser Vorgang des Einschleusens und der intrazellulären Prozessierung der Genvektorkomplexe in die Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Das Erreichen einer hohen Transfereffizienz bei gleichzeitig niedriger Zelltoxizität stellen dabei die wesentlichen Aspekte für die Applikation des genetischen Materials dar. Ziel der Gentherapie ist dabei eine selektive Korrektur bzw. die Modulation von Erkrankungen durch die Verabreichung eines therapeutischen Genes [Marquet et al. (1996)]. Die Einschränkungen der viralen Gentransportsysteme hinsichtlich Immunogenität und Toxizität bescherte dabei den chemischen Vektoren eine zunehmende Bedeutung.

Durch Modifizierung der Liposomenmembran sollte der liposomale Gentransport auch im Rahmen dieser Arbeit optimiert und an zelluläre Gegebenheiten angepasst werden, um eine optimale Freisetzung in der Zelle zu erreichen. Zum Einsatz kamen die sog. stabilized plasmid lipid particles (SPLP). Dies sind Lipoplexe, die von einer liposomalen Hülle mit sterischer Stabilisierung durch mPEG-PE überzogen sind. Ausgehend von diesen Strukturen sollte versucht werden, zusätzlich eine pH-Sensitivität der SPLP für eine gezielte Freisetzung der Plasmide nach Internalisierung aus dem Endosom ins Zytosol zu erreichen, um die lysosomale Degradation des genetischen Materials zu umgehen. Des Weiteren sollte der Einfluss einer zellulären Targetierung durch Kopplung von anti-E-Selektin mAb auf das Ausmaß der Transfektion untersucht werden.

Die SPLP wurden im Hinblick auf das genutzte kationische Lipid, welches zur Komplexierung des Plasmides genutzt wurde, optimiert. Für diese Optimierungsuntersuchungen wurden die Transfektionseffizienz des DOTAP in initialen Untersuchungen an der gut zu transfizierenden Karzinomzelllinie A2780s untersucht und mit dem kationischen Lipid DC-Chol (in einer Mischung mit DOPE im Verhältnis 30 : 70 – DC30) verglichen. Im Anschluss daran folgte der Einsatz der SPLP an den bEnd3.

Da die Aufnahme von Transferrin über seine entsprechenden Rezeptoren ein gut untersuchtes Beispiel für die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist [Qian et al. (2002), Daniels et al. (2006a+b)], wurde sich dieses System in den initialen Optimierungsuntersuchungen an A2780s zu Nutze gemacht. Zur Anwendung kam als spezifischer Ligand für die Kopplung an die pH-sensitiven SPLP das Holotransferrin, welches wie das in der Leber gebildete und mit Eisen beladene Protein Transferrin an den membranständigen Transferrinrezeptor bindet. Für den Zellstoffwechsel ist der Transferrinrezeptor eine essentielle Struktur, sodass über ihn die gezielte endozytotische Aufnahme von Holotransferrin-gekoppelten Gentransfervesikeln im Rahmen dieser Arbeit vermittelt werden sollte.

Die untersuchten A2780s-Zellen exprimierten den Transferrin-Rezeptor. Karzinomzellen zeichnen sich darüber hinaus durch eine gute Transfizierbarkeit aus, sodass dieses System die optimalen Voraussetzungen für umfangreiche Transfektionsuntersuchungen erfüllte. Bindungs- und Internalisierungsuntersuchungen von Holotransferrin-gekoppelten Liposomen an A2780s-Zellen zeigten einen deutlichen Vorteil für die Aufnahme dieser im Vergleich zu unspezifisch gekoppelten Liposomen [Wirth (2005)], sodass dieses Ligand-Rezeptor-System als geeignet betrachtet wurde.

Verschiedene Aspekte, wie die Steigerung der Transfektion durch Einsatz der pH-Sensitivität, die Bedeutung der spezifischen Rezeptor-vermittelten Aufnahme sowie der Einfluss des gewählten kationischen Lipides auf die Transfektion wurden im Rahmen der folgenden Untersuchungen betrachtet. Abschließende Transfektionsversuche mit dem optimalen Gen-

transportsystem an Endothelzellen sollten darauf hin die Basis für einen möglichen *in vivo*-Einsatz der SPLP bilden.

Das Ausmaß der Transfektion wurde sowohl bei den A2780s als auch bei den bEnd3 mittels FACS-Analyse verfolgt.

#### 4.4.1 Herstellung und Charakterisierung der SPLP

Im Rahmen der folgenden Versuche kamen verschiedene liposomale Präparationen der SPLP zum Einsatz. Auf Basis der von Wheeler beschriebenen SPLP wurde die modifizierte liposomale Mischung aus DOPE/mPEG-PE/Cyanur-PEG-PE (87 : 8 : 5 mol%) [Wheeler et al. (1999)] verwendet. Diese sollte in initialen Untersuchungen in Abhängigkeit ihrer vorhandenen Targetspezifität untersucht werden. Darauf folgende Variationen der liposomalen Hülle führten zu den pH-sensitiven SPLP, durch welche eine Transfektionssteigerung erreicht wurde. Diese pH-Sensitivität wurde durch die Lipidmischung der Zusammensetzung DOPE/CHEMS/mPEG-PE (57 : 38 : 5 mol%) erreicht. Sie gewährleistet die Freisetzung der Plasmide aus dem Endosom ins Zytosol und führt somit zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz, da die eingeschlossenen Plasmide der Degradation im Lysosom entgehen. Diese pH-sensitiven SPLP wurden mit verschiedenen pH-*insensitiven* Mischungen verglichen, um den Einfluss der pH-Sensitivität auf das Ausmaß der Transfektion zu verdeutlichen. Dafür kamen Lipidmischungen der Zusammensetzung DOPC/CHEMS/Cyanur-PEG-PE (57 : 38 : 5 mol%) sowie SPC/Chol/Cyanur-PEG-PE (65 : 30 : 5 mol%) zum Einsatz.

Wie auch bei den target-sensitiven Liposomen bildete das DOPE in der Zusammensetzung der pH-sensitiven, liposomalen Hülle den Hauptanteil. Das DOPE senkt die Phasenübergangstemperatur aufgrund der Struktur der Ölsäureketten und steigert somit die Membranfluidität. Es forciert weiterhin die Fusion der liposomalen Hülle mit der Endosomenmembran, was die Freisetzung der Plasmidkomplexe in das Zytosol fördert.

Bei dem CHEMS handelt es sich um ein Cholesterol-Hemisuccinat als helfende Komponente für das DOPE. CHEMS trägt im physiologischen pH-Bereich eine negative Ladung, jedoch führt die Absenkung des pH-Wertes zur Protonierung und damit zur Ladungsneutralisierung, wodurch eine Destabilisierung der liposomalen Membran [Ellens et al. (1984)] und die Fusion der Liposomen mit der Endosomenmembran zur Freisetzung des liposomalen Inhaltes in das Zytosol stattfindet.

Das Cyanur-PEG-PE übernahm in diesen Präparationen eine duale Funktion. Zum einen diente es als Kopplungsanker für die genutzten Liganden (spezifisch oder unspezifisch), zum anderen wurde dadurch eine sterische Stabilisierung und Abschirmung der SPLP erreicht.

#### 4.4.1.1 Herstellung der Gentransfervesikel

Die SPLP wurden mit Hilfe der Detergenzmethode (siehe Kapitel 3.2.2) hergestellt. Im Vorfeld wurde das GFP-Plasmid mit dem ausgewählten, kationischen Lipid (DOTAP oder DC30) komplexiert. Das bildet die Voraussetzung für einen maximalen Einschluss des genetischen Materials in die Liposomen.

Diese im ersten Schritt gebildeten Lipoplexe wurden anschließend in Kontakt mit den Hülllipiden gebracht. Die Lipide der liposomalen Hülle wurden dafür in einer stark konzentrierten Detergenzlösung (0,2M Oktylglucosid) gelöst und lagen somit in mizellarer Form vor. Durch die anschließende Dialyse fand der Detergenzentzug und somit ein Wachstum der Mizellen statt. Das ist die Voraussetzung für die Vesikelbildung durch Transformations- und Fusionsprozesse zur abschließenden Bildung der liposomalen Hülle um die Plasmid-Lipid-Komplexe.

Durch die Komplexierung mit einem geeigneten kationischen Lipid als primären Präparationsschritt und der darauffolgenden Umhüllung der Lipoplexe mit der liposomalen Hülle (pH-sensitiv oder pH-*insensitiv*) mittels Detergenzdialyse kann die Einschussrate im Vergleich zur herkömmlichen Hydratationsmethode enorm gesteigert werden. Mit Einschussraten bis zu 85% ist dieses Herstellungsverfahren sowohl der Hydratationsmethode (Einschussraten von 4%) als auch der Herstellung über Umkehrphasen (Einschussraten von ca. 40%) weit überlegen [Kessner (2004)].

#### 4.4.1.2 Charakterisierungen der SPLP

##### *Quantifizierung der DNA-Mengen*

Bei der Präparation der SPLP betrug die Konzentrationen des GFP-Plasmides 10 µg/µmol bezogen auf die Gesamtlipidmenge. Die Quantifizierung der finalen DNA-Mengen in den SPLP-Proben nach Abschluss der SPLP-Präparation wurde mit Hilfe des Farbstoffes HOECHST durchgeführt. Dabei findet eine spezifische Anlagerung des Farbstoffs an den Basen Adenin und Thymin innerhalb der DNA statt [Latt et al. (1976)]. In Eingangsuntersuchungen wurden HOECHST 33342 und 33258 miteinander verglichen. Bei dem HOECHST 33342 handelt es sich um die lipophilere Substanz, was eine Diffusion durch liposomale Membranen ermöglicht. Aufgrund dessen wurden Versuche mit und ohne Detergenzzugabe durchgeführt. Allerdings fand bei der Verwendung dieses Farbstoffes auch unter Verwendung eines Detergenz eine zu hohe unspezifische Adsorption an vorhandenen Lipiden statt, sodass die endgültige Wahl für die Quantifizierungsuntersuchungen auf das HOECHST 33258 fiel. Bei diesem war allerdings eine Lysis der Vesikel unabdingbar, da der

Farbstoff eine zu große Hydrophilie aufweist. Dies macht ein Durchdringen liposomaler Bilayer unmöglich. Das Vorliegen freier DNA war die Grundvoraussetzung für die spezifische Anlagerung des HOECHST 33258.

In Tabelle 2 sind die ermittelten DNA-Mengen der DOTAP-SPLP im Vergleich zu DC30-SPLP dargestellt.

Lipidzusammensetzung	Kationisches Lipid	DNA-Menge [%]
<b>pH-sensitiv</b>		
DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE	DOTAP	58,4 ± 31,78
DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE	DC30 (DC-Chol)	62,3 ± 39,62

**Tabelle 2:** DNA-Quantifizierung pH-sensitiver SPLP in Abhängigkeit des kationischen Lipides

Wie aus den Daten ersichtlich, unterscheiden sich die Ergebnisse des erfassten Plasmides nur gering. Sowohl für das DOTAP als auch für das DC30 können hohe Anteile an Plasmid-DNA quantifiziert werden. Sie erreichen zwar nicht die Ausmaße, wie sie in verschiedenen Studien beschrieben wurden, allerdings liegen diese Einschussraten noch weit vor den Werten, die mittels Hydratations- oder Umkehrphasenmethode erzielt werden können. Das spricht für das Herstellungsverfahren der Komplexierung der Plasmid-DNA mit anschließender Detergenzdialyse.

In aktuellen Untersuchungen wird jedoch kontrovers diskutiert, ob ein vollständiger Einschluss der Lipoplexe während der Detergenzdialyse stattfindet oder ob auch extraliposomale Adsorptionsvorgänge der Lipoplexe eine Rolle spielen. Um gefüllte Vesikel von ungefüllten abzutrennen, wurden die SPLP nach der Dialyse einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Allerdings konnte eine vollständige Abtrennung von freien Lipoplexen nicht garantiert werden, sodass eine Adsorption möglich scheint. Werden die Standardabweichungen betrachtet, fallen große Schwankungen auf, was unter Umständen ein Indiz für einen variablen, nicht kalkulierbaren Anteil an adsorbierten Komplexen aus Plasmid-DNA und DOTAP oder DC30 sprechen könnte. Da während der Versuchsdurchführung eine Lysis der Vesikel vor der Zugabe des Farbstoffes HOECHST 33258 zur fluorimetrischen Quantifizierung nötig war, konnte keine Differenzierung zwischen verkapselten und adsorbierten Lipoplexen im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgen.

### *Charakterisierung der Vesikelgrößen*

Für die Transfektion spielt neben den chemischen Modifikationen der Transportsysteme auch die Größe der Komplexe eine wichtige Rolle. Die optimale Größe der Vehikel für den

Transport wird kontrovers diskutiert. Einerseits zeigen Untersuchungen, dass vor allem größere Komplexe eine höhere Transfektionseffizienz besitzen [Kawaura et al. (1998), Ross et al. (1999), Almofti et al. (2003)], andererseits existieren Studien, die Vorteile für kleinere Partikel zeigen [Akao et al. (1991), Templeton et al. (1997), Tranchant et al. (2004)]. Stegmann und Legendre dagegen stellten keine Abhängigkeit der Transfektionsrate von der Partikelgröße fest [Legendre et al. (1992)].

Die Herstellungsmethode beeinflusst nicht nur die Einschussrate sondern auch die Größe der erhaltenen Gentransfersysteme. Durch das Dialysieren als zentralen Schritt der Detergenzmethode resultieren sehr geringe Vesikelgrößen ohne weitere nachfolgende Präparationsschritte, wie Extrusion oder Ultraschallbehandlung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die SPLP mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) nach der Präparation kontrolliert.

Die Tabelle 3 führt die unterschiedlichen Größen in Abhängigkeit der liposomalen Zusammensetzung und des Füllstatus auf.

Lipidzusammensetzung	Kationisches Lipid	Vesikelgröße [nm]
<b>Wheeler analoge Mischung</b>		
DOPE/mPEG-PE/Cyanur-PEG-PE	DOTAP	83,5 ± 1,5
<b>pH-insensitiv</b>		
DOPC/CHEMS/Cyanur-PEG-PE	DOTAP	87,4 ± 18,9
SPC/Chol/Cyanur-PEG-PE	DOTAP	143,5 ± 4,1
	ungefüllt	114,6 ± 26,3
<b>pH-sensitiv</b>		
DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE	DOTAP	92,2 ± 28,1
	DC30 (DC-Chol)	77,2 ± 27,0
	ungefüllt	86,9 ± 30,9

**Tabelle 3:** Vesikelgrößen der genutzten SPLP und Liposomen für die Transfektionsversuche an A2780s und bEnd3

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich fast alle Präparationen, bis auf die konventionelle Hülle aus SPC/Chol, im gleichen geringen Größenbereich bewegen. Je nach Lipidkomposition und Füllstatus treten nur geringfügige Variationen auf. Dabei zeigen die DC30/GFP-Plasmid gefüllten, pH-sensitiven SPLP mit 77 nm die geringste Vesikelgröße.

Allerdings spielt nicht nur die Lipidkomposition der Hülle eine Rolle für die Größe der Vesikel, sondern auch das genutzte kationische Lipid, mit welchem die Plasmid-DNA im Vorfeld komplexiert wurde. Werden die pH-sensitiven SPLP diesbezüglich verglichen, so zeigen die DC30-SPLP einen Größenvorteil gegenüber den DOTAP-SPLP. Die Wheeler-analoge Mi-

schung als Basis für die durchgeführten Transfektionsversuche zeigt im Vergleich zu den pH-sensitiven, DOTAP-SPLP eine geringere Größe.

