

**Lipid-basierte Transfektionssysteme für die
posttranskriptionelle Expressionshemmung von
endotheliale VCAM-1 als potentiell
antiinflammatorischer Therapieansatz**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Astrid Hartung

aus

Konstanz

Bonn, April 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Lamprecht

Tag der Promotion: 26. Juli 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas, dessen engagierte Betreuung diese Arbeit stets begleitete und entscheidend zu ihrem Gelingen beigetragen hat. Insbesondere für die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb des Arbeitskreises und die stete Bereitschaft bei Fragen und für Diskussionen möchte ich mich herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Alf Lamprecht bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Roland Kontermann sei gedankt für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Roland Kontermann und seinen Mitarbeitern danke ich des Weiteren für die gute Zusammenarbeit, die Einführung in die Postinsertionstechnik während eines Aufenthalts am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart und für das Bereitstellen der verwendeten Antikörperfragmente. Herrn Prof. Dr. Ulrich Massing und Mitarbeitern möchte ich für die Möglichkeit danken, in den Laboren der Klinik für Tumorbologie Freiburg die Duale Asymmetrische Zentrifugation zur Herstellung Nukleinsäure-haltiger Liposomen zu nutzen. Frau Dr. Anke Schiedel danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese. Ebenso danke ich Hilde Falkenstein-Paul für ihre Unterstützung bei der Plasmid-Aufreinigung. Dieter Baumann und Iris Jusen sei für die zuverlässige Versorgung mit Laborbedarf gedankt.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Kollegen der Arbeitsgruppe Bendas für das gute Miteinander während der letzten Jahre. Insbesondere Michaela Borrmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, nicht nur während der gemeinsamen Zeit im Labor. Besonderer Dank gilt auch meinen Bürokollegen Dr. Katrin Reder-Christ und Patrick Schmitz für das tagtägliche Teilen von Freud' und Leid. Dr. Dirk Simonis sei ebenso wie Dr. Anna Jacobs herzlich gedankt für ihre zuverlässige Unterstützung in allen Lebenslagen. Für das kollegiale Miteinander möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Arbeitskreises Prof. Wiese sowie den Assistenten des 1. Semesters bedanken.

Meinen lieben Freundinnen, meinen Schwestern, meinen Eltern und Uwe danke ich für ihre unermüdliche Geduld und bedingungslose Unterstützung. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	3
2.1. Das Endothel als Zielstruktur zur Therapie entzündlicher Erkrankungen	3
2.1.1. Das Endothel im Entzündungsgeschehen	3
2.1.2. Hemmung der endothelialen Leukozytenadhäsion als antiinflammatorischer Therapieansatz	9
2.1.3. Gentherapeutische Interventionen	12
2.1.4. Posttranskriptionelle Expressionshemmung von Adhäsionsrezeptoren	17
2.2. Liposomen als Endothel-spezifische Arzneistoffträger	18
2.2.1. Stellenwert einer endothelial gerichteten Therapie	18
2.2.2. Liposomen als Wirkstoffträger	19
2.2.3. Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport	25
2.2.4. Endoglin als Antigen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport	30
2.3. Lipid-basierte Transfektion	33
2.3.1. Lipoplexe	34
2.3.2. Liposomen als Gentransfersystem	37
2.3.3. Stabilized plasmid-lipid particles (SPLP)	40
3. Material und Methoden	45
3.1. Verwendete Materialien	45
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	45

3.1.2.	Chemikalien	49
3.1.3.	Lipide	52
3.1.4.	Antikörper	53
3.1.5.	Nukleinsäuren	53
3.1.6.	Puffer und Lösungen	55
3.1.7.	Software	59
3.2.	Zellkultur	60
3.2.1.	Zellkulturtechniken	60
3.2.2.	Zelllinien	61
3.3.	Herstellung Lipid-basierter Trägersysteme	62
3.3.1.	Hydratationsmethode	62
3.3.2.	Duale Asymmetrische Zentrifugation	63
3.3.3.	Detergenz-Dialyse-Methode zur Herstellung von SPLP	65
3.3.4.	Herstellung von Lipoplexen	67
3.3.5.	Bestimmung des liposomalen Nukleinsäureeinschlusses	68
3.4.	Bestimmung der Zytotoxizität von Liposomen und SPLP	69
3.5.	Transfektion	70
3.5.1.	Transfektion von Plasmid-DNA mittels Fugene [®] 6	71
3.5.2.	Transfektion von siRNA mittels HiPerFect	71
3.5.3.	Transfektion mittels Liposomen oder SPLP	72
3.6.	Durchflusszytometrische Untersuchungen	72
3.6.1.	Zelluläre Bindung und Internalisierung Lipid-basierter Partikel	72
3.6.2.	Intrazelluläre 6-CF-Freisetzung aus Liposomen	72
3.6.3.	Bestimmung der GFP-Expression bzw. der Aufnahme von 6-FAM-siRNA	73
3.6.4.	Expression von Oberflächenproteinen auf bEnd.3-Zellen	73
3.7.	Fluoreszenzmikroskopie	74
3.8.	Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen	75
3.9.	Molekularbiologische Arbeiten	77
3.9.1.	Arbeiten mit siRNA	77
3.9.2.	Arbeiten mit Plasmid-DNA	77
3.9.3.	Arbeiten mit Proteinen	79
3.10.	Statistik	80
4.	Ergebnisse und Diskussion	81
4.1.	Posttranskriptionelle Expressionshemmung von VCAM-1 als potentiell antiinflammatorischer Therapieansatz	81
4.1.1.	VCAM-1-Expression auf bEnd.3-Zellen	81

4.1.2. VCAM-1-Knockdown in bEnd.3-Zellen	83
4.1.3. Funktionelle Auswirkung des VCAM-1-Knockdowns auf die endotheliale Bindungsfähigkeit von Tumorzellen	84
4.2. Liposomale Transfektion von VCAM-siRNA	86
4.2.1. Herstellung siRNA-haltiger Liposomen	86
4.2.2. Zelluläre Aufnahme von siRNA-Liposomen	89
4.2.3. Intrazelluläre Wirkstofffreisetzung aus Liposomen	91
4.2.4. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit (liposomaler) VCAM-siRNA	93
4.3. Liposomale Transfektion von VCAM-shRNA	96
4.3.1. shRNA-basierte Expressionshemmung von endotheliale VCAM-1	96
4.3.2. Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen	97
4.3.3. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Plasmid-Liposomen	102
4.4. SPLP als Gentransfersystem	106
4.4.1. Herstellung von SPLP mittels Detergenz-Dialyse	107
4.4.2. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit SPLP	109
4.4.3. pH-sensitive SPLP	110
4.4.4. Endoglin-targetierende SPLP	115
4.4.5. VCAM-Knockdown durch SPLP-vermittelte Transfektion von VCAM-shRNA	123
 5. Zusammenfassung	 127
 A. Anhang	 129
A.1. Strukturformeln der verwendeten Lipide	129
A.2. GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	131
 Literaturverzeichnis	 133
 Publikationen	 155
 Verfassererklärung	 157

Abbildungsverzeichnis

2.1. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten.	5
2.2. Mechanismus der RNA-Interferenz.	14
2.3. Schematische Darstellung eines Liposoms als Wirkstoffträger.	20
2.4. Skizze des endosomalen Transport- und Abbauwegs.	22
2.5. Mechanismus der pH-Sensitivität am Beispiel DOPE/CHEMS.	22
2.6. Nukleophile Addition eines Thiols an Maleimid.	24
2.7. Endoglin als Hilfsprotein des TGF- β -Rezeptorkomplexes.	31
2.8. Schematisch dargestellte Lipoplex-Strukturen.	36
2.9. Schematische Darstellung der Dualen Asymmetrischen Zentrifugation.	38
2.10. Die Struktur von SPLP.	41
2.11. Modell zur SPLP-Formierung mittels Detergenz-Dialyse.	42
3.1. Schematische Darstellung der verwendeten Dialysierapparatur.	66
3.2. Umsetzung von MTT zu Formazan.	70
3.3. Schematische Zeichnung der Durchflusskammer.	76
3.4. Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen.	76
4.1. VCAM-1-Expression auf bEnd.3-Endothelzellen.	82
4.2. VCAM-1-Expression nach Stimulation mit TNF- α	82
4.3. VCAM-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-shRNA.	83
4.4. Adhäsion von B16F10-Melanomzellen an bEnd.3-Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen.	85
4.5. siRNA-Einschluss in Liposomen.	88
4.6. Zelluläre Aufnahme von siRNA-Liposomen.	90
4.7. Intrazelluläre 6-CF-Freisetzung aus pH-sensitiven Liposomen.	92
4.8. VCAM-1-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-siRNA.	92
4.9. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit siRNA-Liposomen.	94
4.10. Zytotoxizität von Liposomen.	94

4.11. VCAM-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-shRNA.	97
4.12. Plasmideinschluss in Liposomen.	98
4.13. Integrität und Funktionalität liposomal eingeschlossener Plasmide. . .	101
4.14. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Plasmid-Liposomen.	103
4.15. Plasmideinschluss in DOTAP-SPLP.	107
4.16. Integrität von SPLP-verkapselten Plasmiden.	108
4.17. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit SPLP.	109
4.18. Herstellung pH-sensitiver SPLP im Überblick.	114
4.19. Endoglin-Expression auf bEnd.3-Zellen.	116
4.20. Zelluläre Bindung von Endoglin-gerichteten Immunoliposomen. . . .	116
4.21. Zelluläre Bindung von Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP (konventionelle Funktionalisierung).	118
4.22. Herstellung von Endoglin-gerichteten SPLP mittels Postinsertionstechnik.	118
4.23. Zelluläre Bindung und Internalisierung von Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP (Funktionalisierung mittels Postinsertionsmethode). .	121
4.24. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Immuno-SPLP.	121
4.25. VCAM-Knockdown durch Transfektion mit VCAM-shRNA-haltigen SPLP.	124
4.26. Zytotoxizität von Liposomen.	124
A.1. Strukturformeln PEGylierter Lipide.	129
A.2. Strukturformeln kationischer Lipide.	129
A.3. Strukturformeln sonstiger verwendeter Lipide.	130
A.4. Plasmidisolierung mittels GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit. . .	131

Tabellenverzeichnis

2.1. siRNA vs. shRNA-kodierende Vektoren als Vermittler von RNA-Interferenz.	16
2.2. siRNA zur Expressionshemmung endothelialer Adhäsionsrezeptoren.	18
2.3. Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport.	26
2.4. Endoglin als Antigen für eine Endothel-spezifische Therapie.	32
2.5. Liposomen als Vektoren für die Transfektion von siRNA.	39
3.1. Geräte	45
3.2. Verbrauchsmaterialien	47
3.3. Chemikalien	49
3.4. Lipide	52
3.5. Antikörper/-fragmente	53
3.6. siRNA	53
3.7. Plasmide	54
4.1. Partikelgröße/-größenverteilung siRNA-haltiger Liposomen.	88
4.2. Partikelgröße/-größenverteilung Plasmid-haltiger Liposomen.	98
4.3. Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von SPLP.	108
4.4. Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen HBS.	111
4.5. Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Calciumpuffer.	111
4.6. Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Citratpuffer.	112
4.7. Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Phosphatpuffer.	113
4.8. Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von Immuno-SPLP.	119
4.9. Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von VCAM-shRNA-SPLP.	123

Abkürzungsverzeichnis

6-CF	6-Carboxyfluorescein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CHEMS	Cholesterylhemisuccinat
Chol	Cholesterol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-Chol	[N-(Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterol- chlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiD	Diocadecyltetramethylindodicarbocyaninchloro- benzensulfonat
DiO	3,3'-Diocadecyloxacarbocyaninperchlorat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoylglycerophosphoethanolamin
DOTAP	Dioleoyltrimethylammoniumpropanmesylat
DOTMA	Di-O-octadecenyltrimethylammoniumpropanchlorid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
End	Endoglin
EU	Europäische Union
Fab	fragment antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GMP	Good Manufacturing Practice
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i.v.	intravenös

ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IL	Immunoliposomen
IL-1	Interleukin-1
kbp	Kilobasenpaare
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LUV	large unilamellar vesicle
mAb	monoklonaler Antikörper
MalPEG-DSPE	Distearoylglycerophosphoethanolamin-N-[maleimid-(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium-Salz)
miRNA	micro RNA
MLV	multilamellar vesicle
mPEG-DSPE	Distearoylglycerophosphoethanolamin-N-[methoxy-(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium-Salz)
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
MW	Mittelwert
nb.	nicht bestimmt
PAP	Probenauftragpuffer
PBS	phosphate buffered saline
PEG-Cer-C ₈	N-Octanoylsphingosin{succinyl[methoxy(polyethylenglycol)2000]}
PI	Polydispersitätsindex
PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
POPC	Palmitoylolelylglycerophosphocholin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNAi	RNA-Interferenz
scFv	single chain Fragment variable
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	small hairpin RNA
sLe ^a	Sialyl-Lewis ^a
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
SPC	Soja-Phosphatidylcholin

SPLP	stabilized plasmid-lipid particle
SUV	small unilamellar vesicle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA - Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late activation antigen-4
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Ungefähr 5 – 7% der westlichen Bevölkerung erkranken im Laufe ihres Lebens an einer Autoimmunerkrankung. Dazu zählen ca. 60 verschiedene Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn. Obwohl diese durch unterschiedlichste Symptome gekennzeichnet sind, beruhen sie alle auf überschießenden Entzündungsreaktionen. Zur Therapie werden daher häufig antiinflammatorische Wirkstoffe eingesetzt. Eine langfristige Therapie mit klassischen Entzündungshemmern wie nichtsteroidalen Antirheumatika oder Kortikosteroiden ist jedoch aufgrund der unspezifischen Wirkungsweise häufig von Therapie-limitierenden Nebenwirkungen begleitet. Daher besteht die Notwendigkeit neuer antiinflammatorischer Therapeutika, die selektiver angreifen und somit nebenwirkungsärmer sind.

Entzündungen gehen mit der Rekrutierung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe einher. Die Extravasation zirkulierender Blutzellen erfolgt über eine komplexe Kaskade von Adhäsionsereignissen, die sogenannte Leukozyten-Adhäsionskaskade. Dabei spielt das vaskuläre Endothel eine zentrale Rolle: Aktivierte Endothelzellen exprimieren verschiedene Adhäsionsrezeptoren, die die Anhaftung der Leukozyten an die Gefäßwand vermitteln und eine nachfolgende Transmigration ermöglichen. Daher stellt die Ausschaltung endothelialer Adhäsionsrezeptoren einen vielversprechenden antiinflammatorischen Ansatz dar. Eine Möglichkeit dazu bietet die posttranskriptionelle Expressionshemmung mittels RNA-Interferenz.

Um die RNA-Interferenz therapeutisch zu nutzen, müssen spezifische siRNA in die Zielzellen eingebracht werden. Dabei stellt ein effizienter Gentransfer die größte Hürde dar. Aufgrund ihres guten Transfektionspotentials werden in der klinischen Praxis zumeist virale Vektoren eingesetzt. Diese bergen allerdings das Risiko von Immunreaktionen oder der Rekombination zu neuen pathogenen Spezies. Unter den nicht-viralen Gentransfersystemen finden insbesondere Lipid-basierte Vehikel Beachtung. Deren Vorteile liegen in der guten Verträglichkeit und sicheren Anwendbarkeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte die posttranskriptionelle Genstilllegung des endothelialen Adhäsionsrezeptors *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) als antiinflammatorischer Therapieansatz untersucht werden. Dazu wurde zunächst die

Auswirkung eines VCAM-1-Knockdowns in aktivierten Endothelzellen auf deren Fähigkeit zur Vermittlung von Zell-Zell-Wechselwirkungen analysiert. Den Schwerpunkt der Arbeit bildete die anschließende Suche nach einem zur Transfektion von Endothelzellen geeigneten Gentransfersystem. Mit Hinblick auf eine perspektivische *in vivo*-Anwendung wurden sterisch stabilisierte Liposomen sowie *stabilized plasmid-lipid particles* (SPLP) als Lipid-basierte siRNA- bzw. shRNA-Trägersysteme ausgewählt und hinsichtlich ihres Potentials zur Vermittlung eines VCAM-1-Knockdowns charakterisiert. Zur Verbesserung des Transfektionsvermögens sollten weiterhin verschiedene Modifikationen an den Partikeln vorgenommen werden: Durch Ausstattung mit einer pH-sensitiven Lipidhülle sollte die intrazelluläre Nukleinsäurefreisetzung gefördert werden. Die Kopplung eines Endothel-spezifischen Liganden (Endoglin-gerichtetes Antikörperfragment) sollte die Aufnahme der Nukleinsäure in die Zelle erleichtern und diene gleichzeitig einer zielgerichteten vaskulären Therapie.

2. Theoretischer Teil

2.1. Das Endothel als Zielstruktur zur Therapie entzündlicher Erkrankungen

2.1.1. Das Endothel im Entzündungsgeschehen

Neben seiner offensichtlichen Funktion in der Kontrolle des Stoffaustauschs zwischen Blutbahn und angrenzendem Gewebe übt das vaskuläre Endothel weitaus vielfältigere Aufgaben aus. So spielt es eine zentrale Rolle bei der Blutdruckregulation, Aufrechterhaltung der Hämostase, Wundheilung, Angiogenese sowie bei Entzündungsreaktionen und der Immunantwort [1]. Auf die beiden zuletzt genannten Funktionen soll in diesem Abschnitt näher eingegangen werden.

Akute Entzündungen sind gekennzeichnet durch die klassischen Symptome Rubor, Dolor, Tumor, Calor und Functio laesa, an deren Ausbildung das Endothel maßgeblich beteiligt ist. Durch Mediatoren wie Histamin oder Thrombin werden ruhende Endothelzellen in einen aktivierten Zustand überführt, der proliferative, prothrombotische sowie proinflammatorische Wirkungen zeigt. Im Rahmen der zellulären Immunabwehr ist das aktivierte Endothel essentiell für die Rekrutierung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe: Stimuliert durch Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1) exprimieren Endothelzellen venöser Blutgefäße nahe des Entzündungsherds eine Reihe proinflammatorischer Chemokine und Rezeptoren, die eine Anhaftung zirkulierender Leukozyten an das Endothel und eine anschließende Extravasation in das Gewebe vermitteln. Dies geschieht in einer hochkomplexen und bis heute nicht vollständig verstandenen Abfolge verschiedener Bindungs- und Migrationsereignisse, der sogenannten *Adhäsionskaskade der Leukozyten* (s. Abbildung 2.1): Die initiale Kontaktaufnahme (*Tethering*) ist durch eine schnelle Assoziation und Dissoziation gekennzeichnet, die zu einer sprunghaften Fortbewegung der Leukozyten entlang der Gefäßwand führt. Diese geht unter Geschwindigkeitsverlust in eine charakteristische Rollbewegung über, die als *Leukozytenrollen* bezeichnet wird. Infolge des intensivierten Zell-Zellkontakts werden über eine komplexe Signalkaskade weitere Adhäsionsmoleküle auf der Leukozytenoberfläche aktiviert, so dass eine *feste*

Bindung der Immunzellen an das Endothel stattfinden kann. Sie ist die Voraussetzung für die anschließende Transmigration in das entzündete Gewebe. Die an der Leukozytenadhäsion beteiligten endothelialen bzw. leukozytären Oberflächenrezeptoren lassen sich im Wesentlichen drei verschiedenen Proteinfamilien zuordnen, die im Folgenden näher vorgestellt werden sollen: den Selektinen, den Integrinen und der Immunglobulin-Superfamilie.

Die *Selektine* dienen der Vermittlung des *Tetherings* und des Zellrollens und sind sowohl auf Endothelzellen wie auch auf Leukozyten zu finden. Zur Familie der Selektine gehören drei Vertreter, denen u.a. eine N-terminale extrazelluläre Lektindomäne gemeinsam ist [2]. Über diese binden Selektine hochselektiv an Kohlenhydratstrukturen glykosylierter Lipide oder Mucin-artiger Glykoproteine. Dabei gelten das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (sLe^x) sowie sein Positionsisomer Sialyl-Lewis^a (sLe^a) als kleinste Bindungseinheiten [3, 4]. Als am besten charakterisierter Selektin-Ligand ist *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) zu nennen, welcher besonders auf Leukozyten, aber auch auf bestimmten Endothelzellen und in geringem Ausmaß auf Thrombozyten exprimiert wird [5, 6] und Affinität zu allen drei Selektinen zeigt [7]. Entsprechend ihrer zellspezifischen Lokalisation werden die Selektine in E-Selektin (Endothel), L-Selektin (Leukozyten) und P-Selektin (Plättchen) unterschieden, wobei letzteres auch auf aktiviertem Endothel nachgewiesen werden kann [8]. Die Ausbildung von E-Selektin (CD62E, ELAM-1) sowie P-Selektin (CD62P, PADGEM) auf der endothelialen Zellmembran erfolgt nach Stimulation der Zellen durch Lipopolysaccharide oder die Zytokine TNF- α bzw. IL-1 [8, 9]. Im Gegensatz dazu findet sich L-Selektin (CD62L, LECAM-1) konstitutiv auf fast allen Leukozyten-Subtypen [10].

Obwohl die auf Leukozyten exprimierten *Integrine* auch an initialen Bindungsereignissen beteiligt sein können [24], liegt ihre Hauptaufgabe in der Vermittlung der festen Adhäsion von Blutzellen an das aktivierte Endothel. Integrine stellen im menschlichen Organismus die größte Klasse der Adhäsionsmoleküle dar. Sie finden sich in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben und übernehmen dort etliche Bindungsfunktionen [25, 26]. Jedes Integrin besteht aus einer nicht-kovalent verknüpften α - und β -Untereinheit, von denen jeweils zahlreiche Subtypen bekannt sind. Für die Leukozytenadhäsion besonders relevant sind Vertreter der β_2 -Unterfamilie wie z.B. *lymphocyte function associated antigen-1* (LFA-1, CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$), sowie die α_4 -Integrine *very late activation antigen-4* (VLA-4, CD49d/CD29, $\alpha_4\beta_1$) und $\alpha_4\beta_7$ [27]. Sie werden häufig konstitutiv auf der Leukozytenoberfläche exprimiert, müssen aber für eine volle Funktionsfähigkeit zunächst aktiviert werden. Dies geschieht während des Leukozytenrollens durch Chemokine, die exponiert auf Endothelzellen oder frei im Lumen aktivierter Gefäße vorliegen [28]. Man kennt etwa 50 verschiedene

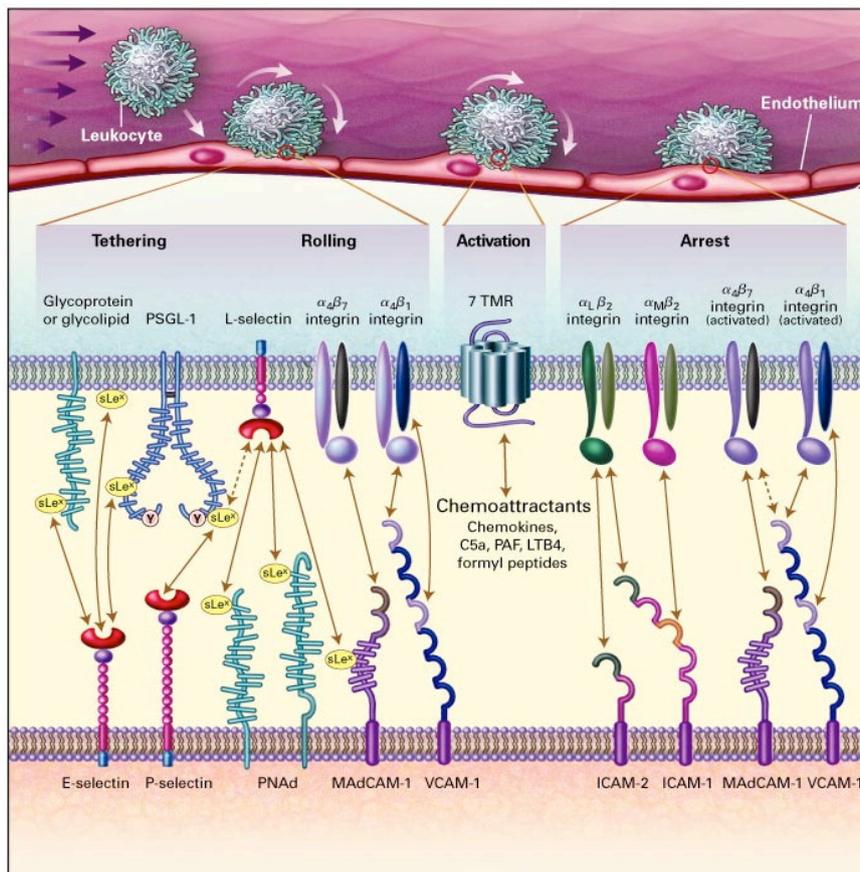


Abb. 2.1.: Die Adhäsionskaskade der Leukozyten. Im oberen Teil der Abbildung sind die vier elementaren Phasen der Leukozytenadhäsionskaskade dargestellt. Darunter sind die an den einzelnen Schritten beteiligten Rezeptoren sowohl auf leukozytärer (oben) als auch auf endothelialer Seite (unten) sowie deren mögliche Wechselwirkungen (Pfeile) gezeigt.

Das initiale Leukozyten-*Tethering* wird primär durch L- und P-Selektin vermittelt, die an sLe^x-Epitope glykosylierter Lipide oder Proteine binden. Beide Selektine wechselwirken u.a. mit leukozytärem *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1). Zirkulierende Leukozyten können daher nicht nur mit dem Endothel interagieren, sondern L-Selektin-vermittelt auch an bereits gebundene Leukozyten anhaften (gestrichelter Pfeil). Dies führt zum sogenannten *secondary tethering*. L-Selektin bindet außerdem an Glykoproteine in hochendothelialen Venolen, die als *peripheral lymph node addressin* (PNAd) bezeichnet werden und dem Leukozyten-*homing* dienen. E-Selektin erkennt ebenfalls sLe^x-Strukturen, ist aber wie die α₄-Integrine hauptsächlich für die Reduktion der Leukozytenrollgeschwindigkeit zuständig. Die Aktivierung der rollenden Leukozyten erfolgt G-Protein-vermittelt über transmembranäre Rezeptoren (7 TMR). Durch Bindung von Liganden wie Chemokine, Komplementfaktor C5, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Leukotrien B4 (LTB₄) oder Formylpeptide wird eine Konformationsänderung der Integrine ausgelöst. Diese können nun an Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (*mucosal addressin-cell adhesion molecule type 1* (MAdCAM-1), *vascular-cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule 1* und *2* (ICAM-1, ICAM-2)) binden und damit eine feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel bewirken. (Abbildung aus [11].)

VCAM-1 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106) ist ein 110 kDa großes transmembranäres Glykoprotein, welches aufgrund seiner Ig-Domänen der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet wird. Seine Expression auf Endothelzellen erfolgt nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-4 oder INF- γ [12]. Daher findet sich VCAM-1 auf dem vaskulären Endothel im Bereich von Entzündungen oder Tumoren, aber nicht im Gefäßsystem gesunder Gewebe [13, 14]. Allerdings konnte VCAM-1 auch auf anderen Zellarten wie dendritischen Zellen in lymphoiden Geweben, Epithelzellen der Niere oder Kupfferzellen in der Leber nachgewiesen werden [13].

Als Adhäsionsrezeptor vermittelt VCAM-1 Zell-Zell-Wechselwirkungen und ist an der Leukozytenrekrutierung im Rahmen von Entzündungsgeschehen beteiligt (s. Kapitel 2.1.1). Dazu bindet es neben VLA-4 weitere leukozytäre Integrine wie $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$ und $\alpha_M\beta_2$ [15–18].

VCAM-1 kann als Molekül mit sechs (6d-VCAM-1) oder sieben Ig-Domänen (7d-VCAM-1) vorliegen. Beide Formen werden durch dasselbe Gen kodiert und entstehen durch alternatives Spleißen [19]. Im Gegensatz zu 6d-VCAM-1 besitzt 7d-VCAM-1 zusätzlich zur Integrinbindungsstelle am N-terminalen Ende eine zweite – weniger affine – Integrinbindungsstelle [18].

Außer einer transmembranären ist für VCAM-1 auch eine lösliche Form beschrieben [20]. Diese wird aus dem membranständigen Molekül durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne nahe der Oberfläche freigesetzt. Obwohl die physiologische Bedeutung des als *shedding* bezeichneten Prozesses nicht eindeutig geklärt ist, wird eine regulatorische Funktion angenommen: Durch Abnahme der endothelialen Rezeptordichte werden die adhäsiven Eigenschaften des aktivierten Endothels verringert, gleichzeitig kann lösliches VCAM-1 die Bindung von leukozytären Integrinen an membranständiges VCAM-1 kompetitiv verhindern [20]. So kann das Ausmaß der Leukozytenrekrutierung kontrolliert werden. Da viele Erkrankungen mit einer erhöhten Konzentration an löslichem VCAM-1 einhergehen [21], kann diese als diagnostischer oder prognostischer Marker herangezogen werden [22, 23].

Chemokine, die je nach Anzahl der Aminosäuren zwischen zwei N-terminalen Cysteinresten in vier Unterfamilien eingeteilt und als CC-, CXC-, CX3C- oder C-Chemokine bezeichnet werden [29]. Durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Leukozyten-Oberfläche induzieren Chemokine eine intrazelluläre Signalkaskade, die eine Konformationsänderung der leukozytären Integrine bewirkt und dadurch deren Affinität zu den entsprechenden Liganden auf der Endothelseite erhöht. Der Mechanismus der Integrin-Aktivierung wird daher auch als *inside-out signalling* bezeichnet [30].

Die auf dem Endothel exprimierten Integrinliganden gehören zur *Superfamilie der Immunglobuline*. Diese vereint 765 Proteine, die eine oder mehrere homologe Ig-Einheiten aufweisen [31]. Davon sind allerdings nur folgende Mitglieder an der Diapedese beteiligt [32]: *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1, CD106), *mucosal addressin-cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1), *platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) sowie die Unterfamilien der *intercellular adhesion molecules* (ICAM) und *junctional adhesion molecules* (JAM). Da VCAM-1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine besondere Stellung einnahm, wird dieses auf S. 6 näher vorgestellt.

Die einzelnen Schritte der Leukozytenadhäsionskaskade werden jeweils durch ausgewählte Moleküle einer Vielzahl verschiedener Adhäsionsrezeptoren und Chemokine vermittelt. Durch die spezifische Rezeptorausstattung der unterschiedlichen Leukozytensubtypen und einem gewebe- und/oder situationsabhängigen Expressionsmuster des Endothels kann so eine selektive Anreicherung bestimmter Leukozytenpopulationen im Zielgewebe erreicht werden [27].

Die Rolle des Endothels bei chronisch entzündlichen Erkrankungen und der hämatogenen Metastasierung

Chronisch entzündliche Erkrankungen beruhen auf unkontrollierten, überschießenden Reaktionen des Immunsystems. Obwohl sie sich systemisch manifestieren können, sind sie zumeist auf ein spezifisches Zielorgan oder eine Gewebekomponente beschränkt und können somit zu sehr unterschiedlichen Krankheitssymptomen führen. Als Beispiele seien hier Haut (Psoriasis), Gelenke (rheumatoide Arthritis), Magen-Darm-Trakt (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) oder zentrales Nervensystem (Multiple Sklerose) genannt. Inzwischen kennt man über 60 Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einer fehlgesteuerten Entzündungsreaktion gebracht werden [33]. Als Ursache werden neben genetischer Disposition Umwelteinflüsse diskutiert, die auf die Lebensweise in westlichen Industrieländern zurückzuführen sind und dort eine

rasant ansteigende Inzidenz und Prävalenz zur Folge haben [34].

Wie eingangs beschrieben, trägt die Aktivierung des Endothels und die nachfolgende Leukozytenakkumulation im Gewebe wesentlich zur Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von akuten Entzündungen bei. Diese Prozesse spielen auch in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen eine Rolle. Im Folgenden soll die Beteiligung endothelialer Adhäsionsrezeptoren an ausgewählten Erkrankungen demonstriert werden:

Im Mittelpunkt der Erforschung von *Morbus Crohn* steht die Überexpression von MAdCAM-1 [35, 36], welches der Einwanderung von Lymphozyten in Darmassoziierte lymphoide Organe und Gewebe dient und exklusiv in mesenterialen Lymphknoten und auf Venolen in Peyerschen Plaques lokalisiert ist [37]. Des Weiteren werden erhöhte ICAM-1/2- sowie E-Selektin-Level in der entzündeten Ileum-Mukosa von Morbus Crohn-Patienten gefunden [35, 38].

Bei Patienten mit *Psoriasis* ist eine verstärkte endotheliale Expression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 in betroffenen Hautbereichen beschrieben, während in gesunden Hautarealen keine oder nur geringe Mengen der genannten Adhäsionsrezeptoren gefunden werden [39].

Auch die Ausbildung einer *rheumatoiden Arthritis*, bei der Zellen des Immunsystems in Gelenkkapseln rekrutiert werden und dort eine Wucherung der Synovialmembran mit anschließender Zerstörung des Knorpels verursachen, ist mit einer Aktivierung des Endothels verbunden: Zahlreiche Studien belegen die erhöhte Expression von P- und E-Selektin sowie VCAM-1, ICAM-1/2/3 und PECAM-1 im Gefäßsystem entzündeter Gelenke [40–43].

Eine massive Einwanderung von Leukozyten in das zentrale Nervensystem mit anschließender Schädigung von Nervenzellen und -fasern kennzeichnet neuroinflammatorische Erkrankungen wie *Multiple Sklerose* [44, 45]. So werden bei Multipler Sklerose (MS) bzw. bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) als entsprechendem Tiermodell erhöhte Expressionslevel von E- und P-Selektin im Mikrogefäßsystem des ZNS gefunden [46, 47]. Weitere Studien belegen neben einer vermehrten VCAM-1-Expression auch erhöhte ICAM-1-Level im Bereich aktiver Läsionen im Vergleich zu histologisch unauffälligen Hirnarealen bei MS-Patienten oder Gesunden [48–50]. Des Weiteren wurde kürzlich eine Beteiligung von *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM, CD166) [51] an der Ausbildung neuroinflammatorischer Erkrankungen gezeigt: Die Blockade von ALCAM, das in aktivierten Endothelzellen der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden kann [50, 52], bewirkt eine eingeschränkte Transmigration bestimmter Leukozyten über die Blut-Hirnschranke *in vitro* und *in vivo* und vermindert das Ausmaß einer EAE im Tiermodell [52].

Auch die angiogenetische Aktivität des Endothels spielt bei der Aufrechterhaltung pathologischer Entzündungen eine Rolle. Diese dient der Deckung des erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarfs am Ort der Entzündung. So ist die Neubildung von Blutgefäßen für eine Reihe entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis und entzündlichen Darmerkrankungen dokumentiert [53–55].

An dieser Stelle soll kurz die Bedeutung des Endothels für das Wachstum und die Metastasenbildung von Tumoren erläutert werden. Es ist bekannt, dass Tumore ab einer Größe von 1 – 2 mm³ auf die Neubildung von Blutgefäßen angewiesen sind, um ihre Versorgung zu sichern [56]. Dazu sekretieren Tumorzellen Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), die nach Bindung an entsprechende Rezeptoren auf dem vaskulären Endothel dieses zur Angiogenese anregen [57].

Weiterhin ist das Endothel in die sogenannte *hämatogene Metastasierung* involviert. Hierbei lösen sich einzelne Zellen des Primärtumors ab, durchwandern die extrazelluläre Matrix und gelangen in das Blutgefäßsystem, über das sie sich im Körper verteilen. Um eine Metastase auszubilden, muss die Tumorzelle an anderer Stelle mit dem Gefäßendothel in Wechselwirkung treten, dieses überwinden und in das umgebende Gewebe eintreten. Zahlreiche Mechanismen sind an diesem komplexen Prozess beteiligt. Interaktionen zwischen Adhäsionsrezeptoren und ihren Liganden scheinen insbesondere bei der Extravasation eine zentrale Rolle zu spielen. Zum Beispiel exprimieren Tumorzellen vermehrt sLe^x-/sLe^a-haltige Oberflächenstrukturen, die sie zu Wechselwirkungen mit Selektinen auf dem vaskulären Endothel befähigen [58, 59]. Insbesondere auf malignen Melanomzellen ist häufig VLA-4 nachweisbar. Dies wird mit einem erhöhten Metastasierungspotential dieser Zellen in Zusammenhang gebracht [60, 61]. Gleichzeitig können zirkulierende Tumorzellen Endothelzellen aktiv oder passiv stimulieren, so dass die Rezeptorexpression auf der Endothelzelloberfläche angestoßen wird [62, 63].

Die ähnlichen zugrundeliegenden Mechanismen der Metastasierung sowie der Diapedese führen dazu, dass die Erforschung von Tumorerkrankungen und möglicher Therapieansätze im engen Zusammenhang mit der Untersuchung von Entzündungsprozessen steht.

2.1.2. Hemmung der endothelialen Leukozytenadhäsion als antiinflammatorischer Therapieansatz

Das in den letzten Jahren hinzugewonnene Verständnis der Diapedese eröffnet die Möglichkeit, diese als neuartigen Ansatzpunkt zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen zu nutzen. Wie in Kapitel 2.1.1 erläutert, bilden Interaktionen zwischen

Immunzellen und aktiviertem Endothel die Grundlage für die Leukozytenextravasation, so dass deren Durchbrechung eine spezifische und effektive antiinflammatorische Wirkung zeigen sollte. Bei der Leukozytenadhäsion handelt es sich um einen kaskadenartig ablaufenden Prozess, bei dem einzelne Rezeptor-Ligand-Bindungen nacheinander zum Tragen kommen. Hierbei ist die erfolgreiche Ausbildung einer Wechselwirkung jeweils Voraussetzung für den nächsten Schritt der Kaskade, so dass die gezielte Blockade einer einzelnen Interaktion ausreichen kann, um die Diapedese eines Leukozyten zu verhindern [64]. Häufig sind allerdings mehrere Leukozytensubtypen an der Ausbildung entzündlicher Erkrankungen beteiligt, deren Transmigration durch verschiedene Signalwege gesteuert wird. Daher kann eine kombinierte Blockade mehrerer involvierter Signalmoleküle für einen ausreichenden Effekt nötig sein [65]. Bei einem Eingriff in die Leukozytenmigration muss eine Balance zwischen ausreichender Spezifität und Wirksamkeit gefunden werden: Wenn ein Wirkstoff zu selektiv angreift, kann ein unzureichender Therapieerfolg die Folge sein. Ist sein Wirkspektrum zu breit, muss mit Nebenwirkungen wie starker Infektanfälligkeit aufgrund einer generalisierten Immunsuppression gerechnet werden [66].

Zur Unterbindung der Leukozytenadhäsion gibt es mehrere mögliche Angriffspunkte, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: Selektine und ihre Liganden, Chemokine und Chemokinrezeptoren sowie Integrine und ihre Bindungspartner der Ig-Superfamilie. Dabei sind verschiedene Eingriffe auf funktioneller oder Expressions-ebene denkbar:

- **Kompetitive bzw. allosterische Rezeptorblockade** – Zur Blockade von Oberflächenrezeptoren werden neben monoklonalen Antikörpern, Peptiden, Polysacchariden oder Aptameren auch niedermolekulare Arzneistoffe (*small molecules*) entwickelt. Letztere haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu den erstgenannten häufig oral applizierbar sind und kaum Immunogenität aufweisen.
- **Hemmung der Rezeptoraktivierung** – Um ihre volle Funktion ausüben zu können, müssen Integrine im Laufe der Adhäsionskaskade aktiviert werden. Dies geschieht nach Bindung von Chemokinen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren via *inside-out signalling* (s. Kapitel 2.1.1). Daher können entweder Chemokin- bzw. Chemokinrezeptorantagonisten eingesetzt oder ein Eingriff in die intrazelluläre Signalkaskade zur Integrinaktivierung vorgenommen werden, um eine Integrin-Aktivierung zu verhindern [67, 68].
- **Expressionshemmung durch Neutralisation proinflammatorischer Zytokine** – Viele neu zugelassene entzündungshemmende Arzneistoffe bzw.

aussichtsreiche Kandidaten in der klinischen Prüfung sind Antikörper gegen Zytokine wie TNF- α oder Interleukine [69]. Durch Ligandneutralisation unterbinden sie deren proinflammatorische Wirkung, so dass die endotheliale Stimulation und somit die Expression von Adhäsionsmolekülen ausbleibt.

- **Expressionshemmung durch Eingriff auf transkriptionaler Ebene** – Die Inhibierung nukleärer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B kann die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle verhindern. Auf diesem Mechanismus beruht u.a. die antiinflammatorische Wirkung von Kortikosteroiden [70, 71].
- **Expressionshemmung durch Eingriff auf posttranskriptionaler Ebene** – Durch Transfektion von Endothelzellen mit komplementärer Antisense-RNA oder siRNA kann die Translation Adhäsionsmolekül-kodierender mRNA gehemmt werden (s. Kapitel 2.1.3).
- **Expressionshemmung durch Eingriff auf posttranslationaler Ebene** – Intrazelluläre Antikörper, sogenannte *intrabodies*, können intrazellulär Proteine wie Adhäsionsmoleküle binden und so deren Expression auf der Zelloberfläche verhindern [72, 73].
- **Hemmung postrationaler Modifikationen** – Selektinliganden wie PSGL-1 sind Glykoproteine, deren Bindungsfähigkeit von einer korrekten posttranslationalen Glykosylierung abhängt [74]. Die Hemmung entsprechender Glykosyltransferasen kann somit zu gestörten Selektin-Ligand-Interaktionen führen.

Mit der erfolgreichen Markteinführung der beiden Antikörper-basierten Arzneistoffe Natalizumab (Tysabri[®]) und Efalizumab (Raptiva[®]) im Jahr 2004 fand das Konzept der Migrationsinhibierung zur Therapie entzündlicher Erkrankungen erstmals Eingang in die klinische Praxis. Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen α_4 -Integrin zur Behandlung hochaktiver, schubförmig verlaufender Multipler Sklerose bei bestimmten Patientengruppen. Während Natalizumab in den USA auch zur Therapie von Morbus Crohn zugelassen wurde, lehnte die Europäische Arzneimittelagentur eine entsprechende Indikationserweiterung wegen unzureichender Datenlage bezüglich der Wirksamkeit ab [75]. Efalizumab erhielt eine EU-weite Zulassung zur Behandlung bestimmter Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ. Der monoklonale Antikörper entfaltet seine entzündungshemmende Wirkung durch selektive Blockade der CD11a-Untereinheit

von LFA-1. Jedoch wurde unter beiden Therapien das Auftreten progressiver multifokaler Leukenzephalopathien (PML) beobachtet [76, 77]. Diese schwerwiegende opportunistische Virusinfektion des Gehirns, die durch das JC-Virus bei Patienten mit Immunschwäche ausgelöst wird, verläuft oft tödlich oder verursacht schwere bleibende Schäden. Dies führte bei beiden Medikamenten zu einem Widerruf der Marktzulassung. Infolge einer positiven Nutzen-Risiko-Abwägung wurde Natalizumab jedoch unter erhöhten Sicherheitsauflagen im Frühjahr 2006 erneut zugelassen [78].

Beide Arzneimittel sind Beispiele für den möglichen Einsatz von Migrationsinhibitoren als antiinflammatorische Therapeutika. Sie machen aber gleichzeitig deutlich, dass es der Erforschung neuer Substanzen bedarf, die spezifischer wirken und somit nebenwirkungsärmer sind. Obwohl nach einigen Misserfolgen die anfängliche Euphorie abgeflaut ist, stehen die Chancen auf neue potente Wirkstoffe gut: Seit der Entwicklung von Migrationsinhibitoren der ersten Generation wurden viele Erkenntnisse über Strukturen, Funktionen und die Regulierung von Adhäsionsmolekülen in Physiologie und Pathophysiologie hinzugewonnen, die in die Synthese neuer Substanzen einbezogen werden können. Für einen Überblick über den derzeitigen Stand der Entwicklung, Fortschritte und zu überwindende Schwierigkeiten wird auf aktuelle Übersichtsartikel zu Selektininhibitoren [79], Chemokin-/Chemokinrezeptorinhibitoren [67, 80, 81], Integrininhibitoren [82] und therapeutischen Antikörpern bei Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen [69] verwiesen.

2.1.3. Gentherapeutische Interventionen

Unter Gentherapie versteht man die gezielte Einführung von Genen in Zellen von Patienten mit dem Ziel der Heilung oder dem Rückgang klinischer Symptome. Die besondere Bedeutung der Gentherapie ergibt sich daraus, dass es sich hierbei um eine echte Kausaltherapie handeln kann. Bei gentherapeutischen Eingriffen ist zwischen der Manipulation somatischer Zellen („somatische Gentherapie“) oder Zellen der Keimbahn zu unterscheiden. Medizinisch gesehen ist beides möglich, wobei letzteres aus ethischen Gründen in Deutschland gesetzlich verboten ist (Embryonenschutzgesetz - ESchG § 5).

Seit der ersten klinischen Studie im Jahr 1989 sind mehr als 1500 gentherapeutische Studien weltweit initiiert worden. Diese haben in der Mehrzahl die Therapie von Tumoren zum Ziel [83]. Dennoch fand die Gentherapie in den westlichen Ländern bisher keinen Eingang in die ärztliche Praxis. In China dagegen sind bereits seit 2003 bzw. 2005 die beiden adenoviralen Krebsmedikamente Gendicine[®] und H101 auf dem Markt und seitdem mehrere tausend Male angewendet worden [84]. Allerdings kriti-

siert die Deutsche Gesellschaft für Gentherapie e. V., dass nur wenig Studiendetails und Informationen zur Therapiemethodik öffentlich zugänglich sind [85].

Die größte Hürde für eine effiziente und sichere Gentherapie stellen heute die noch nicht ausgereiften Gentransfersysteme dar. Aufgrund ihrer überlegenen Effizienz sind die in klinischen Studien verwendeten Genvektoren hauptsächlich virale Vektoren [83]. Diese bergen neben einer möglichen Immunogenität insbesondere die Gefahr einer Rekombination und damit einer möglichen Entstehung neuer pathogener Spezies.

Nach Art der Therapiestrategie unterscheidet man zwischen

- **Substitutionstherapie** – Ersatz oder Korrektur fehlerhafter oder fehlender Genfunktionen bei monogenetischen Erberkrankungen,
- **Additionstherapie** – Verstärkung physiologischer Genfunktionen, z.B. zur Immunabwehr bei Infektionskrankheiten und Krebs,
- **Suppressionstherapie** – Ausschaltung pathogener Genaktivitäten.

Eine Suppressionstherapie kann insbesondere über die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden oder *small interfering RNAs* (siRNA) erfolgen. Hierbei handelt es sich um regulatorisch auf die Genexpression einwirkende Nukleinsäuren und strenggenommen nicht um Gene. Da jedoch auch die Möglichkeit besteht, regulatorische Nukleinsäuren künstlich auf Genen zu kodieren, sind die Übergänge zur Gentherapie im engeren Sinne fließend.

Antisense-Oligonukleotide sind kurzkettige einzelsträngige Nukleinsäuren von definierter Basenabfolge, die synthetisch hergestellt werden. Nach Einbringen in die Zelle binden Antisense-Oligonukleotide über komplementäre Basenpaarung an die *messenger RNA* (mRNA) eines Zielproteins. Aufgrund der sequenzspezifischen Bindung (Watson-Crick-Basenpaarung) kommt es zu einer gezielten Hemmung der Translation des Zielproteins. Mit Fomivirsen (Vitravene[®]), einem zwanzig Basen langen Oligonukleotid zur Behandlung Virustatika-refraktärer Cytomegalie-Virus (CMV)-Retinitis bei AIDS-Patienten, wurde 1998 das erste therapeutische Antisense-Oligonukleotid von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [90]. 1999 folgte die Markteinführung in der Europäischen Union, die allerdings drei Jahre später aus kommerziellen Gründen durch den Hersteller Novartis zurückgezogen wurde [91].

Bei *siRNA* handelt es sich um synthetische doppelsträngige RNA aus 21 – 25 Basenpaaren. Diese ist der natürlich vorkommenden *micro RNA* (miRNA) nachempfunden. Die Ausschaltung von Genen erfolgt dabei jeweils durch sogenannte *RNA-Interferenz* (RNAi), für deren Beschreibung die US-Amerikaner Andrew Z. Fire und Craig C.

Abb. 2.2.: Mechanismus der RNA-Interferenz. Verschiedene kleine RNA-Moleküle, die sich in ihrem Ursprung und ihrer Wirkungsweise voneinander unterscheiden, sind zur RNA-Interferenz befähigt [86, 87].

miRNA entsteht in einem mehrstufigen Prozess aus endogenen Vorläufermolekülen. Dabei wird zunächst genomische DNA durch die *RNA-Polymerase II* (Pol II) in sogenannte *primary miRNA* (pri-miRNA) transkribiert. Diese wird noch im Zellkern unter Beteiligung der RNase *Drosha* in ca. 65 – 70 Basenpaare lange *precursor RNA* (pre-miRNA) mit charakteristischer Haarnadelstruktur gespalten. Mithilfe des Transportproteins *Exportin-5* gelangt die pre-miRNA ins Zytoplasma. Dort findet eine erneute Spaltung durch die RNase *Dicer* im Zusammenspiel mit weiteren Enzymen statt. Als Resultat entsteht doppelsträngige miRNA aus 21-25 Basenpaaren, die an beiden 3'-Enden einen Überhang aus zwei Nukleotiden aufweist.

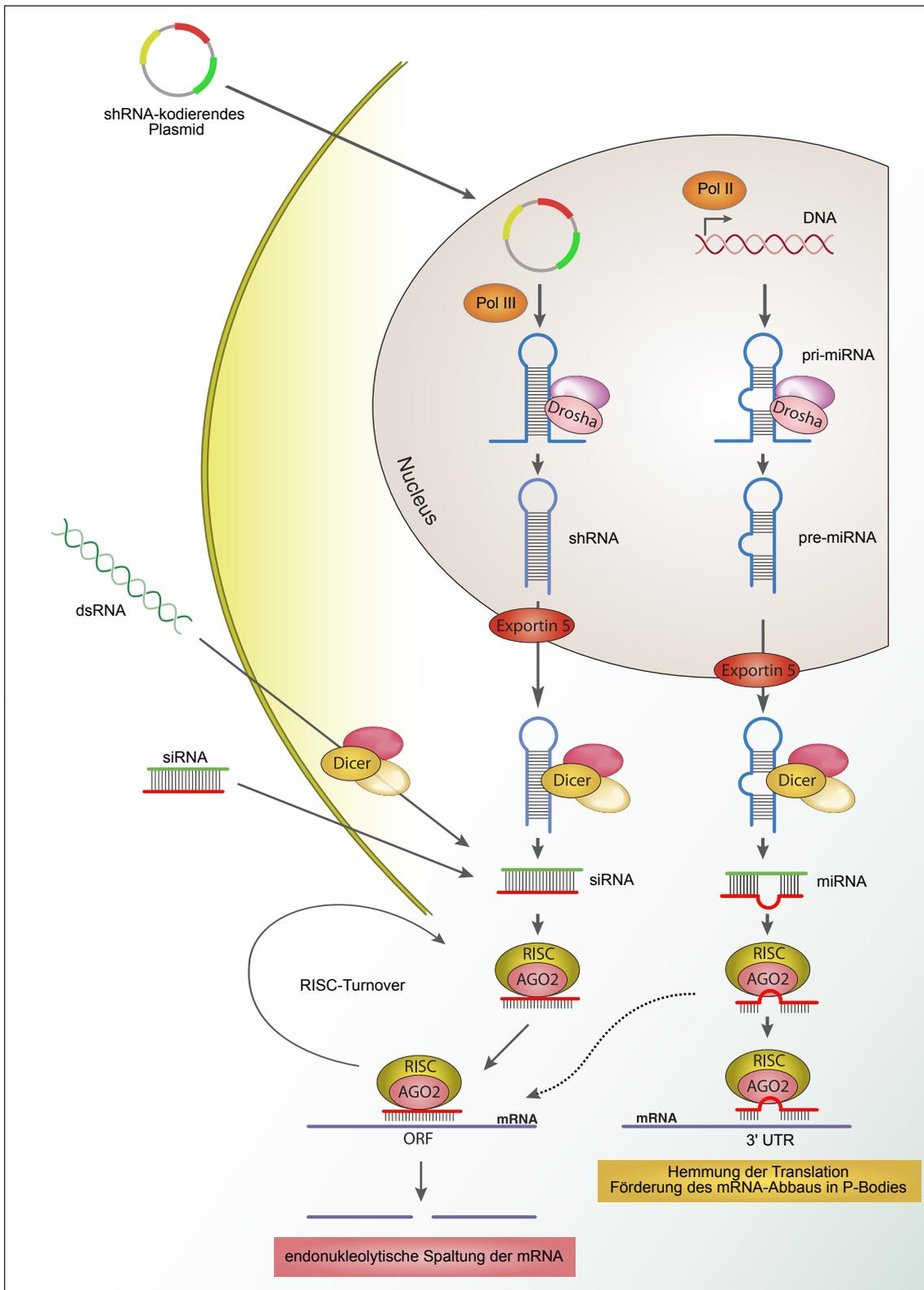
Um den miRNA-Syntheseweg zu imitieren, können ***small hairpin RNA* (shRNA)-kodierende Plasmide** in den Zellkern eingebracht werden. Durch Transkription mittels *RNA-Polymerase III* (Pol III) und Spaltung durch *Drosha* entstehen aus ihnen kurze shRNA-Moleküle, die eine Haarnadelstruktur aufweisen. Diese werden analog zur miRNA-Synthese durch *Dicer* zu siRNA prozessiert.

Als weiteres Substrat kann die RNase *Dicer* **langkettige dsRNA exogenen Ursprungs**, wie sie z.B. bei viralen Infektionen zu finden ist, zu siRNA spalten. Zumindest in Pflanzen, Insekten und Wirbellosen dient die RNA-Interferenz somit auch der viralen Abwehr. Ob dieser Mechanismus auch bei Säugetieren eine Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt [88].

Soll die Expression eines Proteins zu molekularbiologischen oder therapeutischen Zwecken verhindert werden, wird zumeist synthetische **siRNA** eingesetzt. Hierbei handelt es sich ebenso wie bei endogener miRNA um ca. 21 Basenpaare lange doppelsträngige RNA aus einem *guide*-Strang (rot) und einem *passenger*-Strang (grün). siRNA weist aber im Gegensatz zur miRNA meistens eine perfekte Komplementarität auf.

Um einen funktionsfähigen *RNA-induced silencing complex* (RISC) mit dem Argonautenprotein *AGO2* und weiteren Enzymen zu bilden, muss der *guide*-Strang als Einzelstrang vorliegen. Im Falle perfekter Basenpaarung (z.B. bei siRNA) wird der *passenger*-Strang nach Aufnahme in den Effektor-Komplex durch *AGO2* abgebaut. Andernfalls erfolgt eine Entwindung mit anschließender Dissoziation des *passenger*-Strangs. Mithilfe des *guide*-Strangs erkennt RISC die komplementäre Ziel-mRNA. Während siRNA-Effektor-Komplexe meist an kodierende Bereiche (*open reading frame*, ORF) binden, erkennen miRNA-Effektor-Komplexe in der Regel Sequenzen in der 3' UTR-Region. Die RISC-induzierte Genstilllegung kann auf verschiedene Arten erfolgen: Perfekt komplementäre mRNA wird durch *AGO2* katalytisch gespalten. Dagegen führt eine fehlerhafte Basenpaarung zu einer Hemmung der ribosomalen Translation sowie zu einer verstärkten Anreicherung und Degradierung der mRNA in den sogenannten *processing bodies* (P-Bodies).

(Abbildung modifiziert nach [89].)



Mello im Jahr 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden [92]. Die RNA-Interferenz ist neben der kontrollierten Transkription (z.B. durch DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen oder Transkriptionsfaktoren) eine weitere Methode zur Steuerung von Genaktivitäten in Zellen eukaryotischer Lebewesen. Aufgrund von computergestützten Vorhersagen schätzt man, dass etwa ein Drittel der menschlichen Gene durch RNAi reguliert werden [93]. RNA-Interferenz greift in der Regel posttranskriptional ein und beruht auf der spezifischen Wechselwirkung kleiner, nicht-kodierender RNA-Moleküle wie miRNA oder siRNA mit der mRNA bestimmter Gene. Als Folge wird die mRNA enzymatisch gespalten oder die ribosomale Translation der mRNA gehemmt, so dass die Expression des Zielproteins ausbleibt. Eine ausführlichere Beschreibung verschiedener kleiner RNA-Moleküle und des Mechanismus der RNA-Interferenz findet sich in Abbildung 2.2.

Um die RNA-Interferenz für die Grundlagenforschung oder zu therapeutischen Zwecken zu nutzen, bringt man zumeist künstlich erzeugte siRNA oder *small hairpin RNA* (shRNA)-kodierende DNA in die Zielzellen ein, anstatt in die endogene miRNA-

Tab. 2.1.: siRNA vs. shRNA-kodierende Vektoren als Vermittler von RNA-Interferenz [94, 95].

	siRNA	shRNA-kodierender Vektor
Struktur	dsRNA (21 – 25 bp)	dsDNA
Stabilität	RNase-labil	RNase-stabil
Vektor	-	Plasmid oder viraler Vektor (erlaubt Steuerung der shRNA-Expression)
Gewinnung	chemische Synthese oder enzymatischer Verdau langer dsRNA	Aufreinigung aus (bakteriellen) Zellkulturen
Zielkompartiment	Zytoplasma	Zellkern
intrazelluläre Prozessierung	Aufnahme in RISC	Transkription, nukleolytische Spaltung zu shRNA, Transport ins Zytoplasma, nukleolytische Spaltung zu siRNA, Aufnahme in RISC
Effektivität	+	++
Wirkdauer	zeitlich begrenzt (ca 1-3 Tage)	unbegrenzte Wirkdauer möglich
Kosten	++	+

Produktion des Organismus einzugreifen. siRNA und shRNA werden in Tabelle 2.1 vergleichend vorgestellt.

Obwohl die Entdeckung der RNA-Interferenz gerade gut ein Jahrzehnt zurückliegt, befinden sich bereits diverse siRNA-basierte Therapeutika in der klinischen Testung [96]. Diese rasante Entwicklung zeigt das Potential der posttranskriptionellen Genstilllegung als Therapieansatz auf. Jedoch stellen neben einem effektiven zielzellspezifischen Gentransfer unerwünschte Wirkungen (sogenannte *off-target effects*) eine weitere Herausforderung dar [86, 95, 96]. Spezifische Nebenwirkungen können aus partieller Sequenzkomplementarität der eingesetzten siRNA mit anderen als der Ziel-mRNA resultieren, während unspezifische Nebenwirkungen wie Immunstimulation oder toxische Effekte entweder auf das siRNA-Konstrukt selber oder auf sein Transportsystem zurückgeführt werden. Ob die therapeutische Anwendung von siRNA die großen Erwartungen erfüllen wird, bleibt daher abzuwarten.

2.1.4. Posttranskriptionelle Expressionshemmung von Adhäsionsrezeptoren

Auch zur spezifischen Beeinflussung der endothelialen Leukozytenadhäsion bei inflammatorischen Erkrankungen (s. Kapitel 2.1.2) werden RNA-basierte Arzneistoffe entwickelt. Am weitesten fortgeschritten sind die beiden Antisense-Oligonukleotide Alicaforfen (ISIS 2302) und ATL1102. Alicaforfen hybridisiert an die 3'-UTR-Region der humanen ICAM-1-mRNA und führt zu deren Abbau durch die Ribonuklease H. Dadurch wird die ICAM-1-Proteinexpression reduziert [97]. Zur Zeit wird die lokale Applikation von Alicaforfen bei Patienten mit Colitis Ulcerosa klinisch getestet (Phase II) [98]. Zwei Phase III-Studien an Patienten mit Morbus Crohn scheiterten an mangelnder Wirksamkeit [99, 100]. Bei ATL1102 handelt es sich um ein gegen die α_4 -Untereinheit von VLA-4 gerichtetes Antisense-Molekül. Dieses reduziert im Tiermodell der Multiplen Sklerose die Zahl der Immunzellen im ZNS und zeigt positive Effekte auf Häufigkeit und Schweregrad klinischer Symptome [101]. 2008 wurde der erfolgreiche Abschluss einer Phase IIa-Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit an MS-Patienten bekannt gegeben [102].

Im Gegensatz zu Antisense-Oligonukleotiden wurde siRNA zur Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen bisher nur präklinisch in *in vitro*- oder *in vivo*-Studien getestet. Diese sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tab. 2.2.: siRNA zur Expressionshemmung endothelialer Adhäsionsrezeptoren.

Zielstruktur	Erkenntnis	Referenz
VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin	Die Transfektion von HUVEC mit α -VCAM-1-, α -ICAM-1- oder α -E-Selektin-siRNA führt zu einer signifikanten Reduktion der jeweiligen Protein-Expression. Unter physiologischen Flussbedingungen geht die Leukozytenadhäsion an transfizierte HUVEC im Vergleich zu untransfizierten Zellen signifikant zurück. Der größte Effekt tritt bei simultaner Transfektion von allen drei siRNA-Typen auf.	[103–105]
VCAM-1	Die Behandlung mit α -VCAM-1-siRNA reduziert entzündungsbedingte Restenosen als Komplikation nach Endarteriektomien <i>in vivo</i> .	[106]
VCAM-1	Die Transfektion mit α -VCAM-1-siRNA kodierenden Plasmiden verhindert die endotheliale VCAM-1-Expression und reduziert die Adhäsion von Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen unter statischen sowie Flussbedingungen <i>in vitro</i> .	[107]
ICAM-1	Die <i>in vitro</i> -Transfektion mit α -ICAM-1-siRNA führt zu einer verminderten ICAM-1-Expression auf Glucose-stimulierten HUVEC. <i>In vivo</i> verhindert die lokale siRNA-Applikation die ICAM-1-Expression auf stimulierten Endothelzellen der Retina und Chorioidea und ist somit eine Option in der Therapie chronisch-entzündlicher Augenerkrankungen wie diabetische Retinopathie.	[108, 109]
E-Selektin	Die Transfektion mit α -E-Selektin-siRNA reduziert die Expression von E-Selektin sowie die Leukozytenadhäsion unter physiologischen Flussbedingungen auf aktivierten HUVEC.	[110]

2.2. Liposomen als Endothel-spezifische Arzneistoffträger

2.2.1. Stellenwert einer endothelial gerichteten Therapie

Entsprechend seiner mannigfaltigen Aufgaben (s. Kapitel 2.1.1) ist das vaskuläre Endothel an der Ausbildung unterschiedlicher pathologischer Zustände beteiligt, darunter Arteriosklerose, Bluthochdruck, Thrombosen, Ödeme sowie onkologische und entzündliche Erkrankungen [111]. Zur Therapie dieser Erkrankungen können daher jeweils Ansatzpunkte am Endothel herangezogen werden.

Wesentlicher Vorteil einer endothelial gerichteten Therapie ist die direkte Zugänglichkeit von Endothelzellen über die Blutbahn. Somit hängt der Therapieerfolg nicht von der zum Teil problematischen Extravasation eines Wirkstoffes ab [112]. Dies betrifft insbesondere makromolekulare Arzneistoffe wie genetisches Material und Proteine sowie partikuläre Arzneistoffträgersysteme. Allerdings weist das vaskuläre

Endothel aufgrund seiner Barrierefunktion zur Kontrolle des Stoffaustausches nur selten Affinität zu zirkulierenden Arzneistoffen auf. Diese zeigen daher häufig nur eine geringe Wirkung auf die Zellen des Endothels [113]. Für die Wirksamkeit einer endothelial gerichteten Therapie ist es daher notwendig, die selektive Interaktion zwischen Arzneistoff und Zielzellen zu verbessern. Dies kann durch Verwendung funktionalisierter Trägersysteme wie Liposomen (s. Kapitel 2.2.3) erreicht werden, die spezifisch an bestimmte Oberflächenstrukturen auf Endothelzellen binden. Bei der Therapie von entzündlichen Erkrankungen bieten sich dazu die in Kapitel 2.1.1 vorgestellten Adhäsionsrezeptoren an, die exklusiv auf dem aktivierten Endothel exprimiert werden. So kann eine selektive Anreicherung des Arzneistoffes in Gefäßen entzündeter Körperregionen gewährleistet werden.

Die Auswahl der endothelialen Zielstruktur muss mit Sorgfalt erfolgen, da sie einen wesentlichen Einfluss auf Wirkung und Wirksamkeit des liposomalen Arzneistoffes hat [111, 113, 114]. So kann die Bindung eines funktionalisierten Trägersystems an die entsprechende Oberflächendeterminante deren Aktivierung oder Inhibierung bewirken, eine Protease-vermittelte Spaltung (*shedding*) oder Internalisierung des Rezeptors induzieren oder die Funktionalität der Endothelzelle verändern. Vorzugsweise führt die Bindung des Arzneistoffkomplexes zu einem therapeutischen Zusatznutzen. Handelt es sich z.B. um einen Wirkstoff mit einem intrazellulären Angriffspunkt, ist es sinnvoll, einen internalisierenden Rezeptor zu targetieren, der die Wirkstoffaufnahme in das Zellinnere erleichtert. Dagegen muss bei Substanzen, die ihre Wirkung im Gefäßlumen entfalten, auf eine möglichst lange extrazelluläre Verweildauer geachtet werden. Bei der Behandlung mit antiinflammatorischen Wirkstoffen kann die Blockade endothelialer Adhäsionsrezeptoren durch funktionalisierte Trägersysteme einen positiven Nebeneffekt auf das Fortschreiten der Entzündung haben, während eine antivaskuläre Tumorthherapie durchaus von toxischen Nebenwirkungen profitieren kann.

2.2.2. Liposomen als Wirkstoffträger

Aus der Fülle unterschiedlicher Wirkstoffträger werden für den Einsatz in der Medizin oder Kosmetik häufig Liposomen ausgewählt, da sie viele wünschenswerte Eigenschaften in sich vereinen. Als Liposomen bezeichnet man kleine Vesikel aus Phospholipiddoppelschichten, die je nach Größe und Lamellarität in SUV (engl. *small unilamellar vesicle*), LUV (engl. *large unilamellar vesicle*) und MLV (engl. *multilamellar vesicle*) unterteilt werden. Im pharmazeutischen Bereich finden ca. 100 nm große LUV am häufigsten Anwendung. Während sich MLV spontan bei der Dispergierung von Phospholipiden in wässrigen Medien bilden, müssen zur Herstel-

lung von SUV/LUV spezielle Techniken herangezogen werden. Für einen Überblick über die verschiedenen Methoden wird auf die entsprechende Literatur verwiesen [115, 116].

Durch ihren Aufbau aus Lipidmembranen, die einen wässrigen Kern umschließen, sind Liposomen als Träger für eine Vielzahl unterschiedlicher hydrophiler wie lipophiler Wirkstoffe gleichermaßen geeignet. Während hydrophile Substanzen im Liposomeninneren eingeschlossen werden, liegen lipophile Stoffe membranassoziiert vor (s. Abbildung 2.3). Die Verwendung natürlicher oder von der Natur abgeleiteter Phospholipide als Arzneistoffträgermaterial bietet Vorteile wie gute Bioverträglichkeit, geringe Toxizität und Immunogenität.

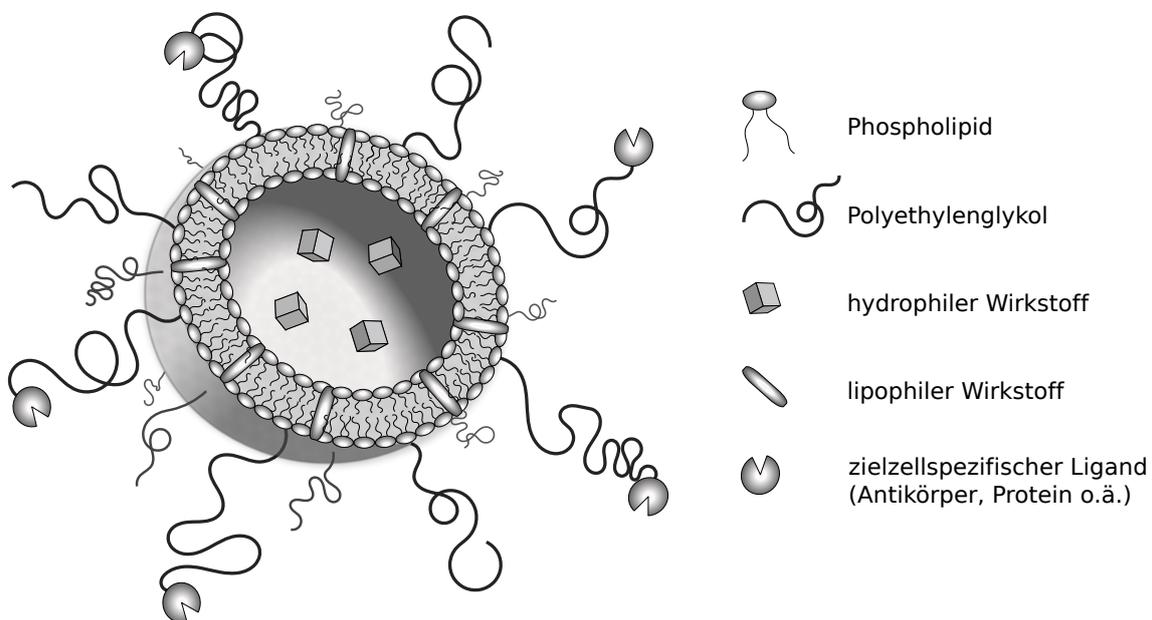


Abb. 2.3.: Schematische Darstellung eines Liposoms als Wirkstoffträger.

Die Inkorporierung von Arzneistoffen in Liposomen führt nicht nur zu einem erhöhten Schutz vor hydrolytischem oder enzymatischem Abbau im Blut oder Gewebe, sondern ermöglicht durch eine gezielte Verarbeitung ausgewählter (Phospho-)lipide indirekt die systematische Modifikation physikalischer, pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften des Wirkstoffes. Dadurch kann die therapeutische Wirksamkeit eines Arzneimittels nachhaltig verbessert werden.

Entscheidend ist auch, dass eine GMP-gerechte Liposomenherstellung im industriellen Großmaßstab möglich ist, ohne die eine breite Anwendung von Liposomen als Arzneistoffträger nicht denkbar wäre.

Das größte Problem bei der systemischen Applikation von Liposomen stellte lange Zeit deren schnelle Eliminierung durch phagozytierende Zellen des Immunsystems dar, die zu kurzen Plasmahalbwertszeiten von wenigen Minuten führte. Damit war

der Einsatz für einen gezielten Arzneistofftransport (*drug targeting*) außerhalb des retikuloendothelialen Systems (RES) stark limitiert [117–119]. Der Durchbruch gelang Anfang der 90er Jahre mit der Einführung sogenannter sterisch stabilisierter Liposomen, die sich durch stark verlängerte Zirkulationshalbwertszeiten auszeichneten und damit ein liposomales *drug targeting* mannigfaltiger Zielstrukturen möglich machten. Durch Modifikationen der Liposomenoberfläche, wie z.B. der Einbau von Polymeren oder negativ geladenen Molekülen, kann eine Opsonierung der Partikel durch Plasmaproteine unterbunden und somit die Akkumulation in Organen des RES wie Leber und Milz zurückgedrängt werden [119, 120]. Man nimmt an, dass dies auf eine Abschirmung der Liposomen durch Ausbildung einer schützenden Hydrathülle zurückzuführen ist [121, 122]. Unter den verschiedenen Ansätzen hat sich insbesondere der Einsatz PEGylierter Lipide bewährt. Diese bieten eine zuverlässige sterische Stabilisierung weitgehend unabhängig von der Liposomenkomposition und sind zudem einfach und kostengünstig zu synthetisieren und modifizieren [119].

pH-sensitive Liposomen

Der erfolgreiche Transport eines liposomalen Arzneistoffes an seinen Wirkort ist allein noch kein Garant für eine gute therapeutische Wirksamkeit. Damit der Wirkstoff mit seiner Zielstruktur wechselwirken kann, muss er in der Regel aus dem Liposom freigesetzt werden. Besonders aussichtsreich erscheint hierbei die Verwendung pH-sensitiver Liposomen, deren Lipidhülle nach Aufnahme in die Zelle pH-abhängig destabilisiert wird und somit eine ausreichende intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes gewährleistet.

Es wird angenommen, dass die zelluläre Aufnahme von Liposomen zumeist durch Endozytose erfolgt [124–127], so dass diese nach Überwindung der Zellmembran in den endosomalen Transport- und Abbauweg eingehen. Dieser ist in Abbildung 2.4 näher erläutert. Damit ein liposomaler Arzneistoff seine Wirkung entfalten kann, müssen Liposomen – oder zumindest ihre aktiven Komponenten – vor Eintritt in die Lysosomen aus dem endosomalen System in das Zytoplasma freigesetzt werden. Es ist bekannt, dass im Verlauf der endosomalen Prozessierung eine allmähliche Azidifizierung des endosomalen Inhalts stattfindet. Dieses Absinken des pH-Werts bildet die Grundlage des Konzepts pH-sensitiver Liposomen [123]. Der Mechanismus der pH-abhängigen Destabilisierung pH-sensitiver Liposomen soll am Beispiel der Lipidmischung aus DOPE und CHEMS näher erklärt werden (s. Abbildung 2.5):

DOPE ist ein ungesättigtes Phosphatidylethanolamin, welches im pH-Bereich von Interesse (pH 7,5 – 4,5) als Zwitterion mit einer relativ kleinen hydrophilen Kopfgruppe und einem ausladenden hydrophoben Fettsäureanteil vorliegt. Aufgrund

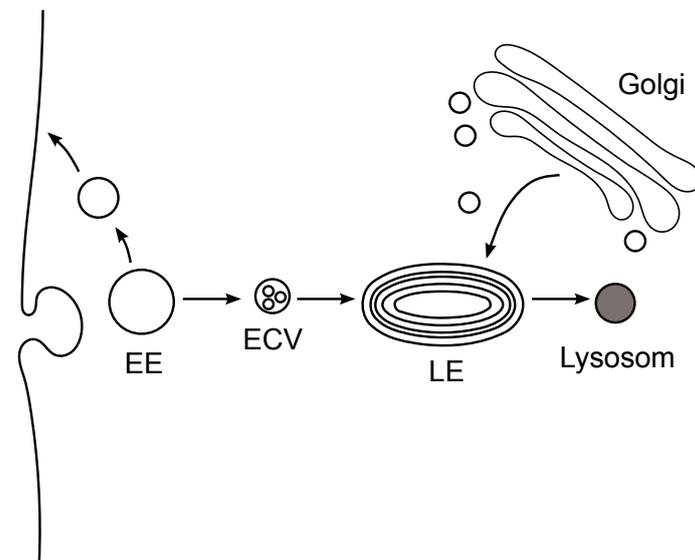


Abb. 2.4.: Skizze des endosomalen Transport- und Abbauwegs. Nach der endozytotischen Aufnahme in die Zelle findet in den frühen Endosomen (EE, *early endosome*) eine Sortierung des internalisierten Materials statt. Substanzen, die nicht zur Wiederverwertung an die Zellmembran zurücktransportiert werden, gelangen über endosomale Transportvesikel (ECV, *endosomal carrier vesicle*) zu den späten Endosomen (LE, *late endosome*). Diese entwickeln sich durch Fusion mit Hydrolase-haltigen Vesikeln aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk sowie einer ATP-abhängigen Azidifizierung zu Lysosomen, in denen der vesikuläre Inhalt enzymatisch abgebaut wird. Während der gesamten Prozessierung ist ein allmählicher Abfall des endosomalen pH-Werts von pH 7,4 auf 5,5 – 5,0 zu beobachten.

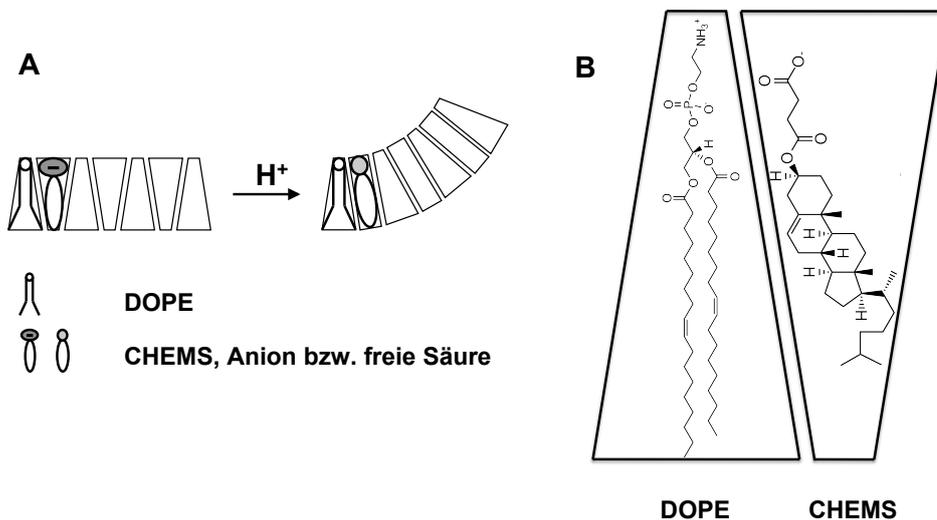


Abb. 2.5.: Mechanismus der pH-Sensitivität am Beispiel DOPE/CHEMS. A Im neutralen pH-Bereich liegt CHEMS als Anion vor und stabilisiert die lamellare Struktur der DOPE/CHEMS-Mischung. Beim Absinken des pH-Werts kommt es zur Protonierung von CHEMS und damit zum Verlust seiner konischen Form. Die Lipidmischung geht in die invers hexagonale H_{II} -Phase über. (Abbildung modifiziert nach [123].) B Strukturformeln von DOPE und CHEMS.

seiner (invers) konischen Struktur ist DOPE nicht in der Lage lamellare Strukturen zu formen, sondern bildet invers-hexagonale (H_{II}) Phasen aus [128]. Dieser Tatsache wird zugeschrieben, dass DOPE die Fusion von Membranen zu fördern vermag, weswegen es auch als *fusogenes Lipid* bezeichnet wird [129].

Die Ausbildung DOPE-haltiger lamellarer Strukturen wie z.B. Liposomen gelingt nur durch Zusatz eines konischen Helferlipids wie CHEMS. Dabei handelt es sich um ein schwach saures Cholesterolderivat mit einem pK_a -Wert von etwa 5,8, welches bei neutralem pH-Wert als Anion vorliegt [130]. Im schwach sauren pH-Bereich um pH 5,5, wie er in den Endosomen zu finden ist, wird CHEMS protoniert. Dadurch verliert es seine ausgeprägte hydrophile Kopfgruppe und somit seine konische Form. Das protonierte CHEMS ist nun nicht mehr in der Lage, die vesikuläre Liposomenstruktur zu stabilisieren. Es kommt zur Verschmelzung der Liposomen mit der Endosomenmembran und der Freisetzung des Wirkstoffes in das Zytosol [131, 132].

Funktionalisierung von Liposomen

Um einen maximalen therapeutischen Effekt bei möglichst geringen Nebenwirkungen zu erzielen, ist ein effizienter Arzneistofftransport zum Ort des Geschehens Ziel der Entwicklung neuer Arzneimittel.

Im Rahmen der Tumorthherapie gelang ein entscheidender Fortschritt mit der Einführung liposomaler Chemotherapeutika, von denen die Doxorubicin-haltigen Arzneimittel Caelyx[®]/Doxil[™] und Myocet[®] sowie das mit Daunorubicin beladene DaunoXome[®] seit ihrer Marktzulassung vor mehr als zehn Jahren erfolgreich in der Klinik angewendet werden [133–135]. Der Vorteil der liposomalen gegenüber den freien Wirkstoffen beruht hauptsächlich auf dem sogenannten *enhanced permeability and retention effect*, kurz EPR-Effekt [136–138]. Dabei macht man sich die unterschiedliche Blutgefäßstruktur in neoplastischen und gesunden Geweben zunutze [139, 140]. Aufgrund der lückenlosen Aneinanderreihung der vaskulären Endothelzellen sind Liposomen nach der systemischen Gabe nicht in der Lage, in gesunden Organen die Blutbahn zu verlassen und sich dort anzureichern. Im Bereich eines Tumors dagegen findet zur Versorgung der sich ständig teilenden Krebszellen eine Neovaskularisierung des Gewebes statt [56]. Die unreifen Blutgefäße sind durch eine unstrukturierte, lückenhafte Ausbildung der Gefäßwand gekennzeichnet, so dass die Liposomen leicht in das Tumorgewebe eintreten können. Gleichzeitig ist der Liposomenabtransport hieraus erschwert, da in neoplastischen Geweben das lymphatische Gefäßsystem häufig nur unzureichend ausgeprägt ist [140]. Mithilfe eines liposomalen Trägersystems können Zytostatika also relativ spezifisch im Tumor akkumulieren. Dies bezeichnet man als *passives Targeting*.

Dagegen versteht man unter *aktivem Targeting* die Verwendung von Wirkstoffträgern, an deren Oberfläche zielzellspezifische Liganden gekoppelt sind (s. Abbildung 2.3). Dadurch erhofft man sich zum einen eine selektive Affinität des Arzneimittels zum Zielgewebe, zum anderen soll durch den Einsatz von Substraten internalisierender Rezeptoren eine verbesserte Aufnahme in die Zelle erreicht werden. Durch Ausnutzung dieser Effekte kann der therapeutische Index eines Arzneistoffes gesteigert werden [141–143].

Die Funktionalisierung von Liposomen erfolgt typischerweise durch kovalente Bindung der Liganden an die Liposomenaußenseite. Dazu werden hydrophobe Ankermoleküle mit einer reaktiven Kopfgruppe in die Liposomen integriert [144, 145]. Durch die Verwendung PEGylierter Ankerlipide, bei denen der Ligand an das distale Ende einer PEG-Kette gekoppelt ist, können die Strategien der sterischen Stabilisierung und des aktiven Targetings effektiv miteinander kombiniert werden [146]. Häufige Anwendung findet das PEGylierte Phosphoethanolamin-Derivat Distearoylglycerophosphoethanolamin-N-[maleimid-(polyethylenglycol)-2000 (Mal-PEG-DSPE; Strukturformel s. Abbildung A.1). An dessen endständige Maleimidgruppe kann im leicht sauren pH-Bereich die Thiolgruppe eines Cysteinrests nukleophil addiert werden (s. Abbildung 2.6). Durch das gezielte Einbringen von Cysteinresten bei der Synthese rekombinanter Antikörperfragmente erfolgt eine gerichtete Kopplung des Liganden. Dadurch kann die Erhaltung der biologische Aktivität sichergestellt werden [147, 148].

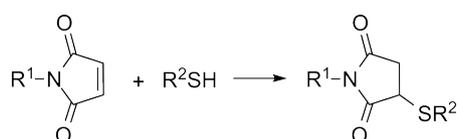


Abb. 2.6.: Nukleophile Addition eines Thiols an Maleimid.

Bei der Herstellung targetierter Liposomen unterscheidet man zwischen zwei allgemeinen Konzepten. Die konventionelle Vorgehensweise beinhaltet die Einarbeitung des Ankermoleküls während der Liposomenbildung und eine anschließende Funktionalisierung der reaktiven Liposomen. Im Gegensatz dazu wird bei der von Iden und Allen [149] beschriebenen *Postinsertionstechnik* der Ligand zunächst an das als mizellare Lösung vorliegende Ankerlipid kovalent gebunden. Anschließend werden die gekoppelten Mizellen in die äußere Lipidschicht vorgefertigter Liposomen inseriert. Da die Wirkstoffbeladung der Liposomen und deren Funktionalisierung in zwei getrennten Schritten vollzogen werden, ergibt sich eine große Flexibilität, therapeutisch verwendete Liposomen individuell nach dem Expressionsmuster des Zielgewebes zu modifizieren [150]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass durch

den Einsatz bereits gekoppelter Ankerlipide eventuelle Reaktionen der reaktiven Maleimid-Kopfgruppe mit dem Beladungsgut ausgeschlossen werden können.

Als Liganden können Antikörper und deren Fragmente, Proteine oder Peptide sowie andersartige Rezeptorliganden dienen. Liposomen, an die ein Antikörper oder -fragment gebunden ist, werden als *Immunoliposomen* bezeichnet. Obwohl Antikörpergekoppelte Immunoliposomen eine starke Bindung an ihre Zielstruktur aufweisen, haben sie den entscheidenden Nachteil einer schnellen Fc-vermittelten Elimination aus der Blutzirkulation durch Makrophagen [151]. Ein weiteres Problem stellt das Hervorrufen einer Immunantwort dar, die die Plasmahalbwertszeit der PEGylierten Liposomen bei wiederholter Gabe drastisch verkürzt [152, 153]. Daher geht man dazu über, anstelle vollständiger Antikörper rekombinante Antikörperfragmente wie Fab- oder scFv-Fragmente einzusetzen, die aufgrund des fehlenden Fc-Teils eine geringere Immunogenität aufweisen. Mittlerweile gibt es zahlreiche Beispiele für die erfolgreiche Targetierung scFv-gekoppelter Immunoliposomen *in vitro* und *in vivo* [154–158].

2.2.3. Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport

Die Vielzahl an Literaturstellen zeugt vom bestehenden Interesse, die Vorzüge des liposomalen Arzneistofftransports mit denen einer endothelial gerichteten Therapie (s. Kapitel 2.2.1) zu kombinieren. Dazu werden Liposomen entwickelt, die Affinität zu Endothel-spezifischen Oberflächenrezeptoren aufweisen (s. Kapitel 2.1.1). Diese Liposomen können z.B. zur Therapie von Tumoren [159–162] oder entzündlichen Erkrankungen [163–166] eingesetzt werden. Zur Targetierung endothelialer Rezeptoren wurden neben Antikörpern auch Antikörperfragmente [147] und Peptide [159, 167–172] als Liganden an die Liposomen gekoppelt. Bei den eingeschlossenen Arzneistoffen handelt es sich hauptsächlich um antivaskuläre Wirkstoffe zur Behandlung von Tumorerkrankungen [160, 169, 173, 174], aber auch der Angiogenesefaktor VEGF zur Therapie des akuten Myokardinfarkts, das antiinflammatorisch wirksame Kortikoid Dexamethason [163–165] sowie Nukleinsäuren für gentherapeutische Interventionen [175, 176] wurden erfolgreich liposomal verkapselt.

Einen Überblick über bisherige Arbeiten mit funktionalisierten Liposomen zur Beeinflussung des vaskulären Endothels vermittelt Tabelle 2.3.