#### 4.4.2 Optimierende Transfektionsversuche an Ovarialkarzinomzellen A2780s

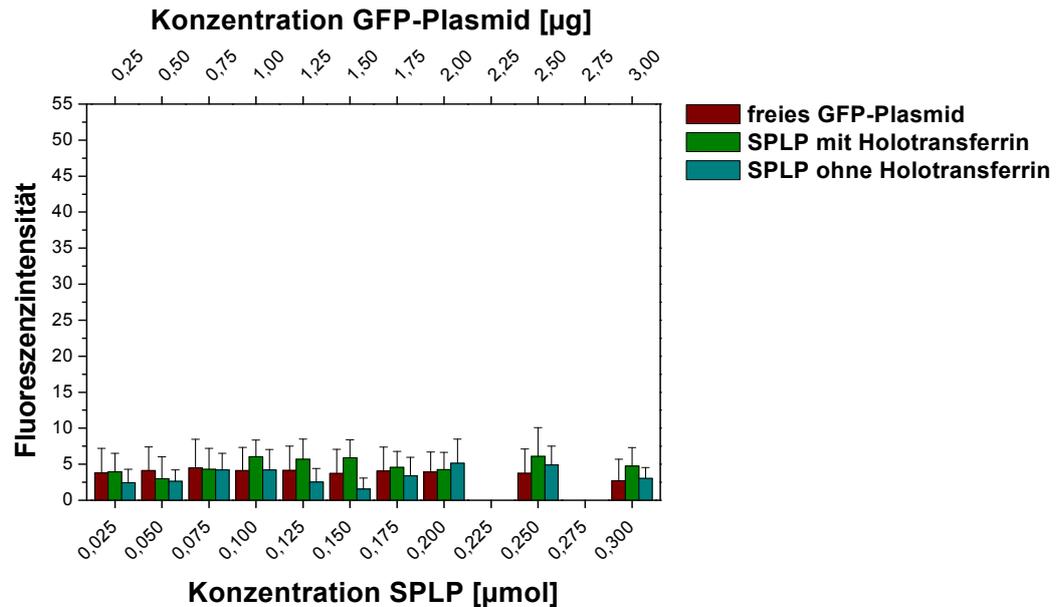
##### 4.4.2.1 Transfektionsfähigkeit pH-*insensitiver* SPLP modifiziert nach Wheeler

Als Basis für die folgenden Transfektionsuntersuchungen wurden zuerst SPLP mit einer nahezu analogen Zusammensetzung der von Wheeler beschriebenen SPLP hergestellt und ihr Transfektionsverhalten an den Ovarialkarzinomzellen A2780s getestet. Die Originalmischung der SPLP von Wheeler et al. setzte sich zusammen aus DOPE/DODAC/PEG-CerC<sub>20</sub> (84:6:10 mol%). Diese molaren Verhältnisse wurden auf die in dieser Arbeit genutzten Lipide übertragen, sodass die Lipidzusammensetzung DOPE/DOTAP/mPEG-PE/Cyanur-PEG-PE im Mischungsverhältnis 79,3:8,8:7,3:4,6 mol% erhalten wurde.

In dieser Zusammensetzung findet das PEG-PE Anwendung, für welches jedoch mindernde Auswirkungen auf die Transfektionsraten aufgrund der negativen Ladungen der PEG-PE-Einheiten beschrieben wurden [Hong et al. (1997)]. Bei normalen Herstellungsprozeduren (in Analogie zu Wheeler et al.) würde aufgrund der negativen Ladungen der PEG-PE-Einheiten starke Veränderungen des Ladungsverhältnisses zwischen dem kationischen Lipid und der Plasmid-DNA sowie eine Anlagerung des PEG-PE an die positiv geladenen DOTAP-Moleküle stattfinden, was Aggregationserscheinungen zur Folge hätte. Es wurde versucht, dieser Störungen durch die separate Komplexbildung im Vorfeld der Lipiddialyse Rechnung zu tragen.

Die erhaltenen Wheeler-analogen SPLP wurden zum Teil mit Holotransferrin gekoppelt und die Transfektion dieser spezifisch gekoppelten SPLP mit den ungekoppelten SPLP der gleichen Zusammensetzung verglichen. Wheeler et al. betrachteten die Aufnahme von ungekoppelten SPLP und begründeten ihre schlechte Transfektionsergebnisse mit der abschirmenden Wirkung des PEG-Ceramides auf die Aufnahme in die Zellen. Die Funktionalisierung mit Holotransferrin stellt im Rahmen dieser Untersuchungen einen ersten Optimierungsschritt für eine spezifische Internalisierung der SPLP in die Zellen dar. Das gewählte Holotransferrin als spezifischen Liganden für die Internalisierung über den Transferrinrezeptor befindet sich darüber hinaus durch die Nutzung des Cyanur-PEG-PE-Ankers an einer gut exponierten Lage an der SPLP-Oberfläche.

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Transfektionsuntersuchungen der Holotransferrintragenden und ungekoppelten Wheeler-adaptierten SPLP im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid.



**Abbildung 31:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion in Abhängigkeit der Spezifität der modifizierten SPLP nach Wheeler

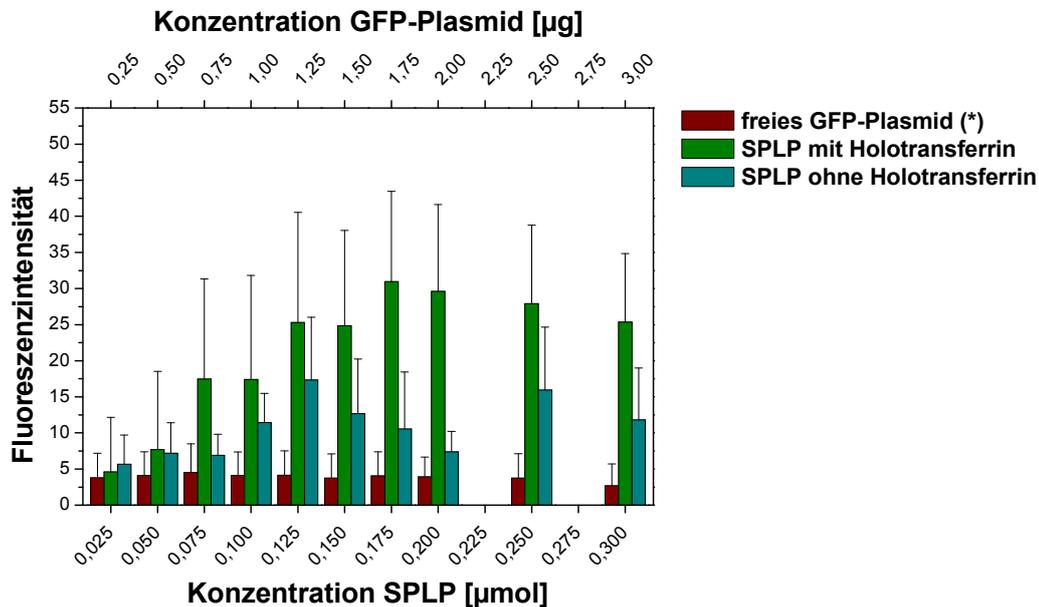
Die Ergebnisse zeigen eine geringe Transfektion für das freie GFP-Plasmid, welche sich auch durch den Einsatz der Wheeler-analogen SPLP nicht deutlich steigern lässt. Beim Vergleich der targetierten mit den untargetierten SPLP zeigt sich nur ein kleiner Vorteil der Holotransferrin-gekoppelten SPLP. Durch die Ligand-Kopplung an die Enden der PEG-Ketten üben diese keinen abschirmenden Effekt auf die Zugänglichkeit des Holotransferrins aus, sodass es für die Bindung am Transferrinrezeptor besser erkennbar sein sollte. Aufgrund des geringen Fluoreszenzausmaßes der Holotransferrin-gekoppelten SPLP lässt sich jedoch resümieren, dass trotz positiver Wirkung der zellulären Targetierung die insgesamt sehr geringe Transfektion der Zellen durch Kopplung eines spezifischen Liganden nicht signifikant verbessert werden kann.

#### 4.4.2.2 Einfluss der Targetierung und der pH-Sensitivität der SPLP auf die Transfektion

In weiteren Versuchen sollte die Rolle der Spezifität sowie der pH-Sensitivität der SPLP auf das Ausmaß der Transfektion verdeutlicht werden.

Durch Kopplung der SPLP mit Holotransferrin wurde der Einfluss der optimierten, pH-sensitiven Lipidhülle mit den Vorteilen einer Targetierung der SPLP kombiniert. In den durchgeführten Versuchen wurden die spezifisch gekoppelten, pH-sensitiven SPLP in ihrer Wirkung mit ungekoppelten, pH-sensitiven SPLP an den A2780s verglichen.

Die Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid.



**Abbildung 32:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion mittels pH-sensitiver SPLP in Abhängigkeit der Spezifität des gekoppelten Liganden im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid (\*bezugnehmend auf die Ergebnisse eines separaten Versuches)

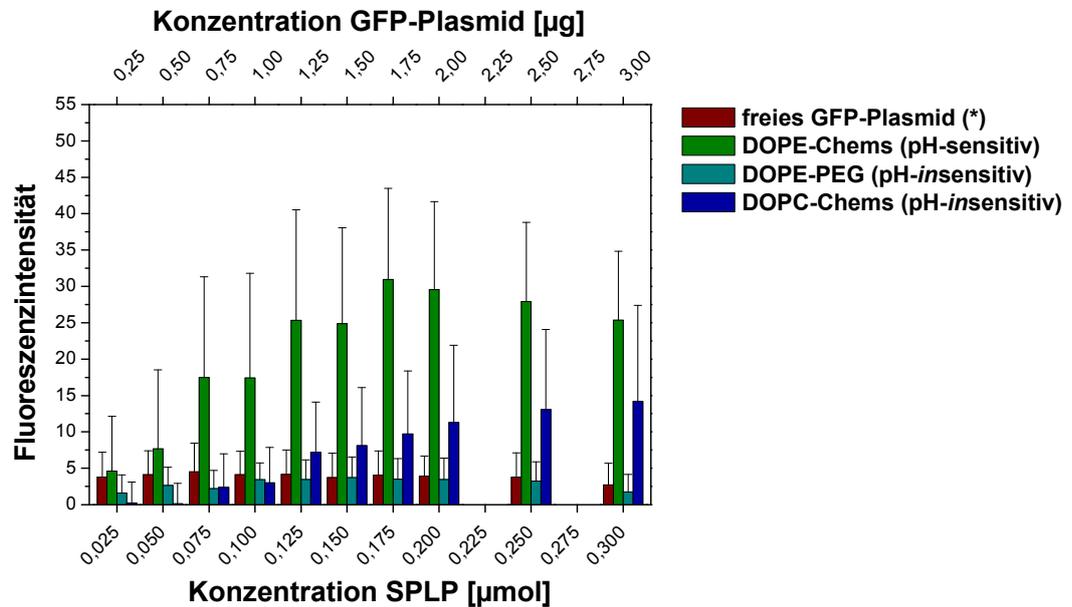
Die Ergebnisse verdeutlichen das höhere Ausmaß der Transfektion bei den Holotransferrin-SPLP. Durch die Möglichkeit der Rezeptor-vermittelten Endozytose dieser und der pH-induzierten, frühen Freisetzung des Plasmid-Komplexes aus dem Endosom werden höhere Fluoreszenzen erreicht. Allerdings werden diese eindeutigen Unterschiede zwischen den spezifischen und ungekoppelten SPLP und somit der Vorteil des spezifisch gekoppelten Gentransfersystems erst ab einer Konzentration von  $0,075\mu\text{mol}$  deutlich.

Durch die Verwendung des spezifischen pH-sensitiven Transfektionssystems kann dagegen eine enorme Steigerung der Transfektion (bis um das Dreifache) erreicht werden, was den deutlichen Vorteil dieses spezifischen Gentransfersystems untermauert. Die Kombination aus der pH-Sensitivität und Targetierung führt somit zu einer deutlichen Steigerung der Fähigkeiten der SPLP als Vektorsystem.

Um den starken Einfluss der pH-sensitiven Hülle auf den Erfolg der Transfektion weiter zu verdeutlichen, wurden in den folgenden Untersuchungen den spezifisch targetierten, pH-sensitiven SPLP zwei Lipidzusammensetzungen mit pH-insensitiven Eigenschaften gegenübergestellt. Bei diesen Versuchen wurde ein Vergleich der pH-sensitiven Hülle (DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE) mit der nach Wheeler modifizierten pH-insensitiven Zusammensetzung DOPE/PEG/Cyanur-PEG-PE mit einer weiteren pH-insensitiven Mischung mit

CHEMS-Anteil (DOPC/CHEMS/Cyanur-PEG-PE) durchgeführt. Alle Präparationen wurden mit Holotransferrin gekoppelt, um eine aktive zelluläre Aufnahme zu erreichen.

Die Abbildung 33 zeigt die Transfektionsergebnisse der unterschiedlichen liposomalen Zusammensetzungen im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid.



**Abbildung 33:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion nach Inkubation mit pH-sensitiven und pH-insensitiven SPLP im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid (\*bezugnehmend auf die Ergebnisse eines separaten Versuches)

Durch die Wahl der liposomalen Zusammensetzung kann die Transfektion deutlich beeinflusst werden. Es findet eine deutliche Erhöhung der Transfektion durch Verwendung der pH-sensitiven Lipidhülle für den Transport des GFP-Plasmid statt.

Wie die Ergebnisse der beiden pH-insensitiven Mischungen zeigen, spielt schon allein die Anwesenheit des CHEMS eine transfektionssteigernde Rolle. Selbst die Mischung DOPC/CHEMS/mPEG-PE bringt eine Erhöhung der Transfektion im Vergleich zur Wheeler-analogen Mischung mit sich.

Bei der Betrachtung des Diagramms fällt weiterhin auf, dass bei diesen Versuchen ein Sättigungseffekt eintritt, jedoch erst ab einer höheren Konzentration (0,175 µmol) verglichen mit den Wheeler-analogen SPLP, was eventuell auf eine schnellere Verstoffwechslung der mit Liposomen besetzten Transferrinrezeptoren zurückzuführen ist. Durch den Einsatz der pH-sensitiven Hülle folgt eine schnellere, effektivere Freisetzung des liposomalen Inhaltes aus dem Endosom nach der Internalisierung in das Zytoplasma. Somit ist eine lysosomale Degradation des endosomalen Inhaltes nicht notwendig, wodurch schneller regenerierte Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche für die erneute Bindung von Holotransferrin-SPLP wieder zur Verfügung stehen.

In zusätzlichen Versuchen wurde darüber hinaus der reine Einfluss der Lipide der pH-sensitiven Hülle auf die Fluoreszenzintensitäten untersucht (Daten nicht gezeigt). Das Ausmaß der Fluoreszenz der leeren pH-sensitiven Vesikel ist vernachlässigbar, somit zeigen die Lipide keinen fluoreszenzsteigernden Einfluss. Der Lipideffekt beschränkt sich nur auf die gewünschte intrazelluläre pH-sensitive Freisetzung des Plasmidkomplexes.

Die Ergebnisse der beiden Diagramme verdeutlichen den notwendigen Einschluss des GFP-Plasmides in ein pH-sensitives Gentransfersystem, um eine ausreichende Transfektion zu erreichen. Freies GFP-Plasmid wird durch seine negative Ladung kaum von den Zellen aufgenommen, da die elektrostatische Abstoßung an den negativ geladenen Zelloberflächen die Aufnahme des GFP-Plasmids erschwert. Das hat eine vernachlässigbare Transfektion zur Folge, da sich beim freien GFP-Plasmid ein gleichbleibend geringes Ausmaß der Transfektion über den gesamten Konzentrationsbereich zeigt.

Findet zusätzlich zum Einschluss des GFP-Plasmides in pH-sensitiven SPLP die Kopplung eines spezifischen Liganden an die Liposomenoberfläche statt, kann eine weitere Steigerung der Transfektion bis in höhere Konzentrationsbereiche erreicht werden. Diese Ergebnisse belegen den deutlichen Vorteil der spezifischen pH-sensitiven SPLP auf das Ausmaß der Transfektion.

#### 4.4.2.3 Einfluss des kationischen Lipides auf das Ausmaß der Transfektion

In abschließenden Untersuchungen sollten die Rolle des kationischen Lipides geklärt und ein Vergleich der kationischen Lipide zur Komplexierung des GFP-Plasmids vorgenommen werden. Zur Verfügung standen das DOTAP, mit welchem sämtliche Versuche zuvor durchgeführt wurden, sowie das DC-Chol. DOTAP ist eine monokationische Substanz mit zwei ungesättigten Alkylresten [Leventis et al. (1990)], wohingegen das DC-Chol ein einfach positiv geladenes Cholesterol-Derivat darstellt [Gao et al. (1991)].

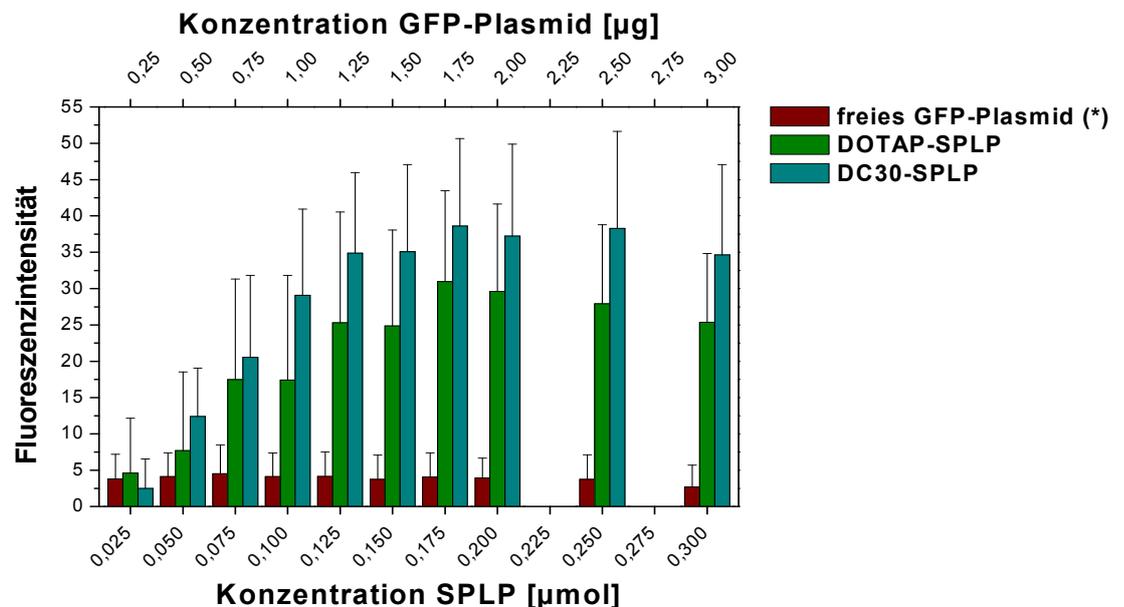
Bei einem Großteil der kationischen Lipide können jedoch vielfach toxische Effekte auf die Zellen beobachtet werden, was u. a. auf Protein-Kinase-C-inhibitorische Effekte, verursacht durch die quartären Ammoniumgruppen, und auf eine geringe biologische Abbaubarkeit (z. B. durch nicht hydrolysierbare Etherbindungen) zurückgeführt werden kann [Farhood et al. (1992)]. Darüber hinaus kommt es nicht nur zu Interaktionen der quartären Ammoniumgruppen mit der zu komplexierenden Plasmid-DNA, sondern auch mit Zellmembranstrukturen, was sich ebenfalls auf die Verträglichkeit auswirkt. Durch die Verwendung von neutralen Helferlipiden, wie z. B. dem DOPE in Kombination mit dem kationischen Lipid, kann dessen Toxizität minimiert und die Transfektionseffizienz gesteigert werden [Ciani et al. (2004),

Sternberg et al. (1994)]. Aus diesem Grund fand im Rahmen dieser Arbeit anstelle des reinen DC-Chols das Gemisch DC30 (DC-Chol/DOPE im Verhältnis 30 : 70) Anwendung. Dieses wurde somit in den folgenden Versuchen nicht nur hinsichtlich der Transfektionsfähigkeit, sondern auch bezüglich der Toxizität mit DOTAP verglichen, da dieser Faktor zusätzlich minimierende Auswirkungen auf den Erfolg des Transfektionssystem hat.

Die bessere Verträglichkeit des DOTAP ist auf seine Esterfunktion zurückzuführen [Chesnoy et al. (2000)], sodass es sich um ein besser bioabbaubares kationisches Lipid im Vergleich zum reinen, nicht mit DOPE-vorkomplexierten DC-Chol handelt. Hinsichtlich der Toxizität wurden die Zellen nach der Inkubation mit den unterschiedlich gefüllten SPLP mikroskopisch betrachtet, um Vergleiche der Verträglichkeit beider kationischer Lipide durchführen zu können.

Die Bildung beider Lipoplexe erfolgte im Vorfeld in analoger Herstellungsweise durch Inkubation des GFP-Plasmides mit dem gewählten kationischen Lipid. Anschließend wurden beide mittels Detergenzdialyse mit der pH-sensitiven Liposomenhülle (DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE) überzogen. Beide SPLP-Präparationen wurden mit Holotransferrin als spezifischen Liganden gekoppelt, um die Rezeptor-vermittelte Endozytose der Gentransfervesikel ins Zellinnere zu erreichen.

Abbildung 34 vergleicht das Ausmaß der Transfektion beider Präparationen miteinander und zeigt die Fluoreszenzen, welche durch die Verwendung der verschiedenen kationischen Lipide erreicht werden.



**Abbildung 34:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion nach der Inkubation mit pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit des verwendeten kationischen Lipides im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid (\*bezugnehmend auf die Ergebnisse eines separaten Versuches)

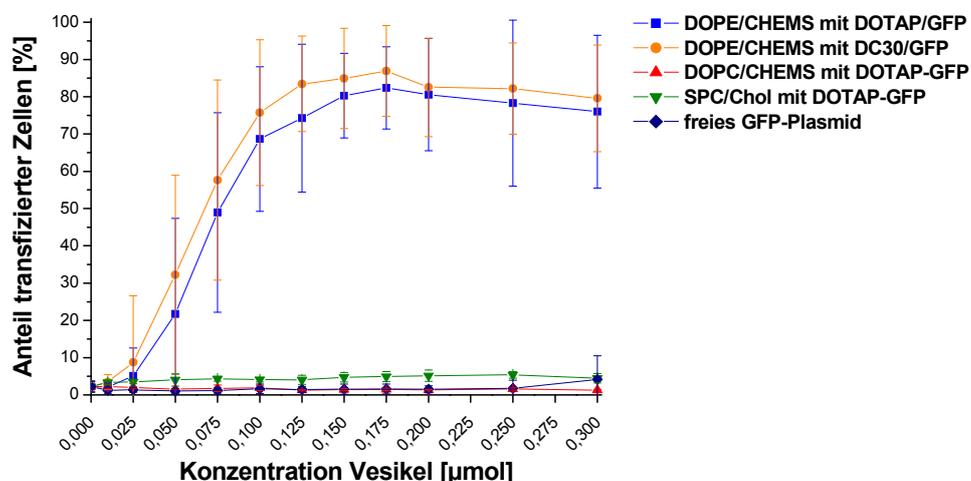
Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Zellen, welche mit den DC30-SPLP behandelt wurden, höhere Fluoreszenzen durch ein stärkeres Ausmaß der Transfektion zeigen. DC30 stellt bei diesen Untersuchungen das effektivere kationische Lipid dar.

Um die Beurteilung der Toxizität vornehmen zu können, wurden die Zellen vor der FACS-Vermessung mikroskopisch betrachtet. Sowohl die DOTAP-SPLP behandelten als auch die DC-Chol(DC30)-SPLP inkubierten Zellen wurden mit den unbehandelten A2780s verglichen. Dabei zeigte sich kaum eine Änderung der Morphologie der Zellen. In diesen Beobachtungen bestätigte sich die Minimierung der Toxizität durch die Kombination des DC-Chols mit dem DOPE. Darüber hinaus scheinen Ovarialkarzinomzellen A2780s sehr robust und widerstandsfähig, sodass sich im Zusammenspiel beider Komponenten bei ihnen kaum toxische Effekte zeigten.

#### 4.4.2.4 Transfektionsraten der Ovarialkarzinomzellen

Der Erfolg eines Transfektionssystems äußert sich nicht nur in der hohen messbaren Fluoreszenz der Zellen, sondern vor allem im Anteil der transfizierten Zellen. Um die Transfektionsraten zu erhalten und somit den endgültigen Beleg für die erfolgreiche Transfektion der A2780s durch pH-sensitive SPLP zu belegen, wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellen der gesamten vermessenen Zellen der jeweiligen Versuche bestimmt.

Die graphische Darstellung in Abbildung 35 zeigt den jeweiligen Anteil an transfizierten Zellen durch spezifisch gekoppelte SPLP in Abhängigkeit der Zusammensetzung der liposomale Hülle, des genutzten kationischen Lipides sowie der eingesetzten Konzentrationen des Gentransfersystems.



**Abbildung 35:** Graphische Darstellung der Transfektionsraten pH-sensitiver, pH-insensitiver SPLP sowie freien GFP-Plasmides in Abhängigkeit der Konzentration sowie des kationischen Lipides

Die Betrachtungen der Transfektionsraten bestätigen den Erfolg des pH-sensitiven Transfektionssystems und unterstreichen die zuvor dargestellten Ergebnisse. Darüber hinaus wird auch an dieser Stelle der Vorteil des DC30 zur Komplexierung der Plasmid-DNA deutlich, was sich in einer Steigerung der Transfektionsraten um bis zu 10% äußert.

Während mit dem spezifischen pH-sensitiven Gentransfersystem Anteile an transfizierten Zellen von 80% erreichen lassen, zeigen sowohl die pH-*insensitiven* Mischungen als auch das freie GFP-Plasmid Transfektionsraten unter 10%. Zumindest für das DOPC/CHEMS-System hätten aufgrund der erzielten Fluoreszenzwerte (vgl. Abbildung 33) höhere Transfektionsraten erwartet werden können.

Darüber hinaus zeigt sich auch hier eine Konzentrationabhängigkeit der Transfektionsraten beim pH-sensitiven SPLP-System im Gegensatz zu den pH-*insensitiven* Systemen. Bei diesen bestehen über den gesamten Konzentrationsbereich gleiche Transfektionsraten. Sie verändern sich somit nicht in Abhängigkeit der Menge an zugesetzten Vesikeln. Der Verlauf der Transfektionsraten bei den pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit der Konzentration korreliert auch mit den Sättigungseffekten, die aus den Ergebnissen zuvor erkennbar sind. Der maximale Wert sowohl bei den Fluoreszenzmessungen zuvor als auch bei den Transfektionsraten ergibt sich für die Konzentration von 0,175  $\mu\text{mol}$ .

Sowohl die Fluoreszenzmessungen als auch die Transfektionsraten stellen die pH-sensitiven SPLP als geeignetes Gentransfersystem heraus, wobei sich die Verwendung des DC30 etwas positiver auf den Erfolg der Transfektion bei diesen Ovarialkarzinomzellen auswirkt als das freie DOTAP.

Diese positiven Ergebnisse galt es in den nachfolgenden Untersuchungen auf das endotheliale System zu übertragen.

#### 4.4.3 Transfektionsversuche an bEnd3

Nachdem die spezifischen pH-sensitiven SPLP in zahlreichen Versuchen an Ovarialkarzinomzellen ihre Eignung als Gentransfervehikel zeigen konnten, sollten folgende Untersuchungen das Verhalten der SPLP an den Endothelzellen bEnd3 verdeutlichen. Damit sollte wiederum der Fokus auf eine endotheliale Beeinflussung vor dem Hintergrund entzündlicher Erkrankungen gelegt werden.

Es wurden eine Reihe von zeitlichen Parametern variiert, da noch keine Erfahrungen mit der Transfektion dieser Zellen existierten. Dabei galt es durch Variation des Inkubationszeitraumes einen Kompromiss aus ausreichender Transfektion und minimaler Toxizität zu finden. Eine Inkubation der bEnd3 von vier Stunden stellte sich als optimal heraus, da nach

zweistündiger Inkubation kaum eine Transfektion zu verzeichnen war. Dahingegen waren nach einem Zeitraum von acht Stunden die Schäden an den Zellen zu groß. Dies sprach für eine hohe Toxizität durch die zu intensive Inkubation.

Darüber hinaus wurden Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, um einen optimalen Zeitpunkt für die Detektion der Transfektion zu erlangen. Es wurden Messungen nach zwei, drei oder vier Tagen durchgeführt, wobei nur nach zwei Tagen verwertbare Ergebnisse erhalten wurden. Nach drei oder vier Tagen konnte ein zunehmendes Absterben der Zellen in den Wells beobachtet werden. Dies spricht für einen negativen Einfluss der SPLP-Behandlung bzw. der Transfektion auf das Zellwachstum. Diese Optimierung der zeitlichen Parameter erfolgte mit DOTAP-SPLP, da die Gefahr der toxischen Wirkung des DC-Chol als zusätzliche Variable zu groß war.

Um eine aktive, endozytische Aufnahme der SPLP in die Endothelzellen zu gewährleisten, wurden diese mit anti-E-Selektin-mAb gekoppelt. Darüber hinaus musste im Vorfeld eine Stimulation der Endothelzellen erfolgen, um eine Expression des E-Selektins wie unter Entzündungsbedingungen zu erreichen. Diese Untersuchungen sollten die Basis für einen perspektivischen systemischen Einsatz dieses Transportsystems im Rahmen einer lokalen Entzündung *in vivo* bilden.

Die Untersuchungen an den stimulierten bEnd3 wurden mit den Ergebnissen an unstimulierten Endothelzellen verglichen. Darüber hinaus wurden unspezifisch gekoppelte, pH-sensitive SPLP an stimulierten Endothelzellen getestet und den anti-E-Selektin-SPLP gegenübergestellt. Diese Vergleiche sollten die Notwendigkeit der Expression des E-Selektins unter Entzündungsbedingungen als Grundlage für die Rezeptor-vermittelten Endozytose der SPLP darstellen. Darüber hinaus sollten in initialen Untersuchungen die beiden kationischen Lipide DOTAP und DC30 (genutzt in einer Mischung mit DOPE, Verhältnis 30:70 mol%, als sog. DC30) am endothelialen System gegenübergestellt werden.