Tab. 2.3.: Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport. (Eine Erläuterung der verwendeten Abkürzungen findet sich am Tabellenende.)

Zielstruktur/ Ligand	Erkenntnis	Referenz
E-Selektin, mAb	Die Kopplung von α -E-Selektin-mAb an verschiedene Liposomen (konventionell, sterisch stabilisiert, kationisch, pH-sensitiv) führt zu einer spezifischen und selektiven Bindung an aktivierte HUVEC mit nachfolgender endozytotischer Aufnahme. Ausschließlich in aktivierten Zellen vermindert die Inkubation mit DXR-haltigen IL die Viabilität der Zellen.	[177]
E-Selektin, mAb	E-Selektin-gerichtete IL binden kumulativ an aktivierte HUVEC unter physiologischen Blutflussbedingungen. Ca. 25% der gebundenen IL werden – hauptsächlich endozytotisch – aufgenommen. Neben einer Rezeptor-vermittelten Internalisierung kann auch die Fusion mit der Zellmembran als Aufnahmeweg nachgewiesen werden.	[178]
E-Selektin, mAb	<i>In vitro</i> -Experimente an aktivierten HUVEC zeigen eine spezifische Bindung und Aufnahme Dexa-haltiger α -E-Selektin-IL. Diese sind in der Lage, im Tiermodell nach intravenöser Applikation in Bereichen entzündeter Haut zu akkumulieren. Dennoch können auch in gesunden Hautarealen sowie in Leber und Milz unspezifische Liposomenanreicherungen nachgewiesen werden.	[179]
E-Selektin, mAb	Untersuchungen an Mäusen mit akuter Glomerulonephritis ergeben, dass die renale Anreicherung von Dexa-beladenen α -E-Selektin-IL nach intravenöser Gabe im Vergleich zu untargetierten Liposomen signifikant erhöht ist, obwohl sie gleichermaßen in unspezifischen Organen akkumulieren. Dies resultiert in einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen ausschließlich auf dem glomerulären Endothel um 60 – 70%, so dass sieben Tage nach Therapiebeginn eine Verbesserung der Nierenfunktion vermerkt werden kann. Im Vergleich zum freien Wirkstoff weisen IL ein wesentlich besseres Nebenwirkungsprofil auf.	[163, 164]
E-Selektin, mAb	Die Kopplung von α -E-Selektin-mAb an echogene liposomale DNA-Vektoren führt zu einer verbesserten Transfektionsfähigkeit aktivierter HUVEC im Vergleich zu unstimulierten Zellen bei gleichzeitiger Erhaltung der akustischen Eigenschaften des Vehikels.	[180]
E-Selektin, mAb	Die Autoren untersuchen die Eignung sogenannter Immuno-SAINT-O-Somen für das vaskuläre Targeting. Dabei handelt es sich um PEGylierte α -E-Selektin-gerichtete IL, die das kationische Ampholyt SAINT-C18 enthalten. Targetierte SAINT-O-Somen weisen im Vergleich mit konventionellen sterisch stabilisierten IL eine ebenso gute Bindung an aktivierte Endothelzellen, aber wesentlich verbesserte intrazelluläre Wirkstofffreisetzung auf. Immuno-SAINT-O-Somen als Träger für DXR haben einen signifikant größeren Effekt auf die Zellviabilität als konventionelle IL. Eine spezifische Herunterregulation der VE-Cadherin-Expression in aktivierten Endothelzellen gelingt ausschließlich mit SAINT-O-Somen-formulierter siRNA.	[175]

Tab. 2.3.: (Fortsetzung – Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport)

Zielstruktur/ Ligand	Erkenntnis	Referenz
E-Selektin, sLe ^x	Werden Mäusen mit induzierter Arthritis sLe ^x -Liposomen intravenös appliziert, akkumulieren diese zeitabhängig im entzündeten Gelenk sowohl auf dem inflammatorischen Blutgefäßendothel kolokalisiert mit CD31 und E-Selektin, als auch im angrenzenden hyperplastischen synovialen Gewebe.	[166]
E-Selektin, sLe ^x	Liposomal gekoppelte sLe ^x -Oligosaccharide vermindern die Nekrotisierung des Herzmuskelgewebes und erhalten die Funktion der Herzkranzgefäße bei myokardialer Ischämie bzw. Reperfusionssyndrom <i>in vivo</i> . Der schützende Effekt wird der gestörten Bindung polymorphkerniger Leukozyten an das Endothel und damit einer ausbleibenden Anreicherung im inflammatorischen Gewebe zugeschrieben.	[181]
E-Selektin, sLe ^x	Im Gegensatz zu ungekoppelten Liposomen verringern sLe ^x -Liposomen als Träger für α -ICAM-1 gerichtete AS-ODN die ICAM-1-Expression auf aktivierten HUVEC.	[176]
P-Selektin, mAb	Im Tiermodell eines Myokardinfarkts akkumulieren α -P-Selektin-gerichtete IL bevorzugt in den entzündlichen Randregionen des akuten Infarkts im Vergleich zum gesunden Herzmuskelgewebe. Die Therapie mit immunoliposomal verkapseltem VEGF resultiert in einer gesteigerten Anzahl vorhandener sowie durchbluteter Gefäße in der Infarktregion. Dies führt zu einer Verbesserung der Herzfunktion im Vergleich zu Tieren, die mit untargetierten Liposomen oder dem freien Wirkstoff behandelt werden.	[182, 183]
ICAM-1, mAb	α -ICAM-IL binden spezifisch, dosis- und zeitabhängig an HUVEC, wobei das Ausmaß der ICAM-Expression der limitierende Faktor zu sein scheint.	[184]
ICAM-1, mAb	α -ICAM-IL binden konzentrationsabhängig an bronchiale Epithelzellen <i>in vitro</i> . 60% der gebundenen Liposomen werden innerhalb 1 h internalisiert.	[185]
ICAM-1, mAb	<i>In vitro</i> -Versuche mit IL unterschiedlicher Fluidität sowie verschiedenen Mengen gebundener α -ICAM-mAb und α -E-Sel-mAb zeigen, dass die Mobilität sowie die molekularen Verhältnisse der unterschiedlich gekoppelten Ankerlipide zueinander eine Schlüsselrolle bei der endothelialen Targetierung spielen.	[186]
VCAM-1, mAb	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zum Potential prokoagulatorischer α -VCAM-gerichteter IL für einen selektiven Blutgefäßverschluss im Bereich des Tumorgewebes belegen deren spezifische Bindung an VCAM-1 bzw. aktivierte HUVEC sowie die thrombogene Aktivität der gekoppelten Liposomen.	[187]
VCAM-1, mAb	α -VCAM-IL zeigen eine spezifische und selektive Bindung an aktivierte humane EC. Ca. 50% werden über die Rezeptor-vermittelte Endozytose via <i>clathrin-coated vesicles</i> internalisiert.	[188]

Tab. 2.3.: (Fortsetzung – Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport)

Zielstruktur/ Ligand	Erkenntnis	Referenz
VCAM-1, mAb	α -VCAM-IL binden spezifisch an aktivierte humane EC unter statischen sowie simulierten Blutflussbedingungen <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> -Untersuchungen an einem Tumor-Xenograft-Modell zeigen eine zeitabhängige Akkumulation der IL in den tumorversorgenden Blutgefäßen, während sich Kontrollliposomen durch passive Diffusion in das Tumorgewebe einlagern. Eine Anreicherung der Liposomen in irrelevanten Organen (Leber, Milz) wird mit der Aufnahme durch das RES in Zusammenhang gebracht.	[162]
Endoglin, scFv'	Die Inkubation von humanen EC mit α -Endoglin-IL führt zu einer spezifischen Bindung und anschließender Internalisierung. DXR-beladene IL weisen eine verstärkte <i>in vitro</i> -Zytotoxizität im Vergleich zu untargetierten Liposomen und dem freien Wirkstoff auf.	[147]
VEGFR, mAb	Gegen VEGFR2 gerichtete IL binden spezifisch an den immobilisierten Rezeptor sowie an diverse VEGFR2-exprimierende Zelllinien. Da der verwendete Antikörper an ein anderes Epitop als der physiologische Ligand VEGF zu binden scheint, gelingt die immunoliposomale Targetierung auch in Gegenwart größerer Mengen VEGF.	[189]
VEGFR, ATWLPPR	Die Kopplung des linearen Peptids ATWLPPR an PEGylierte Liposomen führt zu einer verstärkten Bindung an aktivierte EC <i>in vitro</i> .	[190]
VEGFR, Fab'	DXR-haltige α -VEGFR2-IL reichern sich spezifisch im Tumorgewebe an und hemmen das Wachstum von Tumoren $< 1 \text{ mm}^3$ signifikant.	[191]
Galectin-1, Anginex	Die liposomale Kopplung von Anginex, einem synthetischen Peptid mit angiostatischer Wirkung, führt zu einer spezifischen Bindung der Liposomen an aktivierte EC.	[168]
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin, RGD	Im Gegensatz zu untargetierten Liposomen werden RGD-gekoppelte Liposomen von aktivierten HUVEC verstärkt gebunden und anschließend via Endozytose internalisiert. Obwohl die Funktionalisierung zu einer drastischen Verkürzung der Zirkulationshalbwertszeit der PEGylierten Liposomen <i>in vivo</i> führt, sind sie dennoch in der Lage, sich in proliferierenden Gefäßen und im angrenzenden neoplastischen Gewebe anzureichern. Da die antineoplastische Therapie mit liposomalem DXR nur erfolgreich ist, wenn die Liposomen zuvor funktionalisiert werden, vermutet man eine Wechselwirkung der RGD-Liposomen mit dem Tumorendothel als Ursache für die tumorhemmende Wirkung.	[160, 167, 190]
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin, RGD	Die Inkubation von HUVEC mit B ¹⁰ -haltigen RGD-Liposomen führt zu einer Sensitivierung der Zellen für eine antiproliferative Neutroneneinfangtherapie.	[192]
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin, RGD	Der neue antivaskuläre Wirkstoff Combretastatin A4 lässt sich mit hohen Einschlußraten liposomal verkapseln. Im Vergleich zu unmodifizierten Liposomen zeigen targetierte Liposomen eine signifikant höhere Affinität zu aktivierten HUVEC <i>in vitro</i> .	[173]

Tab. 2.3.: (Fortsetzung – Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport)

Zielstruktur/ Ligand	Erkenntnis	Referenz
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin, RGD	In Versuchen an Ratten mit induzierter Arthritis erweisen sich RGD-gekoppelte Liposomen als geeignete Arzneistoffträger für eine zielgerichtete antiinflammatorische Therapie. Schon die einmalige Gabe Dexa-haltiger RGD-Liposomen führt zu einem starken und anhaltenden antirheumatischen Effekt.	[165]
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin, RGD	Den Autoren gelingt die stabile Verkapselung des antivaskulären Prodrugs ZD6126 in PEGylierte Liposomen, die für ein aktives vaskuläres Targeting mit einem zyklischen RGD-Peptid funktionalisiert werden. Während der freie Wirkstoff <i>in vivo</i> schnell eliminiert wird, zeigt die liposomale Arzneiform eine stark verlängerte Zirkulationshalbwertszeit. RGD-gekoppelte wie untargetierte Liposomen akkumulieren im Tumorgewebe sowie Makrophagen-vermittelt in Leber und Milz. Da beide Liposomenarten gleichermaßen antineoplastisch wirksam sind, schlussfolgern die Autoren, dass ein passives Targeting ausreichend für eine liposomale antivaskuläre Tumorthherapie ist.	[174]
Amino- peptidase N, NGR	Die liposomale Kopplung des NGR-Peptids, welches an den Angiogenesemarker Aminopeptidase N bindet, führt zu einer spezifischen, zeitabhängigen Anreicherung der Liposomen im neoplastischen Gewebe tumortragender Versuchsmäuse. Diese ist im Vergleich zu unmodifizierten Liposomen zehnfach erhöht. Die i.v.-Applikation DXR-beladener NGR-Liposomen führt zu einer ausgeprägten Zerstörung des angiogenetischen Gefäßsystems und somit zu einer schnellen Tumorregression bzw. vollständigen -eradikation. Des Weiteren kann die Bildung von Metastasen zurückgedrängt werden. Durch gleichzeitige direkte Targetierung proliferierender Tumorzellen mittels DXR-Liposomen, die selektiv an den tumorzellspezifischen Disialogangliosid-Rezeptor GD ₂ binden, kann der Therapieerfolg nochmals signifikant verbessert werden.	[159, 161]
MT1-MMP, RLPLPG	Die liposomale Kopplung des MT1-MMP-bindenden Peptids GPLPLR resultiert in einer verbesserten Zellbindung <i>in vitro</i> , sowie in einer vierfach erhöhten Tumorakkumulation <i>in vivo</i> . Dies spiegelt sich in einem signifikant verlangsamten Tumorwachstum nach Inkorporierung des lipophilen Nukleosidanalogen DPP-CNDAC in GPLPLR-Liposomen im Vergleich zu wirkstoffhaltigen untargetierten Liposomen wider.	[169]
Fibrin, CREKA	Tumorversorgende Blutgefäße sind durch zahlreiche wandständige Thromben gekennzeichnet. Daher kann das Fibrin-erkennende Peptid CREKA für ein spezifisches Tumor-Targeting verwendet werden. In <i>in vivo</i> -Versuchen akkumulieren CREKA-gekoppelte Liposomen im Tumorblutgefäß und induzieren dort die Bildung neuer Blutgerinnsel. Durch die positive Rückkopplung der Liposomenakkumulation kann ein effizienter Transport zum Zielgewebe gewährleistet werden, der zu einem Gefäßverschluss führt. Obwohl der Mechanismus der Thrombenbildung nicht geklärt ist, beruht er nicht allein auf der Liposomenanreicherung, da in der Leber zwar ebenfalls hohe Liposomenkonzentrationen, aber keine Thrombosen beobachtet werden.	[170]

Tab. 2.3.: (Fortsetzung – Funktionalisierte Liposomen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport)

Zielstruktur/ Ligand	Erkenntnis	Referenz
unbekannt, APRPG	Durch Kopplung mit dem Peptid APRPG binden PEGylierte Liposomen spezifisch an aktivierte HUVEC <i>in vitro</i> . Obwohl untargetierte und targetierte Liposomen <i>in vivo</i> gleichermaßen im Tumorgewebe akkumulieren, zeigen APRPG-gekoppelte Adriamycin-Liposomen eine effektivere Hemmung des Tumorwachstums. Dies kann in der unterschiedlichen intratumoralen Lokalisation der Liposomen begründet sein: Während APRPG-Liposomen assoziiert mit angiogenetischen Endothelzellen vorliegen, sind untargetierte Liposomen diffus im extravaskulären Raum verteilt.	[171, 172]
unbekannt, SP5-52 u.a.	Mittels <i>in vivo</i> -Phagendisplay wurden diverse neue Peptide identifiziert, die spezifisch im Tumorgefäßsystem akkumulieren. SP5-52, ein Peptid mit der für die Targetierung essentiellen Konsensussequenz PSP, bindet spezifisch an aktiviertes Endothel <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . Die Kopplung an liposomales DXR verhindert die Neovaskularisierung des Tumorgewebes <i>in vivo</i> und führt insgesamt zu einer verbesserten Überlebensrate tumortragender Mäuse.	[193, 194]

APRPG Ala-Pro-Arg-Pro-Gly; **AS-ODN** Antisense-Oligonukleotid; **ATWLPPR** Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg; **CREKA** Cys-Arg-Glu-Lys-Ala; **Dexa** Dexamethason; **DXR** Doxorubicin; **EC** Endothelzellen; **HUVEC** human umbilical vein endothelial cells; **IL** Immunoliposomen; **MT1-MMP** Membran-Typ 1 Matrix-Metalloprotease; **NGR** Asn-Gly-Arg; **PSP** Pro-Ser-Pro; **RGD** Arg-Gly-Asp; **RLPLPG** Arg-Leu-Pro-Leu-Pro-Gly; **sLe^x** Sialyl Lewis^x; **VEGF** vascular endothelial growth factor; **VEGFR** vascular endothelial growth factor receptor.

2.2.4. Endoglin als Antigen für einen Endothel-spezifischen Arzneistofftransport

Bei Endoglin (CD105) handelt es sich um ein als Homodimer vorliegendes transmembranäres Glykoprotein. Die beiden 90 kDa großen Untereinheiten sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verknüpft und weisen jeweils eine große extrazelluläre Domäne auf. Dort befindet sich eine RGD-Bindungsregion, während intrazellulär sieben potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden sind [195–197]. Zwei verschiedene Isoformen sind beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen. Sie unterscheiden sich sowohl in der Länge der zytoplasmatischen Domäne als auch in der Gewebeverteilung: Im Gegensatz zu S-CD105 (*short* CD105) wird L-CD105 (*long* CD105) als längere Variante vorrangig auf Endothelzellen exprimiert. L-CD105 weist außerdem einen höheren Phosphorylierungsgrad auf [198, 199].

Auch wenn seine funktionelle Bedeutung noch nicht abschließend geklärt ist, gibt es viele Hinweise, dass Endoglin eine wichtige Rolle in der Homöostase, der Angiogenese

sowie der Entwicklung des kardiovaskulären Systems während der Embryonalphase spielt [200–202]. Mutationen in Endoglin-kodierenden Genen verursachen das Krankheitsbild der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie Typ I (HHT-1). Diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung geht mit Gefäßmissbildungen und rezidivierenden Blutungen einher [203].

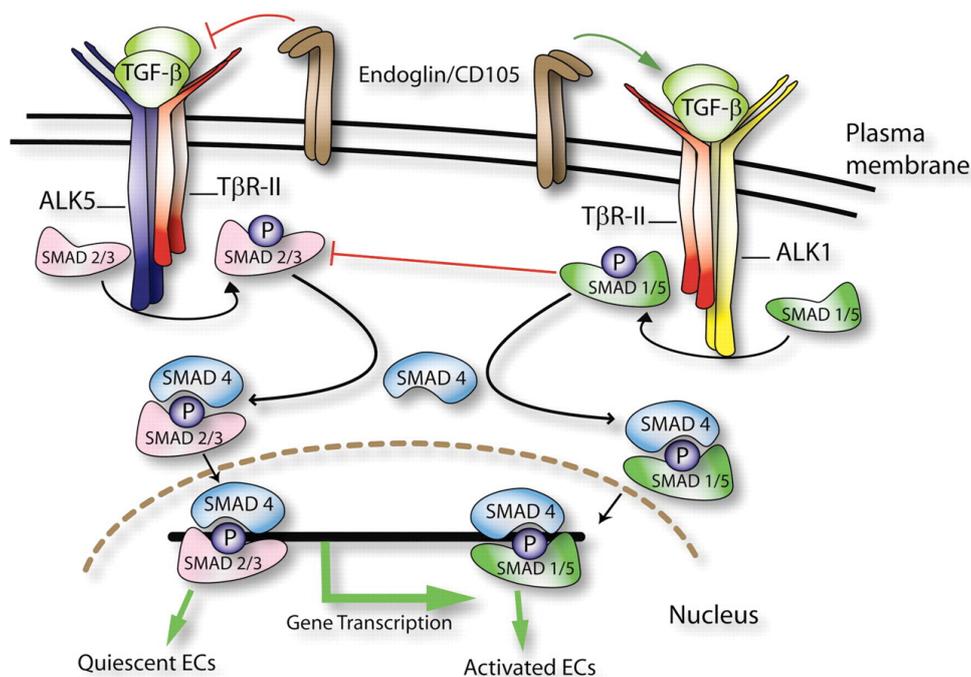


Abb. 2.7.: Endoglin als Hilfsprotein des TGF-β-Rezeptorkomplexes. Nach heutigem Wissensstand ist davon auszugehen, dass die Expression von Endoglin die endotheliale Zellantwort auf die Bindung von TGF-β moduliert. In Endothelzellen können durch TGF-β zwei Signalwege mit gegensätzlicher Wirkung induziert werden [204, 205]: Bindet TGF-β an TβR-II/ALK-1, werden die zyttoplasmatischen Effektorproteine SMAD 1/5 phosphoryliert. Diese bilden mit SMAD 4 einen heteromeren Komplex, der im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt und die Expression proangiogener Gene fördert. Die Bindung an TβR-II/ALK-5 dagegen führt zu einer Aktivierung von SMAD 2/3 und nachfolgend zu einer Herunterregulation angiogenetischer Prozesse. Die Assoziation von Endoglin an TβR-II induziert die endotheliale Zellproliferation, indem es die Signaltransduktion via TβR-II/ALK-1 fördert und die Signaltransduktion via TβR-II/ALK-5 hemmt. (**ALK** Activin receptor-like kinase; **SMAD** Sma and Mad related proteins; **TβR-II** transforming growth factor β-Rezeptor Typ II.) (Abbildung aus [206].)

Auf molekularer Ebene wirkt Endoglin als Hilfsprotein des *Transforming growth factor β* (TGF-β)-Rezeptorkomplexes [207]. TGF-β-Rezeptoren und -Liganden bilden ein komplexes Signaltransduktionssystem, das zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Migration steuert. In Endothelzellen sind dabei hauptsächlich zwei Signalwege mit gegensätzlicher Wirkung von Bedeutung. Diese sind in Abbildung 2.7 näher beschrieben. Endoglin scheint das Gleichgewicht dieser Signalwege

zugunsten einer proangiogenetischen Aktivität der Endothelzellen zu verschieben [208].

Viele Studien belegen die Überexpression von Endoglin auf dem Endothel angiogener Blutgefäße, wie sie in Tumoren und entzündlichen oder sich regenerierenden Geweben zu finden sind [209–212]. Dagegen zeigen ruhende Endothelzellen sowie einige andere Zellarten wie aktivierte Monozyten, Makrophagen, erythroide Vorläuferzellen, Fibroblasten, Mesangialzellen, follikuläre dendritische Zellen und Melanozyten nur geringe Expressionslevel [213]. Damit erscheint Endoglin als geeignete Zielstruktur für eine endothelial gerichtete antiinflammatorische oder antineoplastische Therapie. Hierzu wurden in den letzten Jahren diverse gegen Endoglin gerichtete Antikörper bzw. -fragmente entwickelt, die entweder direkt durch Rezeptorblockade oder gekoppelt an antiinflammatorische bzw. antineoplastische Wirkstoffe als Endothelzell-spezifische Therapeutika dienen können [206, 213]. Völkel et al. [147] nutzten diese erstmals zur Funktionalisierung von Liposomen für einen endothelial gerichteten liposomalen Arzneistofftransport (s. Tabelle 2.3). Vor- und Nachteile von Endoglin als Antigen für eine Endothel-spezifische Therapie sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tab. 2.4.: Endoglin als Antigen für eine Endothel-spezifische Therapie. (Tabelle modifiziert nach [206].)

Vorteile	Nachteile
gute Zugänglichkeit aus dem Blutstrom	Existenz einer löslichen Form
keine Extravasation nötig	gestörte Homöostase als Nebenwirkung?
Überexpression auf Endothel in Tumoren oder Entzündungsgeweben	nur Tumore mit angiogenetischer Aktivität werden erfasst
vielseitig anwendbar, da nicht spezifisch für bestimmte Tumorarten oder Entzündungserkrankungen	
unabhängig vom Expressionsmuster neoplastischer Zellen	
geeignet zur Kontrolle der Wirksamkeit antiangiogenetischer Therapien	

2.3. Lipid-basierte Transfektion

Unter Transfektion versteht man das (transiente oder stabile) Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Physiologisch gesehen stellt dies einen Angriff auf die Integrität des Genoms dar, so dass Lebewesen im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt haben, dieses zu verhindern. Bei der therapeutischen Nutzung von genetischem Material müssen deshalb diverse Hürden überwunden werden [214]:

- Während der systemischen Zirkulation droht ein rascher Abbau der Nukleinsäuren durch Serumnukleasen.
- Die Nukleinsäure muss in die Zielzelle aufgenommen werden. Nukleinsäuren stellen jedoch keine physiologischen Substrate zellulärer Membrantransporter dar. Auch eine passive Überwindung der negativ geladenen Zellmembran ist aufgrund der makromolekularen, polyanionischen Nukleinsäurestruktur problematisch.
- Intrazellulär muss der Transport intakter Nukleinsäuren zu ihrem Wirkort gewährleistet sein. Während Antisense-Oligonukleotide und siRNA zytoplasmatisch angreifen, müssen virale DNA und Plasmid-DNA aktiv oder passiv in den Zellkern als Ort der Transkription aufgenommen werden.

Der Einsatz verschiedenartiger Gentransfersysteme kann dabei helfen, diese Schwierigkeiten zu überwinden. Dabei werden virale von nicht-viralen Methoden unterschieden. Letztere lassen sich weiterhin in physikalische und chemische Ansätze unterteilen.

Virale Genvektoren sind aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz zur Zeit das Mittel der Wahl bei klinischen Anwendungen, bergen aber diverse Risiken (s. Kapitel 2.1.3).

Zu den nicht-viralen, physikalischen Transfektionsmethoden gehören Verfahren wie Elektroporation, Mikroinjektion oder Partikelbeschuss mittels Genkanone. Dabei wird die Zellmembran mechanisch destabilisiert und so der Eintritt der Nukleinsäure in die Zelle erleichtert. Diese Techniken weisen hervorragende *in vitro*-Transfektionsraten auf, haben allerdings keine Relevanz für systemische *in vivo*-Anwendungen und sollen daher nicht näher besprochen werden [215].

Die Grundlage nicht-viraler, chemischer Verfahren bildet zumeist die Komplexierung anionischer Nukleinsäuren mit kationischen Komponenten. Aufgrund ihrer positiven Nettoladung assoziieren die entstehenden Komplexe leicht über elektrostatische Wechselwirkungen an negativ geladene Zellmembranen und fördern so die

Aufnahme der Nukleinsäuren ins Zellinnere [216]. Als kationische Substanzen können Polymere oder Lipide verwendet werden, deren Komplexe mit Nukleinsäuren als *Polyplexe* bzw. *Lipoplexe* bezeichnet werden. Als weitere Methode können die zu applizierenden Nukleinsäuren in Nanopartikel wie z.B. Liposomen (s. Kapitel 2.3.2) oder SPLP (s. Kapitel 2.3.3) verkapselt werden.

An ein ideales Gentransfersystem werden folgende Anforderungen gestellt [215, 217]:

- Die Anwendung soll sicher und gut verträglich sein.
- Das Konstrukt darf keine Immunantwort hervorrufen.
- Das Gentransfersystem soll eine möglichst hohe Transfektionseffizienz aufweisen. Dazu müssen weitere Voraussetzungen erfüllt werden:
 - Die Zirkulationshalbwertszeit muss ausreichend lang sein, um das Erreichen der Zielzellen zu ermöglichen.
 - Das Vehikel muss die Nukleinsäure vor einem Abbau durch Serumnukleasen schützen.
 - Das Vehikel soll die Nukleinsäure zielgerichtet zu den Zielzellen transportieren.
 - Die transportierte Nukleinsäure muss in ausreichender Konzentration intrazellulär an ihrem Wirkort (Zytoplasma/Zellkern) angereichert werden.
 - Spätestens an ihrem Wirkort muss die Nukleinsäure aus ihrem Vehikel freigesetzt werden.
- Die Herstellung soll möglichst einfach, kostengünstig und reproduzierbar im Großmaßstab durchführbar sein.
- Das fertige Produkt muss ausreichende Lagerstabilität bis zum Zeitpunkt der Applikation aufweisen.

Bis heute gibt es kein Transfektionssystem, welches allen Anforderungen gerecht wird. Stattdessen weist jedes Vehikel individuelle Stärken und Schwächen auf. Lipidbasierte Systeme, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, überzeugen insbesondere aufgrund ihrer guten Verträglichkeit, einfachen und kostengünstigen Herstellung und sicheren Anwendbarkeit.

2.3.1. Lipoplexe

Unter Lipoplexen versteht man Komplexe aus Nukleinsäuren (Plasmid-DNA, Antisense-Oligonukleotide oder siRNA) mit kationischen Lipiden. Ihr Einsatz als Gentransfersystem geht auf eine Publikation von Felgner et al. [218] im Jahr 1987 zurück. Darin wurde erstmals über die erfolgreiche *Lipofektion* von Plasmid-DNA

als Komplex mit äquimolaren Mengen des kationischen Lipids Dioleoyltrimethylammoniumchlorid (DOTMA) und DOPE *in vitro* berichtet. Seitdem sind eine Vielzahl weiterer kationischer Lipide als Transfektionsvermittler entwickelt worden, denen ein amphiphiler Aufbau gemeinsam ist: Als hydrophobe Reste dienen in der Regel Cholesterol-Derivate bzw. eine oder mehrere (un-)gesättigte Kohlenstoffketten. Diese sind über ein Bindeglied mit einer kationischen Kopfgruppe verknüpft, die häufig aus einer unterschiedlich substituierten Aminogruppe besteht [219]. Durch Modifikationen des Bindeglieds kann die chemische und metabolische Stabilität gesteuert werden [219]. Maßgeblich für die Transfektionseffizienz scheint insbesondere die Beschaffenheit der kationischen Kopfgruppe zu sein [220]. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters lagern sich kationische Lipide in wässrigem Milieu spontan zu Aggregaten zusammen. Deren Morphologie hängt von der Geometrie der eingesetzten Lipide ab, insbesondere vom Größenverhältnis des hydrophoben Restes zur kationischen Kopfgruppe [219].

Um die Transfektionseigenschaften von Lipoplexen zu verbessern, werden den kationischen Lipiden häufig neutrale *Helferlipide* beigemischt. *In vitro*-Studien zeigten, dass der Zusatz äquimolarer Mengen DOPE die Transfektionseffizienz von Lipoplexen erhöht [221–223]. Als Ursache hierfür wird eine verbesserte intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäure aus dem Lipoplex nach Kontakt mit der Zellmembran angenommen, die auf den fusogenen Eigenschaften des DOPE beruht (s. Kapitel 2.2.2).

Zur Herstellung von Lipoplexen werden Nukleinsäuren nachträglich zu vorgefertigten Lipidpartikeln hinzugefügt. Die Bildung der Lipoplexe läuft dabei in einem zweistufigen, Entropie-vermittelten Prozess ab. Der erste, schnell ablaufende Schritt beinhaltet die exotherme Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und kationischen Lipiden. Dabei bleibt die ursprüngliche Struktur der Lipidaggregate erhalten. In einer zweiten, endothermen Reaktion findet die Fusion und Neuordnung der Lipide statt [224, 225].

Mittels Röntgendiffraktometrie konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lipoplex-Strukturen existieren [226–228]. Lipoplexe können multilamellar (L^C_α) vorliegen, wobei jeweils eine Nukleinsäure-Monoschicht *sandwichartig* zwischen zwei Lipiddoppelmembranen eingelagert ist (s. Abbildung 2.8, (A)). Des Weiteren wurden invers-hexagonale Strukturen (H^C_{II}) beschrieben. Hier bilden die Lipide röhrenförmige inverse Mizellen aus, die sich in hexagonalen Gittern anordnen und in ihrem wässrigen Kern die Nukleinsäuren einschließen (s. Abbildung 2.8, (B)).

Auch wenn die Herstellung trivial erscheint, nehmen viele Parameter Einfluss auf die physiko-chemischen Eigenschaften der entstehenden Lipoplexe wie Größe, Zetapotential, Phasenverhalten und Stabilität. Dazu gehören außer der Wahl des

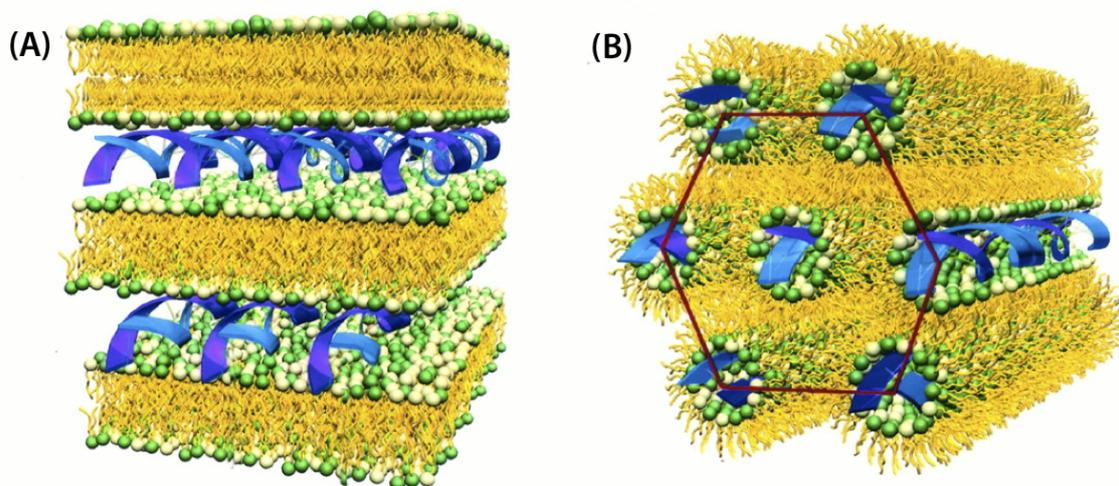


Abb. 2.8.: Schematisch dargestellte Lipoplex-Strukturen. (A) Lamellare Struktur (L^C_α) mit alternierend angeordneten Lipiddoppelmembranen und Nukleinsäure-Monoschichten. (B) Invers-hexagonale Struktur (H^C_{II}) mit zylindrischen Invers-Mizellen, in deren wässrige Kerne die Nukleinsäuren eingelagert sind. (blau: Nukleinsäuren, gelb: hydrophobe Lipidreste, weiß/grün: hydrophile Lipid-Kopfgruppen.) (Abbildung modifiziert nach [226].)

kationischen Lipids die Art und Konzentration beigemischter Helferlipide, die Ionenstärke des umgebenden Puffers, das Lipid:DNA-Verhältnis, die Temperatur und nicht zuletzt das Herstellungsverfahren [229]. Viele Studien belegen eine Abhängigkeit des Transfektionspotentials von der Lipoplexstruktur, allerdings ist der Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt und wird zum Teil kontrovers diskutiert [229, 230].

Im Vergleich zu anderen nicht-viralen Transfektionsvektoren weisen Lipoplexe ausgezeichnete *in vitro*-Transfektionseigenschaften auf. Darin begründet liegt ihre verbreitete Vermarktung als kommerzielle Transfektionsreagenzien für den industriellen Gebrauch oder zu Forschungszwecken. Eine Anwendung *in vivo* und damit zu therapeutischen Zwecken kann allerdings durch mehrere Faktoren limitiert sein: Wiederholt wurden bei der Behandlung mit Lipoplexen zytotoxische Effekte beobachtet [231–233]. Außerdem zeigen Lipoplexe nach der systemischen Applikation häufig unzureichende Zirkulationshalbwertszeiten: Aufgrund ihrer positiven Ladung reagieren Lipoplexe mit negativ geladenen Serumkomponenten, wodurch eine schnelle Inaktivierung des Transfektionssystems bewirkt wird [234, 235]. Als Erklärung ist eine Destabilisierung der Lipoplexstruktur und Freisetzung der Nukleinsäuren denkbar [236]. Zum anderen fördert die Opsonierung der Lipoplexe deren rasche Aufnahme durch Zellen des retikuloendothelialen Systems und hat eine massive Lipoplex-Anreicherung in Lunge, Milz und Leber zur Folge [237–239]. Damit ist der zielgerichtete Nukleinsäuretransport zu anderen Organen stark eingeschränkt.

Verschiedene Modifikationen wurden vorgenommen, um diese Probleme zu überwinden. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Cholesterol als Helferlipid eine Stabilisierung des Lipid-Nukleinsäure-Komplexes in Gegenwart von Serum bewirkt [236], die zu erhöhten Transfektionsraten *in vivo* führt [240, 241]. Weitere Arbeiten befassten sich mit Modifikationen zur Abschirmung der kationischen Ladung z.B. durch Zusatz PEGylierter Lipide [242–245], der Kopplung selektiver Liganden für einen zielzellspezifischen Nukleinsäuretransport und eine verbesserte zelluläre Aufnahme [215, 246] sowie der Synthese bioabbaubarer Lipide zur Reduktion toxischer Effekte [247–249].

2.3.2. Liposomen als Gentransfersystem

Auch die in Kapitel 2.2.2 ausführlich beschriebenen Liposomen mit ihren zahlreichen Modifikationen können als Gentransfersystem eingesetzt werden. Im Gegensatz zu Lipoplexen weisen Liposomen als vesikuläre Partikel aus Phospholipiddoppelmembranen klar definierte Strukturen auf. Die Beladung mit Nukleinsäuren erfolgt anders als bei Lipoplexen bereits während der Herstellung der Lipidpartikel, so dass die Nukleinsäuren in Liposomen vollständig verkapselt vorliegen. Da auch Liposomen kationische Lipidanteile beinhalten können und der Begriff *kationische Liposomen* in der Literatur häufig synonym für Lipoplexe verwendet wird, ist die Einordnung eines lipidbasierten Nukleinsäuretransporters jedoch nicht immer eindeutig.

Noch vor der Entwicklung der Lipoplexe wurde Ende der 70er Jahre erstmals über den erfolgreichen Einschluss von Nukleinsäuren in große, meist negativ geladene Liposomen berichtet [251–253]. Weitere Studien zeigten, dass mit deren Hilfe eine Transfektion *in vitro* und *in vivo* möglich ist [254, 255]. Außer der anfänglich verwendeten langkettigen DNA/RNA bzw. Plasmid-DNA sind mittlerweile auch niedermolekulare Nukleinsäuren wie Antisense-Oligonukleotide oder siRNA zum Zweck der RNA-Interferenz in Liposomen verkapselt worden [217].

Obwohl sich Liposomen im Vergleich mit Lipoplexen durch eine verbesserte Pharmakokinetik und geringere Toxizität auszeichnen, ist ihre Anwendung als Transfektionsvermittler dennoch wenig verbreitet. Ein Grund scheint insbesondere die schlechte Beladungseffizienz der Liposomen zu sein, die sich aus dem passiven Einschlussverfahren ergibt. Für die Verkapselung von siRNA bzw. von Oligonukleotiden in neutrale/anionische Liposomen werden zumeist niedrige Einschlußraten von 3 – 25% gefunden [256–260]. Diese können durch den Einsatz kationischer Lipidmischungen erheblich verbessert werden [175]. Bei kationischen Liposomen ist allerdings wiederum mit den für Lipoplexen beschriebenen Schwierigkeiten *in vivo* zu rechnen (s. Kapitel 2.3.1).

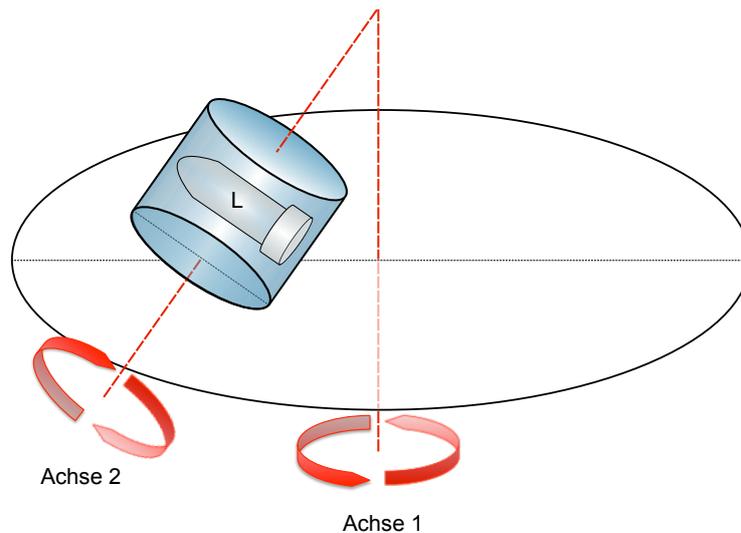


Abb. 2.9.: Schematische Zeichnung der Dualen Asymmetrischen Zentrifugation. Während der Dualen Asymmetrischen Zentrifugation wird eine hochkonzentrierte Lipiddispersion (L) simultan um die Hauptachse der Zentrifuge (Achse 1) sowie in entgegengesetzter Drehrichtung um die eigene vertikale Achse (Achse 2) rotiert. Durch die Drehung um Achse 1 entstehen Zentrifugalkräfte, die die Lipiddispersion auswärts beschleunigen. Gleichzeitig wirken durch die Rotation um Achse 2 einwärts gerichtete Kräfte auf die Lipiddispersion ein, die auf der Adhäsion der Phospholipide an die Gefäßwand beruhen. Durch Überlagerung dieser entgegengesetzt gerichteten Kräfte kommt es zur Ausbildung eines homogenen vesikulären Phospholipidgels. (Abbildung modifiziert nach [250]).

Mithilfe eines speziellen Zentrifugationsverfahrens zur Liposomenherstellung gelang es Hirsch et al. [250], auch bei Verwendung neutraler Lipide Einschussraten bis zu 71% zu erzielen. Bei der sogenannten *Dualen Asymmetrischen Zentrifugation* (DAC) rotiert eine hochkonzentrierte viskose Lipiddispersion, die die einzuschließende Nukleinsäure enthält, nicht nur um die Hauptachse der Zentrifuge, sondern simultan in entgegengesetzter Drehrichtung um ihre eigene vertikale Achse (s. Abbildung 2.9). Durch die sich überlagernden, entgegengesetzt gerichteten Bewegungen wirken hohe Scherkräfte auf die Lipiddispersion ein, die zur Bildung eines homogenen vesikulären Phospholipidgels führen. Nach anschließender Dispergierung in wässrigem Medium erhält man kleine homogene Liposomen mit hohen Beladungsraten.

Einen weiteren Nachteil liposomaler Transfektionsvermittler – insbesondere bei Verwendung neutraler/anionischer Lipidzusammensetzungen – stellt deren mangelnde Affinität zur negativ geladenen Zellmembran und damit eine erschwerte zelluläre Aufnahme dar. Durch Kopplung spezifischer Rezeptorliganden oder durch Einsatz fusogener Lipide gelingt es jedoch, die Transfektionseigenschaften von Liposomen zu verbessern [261, 262].

Eine Übersicht über Liposomen zur Transfektion von siRNA gibt Tabelle 2.5.