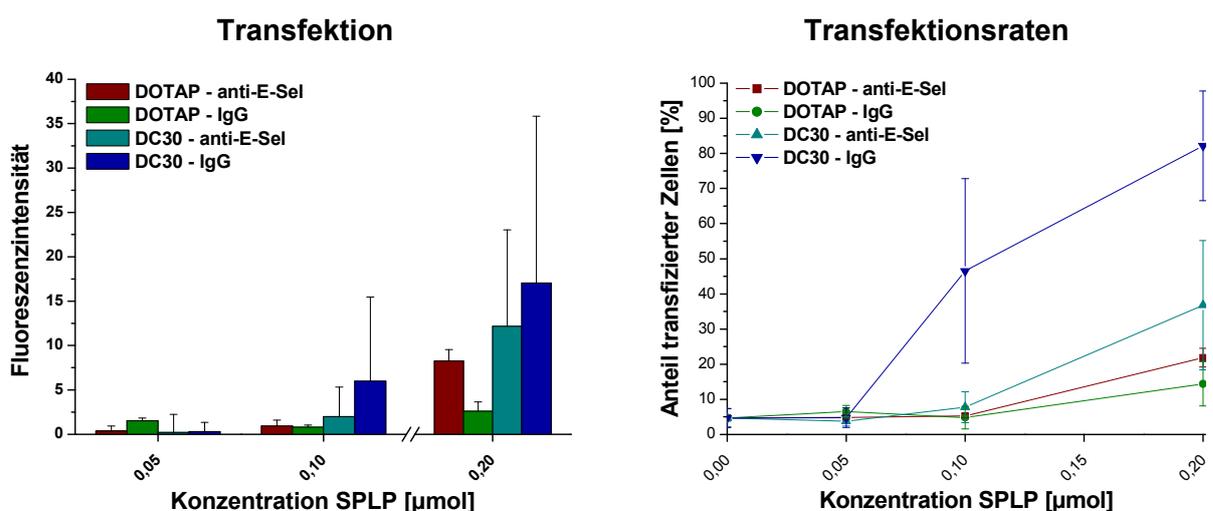
In den Versuchen an den A2780s-Zellen zeigten sich Sättigungserscheinungen bei höheren Konzentrationen, sodass für die folgenden Untersuchungen an den bEnd3 geringere Konzentrationen gewählt wurden. Nach der Stimulation wurden die SPLP in den entsprechenden Konzentrationen auf die bEnd3 gegeben und nach einer Inkubation von vier Stunden wieder abpipetiert. Nach zwei Tagen Transfektionszeit wurden die Zellen nach mikroskopischer Betrachtung per FACS vermessen.

#### 4.4.3.1 Ausmaß der Transfektion von Endothelzellen in Abhängigkeit des kationischen Lipides und der Spezifität der SPLP

In Anlehnung an die Optimierungsversuche an den A2780s wurden initiale Untersuchungen mit beiden kationischen Lipiden (DOTAP und DC30) durchgeführt, um die Transfektionseffizienz sowie die Verträglichkeit beider im endothelialen System zu vergleichen. Durch die höhere Transfektionspotenz des DC30 verglichen mit dem DOTAP sollte die Hürde der schwierigen Transfektionseigenschaften der Endothelzellen gemindert werden. Aufgrund dessen wurde das DC30 trotz der potentiellen toxischen Eigenschaften bei diesen Untersuchungen verwendet. Allerdings galt es, die potentielle Toxizität des DC-Chol als negativen Parameter zu berücksichtigen. Um dies zu beurteilen, wurden die Zellen vor der FACS-Vermessung mikroskopisch betrachtet, um Unterschiede und Veränderungen in der Morphologie nach der Behandlung sowohl mit DOTAP-SPLP als auch mit DC30-SPLP zu erfassen.

Bei beiden Präparationen wurden die Komplexe aus dem GFP-Plasmid und dem gewählten kationischen Lipid mit einer pH-sensitive Hülle (DOPE/CHEMS/Cyanur-PEG-PE) überzogen und mit anti-E-Selektin-mAb oder IgG gekoppelt, um den Einfluss der spezifischen Rezeptor-vermittelten Endozytose und unspezifischen Interaktionen auf die Transfektion gegenüberzustellen. Um eine spezifische Aufnahme zu erreichen, wurden die bEnd3 zur E-Selektin-Expression stimuliert.

Abbildung 36 zeigt den Vergleich der kationischen Lipide DOTAP und DC30 auf das Ausmaß der Transfektion von stimulierten bEnd3 durch spezifisch und unspezifisch gekoppelte, pH-sensitive SPLP sowie die Darstellung der Anteile an transfizierten Endothelzellen in Abhängigkeit vom genutzten Gentransfersystem.



**Abbildung 36:** Graphische Darstellung A) der Transfektion durch pH-sensitive SPLP an stimulierten Endothelzellen und B) der Transfektionsraten der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des gewählten kationischen Lipides, der Spezifität des Liganden und der eingesetzten Konzentrationen der Vesikel

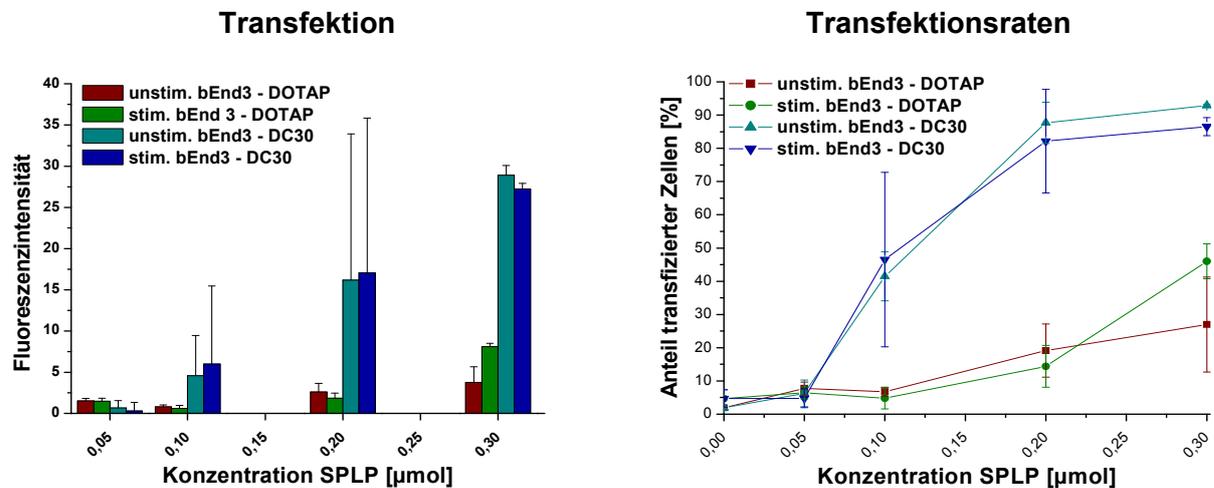
Die Ergebnisse zeigen generell eine höhere Transfektion der DC30-SPLP im Vergleich zu den DOTAP-SPLP mit zunehmender Konzentration, was sich sowohl in einem stärkeren Ausmaß der detektierbaren Fluoreszenz als auch in einem höheren Anteil an transfizierten Zellen äußert. Allerdings fällt auf, dass innerhalb der DC30-SPLP die unspezifisch gekoppelten Vesikel eine deutlich stärkere Fluoreszenz und Transfektionsraten aufweisen als die spezifisch gekoppelten, was auf die ausgeprägten unspezifischen SPLP-Zell-Interaktionen unter den statischen Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Dafür sprechen auch die hohen Transfektionsausmaße der unspezifischen DC30-SPLP bei Konzentration von  $0,2\mu\text{mol}$  an unstimulierten bEnd3 (Daten nicht gezeigt).

Bei den DOTAP-SPLP führt jedoch der Wechsel des Liganden vom anti-E-Selektin-mAb zum IgG zu einer Abnahme der Fluoreszenz und somit auch des transfizierten Endothelzellanteils. Besonders deutlich wird diese Senkung jedoch erst bei hohen Konzentrationen ( $0,2\mu\text{mol}$ ), während bei der geringsten ( $0,05\mu\text{mol}$ ) ein Vorteil im Ausmaß der gemessenen Fluoreszenz für die unspezifisch gekoppelten DOTAP-SPLP sogar gegenüber den DC30-SPLP besteht. Dieser Vorteil fällt jedoch bei Betrachtung der Transfektionsraten geringer aus, sodass eigentlich nicht von einer echten Präferenz dieser IgG-DOTAP-SPLP bei geringen Konzentrationen gesprochen werden kann.

Werden diese Transfektionsergebnisse mit den Resultaten der Versuche an den A2780s verglichen, so bestätigen die geringeren Fluoreszenzausmaße bei diesen Experimenten die schlechte Transfektionsfähigkeit der Endothelzellen. Ähnliches gilt für die Entwicklung der Transfektionsraten. Zwar erreichen die IgG-DC30-SPLP final einen Anteil von 80%, allerdings sind sie die einzige Präparation, welche dieses hohe Fluoreszenzausmaß erreichen. Außerdem zeigt sich dieser Wert von 80% erst bei der maximal eingesetzten Konzentration von  $0,2\mu\text{mol}$ , während die A2780s diese Transfektionsraten schon bei niedrigeren Mengen ( $0,175\mu\text{mol}$ ) erzielen (vgl. Abbildung 35).

Um den Vorteil des DC30 aus den zuvor durchgeführten Versuchen im endothelialen System weiter zu untermauern, wurden zusätzliche Untersuchungen unter Verwendung der IgG-gekoppelten, pH-sensitiven SPLP durchgeführt. Da sich in den Ergebnissen der Abbildung 36 die starken unspezifischen Wechselwirkungen in hohen Fluoreszenzwerten äußerten, wurde diese Möglichkeit gewählt, um Antikörper einzusparen und trotzdem eine hohe Aufnahme über unspezifische Mechanismen zu erreichen. Dabei kommt es zum Einschluss der Vesikel in Phagosomen, die im weiteren intrazellulären Verlauf ebenfalls mit Lysosomen fusionieren (vergleichbar mit dem Endosom). Somit liegen ähnliche Voraussetzungen wie bei der spezifischen Endozytose über clathrin-coated-pits bei der Rezeptor-vermittelten Aufnahme vor, da auch bei den Phagosomen eine Azidifizierung vor dem lysosomalen Abbau stattfindet.

Abbildung 37 zeigt den Vergleich der kationischen Lipide DOTAP und DC30 an unstimulierten und stimulierten bEnd3, erreicht durch den intrazellulären Transport des Plasmid-Lipid-Komplexes mittels IgG-gekoppelter SPLP.



**Abbildung 37:** Graphische Darstellung A) der Transfektion von unspezifisch gekoppelten, pH-sensitiven SPLP und B) der Transfektionsraten der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des Stimulus, des genutzten kationischen Lipides und der eingesetzten Konzentration der SPLP

Bei den Untersuchungen zeigen sich enorme Vorteile für das DC30. Nur bei der geringsten gewählten Konzentration von 0,05 µmol Liposomen zeigt das DOTAP eine höhere Fluoreszenz gegenüber dem DC30.

Allerdings ist der enorme Sprung der Transfektion zwischen den DOTAP- und den DC30-SPLP verblüffend, da solch eine Steigerung sowohl bei der Vermessung der Fluoreszenz als auch bei Betrachtung der Transfektionsraten bei den A2780s-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Das spricht für die schlechte Transfektionsfähigkeit der DOTAP-SPLP bei den Endothelzellen, denn aufgrund der guten Transfizierbarkeit der A2780s bestehen diese ausgeprägten Probleme der DOTAP-SPLP bei den Ovarialkarzinomzellen nicht.

Eine unterstützende Rolle für die Ergebnisse der DC30-SPLP könnte die geringere Versikelgröße (77 nm) im Vergleich zu den DOTAP-SPLP (92 nm) spielen, aufgrund dessen die Aufnahme in die Zellen quantitativer erfolgt, als es bei den DOTAP-SPLP der Fall ist. Dies lässt den Vorteil der DC30-SPLP gegenüber den DOTAP-SPLP wachsen.

Wird jedoch die Morphologie der Endothelzellen nach der SPLP-Behandlung betrachtet, minimiert sich dieser Vorsprung der DC30-Vesikel, da der scheinbar noch vorhandene toxische Effekt den Erfolg des Gentransfersystems beeinträchtigen kann.

Bei den mikroskopischen Betrachtungen der Zellen vor den jeweiligen FACS-Vermessungen konnte allgemein beobachtet werden, dass die Zellen, welche mit DC30-SPLP versetzt wurden generell schlechter (kleiner, teilweise zusammengezogen und rundlich) aussahen, als die bEnd3, die mit DOTAP-SPLP behandelt wurden. Das spricht für einen stärkeren Einfluss des kationischen Lipides. Durch den Einsatz des DC-Chol in Kombination mit DOPE als

DC30 wird zwar die Transfektionsfähigkeit verbessert, jedoch kann die Toxizität des kationischen Lipides für das endotheliale Zellsystem nicht restlos eliminiert werden. Somit besteht die Gefahr, dass die höhere Transfektionseffizienz bei der Anwendung der DC30-SPLP an einem endothelialen Systems zu Lasten der Verträglichkeit gehen könnte.

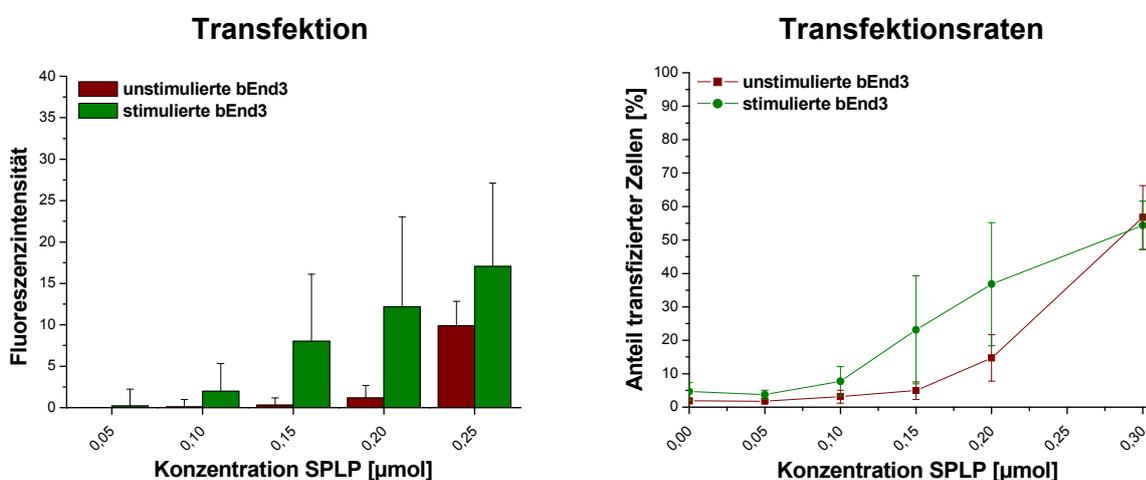
Das DOTAP scheint besser verträglich für die Endothelzellen zu sein, da sie auch nach der Inkubation das gleiche Erscheinungsbild zeigen. DOTAP zeigt eine bessere Bioabbaubarkeit und somit eine geringere Toxizität im Vergleich zum DC-Chol [Chesnoy et al. (2000)]. Da allerdings das DC30 im Vergleich zu DOTAP primär zu einer höheren Transfektion sowie zu höheren Transfektionsraten führt, wurde das Cholesterolderivat für die folgenden Versuche ausgewählt, um die höchstmögliche Transfektionspotenz für die schwer zu transfizierenden Mausendothelzellen zu erreichen.

#### 4.4.3.2 Untersuchungen pH-sensitiver DC30-SPLP in Abhängigkeit des Stimulus der Endothelzellen

Da die zuvor durchgeführten Versuche Vorteile der Transfektion mittels DC30 im Vergleich zu DOTAP sowohl an unstimulierten als auch stimulierten Zellen zeigten, wurden abschließende *in vitro*-Versuche unter Einsatz des spezifischen SPLP-Systems durchgeführt.

Die SPLP erhielten ihre Funktionalität durch Kopplung von anti-E-Selektin-mAb. Mit diesen spezifisch gekoppelten SPLP fand ein Vergleich der Transfektion an unstimulierten und stimulierten bEnd3 statt, um die Effekte der spezifischen Aufnahme auf das Ausmaß der Transfektion zu verdeutlichen.