Tab. 2.5.: Liposomen als Vektoren für die Transfektion von siRNA.

verwendete Lipide	Erkenntnis	Referenz
PC:Chol:DOTAP: PEG-DSPE: R8-PEG-DSPE	Kationische Arginin-Oktamer-modifizierte siRNA-Liposomen sind serumstabil, weisen nur sehr geringe Zytotoxizität auf und führen in <i>in vitro</i> -Transfektionsexperimenten zu einer effektiven Expressionshemmung des Zielproteins.	[263]
DPPG:DPPC: PEG-DPPE	Obwohl die Formulierung als Liposomen die siRNA-Aufnahme in Zellen signifikant verbessert, wird keine RNA-Interferenz beobachtet. Als Ursache wird eine mangelnde endosomale Freisetzung der siRNA vermutet.	[264]
PC:DAP	Liposomen mit pH-sensitiver PEG-Ummantelung als siRNA-Träger führen zu einer verbesserten Genstilllegung <i>in vitro</i> im Vergleich zu pH-insensitiven Liposomen.	[265]
DOPC:Tween20	Die intravenöse oder intraperitoneale Gabe liposomaler siRNA gegen EphA2-Tyrosinkinase-Rezeptor, fokale Adhäsionskinase (FAK), Interleukin-8 bzw. Thrombinrezeptor reduziert das Tumorstadium in verschiedenen Tumor-Tiermodellen.	[266–271]
POPC:DDAB: PEG-DSPE	Immunoliposomal verkapselte CD40-siRNA zeigt eine spezifische Anreicherung in dendritischen Zellen (DC) <i>in vitro</i> bzw. in DC-reichen Organen <i>in vivo</i> . Im Tiermodell reduziert die intravenöse Gabe die CD40-Expression dendritischer Zellen und induziert DC-vermittelte immunomodulatorische Effekte.	[259, 272]
EPC:Chol: PEG-DSPE	Durch Kopplung eines α -CD33-scFv an siRNA-haltige Liposomen kann eine spezifische Bindung und Aufnahme der siRNA in CD33 ⁺ -Zellen erreicht werden. Dies führt zu einer verbesserten Herunterregulierung der siRNA-Zielstruktur auf mRNA- sowie Proteinebene im Vergleich zu ungekoppelten Liposomen.	[260]
POPC:Chol: PEG-DSPE: MalPEG-DSPE: SAINT-C18	Im Gegensatz zu neutralen IL gelingt mithilfe von kationischen SAINT-C18-haltigen IL eine signifikante Expressionshemmung <i>in vitro</i> . Allerdings bleibt ungeklärt, ob dies auf einer Verbesserung der Transfektionseigenschaften oder auf dem erhöhten siRNA-Einschluss durch Verwendung kationischer Lipide beruht.	[175]

DAP Dioleoyldimethylammoniumpropan; **DDAB** Dimethyldioctadecylammoniumbromid; **DOPC** Dioleoylphosphatidylcholin; **DPPC** Dipalmitoylphosphatidylcholin; **DPPG** Dipalmitoylphosphatidylglycerol; **IL** Immunoliposomen; **PC** Phosphatidylcholin; **PEG-DPPE** PEG-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin; **R8-PEG-DSPE** Octaarginin-PEG-DSPE

2.3.3. Stabilized plasmid-lipid particles (SPLP)

Wheeler et al. [273] beschrieben 1990 erstmals die effiziente Verkapselung von Plasmid-DNA (50 – 70%) in PEGylierte Lipidpartikel mit ca. 100 nm Durchmesser, die als *stabilized plasmid-lipid particles* (SPLP) bezeichnet werden. SPLP weisen sowohl die vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften von Liposomen als auch das Transfektionspotential von Lipoplexen auf. Dies ist auf die Verwendung einer Lipidmischung mit geringem Anteil kationischer Lipide zurückzuführen, deren Ladung durch Zusatz PEGylierter Lipide nach außen jedoch weitgehend abgeschirmt wird [274].

Die Herstellung von SPLP erfolgt mithilfe einer Detergenz-Dialysiermethode, bei der die verwendeten Lipide zunächst solubilisiert durch Zusatz des Detergenzes Octylglucosid (OG) als Mischmizellen in einer Plasmid-haltigen Lösung vorliegen. Die ursprünglich eingesetzte Lipidmischung besteht aus einem großen Anteil des fusogenen Lipids DOPE (84 mol%), geringen Mengen des kationischen Lipids DODAC (6 mol%) sowie 10 mol% eines PEGylierten Ceramids (PEG-Cer) [273]. Während der Entfernung des zugesetzten Detergenz mittels Dialyse kommt es zur Umlagerung der Lipide zu kleinen homogenen Vesikeln, in die die Plasmide eingelagert sind (s. Abbildung 2.10). Aus dem resultierenden DNA:Lipid-Verhältnis und der durchschnittlichen Partikelgröße von ca. 100 nm lässt sich ableiten, dass ein SPLP genau eine Plasmid-DNA umschließt [273]. Die Formierung von SPLP gelingt allerdings nur bei einem kritischen DODAC-Gehalt von 6 mol%. Höhere Konzentrationen des kationischen Lipids führen zur Aggregatbildung, während bei niedrigeren Konzentrationen kein oder nur geringer Plasmideinschluss beobachtet wird [273]. Daraus ergibt sich die in Abbildung 2.11 erläuterte Hypothese zur SPLP-Entstehung während der Dialyseprozedur.

Um die *in vitro*-Transfektionseigenschaften von SPLP zu verbessern, wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen. Als besonders entscheidend für das Transfektionsvermögen von SPLP erwies sich die Länge der Acylseitenkette des eingesetzten PEG-Ceramids. So resultiert die Verwendung kurzkettiger Acylreste in einem drastischen Anstieg der Transfektion *in vitro* [273, 278]. Dies scheint auf der kürzeren Verweildauer dieser Ceramide innerhalb der Partikelmembran zu beruhen: Es wird angenommen, dass die schnelle Dissoziation kurzkettiger Ceramide zu einer Destabilisierung der SPLP und einer verbesserten Interaktion mit der Zellmembran führt. Die Variation der verwendeten PEG-Kettenlänge (PEG₇₅₀, PEG₂₀₀₀, PEG₅₀₀₀) dagegen hat nur einen untergeordneten Einfluss auf das Transfektionspotential [278]. Eine Steigerung der *in vitro*-Transfektionsraten gelingt außerdem bei Ersatz des PEG-Ceramids durch ein säure-labiles PEG-Derivat (POD [279]). Dadurch

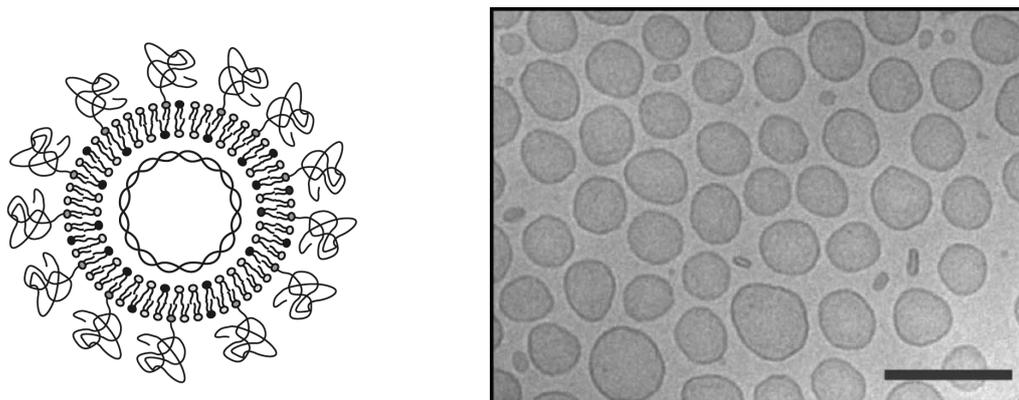


Abb. 2.10.: Die Struktur von SPLP. Links: Schematische Zeichnung des SPLP-Aufbaus (Hypothese). SPLP bestehen aus einer vesikulären Phospholipidmembran, die einen wässrigen Kern umschließt [275]. Pro SPLP liegt jeweils eine Plasmid-DNA vollständig eingelagert vor. Zur Stabilisierung der Struktur werden PEGylierte Lipide verwendet. (Abbildung aus [276].) **Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer SPLP-Präparation.** SPLP weisen Liposomen-ähnliche unilamellare Vesikelstrukturen auf. Sie zeichnen sich durch eine homogene Größenverteilung im Bereich um 100 nm aus. Maßstabsbalken = 200 nm. (Abbildung aus [277].)

werden SPLP mit pH-sensitiven Eigenschaften erhalten (s. Kapitel 2.2.2) [280, 281]. Auch durch den Austausch von DODAC gegen andere kationische Lipide kann die Transfektionseffizienz verbessert werden [278]. Allerdings ist zu beachten, dass bei Nutzung anderer kationischer Lipide der optimale Gehalt für einen maximalen Plasmideinschluss jeweils neu bestimmt werden muss.

Wird die Dialyse in Gegenwart eines Citrat- oder Phosphatsalz-haltigen Puffers durchgeführt, gelingt die Herstellung von SPLP mit hohen kationischen Lipid-Anteilen bis zu 42,5 mol%, die dennoch eine homogene Größenverteilung um 100 nm Durchmesser und Plasmid-Einschlusseffizienzen bis 80% aufweisen [275, 282]. Als Erklärung wird eine verbesserte Abschirmung der kationischen Lipide während der Dialyse durch die erhöhte Ionenstärke des Dialysepuffers postuliert. *In vitro*- und *in vivo*-Experimente zeigten, dass SPLP mit einem DODAC-Gehalt von 24 mol% zu einem optimalen Transfektionsergebnis führen. 24 h nach der intraperitonealen Anwendung dieser SPLP in einem Tumor-Mausmodell war die tumorale Expression des verwendeten Reportergens im Vergleich zur Behandlung mit Lipoplexen (DOPE:DODAC) etwa zehnfach erhöht [275, 282].

Wie zuvor erläutert, erhöhen Ceramide mit kurzkettingen Acylresten die *in vitro*-Transfektionsfähigkeit von SPLP. In Gegenwart von Serum wirken sie aufgrund ihrer kurzen Verweildauer in der Lipidmembran allerdings nicht ausreichend stabilisierend. Daher sind diese zur Herstellung von SPLP für eine systemische Applikation nicht

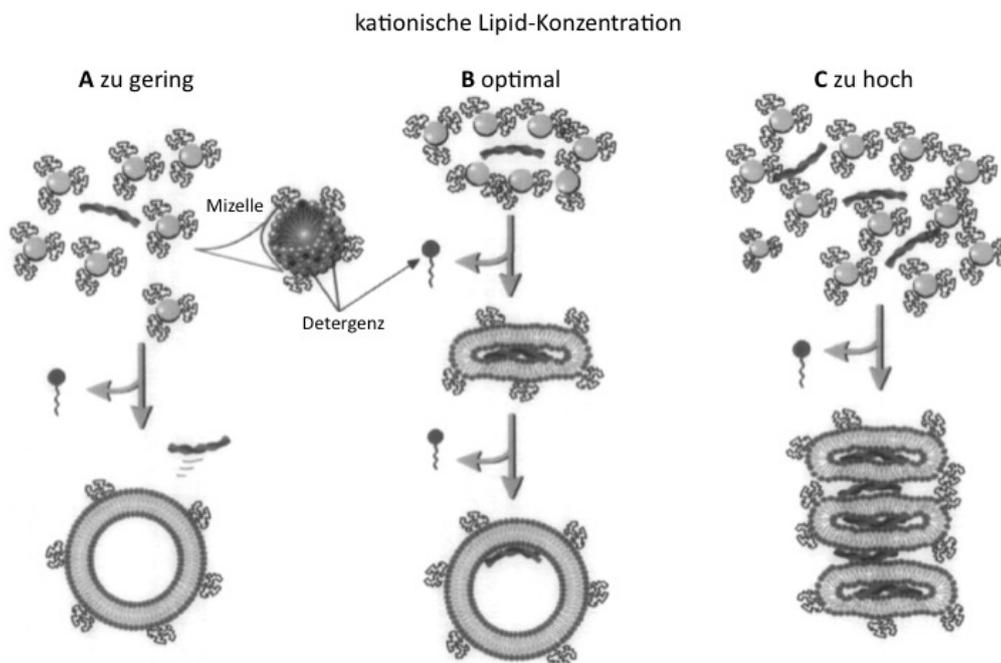


Abb. 2.11.: Modell zur SPLP-Formierung mittels Detergenz-Dialyse. Zu Beginn der Detergenz-Dialyse bilden sich zunächst makromolekulare Lipidintermediate wie Inversmizellen oder lamellare bzw. vesikuläre Strukturen aus. **(A)** Ist der Gehalt an kationischem Lipid zu gering, bleibt die Wechselwirkung der kationischen Lipidintermediate mit der negativ geladenen DNA aus. Dies führt zu geringen Einschussraten. **(B)** Liegen optimale Mengen der kationischen Komponente vor, assoziieren die Lipidintermediate mit exakt einer Plasmid-DNA. Der resultierende Ladungsausgleich verhindert die Anlagerung weiterer Plasmide. Während der weiteren Dialyseprozedur bildet sich eine vesikuläre Lipidhülle um die DNA aus. **(C)** Zu hohe Konzentrationen an kationischen Lipiden führen im Laufe der Dialyse zur Quervernetzung der kationischen Lipidintermediate über die anionische Plasmid-DNA. Somit kommt es zur Zusammenlagerung großer inhomogener Aggregate. (Abbildung aus [276].)

geeignet [275]. Ausreichende Plasmastabilität konnte jedoch für die Formulierung mit PEG-CerC₂₀ gezeigt werden, die zu einer erfolgreichen Transfektion *in vivo* führte [276, 283, 284]: In einem Mausmodell mit subkutanem Lewis-Lungenkarzinom betrug die Plasmahalbwertszeit von SPLP nach intravenöser Gabe $6,1 \pm 1,1$ h (Lipid) bzw. $7,2 \pm 1,6$ h (Plasmid). Lipoplexe aus DODAC:DOPE zeigten unter gleichen Bedingungen kurze Halbwertszeiten von unter 15 min. Zwischen 3 und 10% der injizierten Lipide bzw. 1,5 – 6% der eingesetzten Plasmidmenge akkumulierten im Tumor. Daraus resultierte eine signifikante Expression des verwendeten Reportergens. Die Behandlung mit Lipoplexen oder nackter DNA dagegen führte zu keiner signifikanten tumoralen Plasmidanreicherung.

Basierend auf diesen Erkenntnissen erscheinen SPLP als aussichtsreiche Kandida-

ten für zukünftige Anwendungen zu gentherapeutischen Zwecken. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von Weeke-Klimp et al. [285] keine Transfektion *in vivo* beobachtet werden, obwohl die Lactoferrin-gekoppelten PEG-CerC₁₆-SPLP nach intravenöser Gabe eine spezifische Anreicherung in Hepatozyten zeigten. Als Ursache vermuten die Autoren eine mangelnde intrazelluläre Plasmidfreisetzung aus den Lipidvesikeln.

Stabilized antisense-lipid particles und Stabilized nucleic acid-lipid particles

Analog zu SPLP sind Systeme für die Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden oder siRNA entwickelt worden, die als *stabilized antisense-lipid particles* (SALP) bzw. *stabilized nucleic acid-lipid particles* (SNALP) bezeichnet werden und der Vollständigkeit halber kurz vorgestellt werden sollen. Wie SPLP zeichnen sich S(N)ALP durch ihre geringe Größe und homogene Struktur, durch gute Nukleinsäure-Einschlussquoten sowie durch hohe Serumstabilität und lange Zirkulationshalbwertszeiten aus [286, 287]. Obwohl ihre Lipidzusammensetzungen mit der von SPLP vergleichbar sind, werden zur Herstellung andere Verfahren herangezogen [277, 287]: Die in Ethanol gelösten Lipide werden entweder schritt- oder tropfenweise zu einer Nukleinsäure-haltigen Lösung zugegeben, so dass sich bei einem resultierenden Ethanolgehalt von 40% spontan kleine, homogene Vesikel mit hohen Nukleinsäure-Einschlussraten von 65–80% bilden. Bei Bedarf kann eine Extrusion durch eine Polycarbonatmembran zur weiteren Homogenisierung angeschlossen werden. Zur Entfernung des Ethanols wird die Präparation anschließend dialysiert.

Mehrere *in vivo*-Studien untersuchten die therapeutische Wirksamkeit von SNALP in der Behandlung verschiedener Krankheiten. So konnte durch SNALP-vermittelte RNA-Interferenz die Replikation von Hepatitis B-Viren bzw. von Ebola-Viren im Tiermodell signifikant reduziert werden [288, 289]. Eine weitere Arbeit belegte die Eignung von SNALP als Tumorthapeutikum an zwei unterschiedlichen Tumormausmodellen [290]: Dabei konnte jeweils eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden. Zimmermann et al. [291] nutzten SNALP zur Behandlung der Hypercholesterinämie bei Affen. Die einmalige systemische Gabe von SNALP-formulierter Apolipoprotein B (Apo B)-siRNA verringerte die Menge an Apo B-mRNA in der Leber dosisabhängig um bis zu 90%. Daraus resultierte eine signifikante Senkung der Apo B-Protein-, Cholesterol- sowie LDL-Spiegel im Serum.

Der herausragende Erfolg dieser Studien ist auf synergistische Effekte zurückzuführen, die sich aus der Verwendung wirksamer Transfektionssysteme in Kombination mit dem therapeutischen Potential der RNA-Interferenz ergeben.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.1.: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaugvorrichtung	Biochem-VacuuCenter BVC 21	Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	AutoFlow 5500 Air Jacketed CO ₂ Incubator	NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA
Duale Asymmetrische Zentrifuge	FlackTek SpeedMixer TM DAC 150 FVZ	Hauschild GmbH & Co. KG, Hamm, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur mit BD TM High Throughput Sampler	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbehältnis	Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International, Hereford, Großbritannien
Elektrophoreseapparatur	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Peqlab Modell 40-0911	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlange, Deutschland
Elektrophorese-Stromgeber	EC 250-90	Life Sciences Int. GmbH, Frankfurt, Deutschland
Elektrophorese-Stromgeber	PowerPack 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eppendorf-Mischer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Extruder	Lipex TM 10 ml Thermobarrel Extruder	Lipex TM Biomembranes, Inc., Vancouver, Kanada
Fluoreszenzmikroskop, invers	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Tab. 3.1.: (Fortsetzung – Geräte)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Geldokumentationssystem	Universal Hood II Geldoc	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Horizontalschüttler	Kompaktschüttler KS-15B	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Mehrfachdispenser	Handystep [®] electronic	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Nikon Eclipse Ti	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Labormikroskop, invers	Wilovert Standard HF	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laserdiffraktometer	Malvern Autosizer IIC mit Autosizer Correlator Series 7032	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien
Laserdiffraktometer	Nicomp submicron particle analyzer model 380	Nicomp Inst. Corp., Santa Barbara, CA, USA
Magnetrührer	IKAMAG [®] RCT	IKA [®] -Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mehrkanalpipette	Transferpette [®] S-12	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mikro-Dialysierkapsel	QuixSep 1,0 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroliter-Pipette 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Research [®] (variabel)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliter-Pipette 50 – 200 µL	Reference [®] (variabel)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliter-Pipette 500 – 5000 µL	Transferpette [®] S	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mikroliterzentrifuge	mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliterzentrifuge	Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät	FLUOstar Optima	BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer	Multiscan [®] EX	Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	φ 720	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Pumpe	ISM 796	Ismatec SA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Rotationsverdampfer	Rotavapor-Rs	Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Schüttelinkubator	Modell 4520	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Sicherheitswerkbank	Holten Safe 2010	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Trockenschrank	T 5042	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trockenschrank	T 6030	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 102 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls HD2070 mit Mikrospitze MS72	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Tab. 3.1.: (Fortsetzung – Geräte)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
UV-VIS-Photometer	Ultrospec TM 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vakuumpumpe	MZ 2C mit Steuereinheit CVC24	Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Savant SpeedVac SC 110	Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY, USA
Vakuumzentrifuge	Univapo 100H	UniEquip Laborgerätebau und VertriebsgmbH, Martinsried, Deutschland
Videokamera	CSC-795 (PAL)	Pacific Corporation, Tokio, Japan
Vortexer	MS 2 Minishaker	IKA [®] -Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Elix	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Wasserbad	Lauda ecoline Staredition E119	Lauda Dr. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad	Patz HWR	Daglef Patz KG, Wankendorf, Deutschland
Zentrifuge	Allegra TM 25R	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zellzählgerät	Casy [®] 1 Model TT Cell Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

Tab. 3.2.: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Chromatographiesäule	Chromabond [®] Säule 6 mL	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Deckgläser, rund, Ø 18 mm, Stärke 1		Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser, rund, Ø 18 mm, Stärke 3		Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost, Leipzig, Deutschland
Dialysiermembran MWCO 12 – 14 kDa	Spectra/Por Dialysemembran 4	Spectrum [®] Laboratories, Inc. kD, Roncho Dominguez, CA, USA
Dialysiermembran	Nephrophan [®]	VEB Filmfabrik Wolfen, DDR
Dispenserspitzen 2,5 mL bzw. 12,5 mL	Plastibrand [®] PD-Tips	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Tab. 3.2.: (Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien)

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Einmalpipette 10 mL bzw. 25 mL, steril		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritze	Injekt 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glasperlen Ø 1 mm		Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasperlen Ø 2,5 mm		Bio-Spec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA
Halbmikro-Küvette	Halbmikro-Küvette PMMA	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Impföse	I 612-9355	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc CryoTubes™ Kat.-Nr. 377224	Nalge Nunc International, Hereford, Großbritannien
Kulturflasche 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , mit Filter	Cellstar® Filter Top	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
6-, 24-, 96-Loch-Platte für die Zellkultur	Cellstar® Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Platte schwarz mit F-Boden, unsteril	Kat.-Nr. 655 075	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Platte transparent mit V-Boden, unsteril	Kat.-Nr. 651 101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger, geschnitten, mit Matt- rand		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipette 145 mm bzw. 225 mm, aus Glas		Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen (90 × 14 mm)		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
pH-Papier		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitze 10 µL, 200 µL, 1000 µL	TipOne® Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitze 5 mL	Plastibrand® Universalspitze	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze 10 µL, 200 µL, 1000 µL, mit Filter	TipOne® Filter Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Plasmid-Aufreinigungskit	GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Polycarbonatfilter Porengröße 100 nm	Isopore® Membranfilter VCTP 02500	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Polycarbonatfilter Porengröße 200 nm	Isopore® Membranfilter GTTP 02500	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
PP-Röhrchen 15 mL bzw. 50 mL	Art.-Nr. 188271 bzw. 227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 3.2.: (Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien)

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäß 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL		Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 mL, RNase-frei	Biosphere [®] SafeSeal MicroTube	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2,0 mL für DAC	Safe-Lock Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Ultra-Mikro-Küvette aus Quarzglas	Hellma Präzisionsküvette 105.020-QS 10 mm	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Zellzählgefäß	CASY [®] cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

3.1.2. Chemikalien

Tab. 3.3.: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Lösung (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bacillo [®] AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Bond Breaker [™] TCEP Solution	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
Bovines Serumalbumin, Fraktion V ≥ 96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Brilliant Blau G250	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
6-Carboxyfluorescein	ACROS Organics, Geel, Belgien
CASY [®] ton-Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

Tab. 3.3.: (Fortsetzung – Chemikalien)

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DEPC	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
DMEM D6546	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Größenstandard Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA-Lösung (0,02%) E8008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA-di-Natrium 0,1 M	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland
Essigsäure > 99,5%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen Deutschland
Ethanol 96% (V/V), technisch	Hofmann Chemie Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanol, absolut	Malinckrodt Baker BV, Deventer, Niederlande
FACS flow TM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS rinse TM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS clean TM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoromount TM Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fugene [®] 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Fetales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gel Loading Dye Blue 6x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HiPerFect	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Cystein	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 3.3.: (Fortsetzung – Chemikalien)

Chemikalie	Hersteller
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Melsept SF	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat-Lösung 3M, pH 5,2	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge 1 M	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
n-Octyl- β -D-glucopyranosid	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Paraformaldehyd 98%	MTM Research Chemicals, Lancashire, Großbritannien
Penicillin-Streptomycin-Lösung P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphorsäure 85%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PicoGreen [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Proteinmarker IV	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Puromycin-dihydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
RedSafe [™] Nucleic Staining Solution 20.000 \times	iNtRON Biotechnology Co., Seongnam, Korea
Salzsäure 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sepharose 4B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Standardpuffer pH 4,01; 7,01; 10,01	Hanna Instruments, Tanneries Cedex, Frankreich
Stickstoff	Paxair GmbH, Bonn, Deutschland
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TNF- α murin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 3.3.: (Fortsetzung – Chemikalien)

Chemikalie	Hersteller
Trypsin (0,05%)/EDTA(0,02%)-Lösung	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

3.1.3. Lipide

Tab. 3.4.: Lipide

Bezeichnung	Struktur	Lipid	Hersteller
CHEMS	s. Abb A.3	Cholesterylhemisuccinat (Morpholino - Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Chol	s. Abb A.3	Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DC-Chol	s. Abb A.2	3 β -[N-(Dimethylaminoethan)carbonyl]cholesterolchlorid	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DiD		1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin-4-chlorobenzensulfonat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DiO		3,3'-Dioctadecyloxacarbocyaninperchlorat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DOPE	s. Abb A.3	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DOTAP	s. Abb A.2	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropanmesylat	Acros Organics, Geel, Belgien
DOTMA	s. Abb A.2	1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammoniumpropanchlorid	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
MalPEG-DSPE	s. Abb A.1	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[maleimid(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium-Salz)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
mPEG-DSPE	s. Abb A.1	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglycol)-2000] (Ammonium-Salz)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
SPC	s. Abb A.3	Soja-Phosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
PEG-CerC ₈	s. Abb A.1	N-Octanoylsphingosin-1-{succinyl[methoxy(polyethylen-glycol)-2000]}	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
POPC	s. Abb A.3	Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA

3.1.4. Antikörper

Tab. 3.5.: Antikörper/-fragmente

Antikörper / -fragment	Hersteller
α-Maus-CD106 (VCAM-1), FITC; Klon: M/K-2, Isotyp: Ratte IgG _{1κ}	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
α-Maus-CD105 (Endoglin); Klon: 209721, Isotyp: Ratte IgG _{2A}	R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
α-Ratte-Ig, FITC; Klon: polyklonal, Isotyp: Ziege Ig	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
α-Maus-CD105 (Endoglin) scFv' mE12 [292]	zur Verfügung gestellt durch AG Kontermann, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Deutschland

3.1.5. Nukleinsäuren

Tab. 3.6.: siRNA

siRNA	Sequenz	Hersteller
siGENOME SMARTpool Mouse VCAM-1	CAUCUAAGAGUGUCAAGA GGCAGGAAGUUAGAUAAUG GGAGACAUGGUAUUAAGU UCGGGAUGAUCGUUUUUUU	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
siGLO Green Transfection Indicator		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tab. 3.7.: Plasmide

Bezeichnung	Insert	Vektor	Hersteller
GFP	eGFP	pcDNA3	zur Verfügung gestellt durch AG Kassack, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf, Deutschland
VCAM-shRNA Klon 1	CCGGCCAGATAGACAGCCCCTAAACTCGA-GTTTAGTGGGCTGTCTATCTGGTTTTTG	pLKO.1-puro	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-shRNA Klon 2	CCGGCCCTTTGACCATCTGGAGATTCTCGA-GAATCTCCAGATGGTCAAAGGGTTTTTG	pLKO.1-puro	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-shRNA Klon 3	CCGGCCAAATTGATTCTACTCAACTCGA-GTTGAGTGTAGAATCAATTTGGTTTTTG	pLKO.1-puro	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-shRNA Klon 4	CCGGCGAGGCTGGAATTAGCAGAAACTCGA-GTTTCTGCTAATTCCAGCCTCGTTTTTG	pLKO.1-puro	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-shRNA Klon 5	CCGGCCAGATAGACAGCCCCTAAACTCGA-GTTTAGTGGGCTGTCTATCTGGTTTTTG	pLKO.1-puro	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

3.1.6. Puffer und Lösungen

Bromphenolblau-Lösung

10 μ L Ethanol 96%
~1 mg Bromphenolblau
ad 10,0 mL Aqua dem.

Da es sich bei Bromphenolblau-Lösung um eine gesättigte Lösung handelt, muss der ungelöste Farbstoffanteil durch Zentrifugation abgetrennt werden, bevor der Überstand zur Herstellung des Probenauftragspuffers verwendet werden kann. Die Lagerung erfolgt bei -20°C .

Calciumpuffer 40 mM

8,88 g Calciumchlorid wasserfrei
ad 2 000,0 mL HBS

6-CF-Lösung 0,1 M

376 mg 6-Carboxyfluorescein
ad 10,0 mL Aqua dem.

Das abgewogene 6-Carboxyfluorescein wird in 6 mL Aqua dem. suspendiert und durch Zutropfen von $\text{NaOH}_{\text{konz.}}$ in Lösung gebracht. Anschließend wird der pH-Wert mit $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung mit Aqua dem. ad 10 mL aufgefüllt.

Citratpuffer x mM, x = 60, 80, 100

35 bzw. 47 bzw. 59 mg Natriumcitrat-Dihydrat
ad 2 000,0 mL HBS

Der Puffer wird durch Zusatz von $\text{NaOH}_{\text{konz.}}$ auf pH 7,2 eingestellt.

3. Material und Methoden

Elektrophorese-Laufpuffer

14,0 g Glycin
3,0 g Tris
1,0 g SDS
ad 1 000,0 mL Aqua dem.

Der pH-Wert wird durch Zusatz von NaOH_{konz.} auf pH 8,9 eingestellt. Der Puffer wird bei 4 °C gelagert.

HBS

35,0 g Natriumchlorid
4,8 g HEPES
ad 2 000,0 mL Aqua dem.

Der Puffer wird durch Zusatz von NaOH_{konz.} auf pH 7,4 eingestellt.

L - Cystein 100 mM

61 mg L-Cystein
100 µL EDTA-Lösung 0,1 M
ad 5,0 mL Aqua dem.

Die Lösung wird durch Zusatz von NaOH_{dil.} auf pH 5,5 eingestellt, anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

KHP (5× Konzentrat)

17,25 g Natriumchlorid
5,96 g HEPES (freie Säure)
5,79 g Glucose-Monohydrat
882 mg Natriumhydrogencarbonat
876 mg Kaliumchlorid
408 mg Kaliumdihydrogenphosphat
ad 500,0 mL Aqua dem.

Das Pufferkonzentrat wird aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

KHP

50,0 mL KHP (5× Konzentrat)
325 µL Calciumchloridlösung 1 M
325 µL Magnesiumsulfatlösung 1M
ad 250,0 mL Aqua dem.

Der Puffer wird auf pH 7,4 eingestellt, anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Kopplungspuffer

1,19 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
0,42 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
1,75 g Natriumchlorid
2,0 mL EDTA-Lösung 0,1 M
ad 1 000,0 mL Aqua dem.

Der Puffer wird durch Zusatz von $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ auf pH 6,7 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wird der Puffer zur Vertreibung von Sauerstoff für 30 min mit Stickstoff begast.

OG-HBS 0,2 M

585 mg Octylglucosid
ad 10,0 mL HBS

PBS

8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
1,3 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat
ad 1 000,0 mL Aqua dem.

Der Puffer wird durch Zusatz von $\text{NaOH}_{\text{konz.}}$ auf pH 7,4 eingestellt.

3. Material und Methoden

Phosphatpuffer x mM, x = 100, 150

5,8 g Natriumchlorid
36 bzw. 53 mg Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
ad 2 000,0 mL Aqua dem.

Der Puffer wird durch Zusatz von NaOH_{konz.} auf pH 7,4 eingestellt.

Probenauftragpuffer (PAP)

1,8 mL Tris-HCl pH 6,8
1,5 mL Glycerol
5,0 mL SDS-Lösung 10 %
1,25 mL Bromphenolblau-Lösung

Der Probenauftragpuffer wird in Aliquots bei -20°C gelagert.

Sensitive Coomassie-Lösung

200 mg Brilliant Blau G 250
23,5 g Phosphorsäure 85%
50,0 g Aluminiumsulfat $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{H}_2\text{O})_x, x = 14-18)$
100,0 mL Ethanol 96%
ad 1 000,0 mL Aqua dem.

Die fertige Lösung enthält kleine blaue Partikel, die nicht abfiltriert werden dürfen. Vor Gebrauch ist die Lösung zu schütteln.

TAE-Puffer

484 mg Tris
57,1 mL Eisessig
1,1 mL EDTA-Lösung 0,5 M
ad 1 000,0 mL Aqua dem.

Der pH-Wert wird auf pH 8,0 eingestellt.

TE-Puffer

39 mg Tris-HCl
250 µL EDTA-Lösung 0,1 M
ad 25,0 mL Aqua dem.

Die pH-Wert-Einstellung erfolgt mit HCl_{konz.} auf pH 7,5.

Waschpuffer 1

2,5 g BSA
ad 500,0 mL PBS pH 7,4

Der Puffer wird sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Waschpuffer 2

2,5 g BSA
0,5 g Natriumazid
ad 500,0 mL PBS pH 7,4

Der Puffer wird sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.1.7. Software

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Programme verwendet:

- CellQuest™ Pro Version 5.2.1, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- BD™ PlateManager Vesion 1.0.1, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Die Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mit folgenden Programmen:

- GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
- Microsoft® Excel® 2008 für Mac, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- WinMDI 2.8, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
- Imagoquant MultiTrack-AVI-2, Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland

- Adobe® Photoshop® Elements 6 für Mac, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
- Adobe® Photoshop® CS3, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland

Zur Erstellung der schematischen Zeichnungen wurde folgende Software verwendet:

- Microsoft® PowerPoint® 2008 für Mac, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Inkscape für Mac, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA

Die Dissertationschrift wurde mit L^AT_EX erstellt.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung wurden aseptisch unter einer Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Diese wurde vor Arbeitsbeginn mit dem Flächen-Desinfektionsmittel Bacillol® AF desinfiziert, ebenso wie sämtliche Materialien, die in die Werkbank eingebracht wurden. Soweit Verbrauchsmaterialien und verwendete Puffer nicht bereits ab Werk keimfrei geliefert wurden, wurden diese durch Autoklavieren sterilisiert (120 °C, 20 min). Die Lagerung der in der Zellkultur eingesetzten Nährmedien, Puffer und Lösungen erfolgte bei 4 – 8 °C. Vor ihrer Verwendung wurden diese auf Raumtemperatur gebracht.

Subkultivierung

Zur Subkultivierung der konfluenten Zellen wurde das Nährmedium aus der Kulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit sterilem PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und diese solange im Inkubator aufbewahrt, bis das Ablösen der Zellen beobachtet werden konnte. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde frisches Nährmedium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein PP-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (4 min, 350 × g, 4 °C; Universal 320R) wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in Medium resuspendiert. Jeweils 1/5 oder 1/10 der Zellen wurden in eine neue Kulturflasche mit frischem Zellkulturmedium ausgesät und bis zur erneuten Konfluenz im Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% weiterkultiviert. Alle 1 – 3 Tage erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums und verbrauchtes Medium wurde durch frisches ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mithilfe des elektrischen Zellzählgeräts CASY[®] 1 Modell TT, dessen Messtechnik auf dem Prinzip des Coulter-Counters beruht. Dazu wurde eine Zellsuspension im Verhältnis 1:500 mit sterilfiltrierter CASY[®] ton-Elektrolytlösung verdünnt und im CASY[®] 1 Modell TT vermessen. Als Ergebnis erhielt man die Konzentration der Ausgangssuspension in Zellen/mL. Des Weiteren wurde ein Graph ausgegeben, in dem die Zellanzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen war. Hieraus konnten Rückschlüsse auf die Zellviabilität gezogen werden.

3.2.2. Zelllinien

Kultivierung der Endothelzelllinie bEnd.3

Bei der Zelllinie bEnd.3 handelt es sich um eine murine Endothelzelllinie, die aus einem Endothelium einer BALB/c-Maus etabliert wurde [293]. Auf bEnd.3-Zellen finden sich Endothel-spezifische Oberflächenproteine, z.B. Endoglin. Die Expression von Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1, VCAM-1 oder Selektinen kann durch Inkubation mit inflammatorischen Zytokinen induziert werden [294, 295].

Als Nährmedium wurde DMEM 6546 unter Zusatz von 10% FKS, 2% L-Glutamin 200 mM sowie 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung verwendet (jeweils [V/V]).

Kultivierung der Endothelzelllinie bEnd.3 VCAM-shRNA

Die Zelllinie bEnd.3 VCAM-shRNA wurde durch stabile Transfektion von bEnd.3-Zellen mit dem Plasmid VCAM-shRNA Klon 1 erzeugt. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression von VCAM-1 nach Stimulation mit TNF- α herunterreguliert.

Zur Selektion der Plasmid-tragenden Zellen wurde das für bEnd.3-Zellen verwendete Nährmedium mit Puromycin (2,75 μ g/mL) versetzt.

Kultivierung der Melanomzelllinie B16F10

Die murine Melanomzelllinie B16F10 [296] exprimiert auf ihrer Oberfläche konstitutiv Integrin $\alpha_4\beta_1$ [297].

Zur Kultivierung wurde DMEM 6546 unter Zusatz von 10% FKS, 1% L-Glutamin 200 mM sowie 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (jeweils [V/V]) verwendet.

3.3. Herstellung Lipid-basierter Trägersysteme

3.3.1. Hydratationsmethode

Zur Herstellung von Liposomen mittels der Hydratationsmethode wurden folgende Lipidmischungen verwendet:

pH-insensitive Liposomen		pH-sensitive Liposomen	
	[mol%]		[mol%]
SPC bzw. POPC	65	DOPE	57
Chol	30	CHEMS	38
mPEG-DSPE	5	mPEG-DSPE	5

Entsprechende Mengen der chloroformigen Lipid-Stammlösungen wurden in einem Rundkolben gemischt. Der Gesamtlipidgehalt betrug jeweils 10 μmol . Die Entfernung des Chloroforms erfolgte im Rotationsverdampfer bei zunächst 250 mbar unter Erwärmung im Wasserbad (40 °C). Sobald kein Lösungsmittel mehr im Kolben zu erkennen war, wurde der entstandene Lipidfilm für 30 min bei maximalem Unterdruck getrocknet.

Zur Hydratisierung des Films wurde sterilfiltrierter HBS pH 7,4 in den Kolben pipettiert, so dass die resultierende Lipidkonzentration 10 mM betrug. Die Dispergierung des Films erfolgte durch manuelles Schütteln des Kolbens nach Zugabe von 5 – 10 Glasperlen (\varnothing 2,5 mm). Nachdem sich der Film vollständig von der Glaswand gelöst hatte, wurde die Liposomendispersion über Nacht auf dem Horizontalschüttler bei 150 U/min weitergeschüttelt.

Die entstandenen multilamellaren Vesikel verschiedener Größe wurden mittels Extrusion homogenisiert (LipexTM 10 ml Thermobarrel Extruder). Der angelegte Druck betrug ca. 20 bar. Zur Erhöhung der Fluidität der Lipide wurde der Extruder über ein angeschlossenes Wasserbad (Lauda Ecoline Staredition E119) auf 40 °C aufgeheizt. Die Präparation wurde zweimal durch eine Polycarbonatmembran mit Porengröße 200 nm gepresst. Es folgten fünf weitere Extrusionsschritte durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmesser.

Die durchschnittliche Größe und die Polydispersität der Präparation wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) (Malvern Autosizer IIC) bestimmt. Bis zur Verwendung wurden die Präparationen bei 4 °C gelagert.

Immunoliposomen

Um die Kopplung von Antikörperfragmenten an die Liposomenoberfläche zu ermöglichen, wurde MalPEG-DSPE als reaktives Ankerlipid während der Liposomenherstellung in die Lipidhülle integriert („konventionelle Kopplungsmethode“, s. Kapitel 2.2.2). Die Präparation der Liposomen erfolgte wie oben beschrieben, wobei der Anteil an mPEG-DSPE in der Lipidmischung durch MalPEG-DSPE ersetzt wurde. Als Hydratationsmedium wurde Kopplungspuffer pH 6,7 verwendet.

Vor der Zugabe zu den Liposomen mussten die *single chain*-Antikörperfragmente (scFv') durch Zugabe von Bond-BreakerTM TCEP Solution (5 µL/100 µg Protein) über 2 h bei Raumtemperatur reduziert werden. Dadurch wurden eventuell ausgebildete intermolekulare Disulfid-Brücken aufgebrochen und die Thiolgruppen der Kopplung an das Ankerlipid zugänglich gemacht. Zur Abtrennung des Reduktionsmittels wurde der Ansatz in einer Mikro-Dialysierkapsel (Dialysemembran Spectra/Por 4 MWCO 12.000 – 14.000 Dalton) für 4 h bei 4 °C gegen desoxygenierten Kopplungspuffer pH 6,7 dialysiert. Nach einem Pufferwechsel wurde die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

Zur Kopplung wurden die reduzierten scFv'-Fragmente zu den Liposomen gegeben (50 µg/µmol Lipid) und bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (150 U/min) über Nacht inkubiert. Die Absättigung freier Maleimidgruppen erfolgte durch Zugabe von L-Cystein (Endkonzentration 1 mM). Ungebundene scFv'-Moleküle wurden mittels Gelfiltration über eine Sepharose 4B-Säule abgetrennt.

Fluoreszenzmarkierungen

Zur Färbung der Lipidhülle wurde der lipophile Fluoreszenzfarbstoff 3,3'-Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat (DiO) ($\lambda_{Ex} = 484 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 508 \text{ nm}$) eingesetzt. Dieser wurde der Lipidmischung vor der Filmbildung als chloroformige Lösung zugefügt (Endkonzentration 0,5 mol%).

Die Versuche zur Freisetzung des liposomalen Inhalts erfolgten mit Liposomen, in die der hydrophile Fluoreszenzmarker 6-Carboxyfluorescein (6-CF) ($\lambda_{Ex} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 517 \text{ nm}$) eingeschlossen wurde. Dazu wurde der trockene Lipidfilm mit einer wässrigen 6-CF-Lösung (0,1 M) hydratisiert und anschließend der nicht eingeschlossene Farbstoff mittels Größenausschlusschromatographie (Sepharose 4B) abgetrennt.

3.3.2. Duale Asymmetrische Zentrifugation

Zur Herstellung von siRNA- bzw. DNA-haltigen Liposomen wurde die Duale Asymmetrische Zentrifugation angewendet (s. Kapitel 2.3.2).

Folgende Lipidmischungen wurden verwendet:

pH-insensitive Liposomen		pH-sensitive Liposomen	
	[mol%]		[mol%]
POPC	65	DOPE	57
Chol	30	CHEMS	38
mPEG-DSPE	5	mPEG-DSPE	5

20 mg der jeweiligen Lipidmischung wurden durch Zusatz von 100 μ L Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1 [V/V]) in einem 2 mL-PP-Reaktionsgefäß in Lösung gebracht. Das Lösungsmittel wurde nach folgendem Schema in einer Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac SC 110) entfernt:

Zeit [min]	Druck [mbar]
60	800
30	600
30	450
15	350
15	300
15	250
15	200
15	150
15	50

Anschließend wurde der entstandene Film über Nacht bei maximalem Unterdruck getrocknet.

Am nächsten Tag wurden 30 μ L Nukleinsäure-Lösung (35 – 65 μ M siRNA bzw. 7 – 9 μ g Plasmid / μ L) sowie 63 mg Glasperlen (\varnothing 1 mm) zugefügt und die Lipide unter leichtem Schütteln für 60 min vorgequollen. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß in der Dualen Asymmetrischen Zentrifuge (FlackTek SpeedMixerTM DAC 150 FVZ) 30 min bei 3 540 rpm zentrifugiert. Das resultierende vesikuläre Phospholipidgel wurde mit 200 μ L PBS pH 7,4 versetzt und weitere 30 s zentrifugiert, so dass sich eine Liposomendispersion bildete.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Größe und Polydispersität der Liposomen erfolgte mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) (Nicom submicron particle analyzer model 380). Zur Ermittlung der eingeschlossenen Nukleinsäuremenge wurde wie in Kapitel 3.3.5 erläutert vorgegangen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Präparationen bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.3. Detergenz-Dialyse-Methode zur Herstellung von SPLP

Zur Herstellung von *stabilized plasmid-lipid particles* (SPLP) wurde die von Wheeler et al. [273] beschriebene Detergenz-Dialyse-Methode herangezogen (s. Kapitel 2.3.3).

Die in dieser Arbeit verwendeten Lipidmischungen waren wie folgt zusammengesetzt; die Art und der Anteil des kationischen Lipids wurden variiert und sind den entsprechenden Ergebnisteilen zu entnehmen.

pH-insensitive SPLP		pH-sensitive SPLP	
	[mol%]		[mol%]
DOPE	$90 - x$	DOPE	$(90 - x) \cdot 0,6$
PEG-CerC ₈	10	CHEMS	$(90 - x) \cdot 0,4$
kationisches Lipid	x	PEG-CerC ₈	10
		kationisches Lipid	x

Die verwendeten Lipide lagen als Lösungen in OG-HBS 0,2 M vor und wurden zu entsprechenden Lipidmischungen zusammenpipettiert. Durch Zusatz weiterer OG-HBS-Lösung wurde die Lipidkonzentration auf 10 mM eingestellt. Nach der Zugabe von Plamid-DNA (10 oder 20 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ Lipid) wurden die Ansätze in eine Dialysierkammer überführt und für 40 – 42 h gegen ein Gesamtvolumen von 2 L HBS dialysiert. Bei Verwendung anderer Dialysierpuffer ist dies an den entsprechenden Stellen vermerkt. Nach etwa 4, 18 und 28 h fand je ein Pufferwechsel statt. Die verwendete Dialysierapparatur ist in Abb. 3.1 näher erläutert.

Die mittlere Größe und die Polydispersität der entstandenen Partikel wurde durch Photonenkorrelationsspektroskopie (Malvern Autosizer IIC) bestimmt. Zur Ermittlung der Einschlusseffizienz wurde der PicoGreen[®]-Assay herangezogen (s. Kapitel 3.3.5). Die Lagerung der SPLP erfolgte bei 4 °C.

Immuno-SPLP

Die Funktionalisierung von SPLP erfolgte mittels der in Kapitel 2.2.2, S. 23 beschriebenen Postinsertionstechnik.

Zur Herstellung einer mizellaren Lösung des Ankerlipids MalPEG-DSPE wurde die chloroformige Stammlösung im Rotationsverdampfer zu einem dünnen Film eingedampft (s. Kapitel 3.3.1). Dieser wurde unter Zusatz von Glasperlen (\varnothing 2,5 mm) und leichtem Schwenken im Wasserbad (60 °C) in Kopplungspuffer pH 6,7 aufgenommen. Die resultierende Lipidkonzentration betrug 3,4 mM. Die Kopplung der Ankerlipidmizellen erfolgte durch Zugabe von zuvor reduziertem scFv' (s. Kapitel

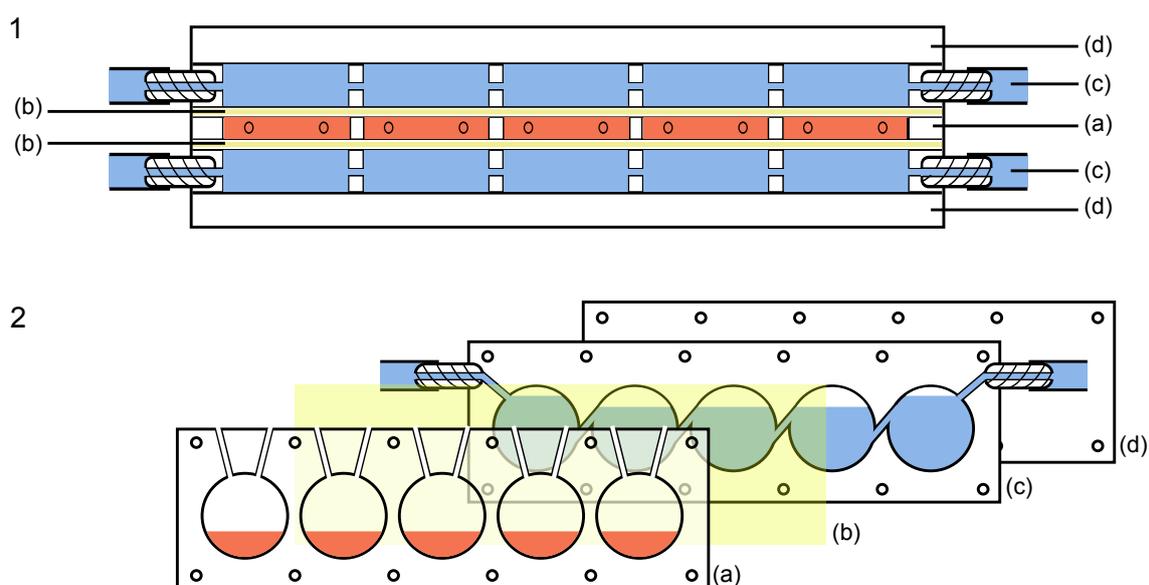


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung der verwendeten Dialysierapparatur. Die Apparatur bietet die Möglichkeit zur simultanen Dialyse von fünf verschiedenen Ansätzen. **1 Aufsicht auf die Apparatur. 2 Längsschnitt durch einzelne Ebenen der Apparatur.** Die Dialyse besteht aus fünf ca. 1 cm dicken Polyacrylplatten, die durch zwölf Schrauben zusammengehalten werden. In der Mitte befindet sich eine Platte mit fünf ausgefrästen Probenkammern (a). Diese können mithilfe einer Pasteurpipette über die Öffnungen an der Oberseite befüllt werden. Die Kammern sind beiderseits durch eingespannte Dialysiermembranen (b) (Nephrophan[®]) von den umgebenden Pufferkammern (c) abgegrenzt. Diese werden jeweils nach außen durch eine Polyacrylplatte (d) abgeschlossen. Eine angeschlossene Pumpe (ISM 796) pumpt das Dialysiermedium mit einer Geschwindigkeit von 250 mL/h aus einem Vorratsgefäß über den Zulauf in die Pufferkammern und über den Ablauf zurück in das Vorratsgefäß.

3.3.1, S. 63) im Verhältnis 4,4:1 [mol/mol]. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von L-Cystein-Lösung beendet (Endkonzentration 1 mM).

Die gekoppelten Ankerlipide wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (300 rpm; Thermomixer comfort) in vorgefertigte SPLP inseriert. Dabei betrug das Lipid-Verhältnis von Mizellen zu SPLP 6:1000 [mol/mol]. Zur Abtrennung nicht-inserterter MalPEG-DSPE-Moleküle bzw. freier *single chain*-Fragmente wurde der Ansatz am nächsten Tag gelchromatographisch über eine Sepharose 4B-Säule aufgereinigt.

Als Kontrolle für die erfolgreiche Targetierung wurden Proben der gekoppelten Mizellen sowie der aufgereinigten Immuno-SPLP mittels SDS-PAGE untersucht (s. Kapitel 3.9.3).

Fluoreszenzmarkierungen

Zur Untersuchung der zellulären Bindung und Internalisierung von SPLP (s. Kapitel 3.6) wurden SPLP mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert. Dieser wurde der Octylglucosid-haltigen Lipidmischung vor der Dialyse in der Konzentration 0,5 mol% zugesetzt.

Immuno-SPLP, die für Transfektionsversuche verwendet werden sollten, wurden in gleicher Weise mit dem fluoreszierenden Membranmarker 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin-4-chlorobenzensulfonat (DiD) angefärbt. Dadurch waren die Immuno-SPLP bei ihrer gelchromatographischen Aufreinigung als blaue Bande auf der Säule zu erkennen. Aufgrund der spektralen Eigenschaften von DiD ($\lambda_{Ex} = 644 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 663 \text{ nm}$) störte dieses nicht bei der fluorimetrischen Erfassung von GFP ($\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 507 \text{ nm}$).

3.3.4. Herstellung von Lipoplexen

Als Positivkontrolle für die SPLP-Transfektionsversuche wurden Lipoplexe verwendet, die aus einer Mischung des kationischen Lipids DC-Chol und DOPE im Verhältnis 3:7 [m/m] bestanden. Sie wurden jeweils unmittelbar vor ihrer Applikation frisch angesetzt.

Die Herstellung erfolgte analog der Liposomenpräparation mittels Hydratationsmethode (s. Kapitel 3.3.1) aus chloroformigen Lipidlösungen. Nach der Hydratisierung des getrockneten Films mit HBS pH 7,4 betrug die Konzentration der Lipiddispersion 1 mg/mL. Abweichend von der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise wurde diese durch Ultraschall homogenisiert. Dazu wurden die multilamellaren Vesikel fünfmal für 30 s auf Eis beschallt (Cycle 5 x 10%, Power 60%; Sonopuls HD2070). Zwischen jedem Schallzyklus wurde eine Pause von 5 min eingehalten. Die anschließende Partikelgrößenbestimmung mittels PCS (Malvern Autosizer IIc) ergab einen mittleren Durchmesser von ca. 200 nm.

Die Komplexierung der Lipidvesikel mit Plasmid-DNA erfolgte im Verhältnis 10:1 [m/m]. Dazu wurde sowohl die eingesetzte Plasmid-Lösung als auch die entsprechende Lipidmenge separat mit HBS pH 7,4 auf 100 μL aufgefüllt. Der Lipidansatz wurde langsam zur DNA-Lösung pipettiert und vorsichtig untergemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die fertigen Lipoplexe auf die vorbereiteten Zellen gegeben.

3.3.5. Bestimmung des liposomalen Nukleinsäureeinschlusses

PicoGreen[®]-Assay

Die Quantifizierung von liposomal verkapselter Plasmid-DNA bzw. siRNA erfolgte mithilfe des PicoGreen[®]-Assays. Bei PicoGreen[®] handelt es sich um einen DNA-Farbstoff, der nach Interkalation in doppelsträngige DNA/RNA fluorimetrisch erfasst werden kann.

Jeweils 5 μL der zu untersuchenden Proben wurden zu 95 μL TE-Puffer in eine schwarze 96-Loch-Platte pipettiert. Die Kalibrierreihe wurde aus einer DNA- bzw. siRNA-Standardlösung der Konzentration 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nach folgendem Schema hergestellt und anschließend analog zu den Proben behandelt:

DNA [ng]	DNA-Standardlösung [μL]	TE-Puffer [μL]
0	0	100,0
25	12,5	87,5
50	25,0	75,0
100	50,0	50,0
200	100,0	0

In jedes Loch wurden 100 μL einer frisch hergestellten PicoGreen[®]-Verdünnung (1:200 in TE-Puffer [V/V]) zugegeben und die resultierende Fluoreszenzintensität vermessen ($\lambda_{Ex} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 520 \text{ nm}$; FLUOStar Optima). Nach Zugabe von jeweils 20 μL Triton[®]X-100-Lösung 5% und einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte eine weitere Messung.

Da PicoGreen[®] die liposomale Membran nicht zu durchdringen vermag, entsprach der erste Messwert einer Probe dem unverkapselten und somit frei zugänglichen DNA-Anteil (DNA_{frei}). Der Zusatz von Triton[®]X-100 führte zur Zerstörung der Liposomen, so dass mit der zweiten Messung der gesamte DNA-Gehalt der Probe erfasst wurde (DNA_{gesamt}). Der Anteil liposomal eingeschlossener DNA konnte somit nach folgender Formel bestimmt werden:

$$DNA_{verkapselt} [\%] = \frac{(DNA_{gesamt} - DNA_{frei})}{DNA_{gesamt}} \cdot 100 [\%] \quad (3.1)$$

Die *Konzentration* der verkapselten DNA berechnete sich wie folgt: Aus den Messwerten der Kalibrierreihe wurde durch lineare Regression eine Geradengleichung aufgestellt. Mit deren Hilfe wurde die gemessene Fluoreszenzintensität nach Triton-Zugabe in die entsprechende DNA-Menge umgerechnet. Durch Division dieses Werts durch die eingesetzte Probenmenge (5 μL) erhielt man die DNA-Gesamtkonzentration

in ng/ μ L bzw. μ g/mL. Die anschließende Multiplikation mit dem in Gleichung 3.1 bestimmten prozentualen Einschluss ergab die Konzentration der liposomal verkapselten DNA einer Probe.

Quantifizierung von liposomaler 6-FAM-siRNA

Da 6-FAM-siRNA (siGLO Green Transfection Indicator) *per se* fluoresziert ($\lambda_{Ex} = 494$ nm, $\lambda_{Em} = 520$ nm), konnte sie ohne Zugabe von PicoGreen[®] am Mikroplattenfluorimeter quantifiziert werden. Hierbei war allerdings keine Unterscheidung zwischen liposomal verkapselter und freier siRNA möglich, so dass die nicht eingeschlossenen Nukleinsäuren zunächst abgetrennt werden mussten.

Dazu wurden 200 μ L einer Präparation auf eine Sepharose 4B-Säule gegeben und das Liposomen-haltige Eluat mit PBS auf 1000 μ L aufgefüllt. Um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten, wurden Proben ungesäulter Liposomen ebenfalls 1:5 verdünnt.

Zur Vermessung am Fluoreszenzgerät ($\lambda_{Em} = 480$ nm, $\lambda_{Ex} = 520$ nm; FLUOStar Optima) wurden 10 μ L Liposomenprobe mit TE-Puffer auf 100 μ L aufgefüllt und in eine schwarze 96-Loch-Platte pipettiert. Die Erstellung einer 6-FAM-siRNA-Kalibrierreihe erfolgte analog zum Pipettierschema in Kapitel 3.3.5, S. 68.

Aus den Messwerten der Kalibrierreihe wurde durch lineare Regression eine Geradengleichung aufgestellt, mithilfe derer die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Proben in die entsprechenden siRNA-Mengen umgerechnet werden konnten. Durch Multiplikation mit dem angewendeten Verdünnungsfaktor wurde die in der Ursprungslösung enthaltene *Konzentration* an 6-FAM-siRNA erhalten.

Die siRNA-Menge in der gesäulten Probe entsprach der Menge an liposomal verkapselter siRNA. Die ungesäulte Probe dagegen setzte sich aus einem Anteil eingeschlossener sowie einem Anteil freier Nukleinsäuren zusammen und entsprach damit der Gesamtmenge eingesetzter siRNA. Durch Division der Menge verkapselter siRNA durch die Gesamtmenge konnte der *anteilige Einschluss* abgeschätzt werden.

3.4. Bestimmung der Zytotoxizität von Liposomen und SPLP

Die Untersuchung der Zytotoxizität liposomaler Transfektionsvektoren erfolgte unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Das gelbliche MTT wird intrazellulär durch mitochondriale Dehydrogenasen zum blau gefärbten Formazan umgesetzt (s. Abb. 3.2). Da nur vitale Zellen zur Reduktion

von MTT befähigt sind, ist die Entstehung des blauen Farbstoffes proportional zur Zellvitalität bzw. umgekehrt proportional zur Zelltoxizität einer Testsubstanz [298].

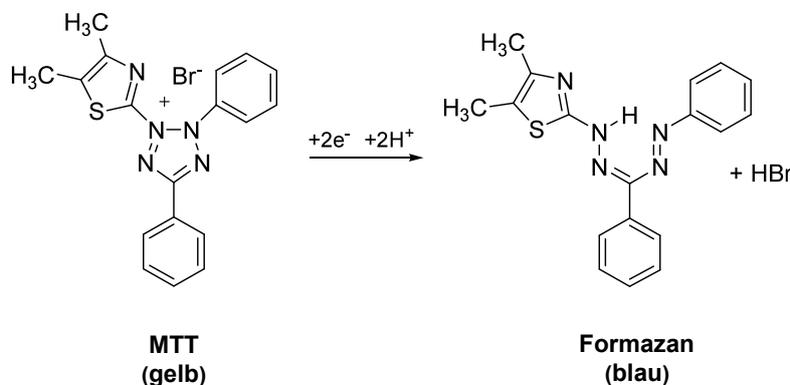


Abb. 3.2.: Umsetzung von MTT zu Formazan.

Eine 96-Loch-Platte wurde mit Zellen bestückt (2000 Zellen/90 μL Medium pro Loch) und über Nacht bei 37 °C und 5% CO_2 aufbewahrt. Von der zu testenden liposomalen Präparation wurde eine Verdünnungsreihe in HBS pH 7,4 hergestellt, die am nächsten Tag auf die Zellen gegeben wurde. Dabei wurden jeweils drei Löcher der 96-Loch-Platte mit 10 μL Probelösung derselben Konzentration versehen. Als Wachstums- bzw. Negativkontrolle wurden 10 μL HBS pH 7,4 bzw. 10 μL DMSO zu den Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden 20 μL MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) in jedes Loch hinzugefügt und die Platte erneut für 90 min im Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurde das Medium verworfen und die entstandenen Formazan-Kristalle durch Zugabe von DMSO (100 μL /Loch) gelöst. Die Bestimmung des gebildeten Formazans erfolgte durch Messung der Absorption bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ (Absorptionsmaximum des Formazans) sowie bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ (Hintergrundabsorption) (Multiscan[®] EX). Die ermittelte Hintergrundabsorption wurde von der bei 570 nm gemessenen Absorption des Formazans subtrahiert und die Differenz als normalisierte Werte gegen die entsprechenden Liposomenkonzentrationen aufgetragen. Mithilfe der Software GraphPad Prism[™] 5 wurden die IC_{50} -Werte der getesteten Präparationen durch nicht-lineare Kurvenregression (sigmoidaler Kurvenverlauf, variable Steigung) abgeschätzt.

3.5. Transfektion

Zur Transfektion wurden 6-Loch- bzw. 24-Loch-Platten verwendet, die jeweils am Vortag mit bEnd.3-Zellen bestückt und über Nacht bei 37 °C/5% CO_2 aufbewahrt worden

waren. Die Konzentration der pro Loch ausgesäten Zellen ist den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

Nach Zugabe des Transfektionsmittels wurden die Zellen bis zu ihrer Analyse nach 1 – 3 Tagen bei 37 °C im CO₂-Inkubator kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden entweder am Durchflusszytometer (s. Kapitel 3.6.3) oder am Fluoreszenzmikroskop (s. Kapitel 3.7) untersucht. Wurde VCAM-shRNA oder -siRNA verwendet, mussten die Zellen vor ihrer Untersuchung mit fluoreszierendem α -VCAM-Antikörper markiert werden (s. Kapitel 3.6.4).

3.5.1. Transfektion von Plasmid-DNA mittels Fugene[®] 6

Bei Fugene[®] 6 handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Lipid-basiertes Transfektionsreagenz. Pro Loch wurden 100 μ L Transfektionsmischung angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzte:

Komponente	[μ L]
Fugene [®] 6	6
Plasmid-DNA 2 μ g	x
FKS-freies Medium	94 – x

Die Fugene[®] 6-Lösung wurde zu vorgelegtem FKS-freies Medium pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen der Plasmid-Lösung und erneutem Mischen erfolgte eine weitere Inkubation von 45 min. Im Anschluss wurde die fertige Mischung tröpfchenweise auf die vorbereiteten Zellen (40.000 Zellen/1,9 mL Medium) gegeben.

3.5.2. Transfektion von siRNA mittels HiPerFect

Die Vor- und Kontrollversuche zu den Transfektionsexperimenten mit siRNA-Liposomen wurden unter Einsatz des kommerziellen Transfektionsmittels HiPerFect durchgeführt. Die finale siRNA-Konzentration betrug 10 nM soweit nicht anders angegeben.

Zur Komplexierung von VCAM-siRNA (6-FAM-siRNA) wurde die entsprechende Nucleinsäuremenge mit FKS-freiem Medium auf 88,0 μ L (95,5 μ L) aufgefüllt und mit 12,0 μ L (4,5 μ L) HiPerFect versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 10 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise in ein Loch mit 40.000 Zellen/1,9 mL Medium (10.000 Zellen/400 μ L Medium) gegeben. Der gebildete Komplex wurde durch Schwenken der Platte gleichmäßig im Medium verteilt.

3.5.3. Transfektion mittels Liposomen oder SPLP

Zur Transfektion mit Liposomen oder SPLP wurde eine entsprechende Menge der liposomalen Präparation mit FKS-freiem Medium auf 100 μL aufgefüllt und tropfenweise in ein mit Zellen bewachsene Loch gegeben. Durch Schwenken der Platte wurde das Transfektionsmittel homogen im Medium verteilt. Für Versuche mit 6-FAM-siRNA wurden 10.000 Zellen/400 μL Medium verwendet. Enthielt die Präparation GFP-Plasmid, VCAM-shRNA oder -siRNA, wurden 40.000 Zellen/1,9 mL Medium eingesetzt.

3.6. Durchflusszytometrische Untersuchungen

3.6.1. Zelluläre Bindung und Internalisierung Lipid-basierter Partikel

Zur Untersuchung der Bindung von Liposomen bzw. SPLP an die Zelloberfläche und deren Aufnahme in die Zelle wurden Präparationen verwendet, die mit dem Fluoreszenzmarker DiO angefärbt worden waren.

Jeweils 100.000 Zellen wurden in 100 μL KHP in ein Loch einer 96-Loch-Platte mit V-Boden pipettiert. Die zu analysierenden Liposomen wurden in Triplikaten hinzugefügt (10 nmol/Loch) und für 60 min bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. Zur Untersuchung der spezifischen Bindung der Immunoliposomen/Immuno-SPLP an ihre Zielstruktur wurden die Zellen 15 min vor Zugabe der funktionalisierten Partikel mit 10 μg des verwendeten α -Endoglin-Antikörperfragments versetzt. Dadurch kam es zur Blockade des Rezeptors, so dass eine Endoglin-spezifische Bindung der Partikel nicht mehr möglich war.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 min, 1580 \times g, 4 °C; Allegra™ 25R) und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit KHP. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 μL frischem KHP aufgenommen und die Proben am Durchflusszytometer vermessen.

3.6.2. Intrazelluläre 6-CF-Freisetzung aus Liposomen

Die intrazelluläre Freisetzung des liposomalen Inhalts wurde modellhaft an 6-CF-haltigen Liposomen untersucht. Die Konzentration der eingeschlossenen 6-CF-Lösung betrug 0,1 M und lag damit in einem Bereich, in dem für 6-CF eine Fluoreszenzlöschung beschrieben ist [299]. Intakte Liposomen zeigten somit nur eine geringe Grundfluoreszenz. Kam es nach der Liposomenaufnahme intrazellulär zu einer Farb-

stofffreisetzung aus den Liposomen, führte die Verdünnung von 6-CF im Außenmedium zu einem messbaren Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Jeweils 100.000 Zellen wurden in 100 μ L KHP in ein Loch einer 96-Loch-Platte mit V-Boden ausgesät und mit 15 nmol der zu untersuchenden Liposomen versetzt. Pro Liposomensorte wurden drei Löcher bestückt. Es folgte eine Inkubation für 60 min oder 120 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen wie im Kapitel 3.6.1 beschrieben zentrifugiert, gewaschen und im FACS analysiert.

3.6.3. Bestimmung der GFP-Expression bzw. der Aufnahme von 6-FAM-siRNA

Am Tag der Vermessung wurden die transfizierten Zellen trypsiniert, in eine 96-Loch-Platte mit V-Boden übertragen und zentrifugiert (4 min, 1580 \times g, 4 °C; AllegraTM 25R). Anschließend wurden die Zellen in 100 μ L KHP resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.6.4. Expression von Oberflächenproteinen auf bEnd.3-Zellen

Bestimmung der VCAM-1-Expression

Zur Detektion von VCAM-1 auf bEnd.3-Zellen wurden diese mit einem gegen VCAM-1 gerichteten fluoreszierenden Antikörper markiert. Ca. 18 h vor der Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit TNF- α (50 ng/mL) stimuliert.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben geerntet. Abweichend davon wurde zum Ablösen des Zellrasens EDTA-Lösung 0,02 % ohne Trypsin-Zusatz verwendet, um eine Beschädigung des Oberflächenrezeptors VCAM-1 durch die Protease Trypsin auszuschließen. Die geernteten Zellen wurden abzentrifugiert (4 min, 350 \times g, 4 °C; Universal 320 R) und in eisgekühltem Waschpuffer 1 resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung (s. Kapitel 3.2.1) wurde die Zellsuspension durch Zugabe von Waschpuffer 1 auf eine Konzentration von 5 \cdot 10⁵ Zellen/mL eingestellt. Jeweils 20 μ L wurden in ein Loch einer 96-Loch-Platte mit V-förmigem Boden übertragen und mit 10 μ L einer frisch hergestellten Verdünnung des fluoreszierenden α -VCAM-Antikörpers (10 μ g/mL in PBS) versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 40 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper wurde die Platte zentrifugiert (4 min, 1580 \times g, 4 °C; AllegraTM 25 R) und die überstehende Flüssigkeit verworfen. Die entstandenen Zellpellets wurden in je 100 μ L frischem Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschsritten wurden die Zellen in je 100 μ L KHP aufgenommen und die Platte im Durchflusszytometer

vermessen. Die Bestimmung der VCAM-Expression erfolgte jeweils in Triplikaten. Als Blindwert dienten Zellen, denen kein Antikörper zugesetzt wurde.

Bestimmung der Endoglin-Expression

Da kein fluoreszenzmarkierter α -Endoglin-Antikörper zur Verfügung stand, musste zur fluorimetrischen Erfassung der Endoglin-Expression zusätzlich ein sekundärer FITC-markierter Antikörper eingesetzt werden, der gegen die F_c -Domäne des primären Antikörpers gerichtet war.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben geerntet. Abweichend davon wurde zum Ablösen des Zellrasens EDTA-Lösung 0,02 % ohne Trypsin-Zusatz verwendet. Das erhaltene Zellpellet wurde in eisgekühltem Waschpuffer 1 resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (s. Kapitel 3.2.1). Nach einer Zentrifugation (4 min, $350 \times g$, 4°C ; Universal 320R) wurden die Zellen in Waschpuffer 2 aufgenommen, so dass die Konzentration 10^6 Zellen/mL betrug. Jeweils 1 mL wurden mit $5 \mu\text{g}$ α -Endoglin-Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper-Moleküle wurde der Ansatz abzentrifugiert (4 min, $1700 \times g$, 4°C ; Universal 32R) und die Zellen mit Waschpuffer 2 gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, bevor die Zellen wiederum in 1 mL Waschpuffer 2 aufgenommen wurden. Nach Zusatz von $2 \mu\text{g}$ sekundärem Antikörper (α -Ratte-Ig, FITC-markiert) wurden die Proben nochmals 30 min auf Eis gelagert. Die anschließende Abtrennung ungebundener sekundärer Antikörper erfolgte wie für den primären Antikörper beschrieben. Danach wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Die Bestimmung der Endoglin-Expression erfolgte jeweils in Triplikaten. Als Negativkontrollen wurden Proben verwendet, die entweder ohne oder ausschließlich mit sekundärem Antikörper behandelt worden waren.

3.7. Fluoreszenzmikroskopie

Ein autoklaviertes Deckgläschen (\varnothing 18 mm, Stärke 1) wurde in das Loch einer 6-Loch-Platte gelegt und mit 50.000 Zellen in 2 mL Medium überschichtet. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag wie in Kapitel 3.5.2 bzw. Kapitel 3.5.3 beschrieben mit 6-FAM-siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium verworfen, die Zellen dreifach mit PBS gewaschen und für 5 min mit Formaldehydlösung (3,7% in PBS) fixiert. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen für 10 min in DAPI-Lösung ($5 \mu\text{g/mL}$) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Glasplättchen vor Licht geschützt an der

Luft getrocknet und anschließend mit FluoromountTM Aqueous Mounting Medium auf Objektträgern fixiert.

Die Untersuchung der Präparate erfolgte mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Nikon Eclipse Ti). Zur Bearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde Adobe[®] Photoshop[®] CS3 verwendet.

3.8. Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen

Die funktionelle Auswirkung des endothelialen VCAM-1-Knockdowns auf Zell-Zell-Wechselwirkungen wurde unter Einsatz eines mikroskopischen Zelladhäsionsassays mit physiologischen Flussbedingungen untersucht. Dazu wurde eine Durchflusskammer mit einer konfluent gewachsenen Endothelzellschicht bestückt und im Mikroskop beobachtet, während adhärierende Tumorzellen mit physiologischer Strömungsgeschwindigkeit über die Endothelzellen gespült wurden. Anschließend wurde das Adhäsionsverhalten der Tumorzellen ausgewertet.

Zur Präparation der Endothelzellschicht wurde ein Loch einer 6-Loch-Platte mit einem autoklavierten Glasplättchen (\varnothing 18 mm, Stärke 3) bestückt und mit 100.000 Zellen der Zelllinien bEnd.3 bzw. bEnd.3 VCAM-shRNA in 2 mL Medium befüllt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz nach etwa 3 Tagen im Inkubator kultiviert und mit Ausnahme der Negativkontrolle 18 h vor Verwendung mit TNF- α stimuliert (50 ng/mL).

Die Durchführung des Zelladhäsionsassays erfolgte mithilfe einer Durchflusskammer, deren Aufbau in einer Publikation von Bendas et al. [300] ausführlich beschrieben und in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt ist. Abbildung 3.4 dient der Veranschaulichung des gesamten Versuchsaufbaus.

Das bewachsene Glasplättchen wurde in die Durchflusskammer eingebaut und diese auf dem Objektisch des Mikroskops (Axiovert 200) eingespannt. Die Fließgeschwindigkeit des Puffers (PBS pH 7,4) wurde auf 2 mL/min eingestellt. Unter Berücksichtigung der Abmessungen der Durchflusskammer entspricht dies der in Venolen vorherrschenden Scherrate von 200/s [300].

Über eine vorgeschaltete Blasenfalle wurden 10^6 B16F10-Zellen in 50 μ L FKS-freiem Medium in die Kammer gespült, so dass die Zellen im Mikroskop zu erkennen waren. Der Pufferfluss wurde für 5 min unterbrochen und die Tumorzellen sedimentierten auf die Endothelzellschicht. Anschließend wurde eine Videoaufnahme begonnen und der Pufferstrom wiederhergestellt. Nach 15 s wurde die Aufzeichnung beendet.

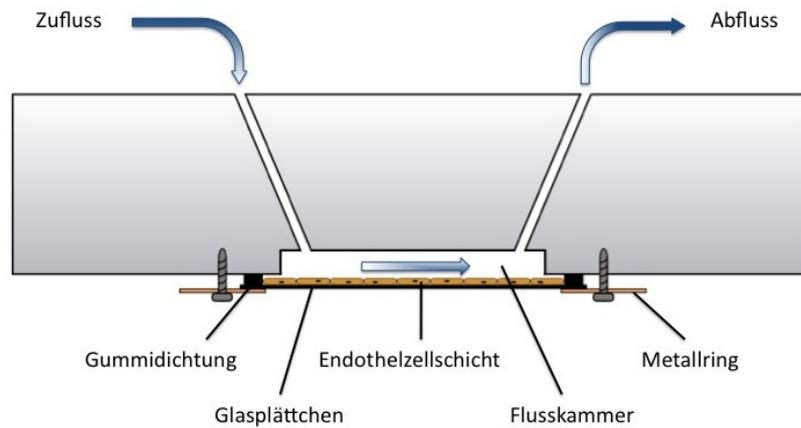


Abb. 3.3.: Schematische Zeichnung der Durchflusskammer. Die Darstellung zeigt die aus Polyacryl gefertigte Durchflussapparatur im Querschnitt. An ihrer Unterseite befindet sich ein mit Endothelzellen bewachsenes Glasplättchen, das über einen Metallring an die Kammer geschraubt ist. Über eine Öffnung an der Oberseite wird das Fließmedium in die Kammer geleitet und kann anschließend über eine zweite Öffnung abströmen. (Abbildung modifiziert nach [300].)

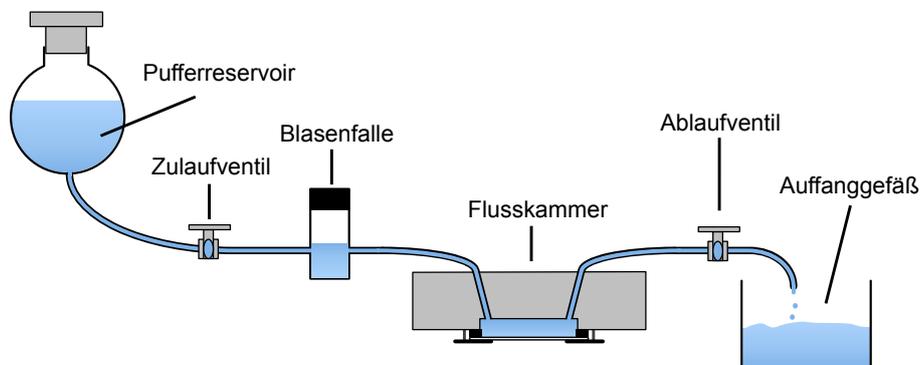


Abb. 3.4.: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen. Aus einem Pufferreservoir wird das Fließmedium durch eine Blasenfalle in die mit Endothelzellen bestückte Durchflusskammer geleitet. Durch Änderung des Höhenunterschieds zwischen Pufferreservoir und -auffanggefäß kann die Fließgeschwindigkeit des Puffers reguliert werden. Ein Zulauf- bzw. Ablaufventil erlaubt die Unterbrechung des Pufferflusses. Durch die Öffnung der Blasenfalle werden Tumorzellen in den Pufferstrom eingebracht und in die Durchflusskammer gespült. Über eine an das Mikroskop angeschlossene Videokamera können die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und dem Endothel aufgezeichnet werden. (Abbildung modifiziert nach [301].)

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Imagoquant MultiTrack-AVI-2. Dabei wurde die Anzahl der auf der Endothelzellschicht anhaftenden B16F10-Zellen zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, 2, 3, 4$ s durch manuelles Zählen bestimmt. Das Ausmaß der Adhäsion wurde als prozentualer Wert bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ angegeben.

3.9. Molekularbiologische Arbeiten

3.9.1. Arbeiten mit siRNA

Um eine Degradierung der verwendeten siRNA durch RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit siRNA mit Handschuhen durchgeführt und – soweit möglich – RNase-freie Einmalartikel eingesetzt. Zur Inaktivierung von RNasen wurden des Weiteren folgende Maßnahmen ergriffen:

Verwendete Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt (0,1% [V/V]). Dieses bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine wie z.B. Histidin und behindert damit die RNase-Aktivität. Die Zerstörung von überschüssigem DEPC erfolgte am nächsten Tag durch Autoklavieren der Lösung. Dabei zerfällt DEPC zu CO_2 und Ethanol.

Hitzestabile Geräte wurden für 2 h bei 200°C im Trockenschrank erhitzt, während temperaturempfindliche Gegenstände über Nacht in DEPC-haltigem Wasser eingelegt und anschließend autoklaviert wurden.

Der Arbeitsplatz sowie die verwendeten Mikroliter-Pipetten wurden mit Wasserstoffperoxid-Lösung 1% abgesprüht.

3.9.2. Arbeiten mit Plasmid-DNA

Plasmidaufreinigung

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus entsprechend transformierten *E. coli*-Stämmen wurde eine kleine Menge der gefrorenen Glycerolkultur in 12 mL steriles LB-Medium überführt und für 8 h bei 200 rpm und 37°C geschüttelt (Schüttelinkubator Modell 4520). Anschließend wurde die Vorkultur in einen sterilen 2 L-Erlenmeyerkolben gegeben und mit Ampicillin-haltigem LB-Medium (Ampicillin-Konzentration $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) auf 250 mL aufgefüllt. Die Inkubation wurde über Nacht fortgesetzt.

Die Plasmidaufreinigung aus den Übernachtskulturen erfolgte unter Verwendung des GenEluteTM HP Plasmid Maxiprep Kits. Dabei wurden die abzentrifugierten Bakterienzellen mithilfe eines SDS-haltigen alkalischen Puffers lysiert und der Rückstand

über einen Filter abgetrennt. Das Plasmid-haltige Lysat wurde über eine Silicagel-Membran gegeben, an welche die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen adsorbierte. Nach zwei Waschstritten zur Entfernung von Kontaminationen wurde die Plasmid-DNA mit 3 mL Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit) eluiert. Die genaue Vorgehensweise entsprechend dem Hersteller-Protokoll ist Anhang A.2 zu entnehmen.

Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen

Die Konzentrierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Alkohol-Fällung. Dazu wurde die Plasmid-Lösung mit 0,1 Volumenteilen Natriumacetat-Lösung 3 M pH 5,2 vermischt und die DNA durch Zusatz von 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (30 min, $15.000 \times g$, 4°C ; Universal 32R) wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen. Es folgte die Zugabe von 1,5 mL Ethanol 70% und eine erneute Zentrifugation für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 50 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde es in einem geringen Volumen Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit) resuspendiert und die Konzentration der resultierenden Lösung bestimmt (s. Kapitel 3.9.2, S. 78).

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Plasmid-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte im Photometer (Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer) bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnung in Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit) in eine Quarzküvette (Hellma Präzisionsküvette 105.020-QS 10 mm) pipettiert und die Absorption bei 260 nm sowie 280 nm nach Auswahl des Programms „Nukleinsäuren“ automatisch erfasst. Die Absorption von reinem Elutionspuffer wurde als Nullwert gesetzt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die DNA-Konzentration der Ausgangslösung in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ausgegeben. Die Konzentration von dsDNA-Lösungen ergibt sich aus:

$$c_{DNA} [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50 \mu\text{g}}{1000 \mu\text{L}} \quad (3.2)$$

Des Weiteren konnte am Photometer der Quotient $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ abgelesen werden. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Abweichende Werte weisen auf Verunreinigungen der Probe durch Proteine hin.

Bligh & Dyer-Extraktion

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Lipid-basierten Präparationen wurde das Extraktionsverfahren nach Bligh und Dyer [302] angewendet.

100 μL Liposomen oder SPLP wurden mit 250 μL Methanol versetzt und gründlich vermischt. Anschließend wurden zweimal je 125 μL Chloroform zupipettiert und die Phasen wiederum jeweils gut gemischt. Nach Zugabe von 125 μL Aqua dem. und einer weiteren Durchmischung wurde der Ansatz zur Trennung der Phasen für 5 min bei $3.000 \times g$ (mini Spin) zentrifugiert. Die untere organische Phase enthielt die Lipide, während in der oberen wässrigen Phase die isolierte DNA vorlag. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zur Reinigung der DNA eine Alkohol-Fällung durchgeführt (s. Kapitel 3.9.2, S. 78).

Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnte sowohl der Plasmideinschluss in Liposomen/SPLP als auch die Integrität der verkapselten Plasmide analysiert werden.

Die Untersuchung der DNA-haltigen Proben erfolgte an 1%-igen Agarosegelen in TAE-Puffer [m/V] in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Peqlab Modell 40-0911). Zur Visualisierung der DNA im UV-Licht wurde die verflüssigte Agarose während der Gelherstellung mit RedSafeTM Nucleic Staining Solution 20.000 \times versetzt (5 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$). Die DNA-Proben wurden mit Gel Loading Dye Blue 6 \times im Verhältnis 5:1 [V/V] vermischt und in die Taschen des Gels übertragen. Eine weitere Tasche wurde mit 6 μL DNA-Größenstandard (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3) befüllt. Zur Auftrennung der DNA wurde für ca. 45 min eine konstante Spannung von 100 V angelegt (Power Pack 300). Anschließend konnten die Banden im UV-Licht (Universal Hood II Geldoc) ausgewertet werden.

3.9.3. Arbeiten mit Proteinen

Konzentrationsbestimmung von scFv'-Antikörperfragmenten

Die Konzentrationsbestimmung von mE12-scFv'-Lösungen erfolgte durch Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (UltrospecTM 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer). Durch Einsetzen des Messwertes in folgende Formel wurde die Proteinkonzentration der vermessenen Lösung erhalten:

$$c_{\text{mE12-scFv}'} [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{OD_{280} \cdot MW}{\varepsilon \cdot d} \quad (3.3)$$

mit $MW = \text{Molekulargewicht}_{\text{mE12-scFv}'} = 26204,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

und $\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient}_{\text{mE12-scFv}} = 43980 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
und $d = \text{Schichtdicke der Kuvette} = 1 \text{ cm}$.

SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente als Nachweismethode für die erfolgreiche Funktionalisierung von SPLP mittels Postinsertion (s. Kapitel 3.3.3, S. 65). Die verwendeten Proben enthielten jeweils ca. $1 \mu\text{g}$ Protein und wurden im Verhältnis 1:1 [V/V] mit Probenauftragspuffer (PAP) versetzt. Die verwendeten Gele aus Sammelgel (5% Acrylamid) und Trenngel (15% Acrylamid) wurden frisch hergestellt und nach der Polymerisation in die mit Elektrophorese-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer (Mini-Protean II) eingesetzt. Die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert, zusätzlich wurde ein Proteingrößenstandard (Proteinmarker IV) aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 200 V angelegt (Elektrophorese-Stromgeber EC250-90). Sobald die Lauffront das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel entnommen.

Zur Darstellung der Proteinbanden wurde das Gel zweimal für jeweils 10 min mit Aqua dem. gewaschen. Es folgte eine ca. zweistündige Inkubation in Sensitiver Coomassie-Färbelösung unter leichter Bewegung auf dem Horizontalschüttler. Durch Verwendung dieser modifizierten Coomassie-Färbetechnik werden die Proteine als blaue Banden sichtbar, ohne dass es zu einer deutlichen Einfärbung des Hintergrundes kommt [303]. Somit konnte auf die sich üblicherweise anschließende Entfärbung des Gels verzichtet werden. Nach einem Waschschrift mit Aqua dem. zur Entfernung überschüssiger Färbelösung wurde das Gel zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und durch Einscannen oder Abfotografieren dokumentiert.

3.10. Statistik

Soweit nicht anders vermerkt, repräsentieren die angegebenen Werte Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten \pm Standardabweichung. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde der ungepaarte Studentsche t-Test durchgeführt. Die Signifikanzebenen sind in den Abbildungen folgendermaßen gekennzeichnet:

* $\hat{=}$ $p < 0,05$; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$; *** $\hat{=}$ $p < 0,001$.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Posttranskriptionelle Expressionshemmung von VCAM-1 als potentiell antiinflammatorischer Therapieansatz

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, spielt die endotheliale Expression des Adhäsionsrezeptors VCAM-1 eine Rolle bei der Leukozytenrekrutierung im Rahmen des Entzündungsgeschehens. Daher wird postuliert, dass die Ausschaltung von VCAM-1 zu einem antiinflammatorischen Effekt führen kann und eine Option zur Therapie entzündlicher Erkrankungen darstellt (s. Kapitel 2.1.2). Zur Ausschaltung von VCAM-1 sind verschiedene Ansätze möglich (s. Kapitel 2.1.4). Aus diesen Möglichkeiten wurde hier die posttranskriptionelle Expressionshemmung durch RNA-Interferenz ausgewählt.

In diesem Teil der Arbeit sollten die funktionellen Folgen eines VCAM-1-Knockdowns in aktivierten Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurde das VCAM-1-Expressionsverhalten von bEnd.3-Endothelzellen charakterisiert und durch Transfektion mit VCAM-shRNA eine VCAM-Knockdown-Mutante (b.End3 VCAM-shRNA) erzeugt. Anschließend wurde deren Fähigkeit zur Vermittlung von Zell-Zell-Wechselwirkungen unter physiologischen Flussbedingungen analysiert.