Die Abbildung 38 zeigt die Transfektionsergebnisse der anti-E-Selektin-SPLP an den bEnd3 in Abhängigkeit des Stimulus sowie die Anteile der transfizierten Zellen.



**Abbildung 38:** Graphische Darstellung A) der Transfektion von anti-E-Selektin-gekoppelten, pH-sensitiven SPLP und B) der Transfektionsrate der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des Stimulus und der eingesetzten Konzentrationen der SPLP

Die Versuche zeigen deutlich bessere Transfektionsergebnisse der E-Selektin gerichteten SPLP an den stimulierten Endothelzellen, was für eine Präferenz der aktiven, Rezeptorvermittelten Endozytose der anti-E-Selektin-SPLP verglichen mit der unspezifischen Phagozytose durch unstimulierte bEnd3 spricht.

Die Fluoreszenz der stimulierten Zellen nimmt stetig zu. Bei der Betrachtung der gemessenen Fluoreszenzwerte und der Transfektionsraten sind allerdings schon bei Konzentrationen von  $0,25\ \mu\text{mol}$  mögliche Sättigungseffekte beim spezifischen System (stimulierte bEnd3 und anti-E-Sel-SPLP) zu erkennen. Diese stetige Zunahme ist bei den unstimulierten Endothelzellen nicht zu verzeichnen, bei ihnen findet dagegen ein deutlicher Sprung sowohl der Fluoreszenz als auch der Transfektionsraten zwischen den Konzentrationen  $0,2\ \mu\text{mol}$  und  $0,25\ \mu\text{mol}$  statt. Ein Grund dafür kann eine mögliche Überladung der unstimulierten Zellen und somit eine Steigerung der unspezifischen Aufnahmemechanismen sein.

Mit den IgG-SPLP in den vorherigen Versuchen (siehe Abbildung 37) werden zwar deutlich höhere Transfektionsergebnisse erzielt, allerdings fehlen ihnen die Targetierung und damit die erwünschte Zielgenauigkeit. Somit sprechen die in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse für den Einsatz der spezifischen pH-sensitiven DC30-SPLP zur Erzielung eines intrazellulären Effektes, jedoch limitiert die Verträglichkeit des kationischen Lipides den Einsatz. Durch Verwendung der Mischung des DC-Chol mit DOPE im Verhältnis von 30 : 70 mol% kann zwar die Toxizität des kationischen Lipides gemindert werden [Sternberg et al. (1994)]. Wie auch bei diesen Versuchen aus den Veränderungen im mikroskopischen Erscheinungsbild vor der FASC-Vermessung erkennbar war, reicht diese erzielte Toxizitäts-senkung jedoch für das hier verwandte endotheliale Zellsystem noch nicht vollständig aus.

#### 4.4.4 Transfektionsversuche *in vivo*

Nachdem die Transfektionsfähigkeit der pH-sensitiven SPLP *in vitro* an aktivierten Endothelzellen gezeigt wurde, sollten abschließende Versuche die Transfektionsfähigkeit der SPLP *in vivo* unter physiologischen Bedingungen zeigen. Analog zu den *in vivo*-Targetierungsuntersuchungen von anti-E-Selektin-IL (siehe Kapitel 4.1.4) wurden die SPLP am Modell des entzündeten Mausohres getestet.

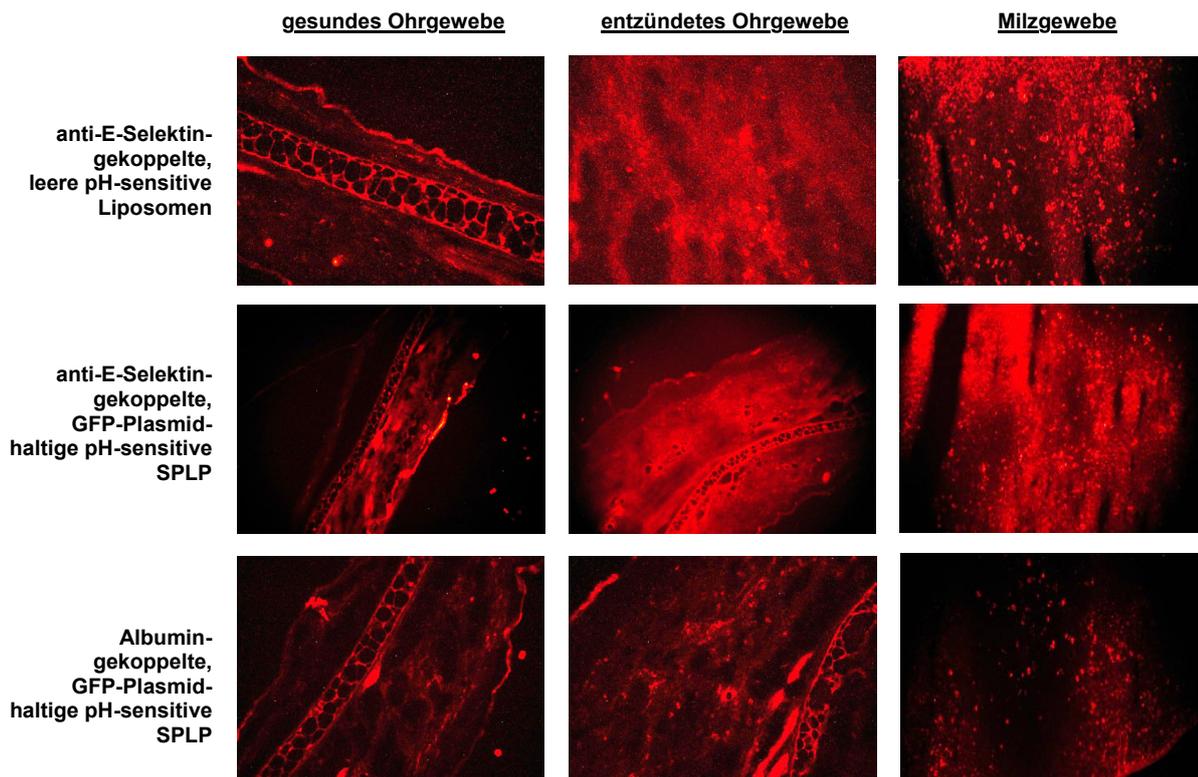
Für diese *in vivo*-Versuche kamen pH-sensitive SPLP zum Einsatz, welche mit einem DC30-GFP-Plasmid-Komplex gefüllt wurden. Um die Akkumulation der SPLP *in vivo* verfolgen zu können, wurden diese mit Rhodamin gelabelt. Nach der Vesikelpräparation erfolgte die Kopplung entweder mit anti-E-Selektin-mAb oder Albumin, um die Relevanz der spezifischen Targetierung für den Erfolg der pH-sensitiven Gentransfervesikel zu zeigen. Die gefüll-

ten SPLP wurden darüber hinaus mit leeren, pH-sensitiven Vesikeln verglichen, um einen möglichen Einfluss der liposomalen Hülle zu erfassen.

Bei den ausgewählten Mäusen wurde analog des *in vivo*-E-Selektin-Targetings an den rechten Ohren eine Kontaktdermatitis stimuliert. Das jeweilige linke Ohr wurde zum Vergleich nur mit dem Lösungsmittel ohne DNFB behandelt, woraufhin keine Entzündung folgte. Nach der Applikation und weiteren 48 Stunden wurden die Akkumulationen der pH-sensitiven SPLP sowie die Transfektionsereignisse im entzündeten Gewebe sichtbar gemacht. Dafür wurde das Ohrgewebe geschnitten und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

### *E-Selektin-Targetierung pH-sensitiver SPLP*

Die Abbildung 39 zeigt das Ausmaß der E-Selektin-Targetierung durch pH-sensitive SPLP im entzündeten Mausohr- sowie Milzgewebe in Abhängigkeit der Spezifität sowie des Füllstatus der SPLP.



**Abbildung 39:** E-Selektin-Targetierung *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Akkumulation pH-sensitiver SPLP in entzündetem Mausohrgewebe in Abhängigkeit von der Spezifität und der Füllung der Vesikel

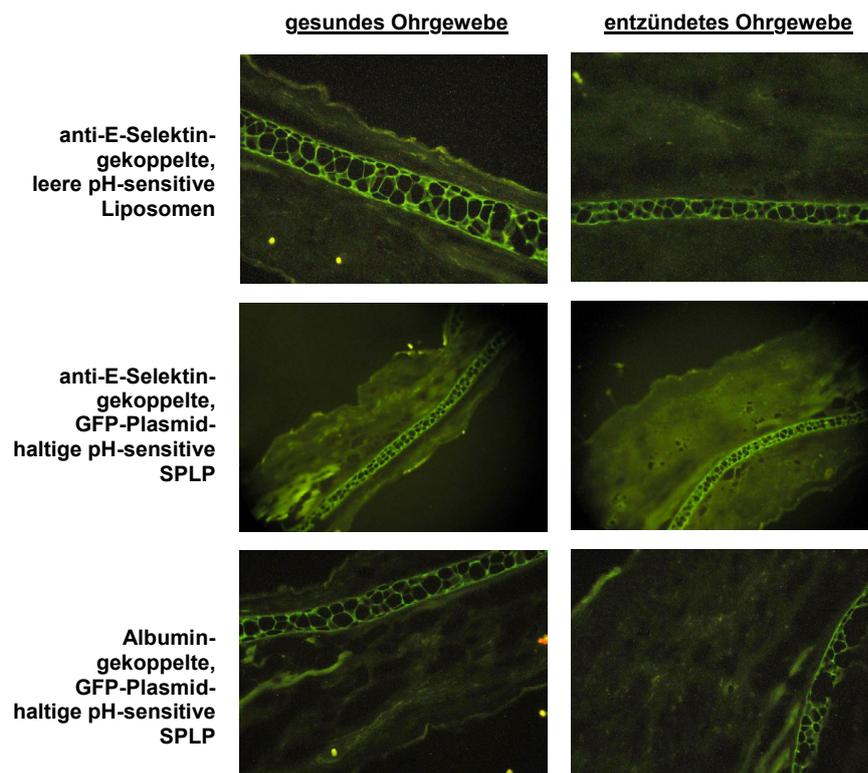
Die Betrachtung der Bilder bestätigt die Targetierungsfähigkeit der E-Selektin-gerichteten SPLP im entzündeten Gewebe. Es ist eine deutliche Akkumulation sowohl der Plasmidgefüllten als auch der leeren E-Selektin-gerichteten SPLP zu verzeichnen. Wie die fluores-

zenzmikroskopischen Aufnahmen der Albumin-gekoppelten SPLP verdeutlichen, zeigen diese nur eine geringfügige Anreicherung im entzündeten Gewebe.

Allerdings führt die exponierte Lage des Antikörpers auch zu einer erhöhten Antigenität, sodass der Großteil der Vesikel, sowohl spezifisch als auch unspezifisch gekoppelt, im Vorfeld durch das Immunsystem eliminiert wurde. Ein Großteil der eingesetzten SPLP konnte in der Milz fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden, was für die schnelle Elimination aus dem Blutkreislauf spricht.

#### *Transfektionsfähigkeit pH-sensitiver SPLP in vivo*

Die Abbildung 40 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der *in vivo*-Transfektionsversuche durch die pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit der Spezifität des gekoppelten Liganden und des Füllstatus der Vesikel.



**Abbildung 40:** Transfektionsergebnisse *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des exprimierten GFPs im entzündeten Mausohrgewebe durch Transfektion mit pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit von der Spezifität und der Füllung der Vesikel im Vergleich zum gesunden Ohrgewebe

Wie aus diesen mikroskopischen Bildern ersichtlich ist, führt die erfolgreiche Targetierung des Ohrgewebes durch die funktionalisierten SPLP nicht zu einer deutlichen Transfektion im Gewebe. Zwar zeigt sich eine leicht erhöhte Fluoreszenz im entzündeten Ohrgewebe bei

Anwendung der E-Selektin-gerichteten SPLP, aber bei einer erfolgreichen Gewebetransfektion sollten stärkere Spots sichtbar werden. Die leeren pH-sensitiven Liposomen sowie die IgG-gekoppelten, Plasmid-gefüllten SPLP zeigen überhaupt keine Fluoreszenzinduktion. Es kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden, inwieweit die relativ starke Aufnahme der SPLP in die Milz eine kritische SPLP-Konzentration im Ohr Gewebe begrenzen oder ob die Ursache der fehlenden Transfektion in einer ungenügenden Zellinternalisierung liegen.

## 5 Zusammenfassung

Endothelzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen. Daher ist die effektive Akkumulation von entzündungshemmenden Substanzen am entzündeten Endothel ein attraktiver Ansatzpunkt, um therapeutisch in pathologische Entzündungsprozesse eingreifen zu können. Die Schwerpunkte dieser Arbeit lagen in der liposomalen Targetierung des endothelialen E-Selektins, um extrazellulär an der Endothelzelloberfläche oder intrazellulär auf genetischer Ebene antiinflammatorische Effekte auf der Ebene der Endothelzellen zu erzielen. Da das E-Selektin im Rahmen von Entzündungsreaktionen nur zeitlich begrenzt von Endothelzellen exprimiert wird, galt es als geeignetes Target, um eine gezielte Akkumulation von Antikörper-gekoppelten Liposomen (IL) im Entzündungsgebiet zu erreichen.

Den initialen Schritt dieser Arbeit bildeten Bindungsuntersuchungen E-Selektin-gerichteter, konventioneller IL an den murinen Endothelzellen bEnd3. In diesen Targetierungsversuchen wurde die Abhängigkeit der extrazellulären Bindung von verschiedenen liposomalen Parametern untersucht. Um Unterschiede in der Positionierung der Liganden an der Liposomenoberfläche zu erreichen, kamen dafür zwei verschiedene Kopplungsanker zum Einsatz. Durch die Verwendung des Cyanur-Ankers und der damit resultierenden Antikörperpräsentation an den terminalen Enden des Polyethylenglycols resultierte eine deutliche Steigerung der Targetierungsfähigkeit im Vergleich zu den verwendeten konventionellen N-Glutaryl-PE-Kopplungsankern. Die positiven Targetierungsuntersuchungen konnten unter *in vivo*-Bedingungen bestätigt werden. Es zeigte sich im Modell des entzündeten Mausohres eine deutliche Anreicherung der E-Selektin gerichteten IL im Vergleich zum gesunden Ohrgehörte und im Vergleich zu irrelevanten IL. Diese Erkenntnisse bestätigen eindrucksvoll das Potential des liposomalen Targetings des Endothels unter Entzündungsbedingungen.

Da die Bindung allein noch kein Garant für einen Therapieerfolg darstellt, wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Liposomenpräparationen so modifiziert, dass eine extrazelluläre Freisetzung eingeschlossener Agenzien an der Endothelzelloberfläche erfolgte. Erste Untersuchungen galten der Aufklärung des target-sensitiven Mechanismus. Diese Versuche, durchgeführt in einem partikulären System, zeigten, dass sowohl eine Aggregation benachbarter Liposomen als auch die Diffusion der Antikörper-Lipidanker-Komplexe innerhalb der Liposomenmembran zur Destabilisierung und somit zur Freisetzung des liposomalen Inhaltes führen.

In weiterführenden *in vitro*-Zellversuchen an Endothelzellen konnte die target-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes sowohl unter statischen als auch dynamischen Bindung quantifiziert werden. Die Wirksamkeit dieser Strategie bei Entzündungsreaktionen wurde in anschließenden Untersuchungen durch einen liposomal verpackten Chemokinantago-

nisten und dessen Beeinflussung des Roll- und Adhäsionsverhaltens von Th1-Lymphozyten unter geeigneten *in vitro*-Bedingungen simuliert. In diesen Untersuchungen wurden jedoch die positiven Freisetzungsergebnisse der zuvor durchgeführten Experimente nicht so deutlich. Aufgrund der nicht vermeidbaren Durchführung der Versuche in verschiedenen Laboren könnten diese stark differierenden Ergebnisse auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein.