4.1.1. VCAM-1-Expression auf bEnd.3-Zellen

Bei VCAM-1 handelt es sich um einen induzierbaren Oberflächenrezeptor, der von Endothelzellen in entzündeten Geweben exprimiert wird (s. Kapitel 2.1.1). Um die VCAM-1-Expression anzuregen, wurde die verwendete Endothelzelllinie bEnd.3 durch Stimulation mit TNF- α in einen aktivierten Zustand versetzt. Abbildung 4.1 zeigt, dass bEnd.3-Zellen nach Zytokin-Stimulation verstärkt VCAM-1 exprimieren. Auch auf unstimulierten Zellen ließ sich der Adhäsionsrezeptor in geringen Mengen (< 10% des Expressionsniveaus stimulierter Zellen) nachweisen. Durch Testung der VCAM-negativen Ovarialkarzinomzelllinie A 2780 konnte ausgeschlossen werden, dass

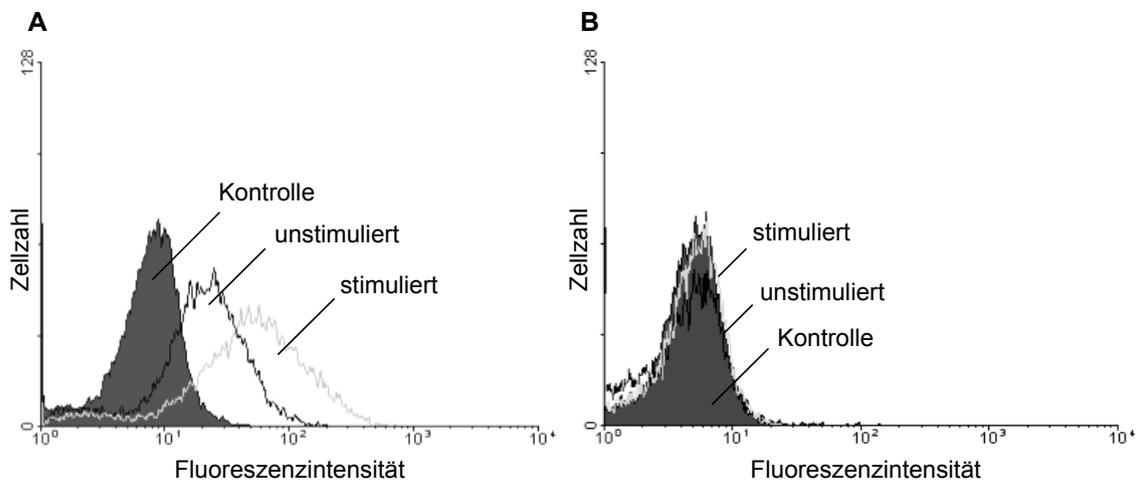


Abb. 4.1.: VCAM-1-Expression auf bEnd.3-Endothelzellen. Die Charakterisierung des VCAM-1-Expressionsverhaltens erfolgte durchflusszytometrisch nach Markierung der Zellen mit einem fluoreszierenden α -VCAM-Antikörper. Stimulierte Zellen wurden für 4 h mit TNF- α (50 ng/mL) behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Antikörpermarkierung. (A) bEnd.3-Zellen. (B) A 2780-Zellen.

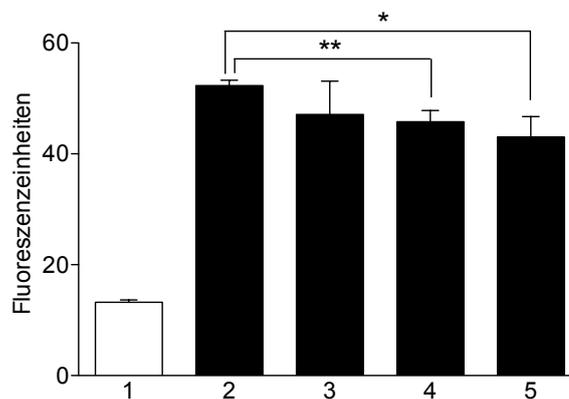


Abb. 4.2.: VCAM-1-Expression nach Stimulation mit TNF- α . bEnd.3-Zellen wurden mit 50 ng/mL TNF- α stimuliert und nach 4 h (2), 24 h (3) und 48 h (4) hinsichtlich ihrer VCAM-Expression untersucht. (5) zeigt die VCAM-Rezeptordichte nach 48 h bei wiederholter Stimulation nach 24 h. (1) stellt die VCAM-Expression unstimulierter Zellen dar.

es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche handelte.

Um ideale Bedingungen für weitere Versuche zu schaffen, wurde die Auswirkung unterschiedlicher TNF- α -Stimulationszeiten auf die VCAM-1-Expression untersucht. In der Literatur ist für bEnd.3-Zellen eine maximale VCAM-Expression nach vierstündiger Inkubation mit TNF- α beschrieben, die bei fortwährender Stimulation innerhalb von 24 h auf ca. 50% des Maximalwertes zurückgeht [295]. Diese Beobachtung konnte hier nicht bestätigt werden: Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der VCAM-Expression nach einer Inkubationszeit von 4 h und 24 h festgestellt (s. Abbildung 4.2). Erst nach 48 h zeigte sich – auch bei wiederholter TNF- α -Zugabe nach 24 h – eine Abnahme der VCAM-1-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche um ca. 20%. Aus praktischen Gründen wurde für alle weiteren Versuche eine einmalige Stimulation 18 h vor der Versuchsdurchführung gewählt.

4.1.2. VCAM-1-Knockdown in bEnd.3-Zellen

Zur posttranskriptionellen Genstilllegung von VCAM-1 wurden bEnd.3-Endothelzellen mit VCAM-shRNA-kodierendem Plasmid transfiziert. Die so erzeugte Zelllinie bEnd.3 VCAM-shRNA zeichnet sich durch eine signifikant verminderte VCAM-Expression TNF- α -stimulierter Zellen aus. Diese ist im Vergleich zu aktivierten bEnd.3-Wildtypzellen um ca. 50% herabgesetzt (s. Abbildung 4.3).

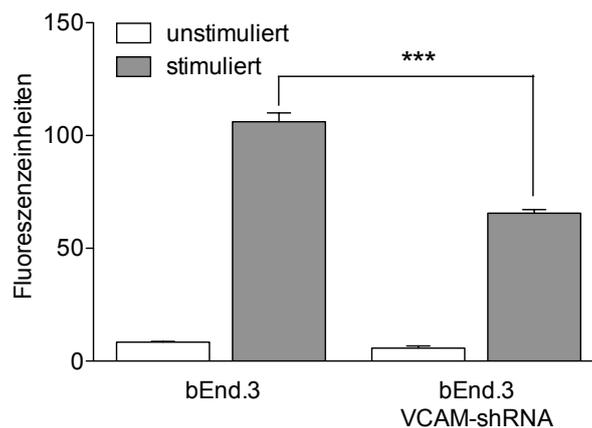


Abb. 4.3.: VCAM-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-shRNA. Die Stimulation mit TNF- α (50 ng/mL) erfolgte 18 h vor der Versuchsdurchführung. Zur Bestimmung der VCAM-Expression wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert.

4.1.3. Funktionelle Auswirkung des VCAM-1-Knockdowns auf die endotheliale Bindungsfähigkeit von Tumorzellen

Es konnte gezeigt werden, dass die posttranskriptionelle Expressionshemmung von VCAM-1 zu einer signifikanten Reduktion der VCAM-1-Rezeptordichte auf aktivierten Endothelzellen führt (s. Kapitel 4.1.2). Im Folgenden sollte deren funktionelle Auswirkung untersucht werden.

Der Adhäsionsrezeptor VCAM-1 vermittelt im Rahmen der Adhäsionskaskade die feste Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand. Ebenso nutzen zirkulierende Tumorzellen die Bindung an VCAM-1 zur hämatogenen Metastasierung (s. Kapitel 2.1.1). Daher wurde stellvertretend für die endotheliale Leukozytenadhäsion das Bindungsverhalten von Tumorzellen an immobilisierte Endothelzellschichten in einer Flusskammer beobachtet. Mit dem gewählten Verfahren konnten die physiologischen Bedingungen im Gefäßlumen von Venolen simuliert werden. Die verwendeten B16F10-Melanomzellen tragen auf ihrer Oberfläche das Integrin VLA-4 [297], so dass eine VCAM-vermittelte Anhaftung an bEnd.3-Endothelzellen möglich war. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsanordnung und Vorgehensweise ist in Kapitel 3.8 zu finden.

Abbildung 4.4 zeigt das Ausmaß der Bindungsfähigkeit von B16F10-Zellen an bEnd.3 VCAM-shRNA-Zellen im Vergleich zu untransfizierten bEnd.3-Wildtypzellen. Wie zu erwarten, konnte eine starke Bindung der Melanomzellen an TNF- α -aktivierte bEnd.3-Wildtypzellen detektiert werden. Auch 5 s nach Wiederherstellung des Pufferflusses waren nahezu 100% der beobachteten Melanomzellen fest an die Endothelzellschicht adhärirt. Im Vergleich war die Zelladhäsion an aktivierte bEnd.3 VCAM-shRNA weniger stark ausgeprägt: Mit einem Rückgang auf ca. 80% nach 5 s unterschied sie sich signifikant von der Bindungsfähigkeit an stimulierte bEnd.3-Wildtypzellen. Wurden unstimulierte bEnd.3-Wildtypzellen auf dem Glasplättchen immobilisiert, verringerte sich die Anzahl der anhaftenden Tumorzellen innerhalb von 5 s auf ca. 40%. Sowohl bei den Untersuchungen an unstimulierten Wildtypzellen als auch an stimulierten bEnd.3 VCAM-shRNA-Zellen konnte das durch Selektine vermittelte typische Zellrollen entlang der Endothelschicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Ausmaß der VCAM-Expression auf den verschiedenen Zellen (s. Kapitel 4.1.2). Da der Adhäsionsrezeptor nicht nur auf TNF- α -stimulierten bEnd.3-Wildtypzellen nachgewiesen werden konnte, sondern in geringerem Maße auch auf stimulierten bEnd.3 VCAM-shRNA sowie auf unstimulierten Wildtypzellen, war mit einer gewissen Bindungsfähigkeit der Tumorzellen auch an letztere zu rechnen.

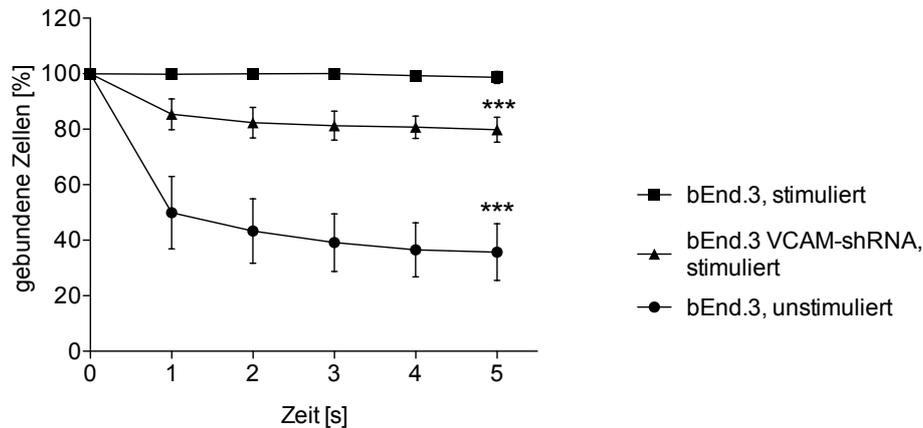


Abb. 4.4.: Adhäsion von B16F10-Melanomzellen an bEnd.3-Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen. Die Adhäsion von B16F10-Zellen an unstimulierte bEnd.3-Wildtypzellen sowie an stimulierte bEnd.3 VCAM-shRNA-Zellen unterscheidet sich statistisch signifikant von der Zelladhäsion an stimulierte bEnd.3-Wildtypzellen zum Zeitpunkt $t = 5$ s.

Aktiviert bEnd.3-Zellen exprimieren außer VCAM-1 weitere Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1 und MAdCAM-1 sowie E- und P-Selektin auf ihrer Zelloberfläche. Diese sind zum Teil auch auf unstimulierten Zellen vorhanden [294, 295]. Auch auf B16F10-Melanomzellen können zusätzlich zu VLA-4 weitere Adhäsionsmoleküle, z.B. L- und P-Selektin, nachgewiesen werden [297]. Neben der VLA-4-/VCAM-1-Interaktion können also auch andere Wechselwirkungen für die beobachtete Zelladhäsion verantwortlich sein, die in diesem Experiment nicht untersucht wurden. Eine Mitwirkung der Selektine lässt das Zellrollen von B16F10 über das Endothel vermuten; dieses wird primär durch Selektine vermittelt (s. Kapitel 2.1.1).

Auch Resultate von Fritzsche et al. [297] sprechen für die Beteiligung weiterer Adhäsionsrezeptoren an der beobachteten Zelladhäsion: Unter identischen Versuchsbedingungen konnte die Bindung von B16F10-Zellen an aktivierte bEnd.3-Zellen durch einen blockierenden VCAM-Antikörper nur um etwa 20% zurückgedrängt werden. Wurde anstelle von bEnd.3-Zellen VCAM-1-Protein immobilisiert, zeigten weniger als 20% der B16F10-Zellen eine feste Adhäsion. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Alam et al. [107], die die Zelladhäsion von humanen Jurkat-T-Zellen an die Endothelzelllinie sEnd.1 untersuchten. Trotz eines nahezu vollständigen VCAM-Knockdowns mittels verschiedener shRNA-Konstrukte ging die T-Zelladhäsion an sEnd.1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen meist nur um 50% zurück. Auch die Vorinkubation von sEnd.1-Wildtypzellen mit einem blockierenden VCAM-Antikörper reduzierte die Leukozytenadhäsion nicht vollständig.

Um eine vollständige Inhibierung der endothelialen Adhäsion zu erreichen, müssten also weitere Mechanismen ausgeschaltet werden. Dennoch belegen eine Reihe von Studien die therapeutische Relevanz der alleinigen Hemmung von VCAM-1. Diese führte in Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis [304], Colitis Ulcerosa [305–307] sowie der atopischen Dermatitis [308] zu einem Rückgang der Krankheitssymptome und reduzierte die Gefahr von Restenosen nach Endarteriektomien [106].

4.2. Liposomale Transfektion von VCAM-siRNA

Wie in Kapitel 4.1 erläutert, kann durch posttranskriptionelle Genausschaltung von VCAM-1 eine verminderte endotheliale Zelladhäsion unter Flussbedingungen erreicht werden. Dies kann in der Therapie von Tumoren bzw. entzündlichen Erkrankungen zu einer Hemmung der Metastasierung bzw. von Entzündungen führen. Zur therapeutischen Nutzung der RNA-Interferenz wird synthetische siRNA in die Zielzellen eingebracht. Dabei stellt ein effektiver Gentransfer die größte Hürde dar (s. Kapitel 2.1.3).

Mit Hinblick auf eine perspektivische *in vivo*-Anwendung sollte ein zur Transfektion von Endothelzellen geeignetes Gentransfersystem für einen siRNA-basierten VCAM-Knockdown gefunden werden. Kationische Lipidmischungen liefern zwar gute Transfektionsergebnisse *in vitro*, zeigen aber *in vivo* häufig die Nachteile mangelnder Serumstabilität und erhöhter Toxizität (s. Kapitel 2.3.1). Aufgrund ihrer guten Pharmakokinetik und Verträglichkeit wurden sterisch stabilisierte Liposomen als Transfektionsvehikel ausgewählt.

Um das Problem geringer Einschussraten zu umgehen, erfolgte die Herstellung siRNA-haltiger Liposomen mittels Dualer Asymmetrischer Zentrifugation (s. Kapitel 2.3.2). Nach der erfolgreichen Präparation wurde das liposomale Transfektionssystem bezüglich der zellulären Aufnahme, des intrazellulären Freisetzungsvermögens sowie des Transfektionspotentials an bEnd.3-Endothelzellen geprüft.

4.2.1. Herstellung siRNA-haltiger Liposomen

Zur Herstellung siRNA-haltiger Liposomen wurden zwei Methoden – die konventionelle Hydratationsmethode sowie die Duale Asymmetrische Zentrifugation (DAC) – vergleichend untersucht. Dazu wurde jeweils eine pH-insensitive Lipidmischung aus POPC/Chol/mPEG-DSPE sowie eine pH-sensitive Lipidmischung aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE verwendet. Die eingeschlossene siRNA war entweder gegen VCAM-1-mRNA gerichtet (VCAM-siRNA) oder eine fluoreszenzmarkierte siRNA ohne Zielstruktur (6-FAM-siRNA).

Partikelgröße und -homogenität

Sowohl die Herstellung mittels Hydratationsmethode als auch mittels DAC resultierte in Liposomen mit kleinem Durchmesser und homogener Größenverteilung (s. Tabelle 4.1). Während durch die Hydratationstechnik im Vergleich mit der DAC homogene Präparationen erhalten wurden (Polydispersitätsindex (PI) $\sim 0,11$ bzw. $\sim 0,23$), lieferte letztere kleinere Partikel ($\varnothing \sim 120$ nm bzw. ~ 85 nm). Damit entsprachen die mittels DAC hergestellten siRNA-Liposomen den in der Literatur zu findenden Angaben [250]. Die Art des Hydratationsmediums (Puffer oder siRNA-haltige Lösung) hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße und -homogenität. Die Zusammensetzung der Lipidmischung dagegen wirkte sich bei beiden Herstellungsmethoden gleichermaßen aus: Unter Verwendung von POPC/Chol/mPEG-DSPE bildeten sich jeweils kleinere Liposomen aus als unter Verwendung von DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE.

siRNA-Einschluss

Wie Abbildung 4.5 zu entnehmen ist, wiesen mittels Hydratationsmethode hergestellte Liposomen lediglich siRNA-Einschlussraten unter 10% auf. Hingegen wurden durch die DAC bis zu 72% der eingesetzten siRNA liposomal verkapselt. Dieser Anteil konnte ohne vorherige Zerstörung der Liposomen durch den Fluoreszenzfarbstoff nicht erfasst werden, so dass von einer vollständigen Ummantelung durch die Lipidhülle auszugehen ist. Die Art der Lipidzusammensetzung sowie der zu verkapselnden siRNA zeigte keinen Einfluss auf die Einschlusseffizienz. Die erhaltenen Werte waren jeweils vergleichbar mit aus der Literatur bekannten siRNA-Einschlussquoten (Hydratationsmethode: 3 – 25%; DAC: 43 – 71%) [250, 260]. Bei Verwendung einer 50 μ M siRNA-Lösung zur Beladung von Liposomen mittels DAC ergaben sich aus den durchschnittlichen Einschlussraten (60% bzw. 68% für pH-insensitive bzw. pH-sensitive Liposomen) folgende siRNA:Lipid-Verhältnisse: 33 pmol/ μ mol für pH-insensitive Liposomen und 40 pmol/ μ mol für pH-sensitive Liposomen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die Hydratationsmethode als auch die DAC Liposomen mit geringem Durchmesser und einer homogenen Größenverteilung lieferte. Dabei lag die eingeschlossene siRNA jeweils vollständig von der Lipidhülle umkapselt vor, so dass von einem ausreichenden Schutz vor dem Abbau durch Serumnukleasen auszugehen ist. Durch das Fehlen einer kationischen Ladung und der Verwendung PEGylierter Lipide kann mit einer ausreichenden Serumstabilität und Zirkulationshalbwertszeit der Partikel gerechnet werden. Somit

Tab. 4.1.: Partikelgröße/-größenverteilung siRNA-haltiger Liposomen. (A) Herstellung mittels DAC. (B) Herstellung mittels Hydratationsmethode. Angegeben ist jeweils der Durchmesser sowie der Polydispersitätsindex als MW \pm SD.

(A)

	PBS	6-FAM-siRNA	VCAM-siRNA
POPC/Chol/mPEG-DSPE	72 \pm 5 nm 0,24 \pm 0,03	80 \pm 11 nm 0,25 \pm 0,03	57 \pm 7 nm 0,34 \pm 0,03
DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE	101 \pm 12 nm 0,17 \pm 0,04	106 \pm 7 nm 0,21 \pm 0,02	91 \pm 9 nm 0,19 \pm 0,02

(B)

	PBS	6-FAM-siRNA	VCAM-siRNA
POPC/Chol/mPEG-DSPE	110 \pm 13 nm 0,10 \pm 0,03	nb.	122 \pm 7 nm 0,09 \pm 0,06
DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE	119 \pm 9 nm 0,11 \pm 0,05	nb.	133 \pm 6 nm 0,12 \pm 0,04

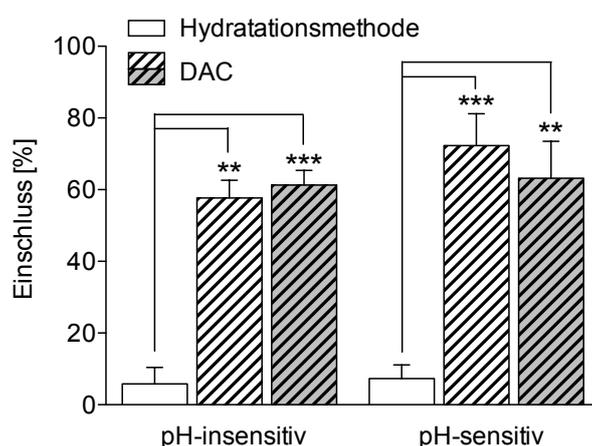


Abb. 4.5.: siRNA-Einschluss in Liposomen. VCAM-siRNA (weiß bzw. weiß/gestreift) oder 6-FAM-siRNA (grau/gestreift) wurden mittels Hydratationsmethode bzw. DAC in Liposomen eingeschlossen. Als Lipidmischung wurde entweder POPC/Chol/mPEG-DSPE (pH-insensitiv) oder DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (pH-sensitiv) verwendet. Die Bestimmung des liposomalen siRNA-Einschlusses erfolgte fluorimetrisch entweder direkt (6-FAM-siRNA) oder mithilfe des DNA-Farbstoffes PicoGreen[®] (VCAM-siRNA).

erfüllen diese Liposomen wichtige Voraussetzungen für eine potentielle systemische Anwendung als Transfektionsvermittler (s. Kapitel 2.3).

Allerdings konnte eine effiziente Verkapselung der siRNA nur mithilfe der DAC erreicht werden. Die Verwendung der Hydratationsmethode führte lediglich zu geringen Einschussraten. Ein Verfahren, mit dem Substanzen effektiv in Liposomen eingeschlossen werden können, ist insbesondere bei teuren Wirkstoffen wie siRNA von Interesse. Aufgrund der wesentlich verbesserten Einschlusseffizienz erfolgte die Herstellung siRNA-haltiger Liposomen im Folgenden ausschließlich mittels DAC.

4.2.2. Zelluläre Aufnahme von siRNA-Liposomen

Die zelluläre Aufnahme stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Wirksamkeit einer therapeutisch angewendeten siRNA dar (s. Kapitel 2.3). Daher wurde die intrazelluläre Anreicherung liposomal verkapselter siRNA am Beispiel fluoreszierender 6-FAM-siRNA in bEnd.3-Endothelzellen geprüft. Als Positivkontrolle wurde 6-FAM-siRNA mithilfe des kationischen Transfektionsreagenzes HiPerFect in bEnd.3-Zellen eingebracht.

Die Untersuchung am Durchflusszytometer zeigte, dass liposomale 6-FAM-siRNA konzentrationsabhängig von bEnd.3-Zellen aufgenommen wird (s. Abbildung 4.6 (A)). In der höchsten Konzentration führte die Verwendung pH-insensitiver bzw. pH-sensitiver Liposomen zu einer vergleichbaren intrazellulären siRNA-Anreicherung. In allen anderen Konzentrationen vermittelten pH-insensitive Liposomen eine signifikant bessere siRNA-Aufnahme als pH-sensitive Liposomen. Verglichen mit HiPerFect mussten allerdings beide Liposomensorten in zehnfach höheren Konzentrationen (bezogen auf die verkapselte siRNA) auf die Zellen gegeben werden, um eine gleichwertige siRNA-Aufnahme zu erreichen.

Die erhaltenen Resultate wurden durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse von bEnd.3-Zellen nach Inkubation mit 10 nM 6-FAM-siRNA bestätigt (s. Abbildung 4.6 (B)). Während HiPerFect eine deutliche intrazelluläre siRNA-Anreicherung vermittelte, wurden durch pH-insensitive bzw. pH-sensitive Liposomen geringere Mengen siRNA in die Zelle eingebracht.

Es wurde festgestellt, dass mithilfe liposomaler Vektoren eine intrazelluläre siRNA-Akkumulation in bEnd.3-Endothelzellen erreicht werden kann. Somit ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion erfüllt. Im Vergleich mit HiPerFect fiel die durch Liposomen vermittelte siRNA-Aufnahme jedoch geringer aus. Dies war aus folgenden Gründen zu erwarten:

4. Ergebnisse und Diskussion

Da HiPerFect als kommerzielles Transfektionsreagenz kationische Komponenten enthält, ist es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Zellmembran befähigt. Demnach ist mit einer guten zellulären Aufnahme von HiPerFect-siRNA-Komplexen zu rechnen. Diese konnte an bEnd.3-Zellen bestätigt werden.

Zur Herstellung der liposomalen Transfektionsvermittler wurden keine kationischen Zusätze verwendet. Während pH-insensitive Liposomen ungeladen waren, enthielten pH-sensitive Liposomen mit dem Lipid CHEMS eine anionische Komponente.

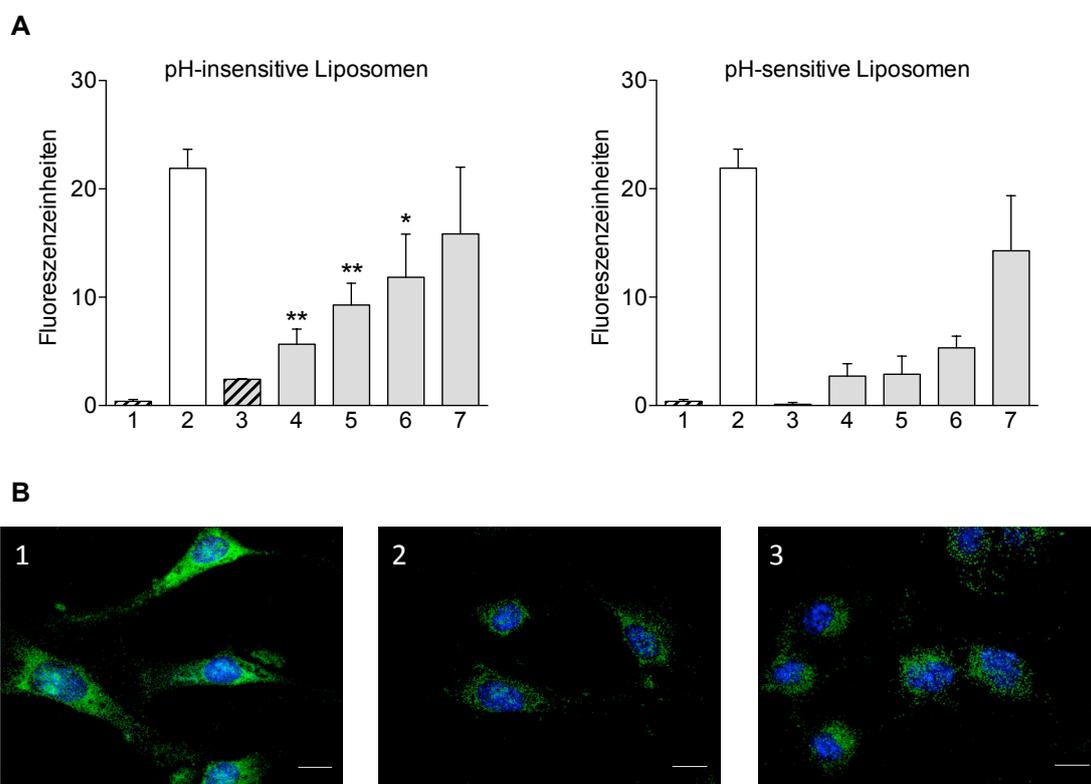


Abb. 4.6.: Zelluläre Aufnahme von siRNA-Liposomen. bEnd.3-Zellen wurden für 24 h mit liposomaler 6-FAM-siRNA inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen bezeichnen jeweils die Konzentrationen komplexierter bzw. liposomal verkapselter siRNA im Zellkulturüberstand. **(A) Untersuchung am Durchflusszytometer.** (1) HiPerFect; (2) HiPerFect-siRNA 10 nM; (3) Leerliposomen; (4) siRNA-Liposomen 10 nM; (5) siRNA-Liposomen 25 nM; (6) siRNA-Liposomen 50 nM; (7) siRNA-Liposomen 100 nM. Die als signifikant gekennzeichneten Proben unterscheiden sich jeweils statistisch signifikant von Proben pH-sensitiver Liposomen der gleichen siRNA-Konzentration. **(B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.** (1) HiPerFect-siRNA 10 nM; (2) pH-insensitive siRNA-Liposomen 10 nM; (3) pH-sensitive siRNA-Liposomen. (grün = 6-FAM-siRNA; blau = Zellkern; Maßstabsbalken = 20 μ m.)

Insbesondere bei letzteren war daher von einer herabgesetzten Affinität zur negativ geladenen Zellmembran auszugehen [309]. Auch die Ausstattung mit einer sterisch stabilisierten Lipidhülle erschwert die Interaktion von Liposomen mit den Zielzellen [310, 311]. Daher war eine reduzierte zelluläre Aufnahme der hier eingesetzten liposomalen Gentransfersysteme anzunehmen. Die signifikante Überlegenheit pH-insensitiver Liposomen im Vergleich mit pH-sensitiven Liposomen im unteren Konzentrationsbereich kann in der unterschiedlichen Nettoladung der Lipidmischungen begründet sein.

4.2.3. Intrazelluläre Wirkstofffreisetzung aus Liposomen

Außer der zellulären Aufnahme stellt die intrazelluläre Freisetzung der siRNA aus ihrem Vehikel in das Zytoplasma eine weitere wichtige Bedingung für die erfolgreiche posttranskriptionelle Expressionshemmung eines Proteins dar. Daher sollte im Folgenden die intrazelluläre Wirkstofffreisetzung aus den verwendeten pH-insensitiven (POPC/Chol/mPEG-DSPE) und pH-sensitiven Liposomen (DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE) überprüft werden. Dazu wurden bEnd.3-Zellen mit 6-Carboxyfluorescein (6-CF)-haltigen Liposomen inkubiert und der intrazellulär freigegebene Fluoreszenzfarbstoff am Durchflusszytometer vermessen.

Nach 60-minütiger Inkubation konnte eine deutliche 6-CF-Freisetzung aus pH-sensitiven Liposomen festgestellt werden, die im Vergleich mit pH-insensitiven Liposomen um mehr als eine Zehnerpotenz erhöht war (s. Abbildung 4.7). Dieser Unterschied war nach 120 min noch etwas deutlicher ausgeprägt.

Erwartungsgemäß zeigten pH-sensitive Liposomen eine bessere intrazelluläre Wirkstofffreisetzung als pH-insensitive Liposomen. Da siRNA erst nach Freisetzung aus dem Trägersystem wirksam ist, kann daraus ein möglicher Vorteil pH-sensitiver Liposomen als Transfektionsvermittler abgeleitet werden.

Im Allgemeinen wird als Ursache für das verbesserte Freisetzungsvermögen pH-sensitiver Liposomen ein pH-abhängiger Verlust der vesikulären Struktur im Zuge der intrazellulären Prozessierung postuliert (s. Kapitel 2.2.2). Auch andere Autoren beobachteten ein verbessertes Freisetzungsvermögen von Liposomen aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE im Vergleich zu pH-insensitiven PEGylierten Liposomen. Sie stellten allerdings fest, dass dieses nicht auf einer pH-abhängigen Destabilisierung beruhen kann, da Liposomen aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE im Gegensatz zu nicht-PEGylierten Liposomen aus DOPE/CHEMS kaum pH-Sensitivität aufwiesen. Daher wird angenommen, dass weitaus komplexere Mechanismen als der

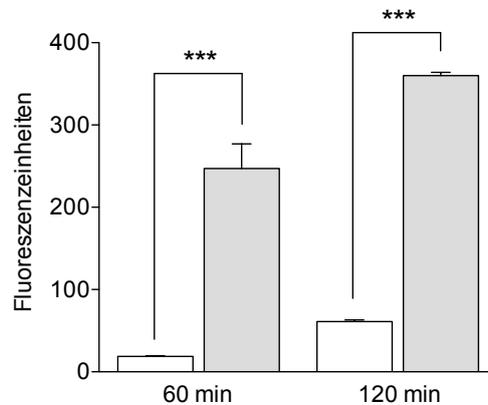


Abb. 4.7.: Intrazelluläre 6-CF-Freisetzung aus pH-sensitiven Liposomen. Die Messung der intrazellulären Farbstofffreigabe aus pH-sensitiven (grau) bzw. pH-insensitiven Liposomen (weiß) erfolgte durchflusszytometrisch nach 60 bzw. 120 minütiger Inkubation von bEnd.3-Zellen mit den entsprechenden Liposomen bei 37 °C.

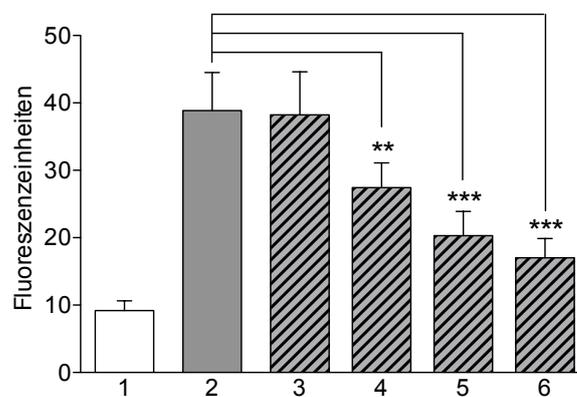


Abb. 4.8.: VCAM-1-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-siRNA. Die Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-siRNA erfolgte mittels HiPerFect. Nach 48 h wurden die Zellen mit fluoreszierendem α -VCAM-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer vermessen. Die Ansätze (2) – (6) wurden 18 h zuvor mit TNF- α (50 ng/mL) stimuliert. Die angegebenen Konzentrationen bezeichnen die siRNA-Konzentration im Zellkulturüberstand. (1) unstimulierte Zellen; (2) stimulierte Zellen; stimulierte Zellen mit (3) HiPerFect, (4) HiPerFect-siRNA 10 nM, (5) HiPerFect-siRNA 25 nM, (6) HiPerFect-siRNA 50 nM.

alleinige pH-abhängige Strukturverlust für die gesteigerte intrazelluläre Freisetzung pH-sensitiver Liposomen verantwortlich sind [132, 312, 313].

Der Einfachheit halber soll im Folgenden die Bezeichnung „pH-sensitive Liposomen“ für Liposomen aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE beibehalten werden.

4.2.4. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit (liposomaler) VCAM-siRNA

siRNA-basierte Expressionshemmung von endotheliale VCAM-1

Um das Knockdown-Potential der zur Verfügung stehenden Mischung aus vier verschiedenen VCAM-siRNA (Sequenzen s. Tabelle 3.6) zu überprüfen, wurde diese zunächst mithilfe des kommerziellen Transfektionsmittels HiPerFect in bEnd.3-Endothelzellen eingebracht.

Wie Abbildung 4.8 zu entnehmen ist, bewirkte die Transfektion mit VCAM-siRNA eine signifikante Reduktion von VCAM-1 auf der Oberfläche stimulierter bEnd.3-Zellen. Die VCAM-Rezeptordichte konnte konzentrationsabhängig bis auf ca. 50% des Ausgangswertes gesenkt werden. Da reines Transfektionsreagenz keinen Einfluss auf die VCAM-Expression der Zellen ausübte, kann von einem siRNA-spezifischen Effekt ausgegangen werden.

Transfektion von bEnd.3-Zellen mit siRNA-Liposomen

Im nächsten Schritt wurde die Eignung der liposomalen Gentransfersysteme zur Transfektion von VCAM-siRNA in bEnd.3-Zellen geprüft. Als Positivkontrolle wurde VCAM-siRNA mittels HiPerFect in bEnd.3-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle dienten siRNA-freie Liposomen (Leerliposomen).

Wie in Abbildung 4.9 (A) dargestellt, waren pH-insensitive siRNA-Liposomen nicht in der Lage, die VCAM-Expression auf bEnd.3-Zellen herunterzuregulieren, sondern führten zum Teil sogar zu gesteigerten Expressionsraten. Auch niedrige Konzentrationen pH-sensitiver siRNA-Liposomen ($\hat{=}$ 10 – 25 nM liposomale siRNA) bewirkten keine Reduktion der VCAM-Expression (s. Abbildung 4.9 (B)). Dagegen gelang durch die Transfektion mit pH-sensitiven siRNA-Liposomen in hohen Konzentrationen ($\hat{=}$ 50 – 100 nM liposomale siRNA) eine signifikante Senkung der VCAM-Molekülanzahl auf der Zelloberfläche. Der durch pH-sensitive siRNA-Liposomen maximal erzielte Effekt übertraf sogar das durch Transfektion mit HiPerFect erreichte Ausmaß der VCAM-Reduktion. Allerdings führte auch die Inkubation mit einer vergleichbaren Menge siRNA-freier Liposomen zu einer deutlich erniedrigten Rezeptordichte. Da

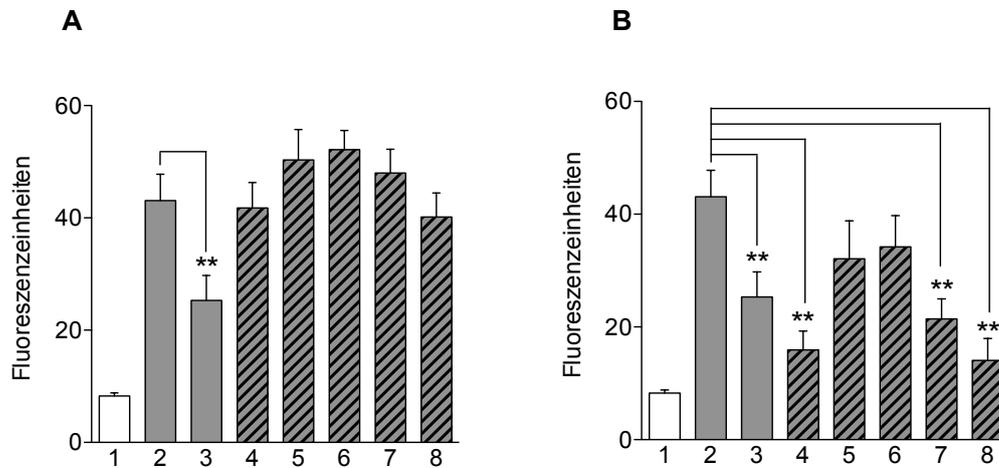


Abb. 4.9.: Transfektion von bEnd.3-Zellen mit siRNA-Liposomen. VCAM-siRNA wurde mittels pH-insensitiver Liposomen (POPC/Chol/mPEG-DSPE) bzw. mittels pH-sensitiver Liposomen (DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE) in bEnd.3-Zellen transfiziert. Die Bestimmung der VCAM-Expression erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Ansätze (2) – (8) wurden 18 h vor der Vermessung mit TNF- α (50 ng/mL) stimuliert. Die angegebenen Konzentrationen bezeichnen jeweils die Konzentration komplexierter bzw. liposomal verkapselter siRNA im Zellkulturüberstand. **(A) Transfektion mit pH-insensitiven VCAM-siRNA-Liposomen.** **(B) Transfektion mit pH-sensitiven VCAM-siRNA-Liposomen.** (1) unstimulierte Zellen; (2) stimulierte Zellen; stimulierte Zellen transfiziert mit (3) HiPerFect-siRNA 10 nM, (4) Leerliposomen, (5) siRNA-Liposomen 10 nM, (6) siRNA-Liposomen 25 nM, (7) siRNA-Liposomen 50 nM, (8) siRNA-Liposomen 100 nM.

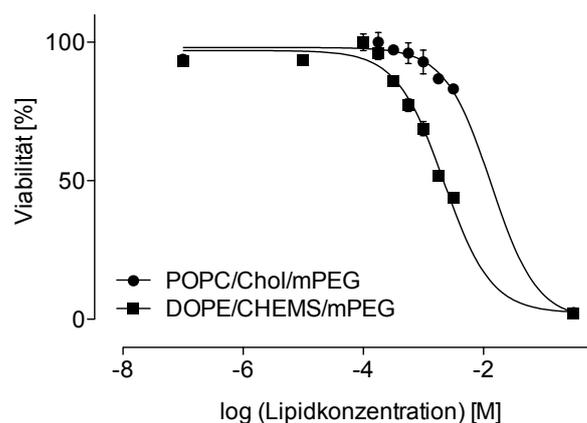


Abb. 4.10.: Zytotoxizität von Liposomen. bEnd.3-Zellen wurden für 48 h mit pH-insensitiven bzw. pH-sensitiven Liposomen inkubiert. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte mittels MTT-Assay. IC_{50} (POPC/Chol/mPEG-DSPE) = 13,3 mM; IC_{50} (DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE) = 2,2 mM.

bekannt ist, dass die Langzeitinkubation mit hohen Lipidkonzentrationen die Zellviabilität beeinflussen kann [314, 315], wurde als Ursache ein toxischer Effekt des Transfektionsvehikels vermutet. Daher wurde die Zytotoxizität der verwendeten Liposomen mittels MTT-Assay geprüft. Der ermittelte IC_{50} -Wert betrug 13,3 mM für die pH-insensitive Lipidmischung bzw. 2,2 mM für die pH-sensitive Lipidmischung (s. Abbildung 4.10). Somit lagen die in diesen Versuchen maximal zur Transfektion eingesetzten Lipidkonzentrationen ($\leq 2,8$ mM für pH-insensitive Liposomen bzw. $\leq 2,4$ mM für pH-sensitive Liposomen) in einem Bereich, bei der pH-sensitive Liposomen die Viabilität von bEnd.3-Zellen beeinträchtigen. Dies scheint eine gestörte VCAM-Expression zur Folge zu haben.

Obwohl bestätigt werden konnte, dass die verwendete VCAM-siRNA-Mischung zur posttranskriptionellen Genausschaltung von VCAM-1 in bEnd.3-Zellen geeignet ist (s. Kapitel 4.2.4), wurde durch Liposomen als siRNA-Trägersystem keine siRNA-spezifische VCAM-Reduktion erreicht. Mehrere Erklärungen kommen als Ursache für die fehlende Transfektionsfähigkeit der liposomalen Formulierungen in Frage:

- Durch die liposomale Verkapselung mittels DAC wurde die Integrität und damit die Wirksamkeit der VCAM-siRNA beeinträchtigt. Diese wurden hier nicht explizit geprüft. Allerdings ist der Literatur zu entnehmen, dass die Struktur der siRNA während der Dualen Asymmetrischen Zentrifugation nicht beschädigt wird [250]. Auch eine Kontamination mit RNasen kann zu einer Degradierung der siRNA führen. Aufgrund der getroffenen Vorsichtsmaßnahmen (s. Kapitel 3.9.1) erscheint dies unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.
- Die verwendeten Liposomen sind zur Transfektion von bEnd.3-Endothelzellen ungeeignet. Dies kann entweder in einer mangelnden zellulären Aufnahme der Liposomen oder in einer unzureichenden intrazellulären Freisetzung der liposomalen siRNA begründet sein:
 - Auch wenn die Aufnahme von liposomaler siRNA in bEnd.3-Endothelzellen gezeigt werden konnte, fiel diese im Vergleich mit der durch das kationische Transfektionsreagenz HiPerFect erzielten siRNA-Aufnahme niedrig aus (s. Kapitel 4.2.2). Daher ist eine zu geringe intrazelluläre siRNA-Anreicherung eine mögliche Erklärung für die fehlende Wirkung. Die Transfektion mit höheren Konzentrationen an siRNA-Liposomen war jedoch aufgrund zelltoxischer Nebenwirkungen der Trägersysteme nicht möglich (s.o.).

- Als weitere Erklärung ist eine unzureichende intrazelluläre Freisetzung der liposomalen siRNA denkbar. Im getesteten Modellsystem zur liposomalen Wirkstofffreisetzung wurde der hydrophile Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein in Liposomen verkapselt. Dabei handelt es sich im Gegensatz zu siRNA um eine niedermolekulare Substanz. Diese vermag die umgebende Lipidhülle wesentlich leichter zu überwinden und führt somit wahrscheinlich zu besseren Freisetzungsraten als liposomal eingeschlossene Nukleinsäuren. Wird die siRNA nach der zellulären Aufnahme nicht rechtzeitig aus dem endosomalen Kompartiment freigesetzt, kommt es in den Lysosomen zum enzymatischen Abbau und damit zu einem Wirkverlust der siRNA (s. Kapitel 2.2.2).

4.3. Liposomale Transfektion von VCAM-shRNA

Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, führte die liposomale Transfektion von VCAM-siRNA in bEnd.3-Zellen nicht zum gewünschten endothelialen VCAM-Knockdown. Als mögliche Ursache wurde insbesondere eine zu geringe Konzentration der siRNA am Wirkort diskutiert.

Außer siRNA können zur posttranskriptionellen Expressionshemmung auch shRNA-kodierende Plasmide eingesetzt werden. Es wurde berichtet, dass diese im Vergleich mit siRNA schon in geringeren Konzentrationen wirksam sind. So soll die Integration von weniger als fünf Kopien eines shRNA-Plasmids in das Wirtsgenom ausreichen, um eine posttranskriptionelle Ausschaltung des Zielproteins zu erreichen [95]. Daher sollte ein Knockdown von endotheliale VCAM-1 im Folgenden durch die Transfektion mit liposomal verkapselten VCAM-shRNA-kodierenden Plasmiden anstelle von siRNA erreicht werden.

4.3.1. shRNA-basierte Expressionshemmung von endotheliale VCAM-1

Für die posttranskriptionelle Genausschaltung von VCAM-1 standen fünf Plasmide zur Verfügung, die jeweils für eine andere gegen murines VCAM-1 gerichtete shRNA kodierten (Sequenzen s. Tabelle 3.7). Da verschiedene shRNA-Plasmide gegen dasselbe Protein in Abhängigkeit von der gewählten Zelllinie unterschiedlich effizient sein können, wurden zunächst alle fünf Klone mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene[®] 6 in bEnd.3-Zellen transfiziert und diese nach 48 h hinsichtlich ihres VCAM-Expressionsniveaus untersucht.

Im Vergleich zu stimulierten Zellen waren nur die Klone 1 und 3 in der Lage, die Zahl der VCAM-Moleküle auf der Zelloberfläche signifikant herunterzuregulieren (s. Abbildung 4.11). Während Klon 4 und 5 die VCAM-Rezeptordichte nicht beeinflussen, führte die Transfektion mit Klon 2 sogar zu einer erhöhten VCAM-Expression. Da sich Klon 1 im Gegensatz zu Klon 3 außer durch sein Knockdown-Potential auch durch gute Ausbeuten bei der Isolierung aus *E. coli* (s. Kapitel 3.9.2) auszeichnete, wurde Klon 1 für Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen ausgewählt.

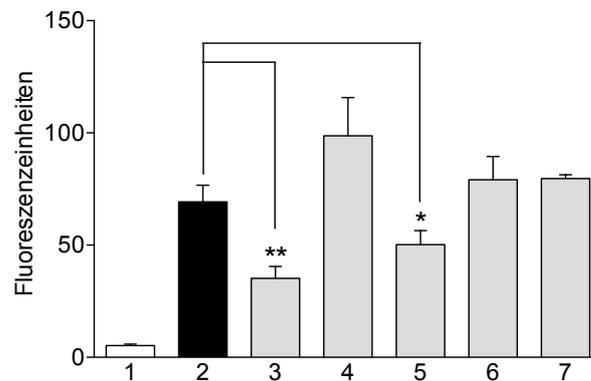


Abb. 4.11.: VCAM-Knockdown durch Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-shRNA. Die Bestimmung der VCAM-1-Expression erfolgte durchflusszytometrisch 48 h nach der Transfektion durch Markierung der Zellen mit einem fluoreszierenden α -VCAM-Antikörper. 18 h vor Versuchsdurchführung wurden die Ansätze (2) – (7) mit TNF- α (50 ng/mL) stimuliert. (1) Wildtyp-Zellen (unstimuliert); (2) Wildtyp-Zellen (stimuliert); mit (3) VCAM-shRNA Klon 1, (4) VCAM-shRNA Klon 2, (5) VCAM-shRNA Klon 3, (6) VCAM-shRNA Klon 4 bzw. (7) VCAM-shRNA Klon 5 transfizierte Zellen (stimuliert).

4.3.2. Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen

Die Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen sollte durch Duale Asymmetrische Zentrifugation (DAC) erfolgen, da diese Methode bei der Verkapselung von siRNA zu hohen Einschussraten führte (s. Kapitel 4.2.1). Dieses Verfahren wurde für die Präparation siRNA-haltiger Liposomen optimiert [250] und ist zur Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen in der Literatur bisher nicht beschrieben. Daher musste zunächst die Eignung dieser Methode für den liposomalen Einschluss von Plasmiden festgestellt werden.

Tab. 4.2.: Partikelgröße/-größenverteilung Plasmid-haltiger Liposomen. (A) Herstellung mittels DAC. (B) Herstellung mittels Hydratationsmethode. Angegeben ist jeweils der Durchmesser sowie der Polydispersitätsindex als MW \pm SD.

(A)

	PBS	GFP	shRNA
POPC/Chol/mPEG-DSPE	79 \pm 11 nm 0,27 \pm 0,03	78 \pm 9 nm 0,27 \pm 0,04	100 \pm 12 nm 0,22 \pm 0,02
DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE	81 \pm 9 nm 0,23 \pm 0,04	90 \pm 8 nm 0,23 \pm 0,06	72 \pm 7 nm 0,27 \pm 0,03

(B)

	PBS	GFP	shRNA
POPC/Chol/mPEG-DSPE	110 \pm 13 nm 0,10 \pm 0,03	121 \pm 10 nm 0,08 \pm 0,04	nb.
DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE	119 \pm 9 nm 0,11 \pm 0,05	128 \pm 8 nm 0,12 \pm 0,08	nb.

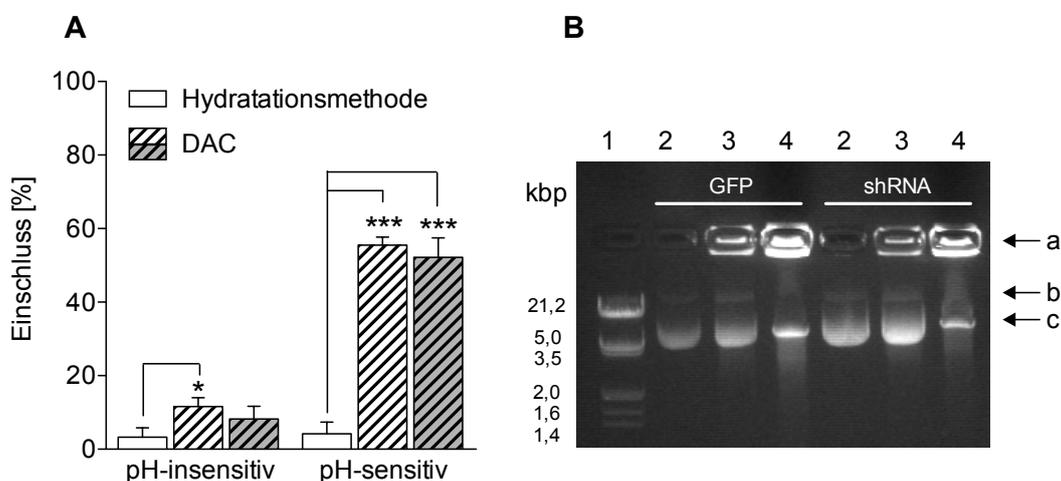


Abb. 4.12.: Plasmideinschluss in Liposomen. (A) Quantifizierung mittels PicoGreen[®]-Assay. GFP- (weiß bzw. weiß/gestreift) oder VCAM-shRNA-kodierende Plasmide (grau/gestreift) wurden mittels Hydratationsmethode bzw. DAC in Liposomen eingeschlossen. Als Lipidmischung wurde POPC/Chol/mPEG-DSPE (pH-insensitiv) oder DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (pH-sensitiv) verwendet. (B) Nachweis mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die aufgetragenen Liposomen wurden mittels DAC hergestellt. (1) Größenstandard; (2) Plasmid; (3) pH-insensitive Plasmid-Liposomen; (4) pH-sensitive Plasmid-Liposomen. (a) Liposomal verkapselte DNA; (b) freie DNA in offen-zirkulärer Konformation; (c) freie DNA in superhelikaler Konformation.

Partikelgröße und -homogenität

Wie Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, wurden sowohl bei der Liposomenherstellung mittels DAC als auch mittels Hydratationsmethode kleine homogene Partikel erhalten. Der Einschluss von GFP- bzw. VCAM-shRNA-kodierenden Plasmiden anstelle von Puffer hatte dabei keinen Einfluss auf die Größe oder Homogenität. Im Vergleich zur Hydratationsmethode lieferte die DAC Liposomen mit geringem Durchmesser (~ 80 nm vs. ~ 120 nm). Allerdings zeigten die durch das Hydratationsverfahren hergestellten Präparationen eine homogenere Größenverteilung (Polydispersitätsindex (PI) $\sim 0,1$ vs. $\sim 0,2$). Somit waren die Partikelgrößen und Polydispersitätsindices von Plasmid-haltigen Liposomen vergleichbar mit denen von siRNA-Liposomen (s. Kapitel 4.2.1).

Plasmideinschluss

Mittels Hydratationstechnik hergestellte Liposomen zeigten erwartungsgemäß nur geringe Plasmid-Einschlussraten von unter 10% (s. Abbildung 4.12 (A)). Dagegen wurden durch die DAC bis zu knapp 60% der eingesetzten Plasmide liposomal verkapselt. Aufgrund der verwendeten Methode zur DNA-Quantifizierung (s. Kapitel 3.3.5) kann dabei von einer vollständigen Ummantelung der Plasmide durch die Lipidhülle ausgegangen werden. Die Wahl des Plasmids (GFP bzw. VCAM-shRNA) zeigte keinen Einfluss auf die Beladungseffizienz. Die eingesetzte Lipidmischung wirkte sich dagegen deutlich auf das Ergebnis aus: Während in pH-sensitive Liposomen aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE die Verkapselung von durchschnittlich 54% der eingesetzten DNA gelang, konnten bei Verwendung der pH-insensitiven Lipide POPC/Chol/mPEG-DSPE nur niedrige Einschlussraten um 10% erzielt werden. Bei Verwendung einer Plasmid-Lösung der Konzentration $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ zur Herstellung Plasmid-haltiger Liposomen mittels DAC ergeben sich aus den durchschnittlichen Einschlussraten folgende Lipid:DNA-Verhältnisse: $0,9 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ für pH-insensitive Liposomen bzw. $5,3 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ für pH-sensitive Liposomen.

Die Beladung der Liposomen erfolgt bei der DAC durch einen passiven Einschluss des Dispersionsmittels. Daher war die unterschiedliche Einschlusseffizienz der beiden Lipidmischungen bei gleicher Vorgehensweise nicht zu erwarten. Allenfalls anionische Zusätze wie CHEMS können eine elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Plasmide und damit verringerte Beladungsraten verursachen. Dennoch war die anionische pH-sensitive Mischung der neutralen pH-insensitiven Mischung bezüglich des Plasmideinschlusses überlegen. Mögliche methodische Fehler bei der hier verwendeten DNA-Bestimmung mittels PicoGreen[®] sollten ausgeschlossen werden, indem der Plasmideinschluss zusätzlich gelelektrophoretisch untersucht wurde. Wie aus Abbildung

4.12 (B) hervorgeht, bestätigte das erhaltene Gel die Ergebnisse der fluorimetrischen Messung. Im Gegensatz zu Proben pH-insensitiver Plasmid-Liposomen verblieben von pH-sensitiven Plasmid-Liposomen große DNA-Mengen in den Einfülltaschen des Gels. Dies weist auf die liposomale Verkapselung des Plasmids hin [316].

Um die hier beobachteten Unterschiede in der Einschlusseffizienz der beiden Lipidzusammensetzungen erklären zu können, erscheint die systematische Untersuchung weiterer Lipidmischungen sinnvoll.

Integrität und Funktionalität der liposomal eingeschlossenen Plasmide

Im Vergleich zu siRNA ist Plasmid-DNA aufgrund ihrer Größe und superhelikalen Konformation anfälliger gegenüber mechanischer Belastung. Da bei der DAC hohe Scherkräfte auf die Probe einwirken, ist eine Beschädigung des zu verkapselnden Plasmids während der Liposomenherstellung möglich. Dabei ist die Entstehung kurzer linearer DNA-Bruchstücke denkbar, wahrscheinlicher ist allerdings der Verlust der superhelikalen Konformation zugunsten anderer Isomere. Dieser ist jedoch ausreichend, um die biologische Aktivität der DNA zu beeinträchtigen [317].

Um die Integrität der liposomal eingeschlossenen Plasmide zu überprüfen, wurden diese durch das Extraktionsverfahren nach Bligh & Dyer isoliert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Da die Größe eines Moleküls nicht nur von seinem Molekulargewicht, sondern auch von seiner Geometrie abhängt, können mithilfe von Agarosegelen auch Plasmide mit der gleichen Sequenz aber unterschiedlicher Konformation voneinander getrennt werden. So ist das gleiche DNA-Molekül in superhelikaler Form dichter gepackt und scheinbar kleiner als in der offen-zirkulären oder linearisierten Form und wandert somit schneller durch das Agarosegel. Um durch das Extraktionsverfahren bedingte Konformationsänderungen offenzulegen, wurde jeweils eine Probe mit reinem Plasmid analog zu den Plasmid-haltigen Liposomen behandelt.

Wie aus Abbildung 4.13 (A) hervorgeht, wurde die Konformation der eingesetzten Plasmid-DNA während der DAC nicht verändert. Die mittels Bligh & Dyer-Verfahren isolierten Plasmide aus pH-insensitiven und pH-sensitiven Liposomen wiesen das gleiche Verhältnis der superhelikalen zur offen-zirkulären Form auf wie die nicht-liposomalen DNA-Proben. Im Vergleich zu unbehandelten Plasmiden war der Anteil an offen-zirkulären Molekülen bei den extrahierten Proben allenfalls leicht erhöht. Dies kann auf das angewendete Bligh & Dyer-Verfahren zurückzuführen sein. Die in den Einfülltaschen erkennbaren Banden der Proben pH-sensitiver Liposomen weisen darauf hin, dass die Lipidabtrennung unvollständig vollzogen wurde. Dies

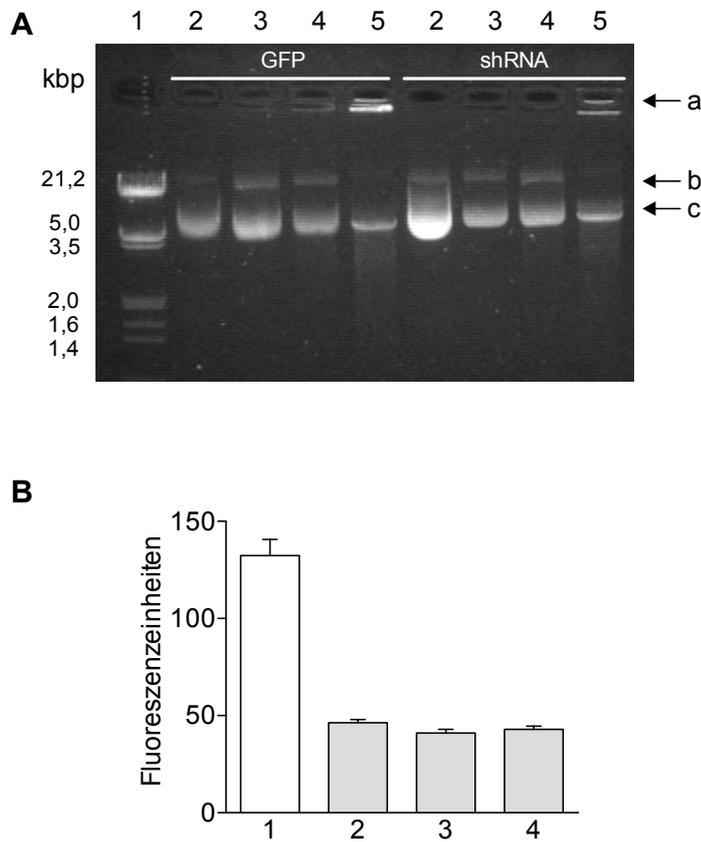


Abb. 4.13.: Integrität liposomal eingeschlossener Plasmide. (A) Untersuchung der Struktur. Die liposomal eingeschlossenen Plasmide wurden mittels Blich & Dyer-Extraktion isoliert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. (1) Größenstandard; (2) Plasmid; durch Blich & Dyer-Extraktion isoliertes (3) Plasmid, (4) Plasmid aus pH-insensitiven Liposomen, (5) Plasmid aus pH-sensitiven Liposomen. (a) Liposomal verkapselte DNA; (b) freie DNA in offen-zirkulärer Konformation; (c) freie DNA in superhelikaler Konformation. **(B) Untersuchung der Funktionalität.** Die liposomal eingeschlossenen GFP-Plasmide wurden durch Blich & Dyer-Extraktion isoliert und mithilfe des kommerziellen Transfektionsreagenzes Fugene[®] 6 in bEnd.3-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde die GFP-Expression am Durchflusszytometer bestimmt. (1) Plasmid, (2) durch Blich & Dyer-Extraktion isoliertes Plasmid, (3) durch Blich & Dyer-Extraktion isoliertes Plasmid aus pH-insensitiven Liposomen, (4) durch Blich & Dyer-Extraktion isoliertes Plasmid aus pH-sensitiven Liposomen.

hätte möglicherweise durch eine wiederholte Extraktionsprozedur vermieden werden können.

Auch wenn der Strukturverlust der Plasmide während des Herstellungsverfahrens auf die Funktionalität der verkapselten Plasmide hindeutete, sollte diese an einem zellulären System sichergestellt werden. Dazu wurden die in pH-insensitive bzw. pH-sensitive Liposomen eingeschlossenen GFP-Plasmide im Bligh & Dyer-Verfahren extrahiert und mithilfe des kommerziellen Transfektionsreagenzes Fugene[®] 6 in bEnd.3-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen hinsichtlich ihrer GFP-Expression analysiert. Dabei zeigten Plasmide aus pH-insensitiven und pH-sensitiven Liposomen ebenso hohe Expressionsraten wie freies Plasmid, das ebenfalls einer Bligh & Dyer-Extraktion unterzogen wurde (s. Abbildung 4.13 (B)). Daher ist anzunehmen, dass die Funktionalität der Plasmide während der DAC vollständig erhalten bleibt. Allerdings wurde die Transfektionsfähigkeit der Plasmide durch Anwendung des Bligh & Dyer-Verfahrens erheblich beeinträchtigt. Dies macht der Vergleich von unbehandeltem Plasmid mit extrahiertem Plasmid deutlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DAC eine geeignete Methode für den liposomalen Einschluss von Plasmid-DNA darstellt. Die resultierenden Liposomen wiesen geringe Partikelgrößen bei einer homogenen Größenverteilung auf. Bei Verwendung der pH-sensitiven Lipidmischung aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE führte die DAC zu Plasmid-Einschlussraten von über 50% und war somit anderen Herstellungstechniken überlegen, sofern dort ebenfalls keine kationischen Lipide beigemischt wurden [318]. Im direkten Vergleich zeigten mittels Hydratationsmethode hergestellte Liposomen eine Einschlusseffizienz von unter 10%. Weiterhin konnte sichergestellt werden, dass die DAC weder die strukturellen noch die funktionalen Eigenschaften der Plasmid-DNA beeinträchtigt, die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transfektion sind.

4.3.3. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Plasmid-Liposomen

Zur Untersuchung des Transfektionspotentials wurden bEnd.3-Endothelzellen mit den verschiedenen Plasmid-Liposomen inkubiert und nach 48 h hinsichtlich ihrer GFP- bzw. VCAM-1-Expression analysiert.

Zunächst soll die in Abbildung 4.14 (A) dargestellte Transfektion von bEnd.3-Zellen mit pH-insensitiven Liposomen aus POPC/Chol/mPEG-DSPE betrachtet werden. Während mit Fugene[®] 6-Komplex transfizierte Zellen große Mengen GFP exprimierten, führte die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen GFP-

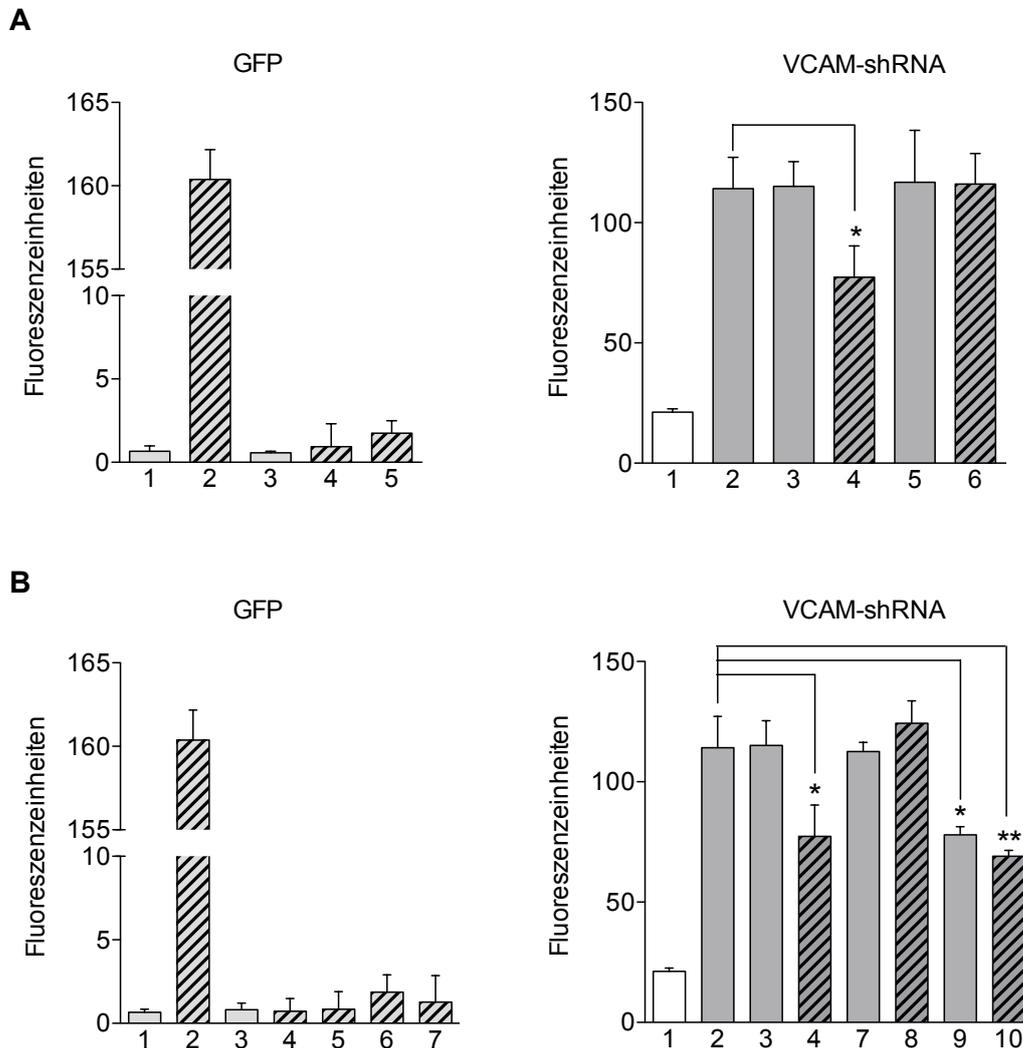


Abb. 4.14.: Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Plasmid-Liposomen. (A) Transfektion mit pH-insensitiven Liposomen. (B) Transfektion mit pH-sensitiven Liposomen. Die Expressionsanalyse erfolgte jeweils 48 h nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Konzentrationen der komplexierten oder liposomal verkapselten Plasmide im Zellkulturüberstand. **linke Spalte: Transfektion von GFP-Plasmid.** (1) Fugene[®] 6; (2) Plasmid-Fugene[®] 6 (1,0 µg/mL); (3) Leerliposomen; (4) Plasmid-Liposomen (1,0 µg/mL); (5) Plasmid-Liposomen (2,5 µg/mL); (6) Plasmid-Liposomen (5,0 µg/mL); (7) Plasmid-Liposomen (10,0 µg/mL). **rechte Spalte: Transfektion von VCAM-shRNA.** Zur Bestimmung der VCAM-Expression wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. (1) unstimulierte Zellen; (2) stimulierte Zellen; stimulierte Zellen mit (3) Fugene[®] 6, (4) Plasmid-Fugene[®] 6 (1,0 µg/mL), (5) Leerliposomen äquivalent zu (6), (6) Plasmid-Liposomen (2,5 µg/mL), (7) Leerliposomen äquivalent zu (8), (8) Plasmid-Liposomen (5,0 µg/mL), (9) Leerliposomen äquivalent zu (10), (10) Plasmid-Liposomen (10,0 µg/mL).

Plasmid-haltiger Liposomen zu keiner relevanten GFP-Expression (s. Abbildung links). Auch die liposomale Transfektion von VCAM-shRNA blieb ohne Erfolg (s. Abbildung rechts): Im Gegensatz zu Fugene[®] 6-Komplexen vermochte liposomal transfizierte VCAM-shRNA die VCAM-Expression in stimulierten bEnd.3-Zellen nicht herunterzuregulieren. Die reinen Transfektionsreagenzien (Fugene[®] 6 bzw. Leerliposomen) blieben jeweils ohne Einfluss auf die Expressionsraten.

Obwohl sich pH-sensitive Liposomen im Vergleich zu pH-insensitiven Liposomen durch eine verbesserte intrazelluläre Freisetzung des eingeschlossenen Inhalts auszeichnen (s. Kapitel 4.2.3) und zur Transfektion höhere Plasmidkonzentrationen eingesetzt wurden, blieb die Expression von GFP-Plasmid auch nach Transfektion mit DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE-Liposomen aus (s. Abbildung 4.14 (B), links). Auch die Inkubation der Zellen mit einer niedrigen Konzentration pH-sensitiver VCAM-shRNA-Liposomen ($\hat{=}$ 5,0 μ g liposomales Plasmid/mL Zellkulturüberstand) blieb ohne Wirkung (s. Abbildung rechts). Dagegen zeigte die höchste Konzentration pH-sensitiver VCAM-shRNA-Liposomen ($\hat{=}$ 10,0 μ g liposomales Plasmid/mL Zellkulturüberstand) einen deutlichen Effekt auf die VCAM-Expression von bEnd.3-Zellen: Diese war im Vergleich mit stimulierten Zellen signifikant herunterreguliert und entsprach der durch VCAM-shRNA-Fugene[®] 6 erzielten Expressionshemmung. Allerdings führte auch eine entsprechende Menge Plasmid-freier Leerliposomen zu ähnlich erniedrigten VCAM-Expressionsraten. Analoge Beobachtungen waren bei der Transfektion mit siRNA-haltigen Liposomen gemacht worden; als Ursache wurde eine zelltoxische Wirkung hoher Konzentrationen der liposomalen Trägersysteme gefunden (s. Kapitel 4.2.4). Auch hier wurden maximale Mengen pH-sensitiver Liposomen zur Transfektion eingesetzt (\leq 2,1 mM), die etwa dem IC₅₀-Wert pH-sensitiver Liposomen von 2,2 mM entsprachen.

Liposomen waren auch nach Austausch von VCAM-siRNA gegen VCAM-shRNA nicht in der Lage, als Gentransfersystem die VCAM-Expression in bEnd.3-Endothelzellen posttranskriptional herunterzuregulieren. Da gezeigt werden konnte, dass bEnd.3-Zellen zur Expression der verwendeten Plasmide befähigt und die eingeschlossenen Nukleinsäuren funktionstüchtig sind, muss das Ausbleiben der Transfektion auf die liposomalen Vehikel zurückgeführt werden. In Kapitel 4.2.4 wurde diskutiert, dass eine zu geringe zelluläre Aufnahme der Liposomen oder ungenügende intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäuren als Ursachen für die mangelnde Wirksamkeit in Betracht zu ziehen sind. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der intrazellulären Plasmidanreicherung stellt die Inkubation der Zellen mit höheren Plasmidkonzentrationen

dar. Eine Erhöhung der Plasmidmenge ging jedoch mit steigenden Lipidmengen einher, so dass dieser Ansatz aufgrund zelltoxischer Effekte der Lipide nur bedingt umsetzbar war. Um dieses Problem zu umgehen, müssten Präparationen mit einem verbesserten Plasmid:Lipid-Verhältnis angewendet werden.

Das Ausbleiben der Transfektion kann hier auch durch einen mangelnden Transport über die Kernmembran bedingt sein, da shRNA-kodierende Plasmide im Gegensatz zu siRNA zur Transkription in den Zellkern aufgenommen werden müssen. Eventuell war die Inkubationszeit von 48 h zu kurz gewählt, um die intrazelluläre Prozessierung der liposomal verkapselten Plasmide zu gewährleisten. Allerdings konnte auch nach 72 h keine Transfektion verzeichnet werden.

In der Literatur wird die Eignung von neutralen/anionischen Liposomen als Gentransfersystem zur Vermittlung von RNA-Interferenzen kontrovers diskutiert. Eine Untersuchung sterisch stabilisierter Liposomen mit anionischer Nettoladung zur Transfektion von siRNA *in vitro* bestätigte die hier gezeigten Ergebnisse: Obwohl sich die Liposomen konzentrationsabhängig in den Zellen anreicherten, wurde keine siRNA-vermittelte Expressionshemmung des Zielproteins festgestellt [264]. Die Autoren führen dies auf eine mangelnde Freisetzung der Liposomen aus dem endosomalen Kompartiment zurück. Zu vergleichbaren Resultaten gelangte auch eine weitere Studie, in der neutrale PEGylierte Immunoliposomen als Transfektionssystem eingesetzt wurden [175]. Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Arbeiten das Potential von neutralen Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen zur Vermittlung von RNA-Interferenz belegt werden. So reduzierte die intravenöse oder intraperitoneale Gabe liposomaler siRNA gegen EphA2-Tyrosinkinase-Rezeptor, fokale Adhäsionskinase (FAK), Interleukin-8 bzw. Thrombinrezeptor das Tumorstadium *in vivo* [266–271]. Allerdings wurde bei diesen Liposomen auf den Zusatz PEGylierter Lipide verzichtet. Hierdurch kann eine verbesserte zelluläre Aufnahme der siRNA-Liposomen und somit ein verbessertes Transfektionsergebnis erreicht werden [311]. In einer anderen Arbeit sollte eine posttranskriptionelle Genausschaltung des AML1/MTG8-Fusionsproteins in verschiedenen CD33⁺-Tumorzelllinien unter Verwendung neutraler PEGylierter siRNA-Liposomen bewirkt werden [260]. Die Reduktion des Zielproteins gelang jedoch nur nach Kopplung von α -CD33-Antikörperfragmenten an die Liposomenoberfläche. Dies führte zu einer gesteigerten zellulären Aufnahme der siRNA-haltigen Liposomen.

An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass insbesondere Endothelzellen als schwer transfizierbar gelten [319]. Dies beruht auf ihrer physiologischen Barrierefunktion, die mit einem streng kontrollierten Stoffaustausch einhergeht. Viele Lipid-basierte Gentransfersysteme zeigen daher bei der Transfektion von Endothelzellen schlechtere Resultate als bei der Transfektion anderer Zelltypen [319, 320]. Insofern kann

das mangelnde Transfektionspotential der hier verwendeten Liposomen auch ein Endothelzell-spezifisches Problem darstellen.

4.4. SPLP als Gentransfersystem

Wie in den vorhergehenden Kapiteln erläutert, waren neutrale bzw. anionische sterisch stabilisierte Liposomen zur Transfektion von Endothelzellen nicht geeignet, obwohl mithilfe der DAC ausgezeichnete Nukleinsäure-Einschlusseffizienzen erreicht wurden. Auch andere Autoren schreiben nicht-kationischen PEGylierten Liposomen ein unzureichendes Potential für einen endothelialen Gentransfer zu und führen dies entweder auf eine unzureichende Aufnahme [321] oder auf eine ungenügende endosomale Freisetzung der Liposomen zurück [175, 264]. Interessanterweise konnte im direkten Vergleich gezeigt werden, dass kationische Liposomen im Gegensatz zu neutralen Liposomen eine erfolgreiche Transfektion des Endothels vermitteln [175]. Eine Reihe weiterer Publikationen belegt, dass Endothelzellen durch kationische Liposomen bzw. Lipoplexe transfiziert werden können [322–326]. Daher scheint eine kationische Ladung des Lipid-basierten Gentransfersystems eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion von Endothelzellen zu sein.

Allerdings ist bei Verwendung kationischer Liposomen/ Lipoplexe mit erhöhter Toxizität sowie unzureichenden Zirkulationshalbwertszeiten nach systemischer Applikation zu rechnen (s. Kapitel 2.3.1). Auch die in Kapitel 2.3.3 vorgestellten *stabilized plasmid-lipid particles* (SPLP) enthalten einen geringen Anteil an kationischen Lipiden. Deren Ladung wird jedoch durch PEGylierte Lipide nach außen ausreichend abgeschirmt. Dadurch wird ein kationisches Transfektionssystem erhalten, das der Forderung nach Serumstabilität gerecht wird.

Im folgenden Kapitel wurde die Transfektion von Endothelzellen mittels SPLP untersucht. Dazu wurden GFP-Plasmid-haltige SPLP hergestellt und deren Transfektionspotential an bEnd.3-Zellen geprüft. Zur Verbesserung des Transfektionsvermögens sollten SPLP mit pH-sensitiven Eigenschaften versehen werden. Weiterhin wurden SPLP für einen Endothel-spezifischen Gentransfer entwickelt, indem ein gegen Endoglin gerichtetes Antikörperfragment an die Oberfläche gekoppelt wurde. Die erhaltenen Immuno-SPLP wurden bezüglich spezifischer Bindung, zellulärer Aufnahme und Transfektionspotential an bEnd.3-Zellen getestet. Anschließend wurden SPLP für einen shRNA-Plasmid-vermittelten VCAM-Knockdown in bEnd.3-Zellen angewendet.

4.4.1. Herstellung von SPLP mittels Detergenz-Dialyse

Die Herstellung von SPLP erfolgte mittels Detergenz-Dialyse-Methode. Zur Stabilisierung wurde der Lipidmischung ein PEG-Ceramid mit kurzer Oktanoylseitenkette (PEG-CerC₈) zugesetzt. Dieses vermittelt gute Transfektionsraten *in vitro* und kann für systemische Applikationen leicht durch ein länger-kettiges Derivat substituiert werden (s. Kapitel 2.3.3). Als kationische Lipide wurden entweder DOTMA oder DOTAP verwendet.

Wie in Kapitel 2.3.3 erläutert, ist der Anteil des kationischen Lipids kritisch für die SPLP-Herstellung und muss für jedes kationische Lipid individuell bestimmt werden. Die optimale Konzentration für DOTMA ist der Literatur zu entnehmen und liegt bei 7 mol% [278]. Zur Optimierung von DOTAP-haltigen SPLP wurden Präparationen mit verschiedenen Anteilen des kationischen Lipids hergestellt und ihr Plasmid-Einschlussvermögen mittels PicoGreen[®]-Assay ermittelt. Abbildung 4.15 zeigt, dass 6 mol% DOTAP zu optimalen Einschlussraten führen.

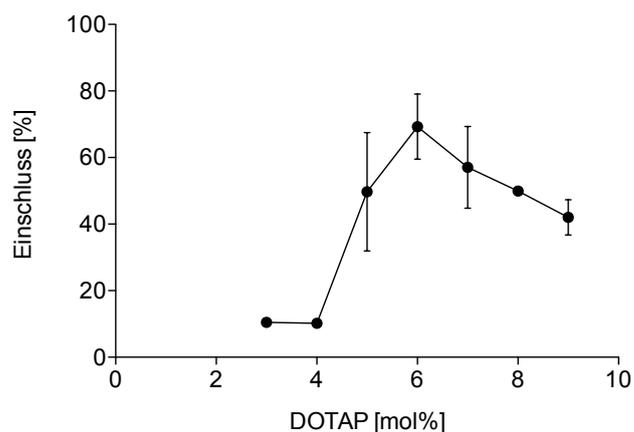


Abb. 4.15.: Plasmideinschluss in DOTAP-SPLP. Der Plasmideinschluss wurde mittels PicoGreen[®]-Assay bestimmt. Die verwendeten Lipidmischungen bestanden aus 90 – x mol% DOPE, 10 mol% PEG-CerC₈ und x mol% DOTAP.

Die Bestimmung der Partikelgröße/-größenverteilung sowie des prozentualen Plasmideinschlusses der verwendeten SPLP ergab vergleichbare Werte bei Verwendung der kationischen Lipide DOTAP bzw. DOTMA (s. Tabelle 4.3). Für beide Lipidmischungen wurden kleine Partikeldurchmesser von unter 120 nm erhalten. Allerdings deuten die Polydispersitätsindices von ca. 0,5 – 0,6 auf eine relativ heterogene Größenverteilung der Präparationen hin. Dies ist auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlich großen Populationen zurückzuführen: Während ungefüllte SPLP einen kleineren Durchmesser aufweisen, führt der Einschluss von Plasmid zu einer

Zunahme der Partikelgröße. Jede Population für sich genommen ist jedoch durch eine enge Partikelgrößenverteilung gekennzeichnet [273].

Sowohl DOTMA-SPLP als auch DOTAP-SPLP zeigten hohe Plasmid-Einschlussraten von ca. 60 – 70%. Bei der Herstellung von SPLP aus 10 μmol Lipiden unter Zusatz von 200 μg Plasmid-DNA kann daraus ein Plasmid:Lipid-Verhältnis von ca. 12 – 14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ abgeleitet werden.

Tab. 4.3.: Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von SPLP. Angegeben ist jeweils der Durchmesser und der Polydispersitätsindex (PI) bzw. der Plasmideinschluss als $\text{MW} \pm \text{SD}$. DOTMA-SPLP enthielten DOPE/PEG-CerC₈/DOTMA(83:10:7 [mol%]). DOTAP-SPLP enthielten DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP(84:10:6 [mol%]).

	Partikelgröße/ PI	Plasmideinschluss
DOTMA-SPLP	118 \pm 7 nm 0,57 \pm 0,04	59 \pm 3%
DOTAP-SPLP	116 \pm 9 nm 0,47 \pm 0,13	69 \pm 10%

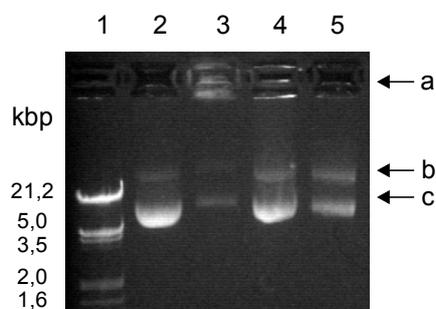


Abb. 4.16.: Integrität von SPLP-verkapselten Plasmiden. Die in DOTAP-SPLP eingeschlossenen GFP-Plasmide wurden mittels Bligh & Dyer-Extraktion isoliert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. (1) Größenstandard; (2) unbehandeltes Plasmid; (3) unbehandelte SPLP; durch Bligh & Dyer-Extraktion isoliertes (4) Plasmid bzw. (5) Plasmid aus SPLP. (a) Verkapselte DNA; (b) freie DNA in offen-zirkulärer Konformation; (c) freie DNA in superhelikaler Konformation.

Um die Integrität der in SPLP eingeschlossenen Plasmid-DNA zu überprüfen, wurde diese durch das Extraktionsverfahren nach Bligh & Dyer isoliert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Abbildung 4.16 zeigt, dass mindestens 50% der in SPLP eingeschlossenen Plasmide die gewünschte superhelikale Konformation

aufwiesen. Im Vergleich mit freiem Plasmid war der Anteil superhelikaler Moleküle allerdings zugunsten der offen-zirkulären Konformation verringert. Der Vergleich von Plasmidproben vor und nach der Extraktion macht deutlich, dass der Strukturverlust teilweise auf das Extraktionsverfahren zurückzuführen und somit nicht allein durch die Dialyseprozedur bedingt ist.

4.4.2. Transfektion von bEnd.3-Zellen mit SPLP

Zur Prüfung des Transfektionspotentials von SPLP in Endothelzellen wurde GFP-Plasmid als Reportergen in DOTMA- sowie DOTAP-SPLP eingeschlossen und für 24 bzw. 48 h auf bEnd.3-Zellen gegeben. Als Positivkontrolle wurde GFP-Plasmid mithilfe von Lipoplexen in die Zellen eingebracht. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Während die Transfektion mit SPLP nach 24 h zu einer geringen GFP-Expression in bEnd.3-Zellen führte, konnte nach 48 h sowohl mit DOTMA- als auch mit DOTAP-SPLP eine deutliche Expression des Reportergens verzeichnet werden (s. Abbildung 4.17). Im Vergleich der beiden kationischen Lipide lieferte DOTAP in allen Konzentrationen signifikant höhere Transfektionsraten. Daher wurden die weiteren Experimente mit DOTAP-haltigen SPLP durchgeführt. Insgesamt wiesen SPLP jedoch ein um ca. $\frac{2}{3}$ geringeres Transfektionspotential als Lipoplexe auf.

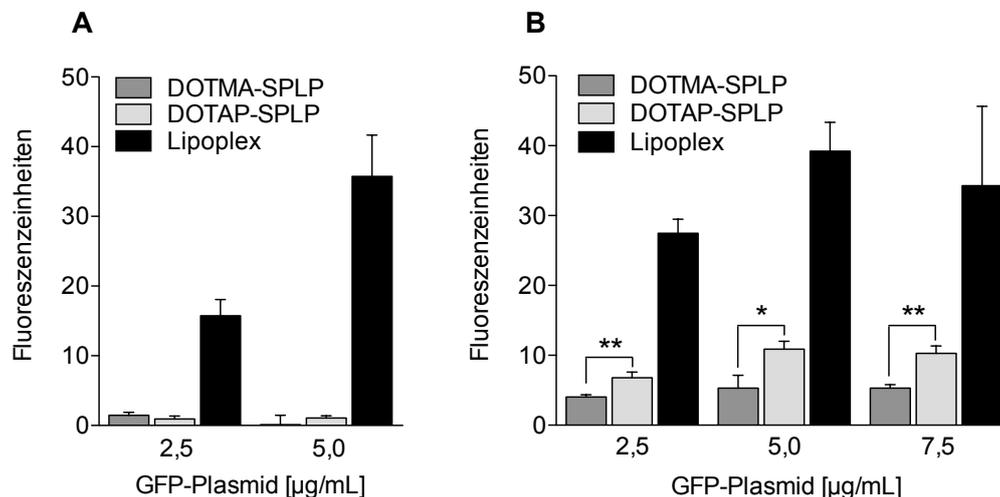


Abb. 4.17.: Transfektion von bEnd.3-Zellen mit SPLP. DOTMA-SPLP enthielten DOPE/PEG-CerC₈/DOTMA (83:10:7 [mol%]). DOTAP-SPLP enthielten DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP (84:10:6 [mol%]). Lipoplexe bestanden aus DC-Chol/DOPE (3:7 [m/m]). Das eingeschlossene Plasmid kodierte GFP. (A) GFP-Expression nach 24 h. (B) GFP-Expression nach 48 h.