Ein weiterer Teil der Arbeit widmete sich der genetischen Manipulation von Endothelzellen. Dafür kamen lipidbasierte Vektorsysteme, sog. stabilized plasmid lipid particles (SPLP), im Entzündungsmodell zur Anwendung. Wie bei den konventionellen Liposomen sollten die SPLP hinsichtlich Targetierung und intrazellulärem Trafficking modifiziert und untersucht werden. Um nach erfolgter Bindung und Internalisierung der SPLP die lysosomale Degradation des genetischen Materials zu vermeiden, wurde die Lipidzusammensetzung so modifiziert, dass eine pH-sensitive Freisetzung des liposomalen Inhaltes aus dem Endosom ins Zytosol folgte. In den durchgeführten *in vitro*-Versuchen konnten die pH-sensitiven SPLP mit ihrer Transfektionsfähigkeit sowohl an den Ovarialkarzinomzellen A2780s als auch an den schwer zu transfizierenden murinen Endothelzellen bEnd3 überzeugen und hinsichtlich der Spezifität des gekoppelten Liganden und des zur Lipoplexbildung genutzten kationischen Lipides charakterisiert werden. Diese Transfektionsergebnisse konnten abschließend *in vivo* trotz deutlich detektierbarer Akkumulation der pH-sensitiven SPLP im entzündeten Gewebe nicht gezeigt werden. Ursachen dafür könnten in der hohen Immunogenität und der daraus resultierenden Elimination der SPLP aus der Blutzirkulation liegen. Es lässt sich nur spekulieren, ob für diese Immunogenität einzig die Lokalisation des Liganden an der Liposomenoberfläche oder auch die Anwesenheit oberflächlich adsorbierter Lipoplexe verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit war jedoch keine Differenzierung der Positionierung der Lipoplexe möglich, sodass diese Frage nicht abschließend geklärt werden kann.

Zusammenfassend stellt das endotheliale E-Selektin ein geeignetes Target zur Akkumulation von modifizierten IL oder SPLP in Entzündungsgebieten dar, um auf extrazellulärer oder intrazellulärer Ebene antiinflammatorisch in pathologische Prozesse einzugreifen. Allerdings wird sich das target-sensitive System aufgrund des hohen präparativen Aufwandes, der geringen Einschlussmengen und des damit verbundenen hohen Verlustes an Substanzen in dieser Form nicht durchsetzen können. Innerhalb der SPLP müssten darüber hinaus verschiedene Parameter wie die Charakterisierung der Verteilung der Lipoplexe, die Immunogenität sowie eine mögliche Toxizität der pH-sensitiven SPLP *in vivo* geklärt werden, um eine erfolgreiche Transfektion auch *in vivo* zu erreichen. Weiterführende Untersuchungen sowohl der target-sensitiven IL als auch der pH-sensitiven SPLP sind somit nötig, um auch *in vivo* extrazellulär oder intrazellulär erfolgreich in das Entzündungsgeschehen einzugreifen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793.
- Akao T., Osaki J., Mitoma J. I., Ito A., Kunitake T. (1991) Correlation between physicochemical characteristics of synthetic cationic amphiphiles and their DNA transfection ability. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 3677–3681.
- Ahlén G., Söderholm J., Tjelle T., Kjekén R., Frelin L., Höglund U., Blomberg P., Fons M., Mathiesen I., Sällberg M. (2007) *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 179 (7), 4741–4753.
- Ali S., Robertson H., Wain J. H., Isaacs J. D., Malik G., Kirby J. A. (2005) A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation. *J. Immunol.* 175 (2), 1257–1266.
- Allen T. M., Hansen C., Martin F., Redemann C., Yau-Young A. (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylen glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1066, 29–36.
- Allen T. M., Brandeis E., Hansen C. B., Kao Y., Zalipsky S. (1995) A new strategy of attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1237, 99–108.
- Allen T. M., Ryan J. L., Papahadjopoulos D. (1985) Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 818, 205–210.
- Allen T. M., Sapra P., Moase E., Moreire J., Iden D. (2002) Adventures in targeting. *J. Liposom. Res.* 12 (1&2), 5–12.
- Almofti M. R., Harashima H., Shinohara Y., Almofti A., Baba Y., Kiwada H. (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 410 (2), 246–253.
- Alving C. R. (1992) Immunologic aspects of liposomes: Presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113 (3–4), 307–22.
- Ambegia E., Ansell A., Cullis P., Heyes J., Palmer L., MacLachlan I. (2005) Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1669, 155–163.
- Baggiolini M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250 (2), 91–104.
- Bally M.B., Havrie P., Wong F. M., Kong S., Wasan E. K., Reimer D. L. (1999) Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA Carriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 38 (3), 286–291.
- Bartlett G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234, 466–468
- Bendas G. (2001) Immunoliposomes, a promising approach to targeting cancer therapy. *Biodrugs* 15 (4), 215–224.
- Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U. (1999) Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J. Pharm.* 188, 79–93.
- Bevilacqua M. P., Stengelin S., Gimbrone M. A., Seed B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243 (4895), 1160–1165.
- Birchall J. C., Kellaway I. W., Mills S. N. (1999) Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes. *Int. J. Pharm.* 183, 195–207.
- Blaese R. M., Culver K. M. (1992) Gene therapy for primary immunodeficiency disease. *Immunodef. Rev.* 3, 329–349.

- Blume G., Cevc G. (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*. *Biochim Biophys Acta.* 1146 (2), 157–168.
- Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P. P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani S., Allavena P., Gray P. A., Mantovani A., Sinigaglia F. (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187, 129–134.
- Bonte F., Juliano R. L. (1986) Interactions of liposomes with serum proteins. *Chemistry and Physics of Lipids* 40, 359–372.
- Boulikas T. (1998) Status of gene therapy in 1997: Molecular mechanism, disease targets, and clinical applications. *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 1–172.
- Bradford J. G., Crowther R. L., Chandran C., Rumberger J. M., Li S., Huang K. S., Presky D. H., Familletti P. C., Woltzky B. A., Burns D. K. (1994) Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of IEC/EGF domains. *Nature* 367, 532–538.
- Braun J., Sieper J. (2003) Overview of the use of the anti-TNF agent infliximab in chronic inflammatory diseases. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3 (1), 141–168.
- Breunig M., Lungwitz U., Göpferich A. (2008) Bioabbaubare Polymere als Transporter ins Zellinnere. *Pharm. Ztg.* 153 (6), 16–23.
- Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., Goepferich A. (2007) Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14454–14459.
- Broxmeyer H. E. (2001) Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. *Int. J. of Hematol.* 74, 9–17.
- Broxmeyer H. E. (2006) Chemokine and chemokine receptors in hematopoiesis and immunology. *Exp. Hematol.* 34, 965–966.
- Budker V., Zhang G., Danko I., Williams P., Wolff J. (1998) The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* 5, 272–276.
- Burns J. M., Summers B. C., Wang Y., Melikan A., Berahovich R., Miao Z., Penfold M. E., Sunshine M. J., Littman D. R., Kuo C. J., Wei K., McMaster B. E., Wright K., Howard M. C., Schall T.J. (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* 2003, 2201–2213.
- Bursill C. A., Channon K. M., Greaves D. R. (2004) The role of chemokines in atherosclerosis: Recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr. Opin. Lipid* 15, 145–149.
- Campanati A., Goteri G., Simonetti O., Ganzetti G., Giuliadori K., Stramazzotti D., Morichetti D., Bernardini M. L., Mannello B., Fabris G., Offidani A. (2007) CTACK/CCL27 expression in psoriatic skin and its modification after administration of etanercept. *Br. J. Dermatol.* 157 (6), 1155–1160.
- Campbell J. J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M. A., Thompson D. A., Butcher E. C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279 (5349), 381–384.
- Caplen N. J., Kinrade E., Sorgi F., Gao X., Gruenert D., Geddes D., Coutelle C., Huang L., Alton E. W., Williamson R. (1995) *In vitro* liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther.* 2, 603–613.
- Chesnoy S., Huang L. (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 27–47.
- Ciani L., Ristori S., Salvati A., Calamai L., Martini G. (2004) DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: Zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (1), 70–79.
- Collins D., Litzinger D. C., Huang L. (1989) Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 234–242.

- Connor J., Huang L. (1986a) pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res* 46, 3431–3435.
- Connor J., Norley N., Huang L. (1986b) Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 884 (3), 474–481.
- Connor J., Yatvin M. B., Huang L. (1984) pH-sensitive liposomes: Acid-induced liposome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (6), 1715–1718
- Crump M.P., Gong J. H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdeos F., Virelizier J. L., Baggolini M., Sykes B. D., Clark-Lewis I. (1997) Soluton structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 16 (23), 6996–7007.
- Dal Canton A. (1995) Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int.* 48 (6), 1687–1696.
- Daniels T. R., Delgado T., Rodriguez J. A., Helguera G., Penichet M. L. (2006a) The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* 121 (2), 144–158.
- Daniels T. R., Delgado T., Helguera G., Penichet M. L. (2006b) The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin. Immunol.* 121 (2), 159–176.
- Davis B. R., Brown D. B., Prokopishyn N. L., Yannariello-Brown J. (2000) Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2 (4), 412–419.
- Düzgünes N., Straubinger R. M., Baldwin P. A., Friend D. S., Papahadjopoulos D. (1985) Proton-induced fusion of oleic acid-phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry* 24, 3091–3098.
- Duncan R., Ringsdorf H., Satchi-Fainaro R. (2006) Polymer therapeutics polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: Past, present and future opportunities. *J. Drug Target.* 14 (6), 337–341.
- Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., Edelstein R. M. (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 – an overview. *J. Gene Med.* 6 (6), 597–602.
- Ehrhardt C., Kneuer C., Bakowsky U. (2004) Selectins – an emerging target for drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56, 527–549.
- Ellens H., Bentz J., Szoka F. C. (1984) pH-induced destabilization of phosphatidyl-ethanolamine-containing liposomes: Role of bilayer contact. *Biochemistry* 23, 1532–1538.
- Ellens H., Morselt H., Scherphof G. (1981) *In vivo* fate of large unilamellar sphingomyelin-cholesterol liposomes after intraperitoneal and intravenous injection into rats. *Biochim. Biophys. Acta* 674, 10–18.
- Farhood H., Bottega R., Epand R. M., Huang L. (1992) Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (2), 239–246.
- Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 289–295.
- Felgner P. L., Barenholz Y., Behr J. P., Cheng S. H., Cullis P., Huang L., Jessee J. A., Seymour L., Szoka F., Thierry A. R., Wagner E., Wu G. (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* 8 (5), 511–512.
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413–7417.
- Felgner P. L., Ringold P. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337, 387–388.
- Fenske D. B., MacLachlan I., Cullis P. R. (2002) Stabilized plasmid-lipid particles: A systemic gene therapy vector. *Methods Enzymol.* 346, 36–71.
- Fidler I. J. (1990) Systemic activation of macrophages by liposomes containing muramyl-tripeptide phosphatidylethanolamine for therapy of cancer metastasis. *J. Liposom. Res.* 1, 451–461.

- Forssen E., Willis M. (1998) Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.* 29, 249–271.
- Fraley R. P., Papahadjopoulos D. (1982) Liposomes: The development of a new carrier system for introducing nucleic acid to plant and animal cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 96, 171–187.
- Fuloria M., Rubin B. K. (2000) Evaluating the efficacy of mucoactive aerosol therapy. *Respir. Care* 45 (7), 868–873.
- Funari S. S., Barcelo F., Escriba P. V. (2003) Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidyl-ethanolamine membranes. *J. Lipid. Res.* 44, 567–575.
- Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y. (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: Review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.* 42 (5), 419–436.
- Gao X., Huang L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280–285.
- Gaucheron J., Wong K., Cullis P. (2007) Multivalent cationic lipids and methods of using in the same production of lipid particles. US Patent Issued 2022
- Gerlach L. O., Skerlj R. T., Bridger G. J., Schwartz T. W. (2001) Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 276 (17), 14153–14160.
- Ghirnikar R. S., Lee Y. L., Eng L. F. (2000) Chemokine antagonist infusion attenuates cellular infiltration following spinal cord confusion injury in rat. *J. Neurosci. Res.* 59, 63–73.
- Gilbreath M. J., Nancy C. A., Hoover D. L., Alving C. R., Swatz G. M. Jr., Meltzer M. S. (1985) Macrophage activation for microbicidal activity against *Leishmania major*: Inhibition of lymphokine activation by phosphatidylcholine-phosphatidylserine liposomes. *J. Immunol.* 134, 3420–3425.
- Goldman A. J., Cox R. G., Brenner H. (1967) Slow viscous motion of sphere parallel to a plane wall - II. Couette flow. *Chem. Eng. Sci.* 22, 653–660.
- Gregoriadis G. (1976a) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 295 (13), 704–710.
- Gregoriadis G. (1976b) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 295 (14), 765–770.
- Grewe M., Walther S., Gyufko K., Czech W., Schopf E., Krutmann J. (1995) Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.* 105 (3), 407–410.
- Hasegawa H., Fujita S. (2001) Chemokines and lymphocytes: The role of chemokines and their receptors in immune system. *Cell. Mol. Biol.* 47 (4), 599–607.
- Hermann E. H., Rahmann A., Ferrans V. J., Vick J. A., Schein P. S. (1983) Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles in liposomal encapsulation. *Cancer Res.* 43, 5427–5432.
- Hickman M. A., Malone R. W., Lehmann-Bruinsma K., Sih T. R., Knoell D., Szoka F. C., Walzem R., Carlson D. M., Powell J. S. (1994) Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* 5, 1477–1483.
- Ho R. J. Y., Rouse B. T., Huang L. (1986) Target-sensitive immunoliposomes: preparation and characterization. *Biochemistry* 25, 5500–5506.
- Ho R. J. Y., Rouse B. T., Huang L. (1987) Target-sensitive immunoliposomes as an efficient drug carrier for antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 262, 13973–13978.
- Ho R. J. Y., Ting-Beall H. P., Rouse B. T., Huang L. (1988) Kinetic and ultrastructural studies of interaction of target-sensitive immunoliposomes with herpes simplex virus. *Biochemistry* 27, 500–506.
- Holzknacht Z. E., Platt J. L. (2000), The fine cytokine line between graft acceptance and rejection. *Nat. Med.* 6, 497–498.

- Hong K., Zheng W., Baker A., Papahadjopoulos D. (1997) Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and polyethyleneglycolphospholipid conjugates for efficient *in vivo* gene delivery. *FEBS Lett.* 400 (2), 233–237.
- Horn E. (2006) Konkurrenz für Deckglas & Co. – Neue Methoden der Kombination von Zellkultur und Mikroskopie. *Mikrokosmos* 95 (3), 183–186.
- Horuk R. (2001) Chemokine receptors. *Cytokines Growth Factor Rev.* 12 (4), 313–335.
- Huang A., Kennel S. J., Huang L. (1983) Interactions of immunoliposomes with target cells. *J. Biol. Chem.* 258, 14034–14040.
- Huang X., Shen J., Cui M., Shen L., Luo X., Ling K., Pei G., Jiang H., Chen K. (2003) Molecular dynamics simulations on SDF-1 $\alpha$ : Binding with CXCR4 receptor. *Biophys. J.* 84 (1), 171–184.
- Huang L., Viroonchatapan E. (1999) Introduction. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. Academic Press, San Diego, California, 3–22
- Hyde S. C., Southern K. W., Gileadi U., Fitzjohn E. M., Mofford K. A., Waddell B. E., Gooi H. C., Goddard C. A., Hannavy K., Smyth S. E., Egan J. J., Sorgi F. L., Huang L., Cuthbert A. W., Evans M. J., Colledge W. H., Higgins C. F., Webb A. K., Gill D. R. (2000) Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 7 (13), 1156–1165.
- Jarnagin W. R., Debs R. J., Wang S. S., Bissell D. M. (1992) Cationic lipid-mediated transfection of liver cells in primary culture. *Nucleic Acids Res.* 20, 4205–4211.
- Junior Carvalho A. D., Vieira F. P., Melo V. J., Lopes M. T., Silveira J. N., Ramaldes G. A., Garnier-Suillerot A., Pereira-Maia E. C., Oliveira M. C. (2007) Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (8), 1149–1157.
- Kabanov A. V., Kabanov V. A. (1995) DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug. Chem.* 6 (1), 7–20.
- Kautz K., Schwarz M., Radeke H. H. (2005) Interference with MCP-1 gene expression by vector generated triple helix-forming RNA oligonucleotides. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 362–276.
- Kawakami S., Hashida M. (2007) Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22 (3), 142–151.
- Kawaura C., Noguchi A., Furuno T., Nakanishi M. (1998) Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *FEBS Lett.* 421 (1), 69–72.
- Kessner S. (2004) Die Untersuchung des immunoliposomalen Targetings von Endothelzellen als Grundlage für eine neuartige antiinflammatorische Therapie. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kirby C., Clarke J., Gregoriadis G. (1980) Effects of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 186, 591–597.
- Kishimoto T. K., Jutila M. A., Berg E. L., Butcher E. C. (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245 (4923), 1238–1241.
- Kledal T. N., Rosenkilde M. M., Coulin F., Simmons G., Johnson A. H., Alouani S., Power C. A., Lüttichau H. R., Gerstoft J., Clapham P. R., Clark-Lewis I., Wells T. N., Schwartz T. W. (1997) A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science* 277 (5332), 1656–1659.
- Klibanov A. I., Maruyama K., Beckerleg A. M., Torchilin V. P., Huang L. (1991) Activity of amphipatic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 142–148.
- Koltover I., Salditt T., Rädler J. O., Safinya C. R. (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* 281, 78–81.

- Kunckel E. J., Jung U., Bullard D. C., Norman K. E., Wolitzky B. A., Vestweber D., Beaudet A. L., Ley K. (1996a) Absence of trauma induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 183, 57–65.
- Kunckel E. J., Ley K. (1996b) Distinct phenotype of E-Selectin deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in mice. *Circ. Res.* 79 (6), 1196–204.
- Kuschert G. S. V., Coulin F., Power C. A., Proudfoot A. E. I., Hubbard R. E., Hoogewerf A. J., Wells T. N. C. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959–12968.
- Lasic D. D. (1998) Novel application of liposomes. *Trends Biotech.* 16, 307–321.
- Latt S. A., Stetten G. (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* 24 (1), 24–33.
- Laudanna C., Kim J. Y., Constantin G., Butcher E. (2002) Rapid leukocyte activation by chemokines. *Immunol. Reviews* 186, 37–46.
- Ledley F. D. (1995) Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther.* 6, 1129–1144.
- Leonardi C. L., Kimball A. B., Papp K. A., Yeilding N., Guzzo C., Wang Y., Li S., Dooley L. T., Gordon K. B. (2008) Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 371 (9625), 1665–1674.
- Leung D. Y., Bieber T. (2003) Atopic dermatitis. *Lancet* 361 (9352), 151–160.
- Leventis R., Silvius J. R. (1990) Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 124–132.
- Levoe A., Balabanian K., Baleux F., Bachelier F., Lagane B. (2009) CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 113 (24), 6085–6093.
- Li S., Huang L. (1999a) Novel Lipidic Vectors for Gene Transfer. *Nonviral Vectors for Gene Therapy.* Academic Press, San Diego, California, 289–309.
- Li S., Rizzo M. A., Bhattacharya S., Huang L. (1998) Characterization of cationic lipid-protamin-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther.* 5, 930–937.
- Li S., Tseng W. C., Stolz D. B., Wu S. C., Huang L. (1999b) Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: Implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* 6, 585–594
- Li W., Huang Z., MacKay J. A., Grube S., Szoka F. C. Jr. (2005) Low-pH-sensitive poly(ethylene glycol)(PEG)-stabilized plasmid nanolipoparticles: Effects of PEG chain length, lipid composition and assembly conditions on gene delivery. *J. Gene Med.* 7, 67–79.
- Li S., Wang H., Peng B., Zhang M., Zhang D., Hou S., Guo Y., Ding J. (2009) Efalizumab binding to the LFA-1 alpha(L) I domain blocks ICAM-1 binding via steric hindrance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (11), 4349–4354.
- Lindow M., Nansen A., Bartholdy C., Stryhn A., Hansen N. J. V., Boesen T. P., Wells T. N. C., Schwartz T. W., Thomsen A. R. (2003) The virus-encoded chemokine vMIP-II inhibits virus-induced Tc1-driven inflammation. *J. of Virol.* 77 (13), 7393–7400.
- Litzinger D. C., Huang L. (1992) Phosphatidylethanolamine liposomes: Drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 201–227.
- Loetscher P., Clark-Lewis I. (2001) Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 69 (1), 881–884.
- Longo M. L., Waring A. J., Hammer D. A. (1997) Interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers: Area expansion and permeation. *Biophys. J.* 73, 1430–1439.

- Lortat-Jacob H., Grosdidier A., Imberty A. (2002) Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (3), 1229–1234.
- Lowe J. B. (2002) Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol. Rev.* 186, 19–36.
- Lowe J. B. (2003) Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 531–538.
- Loyter A., Scangos G., Juricek D., Keene D., Ruddle F. H. (1982) Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp. Cell. Res.* 139 (1), 223–234.
- Lüttichau H. R. (2008), The herpesvirus 8 encoded chemokines vCCL2 (vMIP-II) and vCCL3 (vMIP-III) target the human but not the murine lymphotactin receptor. *J. Virol.* 21, 5:50.
- Lüttichau H. R., Johnsen A.H., Jurlander J., Rosenkilde M.M., Schwartz T.W. (2007) Kaposi sarcoma-associated herpes virus targets the lymphotactin receptor with both a broad spectrum antagonist vCCL2 and a highly selective and potent agonist vCCL3. *J. Biol. Chem.* 282 (24), 17794–1805
- Luster A. D. (1998) Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *Eng. J. Med.* 338 (7), 436–445.
- Luther S. A., Cyster J. G. (2001) Chemokines as regulators of t cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2, 102–107.
- Ma X. L., Weyrich A. S., Lefer D. J., Buerke M., Albertine K. H., Kishimoto T. K., Lefer A. M. (1993) Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfusion cat myocardium. *Circulation* 88, 649–658.
- Marquet M., Horn N. A., Meek J. A. (1996) Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. *Pharm.* 4, 28–46.
- Marshall D., Haskard D. O. (2002) Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: Where are we now? *Semin. Immunol.* 14 (2), 133–140.
- Maruyama K. (2002) PEG-Immunoliposome. *Biosci Rep.* 22 (2), 251–266.
- Maruyama K., Yuda T., Okamoto A., Ishikura C., Kojima S., Iwatsura M. (1991) Effect of molecular weight in amphipatic poly(ethylene glycol) on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1620–1622.
- Mastrobattista E., Storm G., van Bloois L., Reszka R., Bloemen P. G. M., Crommelin D. J. A., Henricks P. A. J. (1999) Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) on bronchial epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1419, 353–363.
- Matsui H., Johnson L. G., Randell S. H., Boucher R. C. (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1117–1126.
- Meier-Abt P. J., Mölling K. (1996) Somatische Gentherapie. *unizürich-Magazin*, Zürich.
- Middleton J., Patterson A. M., Gardner L., Schmutz C., Ashton B. A. (2002) Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100, 3853–3860.
- Mok K. W. C., Lam A. M. I., Cullis P. R. (1999) Stabilized plasmid-lipid particles: Factors influencing plasmid entrapment and transfection properties. *Biophys. Biochim. Acta* 1419 (2), 137–150.
- Molema G., Meijer D. K. F. (2001) Drug Targeting: Organ-Specific strategies. Vol. 12, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2–3
- Morgan R. A., Anderson W. F. (1993) Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 191–217.
- Mortimer I., Tam P., MacLachlan I., Graham R. W., Saravolac E. G., Joshi P. B. (1999) Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther.* 6, 403–411.

- Moser B., Willmann K. (2004) Chemokines: Role in inflammation and immun surveillance. *Ann. Rheum. Dis.* 63 (3), 84–89.
- Nabel G. J., Felgner P. L. (1993) Direct gene transfer for immunotherapy and immunization. *Trends Biotechnol.* 11 (5), 211–215.
- Nayar R., Schroit A. J. (1985) Generation of pH-sensitive liposomes: Use of large unilamellar vesicles containing N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry* 24, 5967–5971.
- Nelson R. M., Cecconi O., Roberts W. G., Affuro A., Linhardt R. J., Belvilaqua M. P. (1993) Heparin oligosaccharides bind L- and P-Selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 82, 3253–3258.
- Ng K.-Y., Zhao L., Lui Y., Mahapatro M. (2000) The effects of polyethyleneglycol (PEG)-derived lipid on the activity of target-sensitive immunoliposome. *Int. J. Pharmaceut.* 193, 167–166.
- Ohsugi Y. (2007) Recent advances in immunopathophysiology of interleukin-6: An innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interleukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of immune-mediated inflammatory diseases. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (11), 2001–2006.
- Olson T. S., Ley K. (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R7–28.
- Orgis M., Brunner S., Schüller S., Kircheis R., Wagner E. (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6, 595–605.
- Ortonne J. P., Shear N., Shumack S., Henninger E. (2005) Impact of efalizumab on patient-reported outcomes in high-need psoriasis patients: Results of the international, randomized, placebo-controlled Phase III Clinical Experience Acquired with Raptiva (CLEAR) trial [NCT00256139]. *BMC Dermatol.* 16, 5:13.
- Paleolog E. (2003) The therapeutic potential of TNF-alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 12 (7), 1087–1095.
- Papahadjopoulos D. (1990) Stealth liposomes: Prolonged circulation time in blood, improved accumulation in tumors and increased therapeutic index. *Liposomes in Drug Delivery, 21 Years on.* London, 12–15
- Papazisis K. T., Geromichalos G. D., Dimitriadis K. A., Kortsaris A. H. (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J. Immunol. Methods* 208, 151–158.
- Papp K. A., Langley R. G., Lebwohl M., Krueger G. G., Szapary P., Yeilding N., Guzzo C., Hsu M. C., Wang Y., Li S., Dooley L. T., Reich K. (2008) Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 371 (9625), 1675–1684.
- Pari G. S., Keown W. A. (1997) Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells. Calcium phosphate and DEAE-dextran. *Methods Mol. Biol.* 62, 301–306.
- Parish C. R. (2005) Heparan sulfate and inflammation. *Nat. Immunol.* 6 (9), 861–862.
- Patel R. V., Clark L. N., Lebwohl M., Weinberg J. M. (2009) Treatments for psoriasis and the risk of malignancy. *J Am Acad Dermatol.* 60 (6), 1001–1017.
- Pedersen N., Hansen S., Heydenreich A. V., Kristensen H. G., Poulsen H. S. (2006) Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62 (2), 155–162.
- Peled A., Grabovsky V., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Petit I., Ben-Hur H., Lapidot T., Alon, R. (1999) The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J. Clin. Invest.* 104 (9), 1199–1211.
- Peschka-Süss R., Schubert R. (2003) pH-sensitive liposomes. *Liposomes: A practical approach.* Oxford University Press Inc. 264 New York 2003, 305–318.

- Peterson G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Petre C. E., Dittmer D. P. (2007) Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *Int. J. Nanomedicine* 2 (3), 277–288.
- Pinnaduwege P., Huang L. (1992) Stable target-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry* 31, 2850–2855.
- Plank C., Mechtler K., Szoka F. C. Jr., Wagner F. (1996) Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 7, 1437–1446.
- Plushner S. L. (2008) Tocilizumab: An interleukin-6 receptor inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis; *Annu. Pharmacother.* 42 (11), 1660–1668.
- Qian Z. M., Li H., Sun H., Ho K. (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev.* 54 (4), 561–587.
- Qin S., Rottman J. B., Myers N., Weinblatt M., Loetscher M., Koch A. E., Moser B., Mackay C. R. (1998) The chemokine receptor CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin Invest.* 101, 746–754
- Rädler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes; DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275, 810–814.
- Rädler U., Zantl R. (2005) Cell culture biochips for optical microscopy. *Appl. Note Am. Biotech Lab.* 27–28.
- Reisdorf S. (2008) Golimumab bei entzündlichen Erkrankungen. *Dt. Apoth. Ztg.* 29, 40–41.
- Roberts W. G., Palade G. E. (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57, 765–772.
- Roerdink F., Wassef N. M., Richardson E. C., Alving C. R. (1983) Effects of negatively charged lipids on phagocytosis of liposomes opsonized by complement. *Biochim. Biophys. Acta* 734, 33–39.
- Romagnani P., Lasagni L., Annunziato F., Serio M., Romagnani S. (2004) CXC-chemokines: The regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 25, 201–209.
- Rosenkilde M. M., Smit M. J., Waldhoer M. (2008) Structure, function and physiological consequences of virally encoded chemokine seven transmembrane receptors. *Br. J. Pharmacol.* 153 (1), 154–166.
- Ross P. C., Hui S. W. (1999) Lipoplex size is a major determinant of *in vitro* lipofection efficiency. *Gene Ther.* 6 (4), 651–659.
- Rubant S. (2005) Molekulare Wirkmechanismen rekombinant hergestellter Chemokin-rezeptor-Antagonisten auf entzündungsrelevante Immunzellen. Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt (Main)
- Rubant S., Ludwig R. J., Pfeffer J., Schulze-Johann P., Kaufmann R., Pfeilschifter J. M., Boehncke W. H., Radeke H.H. (2006) Eukaryotic expression of broad-spectrum chemokine receptor antagonist vMIP-II and its effects on T-cell function *in vitro* and *in vivo*. *Exp Dermatol.* 15 (8), 634–642.
- Rudolph C., Schillinger U., Ortiz A., Tabatt K., Plank C., Müller R. H., Rosenecker J. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide *in vitro* and *in vivo*. *Pharm. Res.* 21 (9), 1662–1669.
- Sadelain M. (2004) Insertional oncogenesis in gene therapy: How much of a risk? *Gene Ther.* 11, 569–573.
- Sallusto F., Lenig D., Mackay C. R., Lanavecchia A. (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187, 875–883.
- Sandhu A. P., Lam A. M. I., Fenske D. B., Lorne R. P., Johnston M., Cullis P. R. (2005) Calcium enhances the transfection potency of stabilized plasmid-lipid particles. *Analyt. Biochem.* 341, 156–164.

- Scherphof G., Roerdink F., Waite M., Parks J. (1978) Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interactions with high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 542, 296–303.
- Scheule R. K., St George J. A., Bagley R. G., Marshall J., Kaplan J. M., Akita G. Y., Wang K. X., Lee E. R., Harris D. J., Jiang C., Yew N. S., Smith A. E., Cheng S. H. (1997) Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to mammalian lung. *Hum. Gene Ther.* 8, 689–707.
- Schmidt-Schönbein G. W., Usami S., Skalak R., Chien S. (1980) The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.* 19, 45–70.
- Seet B. T., McFadden G. (2002) Viral chemokine-binding proteins. *J. Leukoc. Biol.* 72 (1), 24–34.
- Setiadi H., McEver R. P. (2008) Clustering endothelial E-selectin in clathrin-coated pits and lipid rafts enhances leukocyte adhesion under flow. *Blood* 111 (4), 1989–1998
- Singer A. J., Clark R. A. (1999) Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341 (10), 738–746.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 1107–1112.
- Soloman R., Gabizon A. A. (2008) Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: Focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin. Lymphoma Myeloma.* 8 (1), 21–32.
- Sonawane N. D., Szoka F. C., Verkman A. S. (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 44826–44831.
- Spragg D. D., Alford D. R., Greferath R., Larsen C. E., Lee K. D., Gurtner G. C., Cybulsky M. L., Tosi P. F., Nicolau C., Gimbrone M. A. (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8795–8800.
- Springer T. A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and lymphocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827–872.
- Sternberg B., Sorgi F. L., Huang, L. (1994) New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* 356, 361–366.
- Sudimack J. J., Guo W., Tjarks W., Lee R. J. (2002) A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochim Biophys Acta.* 1564 (1), 31–37.
- Takami S., Minami M., Nagata I., Namura S., Satho M. (2001) Chemokine receptor antagonist peptide, viral MIP-II, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1430–1435.
- Tam P., Monck M., Lee D., Ludkovski O., Leng E. C., Clow K., Stark H., Scherrer P., Graham R. W., Cullis P. R. (2000) Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy. *Gene Ther.* 7, 1867–1874.
- Templeton N. S., Lasic D. D., Frederik P. M., Strey H. H., Roberts D. D., Pavlakis G. N. (1997) Improved DNA: Liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* 15 (7), 647–652.
- Tranchant I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., Scherman D. (2004) Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J. Gene Med.* 6 Suppl. 1, S24–35.
- Tümer A., Kirby C., Senior J., Gregoriadis G. (1983) Fate of cholesterol-rich liposomes after subcutaneous injection into rats. *Biochim. Biophys. Acta* 760, 119–125.
- Unger F. M. (2001) The chemistry of oligosaccharide ligands of selectins: Significance for the development of new immunomodulatory medicines. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 57, 207–435.
- Urmoneit B. (2001) Gentherapie – Die Medizin der Zukunft. *Pharm Ztg.* 146 (7), 10–16.
- Varki A. (1997) Selectin Ligands: Will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* 99, 158–162.

- Vertut Doi A., Ishiwata H., Miyajima K. (1996) Binding and uptake of liposomes containing a poly(ethylene glycol) derivate of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: Influence of PEG content and its molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* 1278, 19–28.
- Vestweber D., Blanks J. E. (1999) Mechanism that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 79 (1), 181–213.
- von Andrian U. H., Hasslen S. R., Nelson R. D., Erlandsen S. L., Butcher E. C. (1995) A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82, 989–999.
- Wagner L., Yang O. O., Garcia-Zepeda E. A., Ge Y., Kalams S. A., Walker B. D., Pasternack M. S., Luster A. D. (1998) Beta-chemokines are released from HIV-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391, 908–911.
- Wang L., Fuster M., Sriramarao P., Esko J. D. (2005) Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nature Immunology* 6 (9), 902–910.
- Weber K. S. C., Gröne H. J., Röcken M., Klier C., Gu S., Wank R., Proudfoot A. E. I., Nelson P. J., Weber C. (2001) Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. *Eur. J. Immunol.* 31, 2458–2466.
- Weeke-Klimp A. H., Bartsch M., Morselt H. W. M., Van Veen-Hof I., Meijer D. K. F., Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. (2007) Targeting of stabilized plasmid lipid particles to hepatocytes *in vivo* by means of coupled lactoferrin. *J. Drug Targ.* Vol 15 (9), 585–594.
- Weyrich A. S., Ma X. L., Lefer D. J., Buerke M., Albertine K. H., Lefer A. M. (1993) *In vivo* neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 91, 2620–2629.
- Wheeler J. J., Palmer L., Ossanlou M., MacLachlan I., Graham R. W., Zhang Y. P., Hope M. J., Scherrer P., Cullis P. R. (1999) Stabilized plasmid lipid particles: Construction and characterization. *Gene Ther.* 6, 271–281.
- Winn R. K., Liggit D., Vedder N. B., Paulson J. C., Harla J. M. (1993) Anti-P-Selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J. Clin. Invest.* 92, 2042–2047.
- Wirth A. (2005) Untersuchung und Beeinflussung der Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen durch einen liposomalen Wirkstofftransport. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Woodle M. C. (1993) Surface-modified liposomes: Assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 249–263
- Woodle M. C., Newman M. S., Cohen J. A. (1994) Sterically stabilized liposomes: Physical and biological properties. *J. Drug. Targ.* 2, 397–403.
- Worthylake R. A., Burridge K. (2001) Leukocyte transendothelial migration: Orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (5), 569–577.
- Xu Y., Hui S. W., Frederik P., Szoka F. C. Jr. (1999) Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophys. J.* 77, 341–353.
- Xu Y., Szoka F. C. Jr. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochem.* 35, 5616–5623.
- Yan X., Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. (2005) Liposome opsonisation. *J. Lipos. Res.* 15, 109–139.
- Yang J. P., Huang L. (1996) Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther.* 3, 542–546.
- Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K., Furth E. E., Gonczol E., Wilson J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (10), 4407–4411.
- Yao L., Setiadi H., Xia L., Laszik Z., Taylor F. B., McEver R. (1999) Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* 94 (11), 3820–3828.

- Zabner J., Fasbender A. J., Moninger T., Poellinger K. A., Welsh M. J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270, 18997–19007.
- Zalipsky S. (1993) Synthesis of endgroup functionalized poly(ethylene glycol)-lipid conjugates for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjug. Chem.* 4, 296–299.
- Zelphati O., Uyechi L. S., Barron L. G., Szoka F. C. (1998) Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interaction with cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1390 (2), 119–133.
- Zhang Y. P., Sekirov L., Saravolac E. G., Wheeler J. J., Tardi P., Clow K., Leng E., Sun R., Cullis P. R., Scherrer P. (1999) Stabilized plasmid-lipid particles for regional gene therapy: Formulation and transfection properties. *Gene Ther.* 6, 1438–1447.
- Zlotnik A., Yoshie O. (2000) Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121–127.
- Zwioerek K., Kloeckner J., Wagner E., Coester C. (2005) Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J. Pharm. Sci.* 7 (4), 22–28.

## 7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

- Abbildung 1: Adhäsionskaskade
- Abbildung 2: Struktur der Selektine und ihrer Liganden [modifiziert nach Vestweber et al. (1999)]
- Abbildung 3: Struktur der Chemokine
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Modifizierungen der Liposomenoberfläche für ein optimales Drug Targeting und zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und Zielorientiertheit (aus [Molema et.al, 2001])
- Abbildung 5: Chemische Strukturen des fusogenen DOPE und des stabilisierenden mPEG-DPPE
- Abbildung 6: Chemische Strukturen des fusogenen DOPE und des pH-sensitiven CHEMS, welches nach Protonierung zur Destabilisierung der Liposomenbilayer führt
- Abbildung 7: Apparaturaufbau für die dynamischen Untersuchungen der Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Th1-Lymphozyten in den Laboren des *pharmazentrums frankfurt*
- Abbildung 8: Graphische Darstellung der Detektion des E-Selektins auf murinen Endothelzellen (bEnd3) in Abhängigkeit des Stimulus
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Antikörperposition nach Kopplung an unterschiedliche Lipid-Anker in der Liposomenbilayer
- Abbildung 10: Bindungsereignisse zwischen Liposomen und stimulierten bEnd3 in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Lipid-Ankers, des Antikörpers und der Konzentration der IL
- Abbildung 11: Einfluss der IL auf das Ausmaß der Ohrschwellung 24 Stunden nach der Applikation
- Abbildung 12: Erfolgreiches E-Selektin-Targeting *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Akkumulation der IL in entzündetem Mausohrgewebe in Abhängigkeit vom Lipid-Anker und des gekoppelten Proteins
- Abbildung 13: Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus ungekoppelten Liposomen nach 120 Minuten
- Abbildung 14: Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus unspezifisch gekoppelten Liposomen nach 120 Minuten
- Abbildung 15: Einfluss der PEG-Konzentration auf die target-sensitive Freisetzung von 6-CF aus anti-Biotin-gekoppelten Liposomen nach 120 Minuten
- Abbildung 16: Schematische Darstellung der Partikelgrößen und Anordnung der Liposomen nach Bindung an der Partikeloberfläche
- Abbildung 17: Prozentuale Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen in Abhängigkeit der Partikelgröße und des Liganden nach 120 Minuten
- Abbildung 18: Graphische Darstellung der Zunahme der Fluoreszenz durch freigesetztes 6-CF aus den Liposomen in Anwesenheit von PBS und Serum verschiedener Konzentrationen
- Abbildung 19: Prozentuale Freisetzung von 6-CF nach Kontakt der Liposomen mit Biotin-präsentierenden Partikeln und Neutralpartikeln in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung der Liposomen und der Konzentration des Serums
- Abbildung 20: Graphische Darstellung der Bindungsereignisse von target-sensitiven Liposomen an stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit der Spezifität des Liganden

- Abbildung 21: Prozentuale Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit des Liganden
- Abbildung 22: Schematische Ansicht der verwendeten Durchflussapparatur mit zwei Durchflusskammern
- Abbildung 23: Graphische Darstellung der prozentualen Freisetzung von 6-CF aus target-sensitiven Liposomen unter physiologischen Scherflussbedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit der Spezifität der Liposomen.
- Abbildung 24: Ausmaß der E-Selektin-Targetierung durch target-sensitive Liposomen in Abhängigkeit der Spezifität und des Aktivierungsstatus der Endothelzellen
- Abbildung 25: Graphische Darstellung der prozentualen Freisetzung des 6-CF aus target-sensitiven Liposomen nach Kontakt mit stimulierten Endothelzellen in Abhängigkeit des gekoppelten Liganden über einen Zeitraum von 24 Stunden
- Abbildung 26:  $\mu$ -Slide der Firma ibidi®
- Abbildung 27: Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an Endothelzellen in Abhängigkeit des Stimulus nach einstündiger Inkubation mit spezifisch und unspezifisch gekoppelten, target-sensitiven Liposomen
- Abbildung 28: Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an stimulierten Endothelzellen nach Inkubation mit vMIP-II und/oder SDF-1
- Abbildung 29: Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an Endothelzellen nach Inkubation mit spezifisch und unspezifisch gekoppelten, konventionellen SPC-Liposomen
- Abbildung 30: Graphische Darstellung des Ausmaßes des Rollings und der Adhäsion von Th1-Lymphozyten an stimulierten, SDF-behandelten Endothelzellen nach der Inkubation mit vMIP-II-gefüllten, target-sensitiven Liposomen in Abhängigkeit der Spezifität des Liganden
- Abbildung 31: Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion in Abhängigkeit der Spezifität des modifizierten SPLP nach Wheeler
- Abbildung 32: Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion mittels pH-sensitiver SPLP in Abhängigkeit der Spezifität des gekoppelten Liganden im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid
- Abbildung 33: Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion nach Inkubation mit pH-sensitiven und pH-insensitiven SPLP im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid
- Abbildung 34: Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von A2780s-Zellen nach GFP-Transfektion nach der Inkubation mit pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit des verwendeten kationischen Lipides im Vergleich zu freiem GFP-Plasmid
- Abbildung 35: Graphische Darstellung der Transfektionsraten pH-sensitiver, pH-insensitiver SPLP sowie freien GFP-Plasmides in Abhängigkeit der Konzentration sowie des kationischen Lipides
- Abbildung 36: Graphische Darstellung A) der Transfektion durch pH-sensitiven SPLP an stimulierten Endothelzellen und B) der Transfektionsraten der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des gewählten kationischen Lipides, der Spezifität des Liganden und der eingesetzten Konzentrationen der Vesikel
- Abbildung 37: Graphische Darstellung A) der Transfektion von unspezifisch gekoppelten, pH-sensitiven SPLP und B) der Transfektionsraten der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des Stimulus, des genutzten kationischen Lipides und der eingesetzten Konzentration der SPLP
- Abbildung 38: Graphische Darstellung A) der Transfektion von anti-E-Selektin-gekoppelten, pH-sensitiven SPLP und B) der Transfektionsrate der bEnd3 jeweils in Abhängigkeit des Stimulus und der eingesetzten Konzentrationen der SPLP

Abbildung 39: E-Selektin-Targetierung *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Akkumulation pH-sensitiver SPLP in entzündetem Mausohrgewebe in Abhängigkeit von der Spezifität und der Füllung der Vesikel

Abbildung 40: Transfektionsergebnisse *in vivo*: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des exprimierten GFPs im entzündeten Mausohrgewebe durch Transfektin mit pH-sensitiven SPLP in Abhängigkeit von der Spezifität und der Füllung der Vesikel im Vergleich zum gesunden Ohrgehör

### *Tabellen*

Tabelle 1: Einteilung der Chemokine und ihrer Rezeptoren [modifiziert nach Zlotnik et al. (2000) und Olsen et al. (2002)]

Tabelle 2: DNS-Quantifizierung pH-sensitiver SPLP in Abhängigkeit des kationischen Lipides

Tabelle 3: Vesikelgrößen der genutzten SPLP und Liposomen für die Transfektionsversuche an A2780s und bEnd3

## 8 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Bendas, dessen umfangreiche Betreuung, Hilfestellungen und Motivation während der gesamten Promotionszeit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H. H. Radeke vom *pharmazentrum frankfurt* für die Kooperation und die Bereitstellung des vMIP-II sowie die Möglichkeit, Untersuchungen in den Laboren des *pharmazentrums* durchführen zu können. In diesem Zusammenhang möchte ich auch den Mitarbeitern um Herrn Prof. Radeke, insbesondere Frau Dr. J. Will, für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuche danken.

Herrn Dr. Ralf Ludwig danke ich für die Durchführung der *in vivo*-Experimente in der Dermatologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, deren Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Sabine Meis der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. M. Kassack für die Bereitstellung des GFP-Plasmides und der kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  sowie die Einführungen in die Transformationstechniken.

Abschließend danke ich ganz herzlich Frau I. Mewes und Herrn D. Welle für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und Zuversicht während dieser Zeit.

## **9 Verfassungserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Bonn, August 2009



## 11 Veröffentlichungen

### *Kongressbeiträge (Vorträge)*

Ulbrich, C. (2005) Liposomal targeting to induce an extracellular site-specific drug release. 17<sup>th</sup> Mountain / Sea Liposome Workshop, Oberjoch

Ulbrich, C. (2005) Targeting of selectin-directed immunoliposomes to induce potential antiinflammatory effects. DPhG-Jahrestagung, Mainz

Ulbrich, C. (2006) Targeting of selectin-directed immunoliposomes to induce potential antiinflammatory effects. 24<sup>th</sup> Conference of the European Society for Microcirculation, Amsterdam

### *Kongressbeiträge (Poster und abstracts)*

Ulbrich, C. Ludwig R., Boehncke W. H., Radeke H. H., Bendas G. (2004) Targeting of selectin-directed immunoliposomes to induce a site-specific drug release. DPhG-Jahrestagung and Joint Meeting, Regensburg

Ulbrich, C. Ludwig R., Boehncke W. H., Radeke H. H., Bendas G. (2004) Targeting of selectin-directed immunoliposomes to induce a site-specific drug release. Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Marburg

Ulbrich, C. Ludwig R., Will J., Radeke H. H., Bendas G. (2006) Targeting of selectin-directed immunoliposomes to induce a site-specific drug release. 24<sup>th</sup> Conference of the European Society for Microcirculation, Amsterdam