4.4.3. pH-sensitive SPLP

Um die Transfektionseigenschaften von SPLP zu verbessern, sollten diese mit einer pH-sensitiven Lipidhülle ausgestattet werden. Durch eine pH-sensitive Lipidzusammensetzung kann eine erhöhte intrazelluläre Plasmidfreisetzung und infolgedessen ein verbessertes Transfektionsergebnis erzielt werden (s. Kapitel 2.2.2). Ein gesteigertes Freisetzungsvermögen wurde für pH-sensitive Liposomen aus DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE in Kapitel 4.2.3 gezeigt. Zur Präparation pH-sensitiver SPLP wurde daher der DOPE-Anteil der ursprünglichen Lipidmischung (DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP (84:10:6 [mol%])) durch die pH-sensitive Mischung DOPE/CHEMS ersetzt (DOPE/CHEMS/PEG-CerC₈/DOTAP (50:34:10:6 [mol%])).

Wie Tabelle 4.4 zu entnehmen ist, resultierte die Verwendung der pH-sensitiven Lipidmischung mit dem zuvor optimierten DOTAP-Anteil von 6 mol% in kleinen Partikeln mit homogener Größenverteilung. Jedoch konnte kein Plasmideinschluss festgestellt werden. Als Ursache wird die Einführung einer negativen Ladung durch das anionische Lipid CHEMS angenommen (Strukturformel s. Abbildung A.3): Dieses konkurriert während der SPLP-Formierung mit der negativ geladenen Plasmid-DNA um die Bindung an das kationische DOTAP und verdrängt das Plasmid aus den sich bildenden Lipidpartikeln. Um die anionische Ladung von CHEMS zu kompensieren, wurde der DOTAP-Anteil schrittweise erhöht. Bis zu einer neutralen Nettoladung der pH-sensitiven Lipidmischung (~ 25 mol% DOTAP) wurden wiederum homogene Präparationen mit kleinem Partikeldurchmesser erhalten. Jedoch zeigten auch diese Formulierungen nicht den gewünschten Plasmideinschluss. Bei weiterer Anhebung der DOTAP-Konzentration bis auf 40 mol% wurde ein stetiger Anstieg der Partikelgröße sowie der Polydispersität beobachtet. Gleichzeitig kam es zum Niederschlag großer Lipidaggregate. Dies ist vermutlich auf eine ladungsinduzierte Quervernetzung der stark kationischen Lipidintermediate durch die anionische DNA zurückzuführen.

Zur Abschirmung der negativen Ladung von CHEMS wurden dem Dialysierpuffer Ca²⁺-Ionen (40 mM) zugesetzt. Jedoch bildeten alle getesteten pH-sensitiven Lipidmischungen mit einem DOTAP-Anteil von 9 – 40 mol% heterogene Präparationen mit deutlichen Lipidpräzipitaten (s. Tabelle 4.5). Das vermeintlich gute DNA-Einschlussvermögen beruht auf einer unspezifischen Einlagerung der Plasmide innerhalb der Lipidaggregate.

Wie in Kapitel 2.3.3 erläutert, gelingt die Herstellung von SPLP mit bis zu 42,5 mol% kationischem Lipid, wenn die Detergenz-Dialyse in Gegenwart hoher Citrat- oder Phosphatsalzkonzentrationen durchgeführt wird. Dabei hängt die zur Bildung von SPLP notwendige Ionenstärke des Puffers von der Menge des eingesetzten kationischen Lipids ab. Zur Herstellung von pH-sensitiven SPLP mit höheren DOTAP-

Tab. 4.4.: Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen HBS. Die verwendete Lipidmischung enthielt $0,6 \cdot (90 - x)$ mol% DOPE, $0,4 \cdot (90 - x)$ mol% CHEMS, 10 mol% PEG-CerC₈, x mol% DOTAP. Die Bestimmung der Partikelgröße und Polydispersität (PI) erfolgte mittels PCS. Zur Bestimmung des Plasmideinschlusses wurde der PicoGreen[®]-Assay verwendet.

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
40	+	161	0,49	+	2,0
39	+	164	0,58	+	2,4
38	+	159	0,57	+	1,6
37	+	170	0,57	+	2,1
36	+	166	0,63	+	2,0
35	+	152	0,59	+	1,6
30	+	129	0,15	+	-
25	0	121	0,15	-	-
20	-	107	0,22	-	-
15	-	116 ± 21	0,22 ± 0,18	-	-
12	-	122	0,13	-	-
10	-	103 ± 10	0,24 ± 0,17	-	-
9	-	94 ± 9	0,29 ± 0,10	-	-
7	-	96 ± 9	0,27 ± 0,13	-	-
6	-	93 ± 7	0,25 ± 0,12	-	-

Tab. 4.5.: Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Calciumpuffer. Die verwendete Lipidmischung enthielt $0,6 \cdot (90 - x)$ mol% DOPE, $0,4 \cdot (90 - x)$ mol% CHEMS, 10 mol% PEG-CerC₈, x mol% DOTAP. Die Bestimmung der Partikelgröße und Polydispersität (PI) erfolgte mittels PCS. Zur Bestimmung des Plasmideinschlusses wurde der PicoGreen[®]-Assay verwendet.

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
40	+	200	0,61	+	43,0
36	+	178	0,69	+	76,0
30	+	149	0,43	+	61,0
20	-	142	0,45	+	-
9	-	126	0,45	+	5,0

4. Ergebnisse und Diskussion

Konzentrationen wurde daher entweder Citratpuffer (60 mM, 80 mM, 100 mM) oder Phosphatpuffer (100 mM, 150 mM) als Dialysiermedium eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 dargestellt.

Tab. 4.6.: Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Citratpuffer. Die verwendete Lipidmischung enthielt $0,6 \cdot (90 - x)$ mol% DOPE, $0,4 \cdot (90 - x)$ mol% CHEMS, 10 mol% PEG-CerC₈, x mol% DOTAP. Die Bestimmung der Partikelgröße und Polydispersität (PI) erfolgte mittels PCS. Zur Bestimmung des Plasmideinschlusses wurde der PicoGreen[®]-Assay verwendet.

Citratpuffer 60 mM

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
42	+	232	0,62	+	1,2
39	+	212	0,49	+	0,7
36	+	203	0,61	+	0,5
33	+	191	0,42	+	0,8

Citratpuffer 80 mM

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
36	+	372	0,70	+	1,0
33	+	222	0,49	+	1,2

Citratpuffer 100 mM

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
39	+	335	0,72	+	12,0
36	+	231	0,68	+	19,0
35	+	206	0,27	-	2,7
34	+	191	0,20	-	2,9
33	+	221	0,24	-	-
32	+	198	0,15	-	-
31	+	200	0,16	-	-

Tab. 4.7.: Herstellung pH-sensitiver SPLP mittels Detergenz-Dialyse gegen Phosphatpuffer. Die verwendete Lipidmischung enthielt $0,6 \cdot (90 - x)$ mol% DOPE, $0,4 \cdot (90 - x)$ mol% CHEMS, 10 mol% PEG-CerC₈, x mol% DOTAP. Die Bestimmung der Partikelgröße und Polydispersität (PI) erfolgte mittels PCS. Zur Bestimmung des Plasmideinschlusses wurde der PicoGreen[®]-Assay verwendet.

Phosphatpuffer 100 mM

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
45	+	594	0,88	+	75,6
40	+	159	0,82	+	73,7
38	+	221	0,90	+	10,6
37	+	271	0,82	+	10,0
36	+	423	0,76	+	8,9
35	+	147 ± 6	0,62 ± 0,09	+	16,4 ± 4,9
34	+	81	0,32	-	11,1
33	+	74 ± 15	0,15 ± 0,08	-	14,1 ± 1,5
32	+	54	0,36	-	12,8
31	+	59	0,24	-	14,2
30	+	67 ± 6	0,29 ± 0,04	-	17,6 ± 3,6
25	0	70	0,22	-	16,7

Phosphatpuffer 150 mM

DOTAP [mol%]	Nettoladung	Größe [nm]	PI	Niederschlag sichtbar?	Einschluss [%]
38	+	120	0,06	-	-
36	+	104	0,23	-	-
35	+	107	0,33	-	-
34	+	108	0,26	-	-
32	+	114	0,20	-	-

Wie erwartet konnten erhöhte DOTAP-Mengen bis zu 38 mol% eingesetzt werden, ohne dass eine Aggregatbildung beobachtet wurde. In die kleinen monodispersen Partikel war jedoch wie zuvor kein Plasmid eingeschlossen. In Abhängigkeit von der Art und Konzentration des verwendeten Puffers wurden ab einer bestimmten DOTAP-Konzentration wiederum heterogene Partikelverteilungen erhalten, die mit einem Niederschlag einhergingen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Formierung von SPLP auf einem sensiblen Gleichgewicht zwischen kationischen und anionischen Komponenten beruht. Suboptimale Ladungsverhältnisse führen entweder zu einem geringen DNA-Einschluss oder

zur Bildung polydisperser Präparationen mit unkontrollierter Zusammenlagerung zu Lipidaggregaten. Dies ist in Abbildung 4.18 zusammenfassend für alle getesteten pH-sensitiven Präparationen dargestellt.

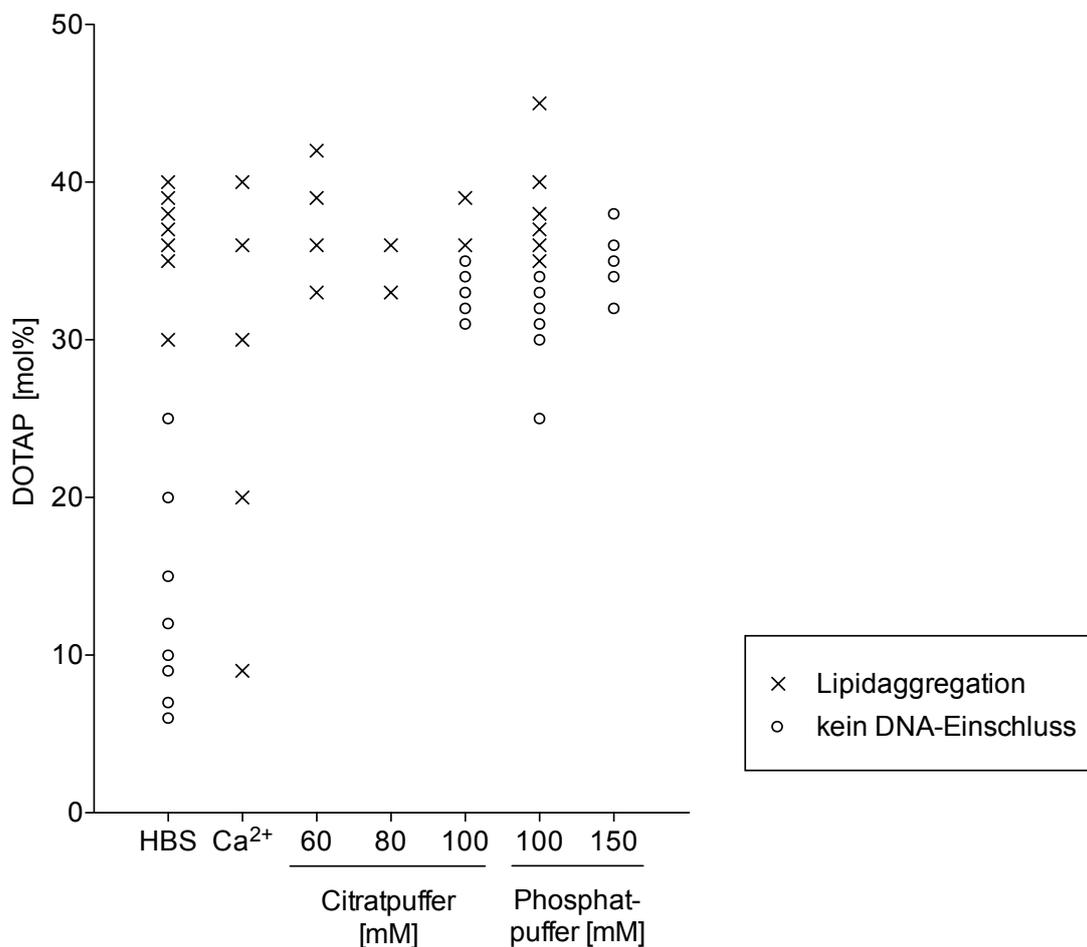


Abb. 4.18.: Herstellung pH-sensitiver SPLP im Überblick. Die verwendete Lipidmischung enthielt $0,6 \cdot (90 - x)$ mol% DOPE, $0,4 \cdot (90 - x)$ mol% CHEMS, 10 mol% PEG-CerC₈, x mol% DOTAP. Je nach eingesetzter DOTAP-Konzentration und verwendetem Dialysepuffer resultierten Präparationen mit mangelndem Plasmideinschluss oder mit Neigung zur Aggregatbildung.

Die meisten in der Literatur beschriebenen pH-sensitiven Lipidmischungen enthalten anionische Komponenten [123]. Deren Übertragbarkeit auf SPLP ist aufgrund der oben dargestellten Beobachtungen fraglich. Allerdings sind einige wenige kationische pH-sensitive Lipide bekannt, deren Eignung zur Präparation pH-sensitiver SPLP in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden sollte. Dazu gehören amphiphile Amine, die mit einem pK_S -Wert von 5 – 7 bei neutralem pH-Wert nur teilweise protoniert vorliegen [327]. Während der endosomalen Prozessierung werden die pH-

sensitiven Amine zunehmend protoniert und fördern als kationische Substanzen die Membranfusion. Daher vermitteln diese Amine in Kombination mit DOPE höhere Transfektionsraten als die Mischung aus DOPE und pH-insensitiven kationischen Lipiden.

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung pH-sensitiver SPLP stellt die Verwendung eines säurelabilen PEG-Derivates dar [279]. Dieses verliert im Zuge der endosomalen Azidifizierung seine stabilisierenden Eigenschaften und fördert so die endosomale DNA-Freisetzung. Es wurde gezeigt, dass dadurch ein verbessertes Transfektionsvermögen von SPLP erreicht werden kann [280].

4.4.4. Endoglin-targetierende SPLP

In Analogie zu Immunoliposomen sollten durch die Kopplung spezifischer Antikörper an die Oberfläche von SPLP *Immuno-SPLP* hergestellt werden. Funktionalisierte Partikel bieten zum einen den Vorteil eines zielgerichteten Arzneistofftransportes, zum anderen kann durch die spezifische Wechselwirkung des Ligand-gekoppelten Trägersystems mit Rezeptoren auf der Zellmembran eine verbesserte zelluläre Aufnahme und damit eine erhöhte Wirksamkeit des Arzneistoffes erreicht werden (s. Kapitel 2.2.2).

Als Zielstruktur für ein Endothel-spezifisches Gentransfersystem wurde der endotheliale Oberflächenrezeptor Endoglin ausgewählt. Endoglin wird selektiv auf aktivierten Endothelzellen exprimiert und kann somit als Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie entzündlicher Erkrankungen dienen (s. Kapitel 2.2.4).

Untersuchung der Bindungsfähigkeit des α -Endoglin-Antikörperfragments mE12-scFv' an bEnd.3-Zellen

bEnd.3-Endothelzellen exprimieren konstitutiv Endoglin auf ihrer Oberfläche (s. Abbildung 4.19). Somit konnte das Zellsystem zur Testung von α -Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP herangezogen werden.

Zur Funktionalisierung der SPLP stand ein gegen Endoglin gerichtetes Antikörperfragment (mE12-scFv') zur Verfügung. Um die generelle Bindungsfähigkeit von mE12-scFv' bzw. mE12-scFv'-funktionalisierten Nanopartikeln an bEnd.3-Zellen sicherzustellen, wurde das Antikörperfragment an fluoreszenzmarkierte Liposomen gekoppelt und die Bindung der Liposomen an bEnd.3-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Liposomen bestanden aus der pH-sensitiven Lipidmischung DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, da diese aufgrund des hohen DOPE-Anteils ein

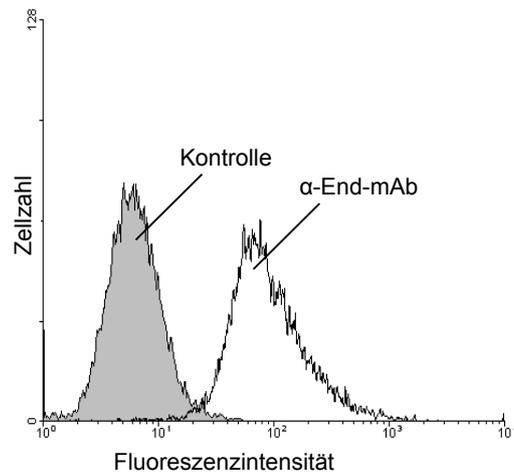


Abb. 4.19.: Endoglin-Expression auf bEnd.3-Zellen. Die Bestimmung der Endoglin-Expression auf bEnd.3-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung fluoreszierender Antikörper.

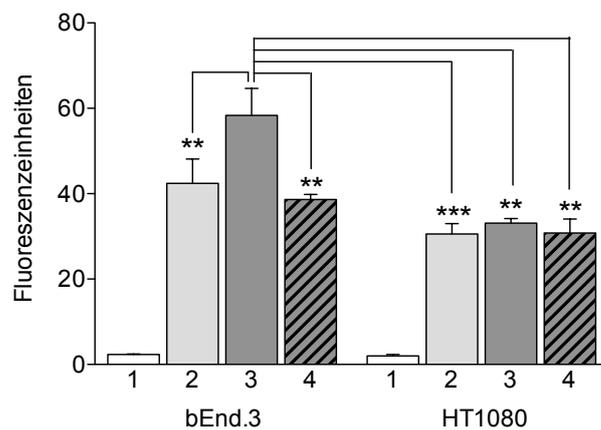


Abb. 4.20.: Zelluläre Bindung von Endoglin-gerichteten Immunoliposomen. Die Bindung fluoreszenzmarkierter Liposomen an bEnd.3-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(1)** Liposomen (POPC/Chol/MalPEG-DSPE/DiO); **(2)** Liposomen (DOPE/CHEMS/MalPEG-DSPE/DiO); **(3)** mE12-Immunoliposomen (DOPE/CHEMS/MalPEG-DSPE/DiO); **(4)** mE12-Immunoliposomen + freier mE12-scFv'.

besseres Modell für SPLP darstellt als pH-insensitive Liposomen aus POPC/Chol/MalPEG-DSPE.

Abbildung 4.20 zeigt, dass mE12-Immunoliposomen signifikant besser an bEnd.3-Zellen binden als ungekoppelte Liposomen. Da die Bindung der Immunoliposomen durch Zugabe freien Antikörperfragments auf das Niveau unfunktionalisierter Kontrollliposomen zurückgedrängt werden konnte, ist von einer spezifischen Wechselwirkung auszugehen. An der Endoglin-negativen Fibroblastenzelllinie HT1080 [328] zeigten Immunoliposomen im Vergleich mit ungekoppelten Liposomen kein verbessertes Bindungsvermögen. Insgesamt wurde jedoch trotz der Verwendung PEGylierter Lipide ein relativ hohes Ausmaß unspezifischer Wechselwirkungen der pH-sensitiven Liposomen festgestellt. Dies scheint auf den fusogenen Eigenschaften dieser Lipidmischung zu beruhen, da Kontrollliposomen aus POPC/Chol/MalPEG-DSPE kaum Affinität zu den verwendeten Zellen aufwiesen.

Herstellung von Immuno-SPLP

Nachdem gezeigt wurde, dass das Antikörperfragment mE12-scFv' eine spezifische Bindung von Nanopartikeln an bEnd.3-Zellen vermitteln kann, sollte dieses zur Präparation Endothel-spezifischer Immuno-SPLP verwendet werden. Dazu sollte die zur Funktionalisierung von Liposomen verwendete „konventionelle Methode“ auf SPLP übertragen werden. Die Funktionalisierung erfolgt hierbei durch Einbau eines reaktiven Ankerlipids in die Lipidmembran während der Partikelformierung und anschließender Kopplung des Liganden an die Partikeloberfläche. Als Ankerlipid wird häufig MalPEG-DSPE in der Konzentration 5 mol% eingesetzt. Allerdings handelt es sich bei MalPEG-DSPE um ein Lipid mit negativer Ladung (Strukturformel s. Abbildung A.1). Wie in Kapitel 4.4.3 erläutert, stört die Verwendung anionischer Komponenten die Bildung von SPLP. Daher wurde zur Präparation von Immuno-SPLP die zugesetzte MalPEG-DSPE-Konzentration auf 1 mol% reduziert. Gleichzeitig wurde der Anteil des kationischen DOTAP um 1 mol% auf 7 mol% angehoben. Um die Auswirkung der verringerten Ankerlipidkonzentration auf die Bindungsfähigkeit funktionalisierter Partikel zu untersuchen, wurden zusätzlich Immunoliposomen mit 1 mol% bzw. 5 mol% MalPEG-DSPE hergestellt.

Wie in Abbildung 4.21 dargestellt ist, bewirkte die Kopplung von mE12-scFv' bei allen drei Präparationen eine verbesserte Bindung der Partikel an bEnd.3-Endothelzellen. Diese war allerdings nur bei Verwendung von Liposomen mit 5 mol% Ankerlipid signifikant. Der Einbau einer geringen Ankerlipidkonzentration von 1 mol% scheint daher nicht ausreichend, um genügend Antikörperfragment-Moleküle für eine

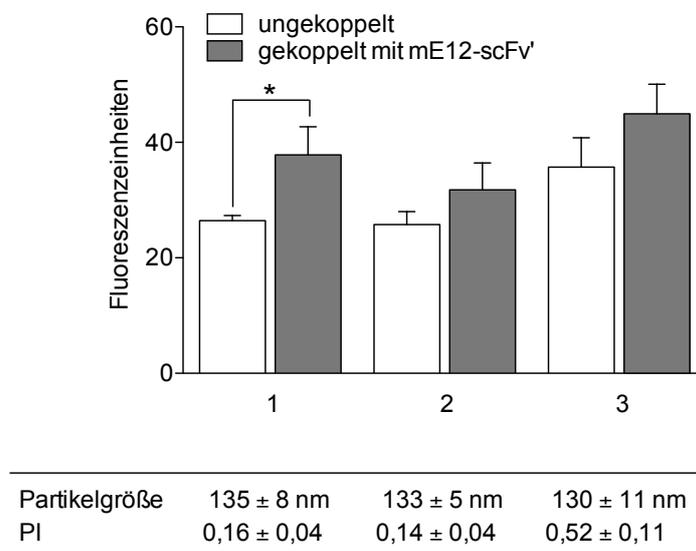


Abb. 4.21.: Zelluläre Bindung von Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP (konventionelle Funktionalisierung). Die Bindung fluoreszenzmarkierter Lipidpartikel an bEnd.3-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die angegebenen Partikelgrößen und Polydispersitätsindices (PI) beziehen sich jeweils auf die funktionalisierten Partikel. **(1)** (Immuno)liposomen mit 5 mol% MalPEG-DSPE (DOPE/CHEMS/MalPEG-DSPE/DiO (57:38:5:0,5 [mol%])); **(2)** (Immuno)liposomen mit 1 mol% MalPEG-DSPE (DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/MalPEG-DSPE/DiO (57:38:4:1:0,5 [mol%])); **(3)** (Immuno-)SPLP mit 1 mol% MalPEG-DSPE (DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/MalPEG-DSPE/DiO (83:9:7:1:0,5 [mol%])).

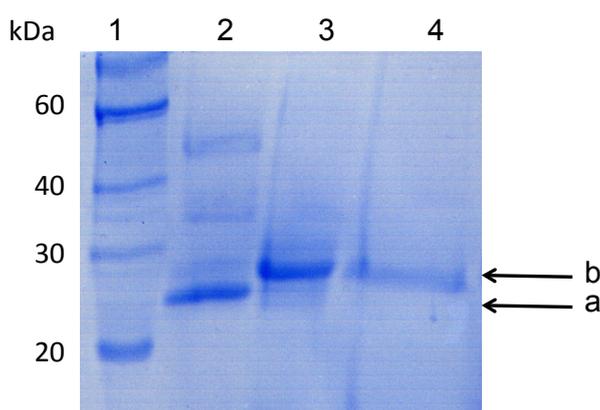


Abb. 4.22.: Herstellung von Endoglin-gerichteten SPLP mittels Postinsertionstechnik. Die Funktionalisierung von SPLP mit α -Endoglin-Antikörperfragmenten (mE12-scFv') wurde mittels SDS-PAGE sichergestellt. **(1)** Größenstandard; **(2)** mE12-scFv'; **(3)** mE12-scFv'-MalPEG-DSPE; **(4)** mE12-Immuno-SPLP. **(a)** freier mE12-scFv'; **(b)** MalPEG-DSPE-gekoppelter mE12-scFv'.

spezifische Bindung auf der Partikeloberfläche zu koppeln. Insofern erwies sich die konventionelle Kopplungsmethode zur Herstellung von Immuno-SPLP als ungeeignet.

Als weitere Methode zur Funktionalisierung von Lipid-basierten Partikeln ist die Postinsertionstechnik beschrieben (s. Kapitel 2.2.2). Hierbei werden lediglich geringe Mengen des zuvor Ligand-gekoppelten Ankerlipids MalPEG-DSPE (0,6 mol%) nachträglich in die vorgefertigten Partikel inseriert. Aufgrund der effizienten Ligandkopplung an MalPEG-DSPE im Vorfeld der Inserierung reichen niedrige Ankerlipidkonzentrationen in der Lipidmembran dennoch für eine spezifische Bindung an die Zielstruktur aus. Daher scheint diese Methode bezüglich der Präparation von Immuno-SPLP im Vergleich mit der konventionellen Kopplung von Vorteil zu sein.

Die erfolgreiche Kopplung von mE12-scFv' an MalPEG-DSPE sowie die Inserierung der gekoppelten Ankerlipide in SPLP konnten mittels SDS-PAGE gezeigt werden (s. Abbildung 4.22). Das Molekulargewicht von MalPEG-DSPE beträgt 2,94 kDa, so dass sich Lipid-gekoppelte Antikörperfragmente durch eine geringe Verschiebung der Bande von freiem scFv' unterscheiden.

Wie Tabelle 4.8 zu entnehmen ist, wurde der Plasmideinschluss in SPLP durch die Inserierung der scFv'-gekoppelten Ankerlipide nicht beeinträchtigt. Das scheinbar leicht verbesserte Einschlussvermögen von Immuno-SPLP ist auf die Abtrennung unverkapselter Plasmide während der gelchromatographischen Aufreinigung zur Entfernung ungebundener Antikörperfragmente zurückzuführen. Auch auf die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung zeigte die Funktionalisierung keinen signifikanten Einfluss.

Tab. 4.8.: Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von Immuno-SPLP. Angegeben ist jeweils der Durchmesser und der Polydispersitätsindex (PI) bzw. der Plasmideinschluss als $MW \pm SD$. SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/DiD (83:10:7:0,5 [mol%]). Immuno-SPLP wurden mittels Postinsertionstechnik mit mE12-scFv' funktionalisiert und bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/MalPEG-DSPE/DiD (83:10:7:0,6:0,5 [mol%]).

	Partikelgröße/ PI	Plasmideinschluss
SPLP	115 ± 9 nm 0,47 ± 0,13	61 ± 8%
Immuno-SPLP	123 ± 3 nm 0,54 ± 0,06	71 ± 15%

Die Untersuchung des zellulären Bindungsvermögens erfolgte wie zuvor anhand fluoreszenzmarkierter SPLP-Präparationen. Dabei zeigten die mittels Postinsertionstechnik hergestellten Immuno-SPLP eine ca. doppelt so hohe Bindung an bEnd.3-Zellen wie unfunktionalisierte SPLP (s. Abbildung 4.23, 4 °C). Nach Vorinkubation der Zellen mit freiem Antikörperfragment wurde diese Überlegenheit nicht mehr beobachtet. Daher scheint die erhöhte Affinität der Immuno-SPLP zu bEnd.3-Zellen auf einer spezifischen Wechselwirkung des gekoppelten Antikörperfragments mit seinem Rezeptor zu beruhen.

Der Erfolg einer Transfektion hängt nicht nur von der Bindung sondern insbesondere von der zellulären Aufnahme des Gentransfersystems ab. Obwohl der genaue Aufnahmemechanismus von Lipid-basierten Partikeln in die Zelle bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist, wird eine Internalisierung via Endozytose postuliert (s. Kapitel 2.2.2). Dabei handelt es sich um aktiven Transport, der auf die Energiebereitstellung durch die Zelle angewiesen ist. Diese ist nur bei Inkubation der Zellen bei 37 °C gewährleistet. Werden die Zellen bei 4 °C gelagert, kommen aktive Prozesse zum Erliegen, so dass lediglich eine passive Bindung der Liposomen an die Außenseite der Zellmembran stattfindet. Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von SPLP wurde daher die Inkubation von bEnd.3-Zellen mit SPLP bei 37 °C durchgeführt und mit der Behandlung bei 4 °C verglichen. Die Anhebung der Temperatur führte zu einer signifikant gesteigerten zellulären Assoziation der Immuno-SPLP (s. Abbildung 4.23). Demnach werden Immuno-SPLP von bEnd.3-Zellen nicht nur gebunden, sondern auch aktiv in die Zelle aufgenommen. Das Ausmaß der Internalisierung konnte aus der Differenz der bei den unterschiedlichen Temperaturen erhaltenen Werte abgeleitet werden: So lagen etwa 60% der assoziierten Immuno-SPLP intrazellulär vor. Auch bei Verwendung unfunktionalisierter SPLP konnte durch Inkubation bei 37 °C die zelluläre Assoziation verbessert werden, der Anteil internalisierter Partikel betrug hier allerdings nur etwa 24%. Im direkten Vergleich von Immuno-SPLP mit unfunktionalisierten SPLP zeigten Immuno-SPLP bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C eine ca. 3,5fach gesteigerte zelluläre Assoziation. Immuno-SPLP bieten also nicht nur in Bezug auf die zelluläre Bindung sondern insbesondere in Bezug auf die intrazelluläre Anreicherung einen Vorteil gegenüber ungekoppelten SPLP.

Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Immuno-SPLP

Der Vergleich der Transfektionspotentiale von mittels Postinsertionstechnik hergestellten mE12-Immuno-SPLP und Antikörper-freien SPLP wurde unter Verwendung eines GFP-kodierenden Plasmids an bEnd.3-Zellen vorgenommen. Obwohl für Immuno-SPLP gegenüber Antikörper-freien SPLP eine verbesserte zelluläre Bindung und

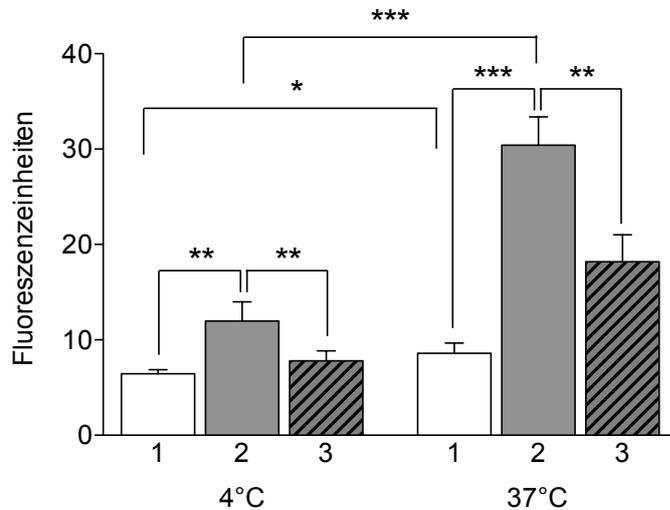


Abb. 4.23.: Zelluläre Bindung und Internalisierung von Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP (Funktionalisierung mittels Postinsertionsmethode). Die Bindung und Internalisierung fluoreszenzmarkierter Immuno-SPLP wurde mittels Durchflusszytometrie an bEnd.3-Zellen untersucht. **(1)** SPLP (DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/DiO (83:10:7:0,5 [mol%])); **(2)** mE12-Immuno-SPLP (DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/MalPEG-DSPE/DiO (83:10:7:0,6:0,5 [mol%])); **(3)** mE12-Immuno-SPLP + freier mE12-scFv'.

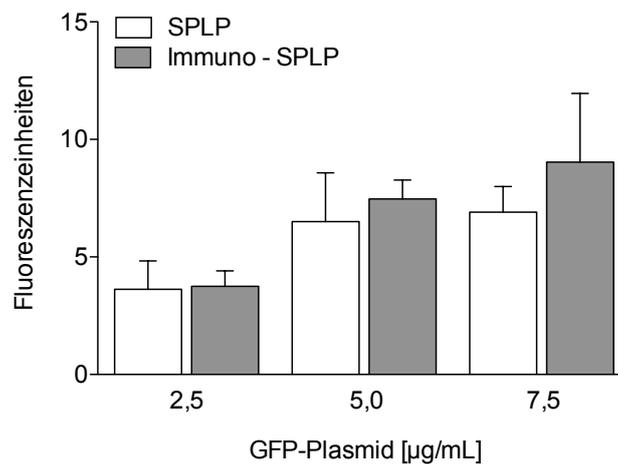


Abb. 4.24.: Transfektion von bEnd.3-Zellen mit Immuno-SPLP. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte GFP-Expression von bEnd.3-Zellen nach 48stündiger Inkubation mit (Immuno-)SPLP. SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/DiD (83:10:7:0,5 [mol%]). Immuno-SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP/MalPEG-DSPE/DiD (83:10:7:0,6:0,5 [mol%]) und waren mittels Postinsertionstechnik mit scFv'-mE12 funktionalisiert. Das eingeschlossene Plasmid kodierte GFP.

Internalisierung gezeigt werden konnte, war das Transfektionsvermögen der Immuno-SPLP dem ungekoppelter SPLP nicht signifikant überlegen (s. Abbildung 4.24). Nach einer Inkubationszeit von 48 h führten Immuno-SPLP verglichen mit ungekoppelten SPLP lediglich zu einer leicht gesteigerten GFP-Expression.

In diesem Kapitel wurde die Herstellung und Charakterisierung von Immuno-SPLP beschrieben. Am Beispiel der mE12-Immuno-SPLP konnte gezeigt werden, dass durch Anwendung der Postinsertionsmethode eine Funktionalisierung von SPLP möglich ist. Ebendiese Technik war von anderen Autoren erfolgreich zur nachträglichen Inse-rierung PEGylierter Lipide mit kationischer Kopfgruppe verwendet worden, um eine verbesserte zelluläre Bindung und Internalisierung der SPLP zu erreichen [329].

Die mittels Postinsertionstechnik hergestellten mE12-Immuno-SPLP zeigten an bEnd.3-Endothelzellen eine spezifische Bindung und eine verbesserte intrazelluläre Anreicherung im Vergleich mit unfunktionalisierten SPLP. Dagegen konnte durch die Funktionalisierung mittels konventioneller Methode keine spezifische Bindung der Immuno-SPLP erreicht werden. Weeke-Klimp et al. [285] verwendeten zur Kopplung von Lactoferrin (LF) an SPLP ebenfalls die konventionelle Kopplungsmethode und setzten dazu der Lipidmischung vor der Detergenz-Dialyse 1 mol% MalPEG-DSPE zu. Im Gegensatz zu den konventionell hergestellten mE12-Immuno-SPLP zeigten Lactoferrin-gekoppelte SPLP eine spezifische Bindung an ihre Zielzellen. Diese führte jedoch in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie nicht immer zu einer Steigerung des *in vitro*-Transfektionspotentials der LF-SPLP. Damit wurde ein ähnliches Ergebnis wie hier für die mittels Postinsertion funktionalisierten mE12-Immuno-SPLP dokumentiert; eine mögliche Erklärung wurde dort jedoch nicht diskutiert.

Die Untersuchungen zur zellulären Bindung von SPLP zeigten, dass diese wie pH-sensitive Liposomen trotz Verwendung PEGylierter Lipide zur unspezifischen Anlagerung an bEnd.3-Zellen neigten. Dies kann außer auf den hohen Anteil des fusogenen Lipids DOPE auch auf die Art der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Die statischen Bedingungen während der Inkubation der Zellen mit Liposomen bzw. SPLP führen möglicherweise zu einem intensivierten Kontakt der Lipidpartikel mit der Zellmembran und fördern so die Ausbildung unspezifischer Wechselwirkungen. Es kann also angenommen werden, dass unspezifische Assoziationen unter physiologischen Flussbedingungen weniger ausgeprägt sind und das spezifische Bindungsvermögen funktionalisierter Systeme demnach stärker zum Tragen kommt. Um die Relevanz der Funktionalisierung von SPLP abschließend zu klären, bietet sich

eine zukünftige Prüfung des Bindungsverhaltens sowie des Transfektionspotentials von α -Endoglin-gerichteten Immuno-SPLP unter dynamischen Versuchsbedingungen an.

4.4.5. VCAM-Knockdown durch SPLP-vermittelte Transfektion von VCAM-shRNA

Es konnte festgestellt werden, dass SPLP im Gegensatz zu nicht-kationischen Liposomen zur Transfektion von Endothelzellen geeignet sind. Daher sollten diese im Folgenden für die shRNA-basierte posttranskriptionelle Genausschaltung des endothelialen Adhäsionsrezeptors VCAM-1 verwendet werden. Da gezeigt wurde, dass die Kopplung eines α -Endoglin-Antikörperfragments keine signifikante Verbesserung des *in vitro*-Transfektionspotentials von SPLP bewirkte, wurden für die folgenden Versuche keine Immuno-SPLP verwendet.

Wie aus Tabelle 4.9 hervorgeht, lieferte der Einschluss von VCAM-shRNA-kodierenden Plasmiden SPLP, die bezüglich ihrer Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Plasmideinschlussrate mit GFP-Plasmid-haltigen SPLP vergleichbar waren.

Tab. 4.9.: Partikelgröße/-größenverteilung und Plasmideinschluss von VCAM-shRNA-SPLP. Angegeben ist jeweils der Durchmesser und der Polydispersitätsindex (PI) bzw. der Plasmideinschluss als $MW \pm SD$. SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP (84:10:6 [mol%]). Die eingeschlossenen Plasmide kodierten entweder GFP oder eine gegen VCAM-1 gerichtete shRNA.

	Partikelgröße/ PI	Plasmideinschluss
GFP-SPLP	116 \pm 9 nm 0,47 \pm 0,13	69 \pm 10%
shRNA-SPLP	120 \pm 3 nm 0,50 \pm 0,03	68 \pm 4%

Das Potential shRNA-Plasmid-haltiger SPLP zur posttranskriptionellen Genausschaltung von VCAM-1 wurde an TNF- α -stimulierten bEnd.3-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.25 dargestellt, konnte durch SPLP-basierte Transfektion von VCAM-gerichteter shRNA die endotheliale VCAM-1-Expression signifikant herunterreguliert werden. Allerdings führte auch die Inkubation mit leeren SPLP zu einer Reduktion von VCAM-1. Ähnliche Effekte waren bei der Verwendung von Liposomen als Transfektionsvermittler beobachtet worden und wurden dort auf eine Toxizität der Lipid-basierten Trägersysteme zurückgeführt (s. Kapitel 4.2.4 und 4.3.3). Daher

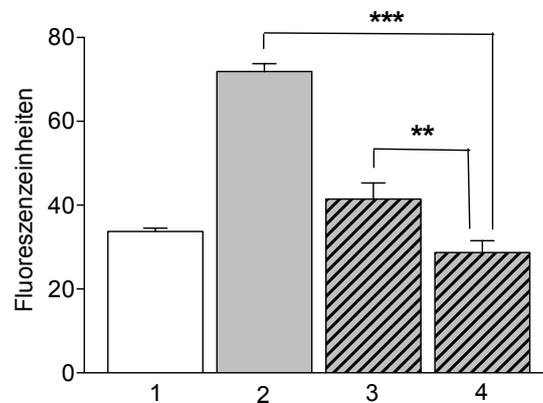


Abb. 4.25.: VCAM-Knockdown durch Transfektion mit VCAM-shRNA-haltigen SPLP. Die Bestimmung der VCAM-Expression von bEnd.3-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer 48 h nach der Transfektion. Dazu wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Die Ansätze (2) – (4) wurden 18 h vor der Vermessung mit $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) stimuliert. Leere SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈ (90:10 [mol%]). shRNA-SPLP bestanden aus DOPE/PEG-CerC₈/DOTAP (84:10:6 [mol%]) und enthielten gegen VCAM-1 gerichtetes shRNA-Plasmid. (1) unstimulierte Zellen; (2) stimulierte Zellen; stimulierte Zellen transfiziert mit (3) leeren SPLP bzw. (4) shRNA-SPLP (2,5 μg verkapseltes Plasmid/mL Zellkulturüberstand).

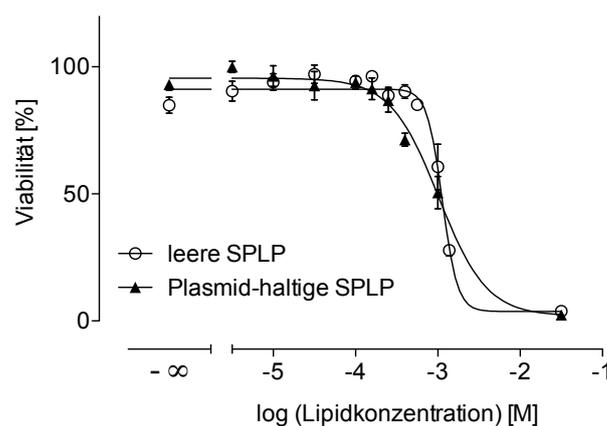


Abb. 4.26.: Zytotoxizität von SPLP. bEnd.3-Zellen wurden für 48 h mit leeren bzw. Plasmid-haltigen SPLP inkubiert. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte mittels MTT-Assay. IC_{50} (leere SPLP) = 1,1 mM; IC_{50} (Plasmid-haltige SPLP) = 1,0 mM.

wurde im Folgenden die Zytotoxizität von SPLP untersucht. Wie aus Abbildung 4.26 hervorgeht, wurden für Plasmid-freie und Plasmid-haltige SPLP vergleichbare IC_{50} -Werte von ca. 1 mM gefunden. Somit lagen die maximal zur Transfektion eingesetzten Lipidkonzentrationen hier – anders als bei der Transfektion mit Liposomen – deutlich unterhalb des IC_{50} -Wertes ($< 180 \mu\text{M}$). Die beobachtete VCAM-Reduktion durch leere SPLP scheint daher auf einem Eingriff der Lipide in den Zellstoffwechsel zu beruhen, der aber nicht die Viabilität der Zellen beeinträchtigt. Das Auftreten ähnlicher Effekte beschrieben Maus et al. [330], die eine endotheliale VCAM-1-Reduktion nach Inkubation mit Liposomen aus DOTMA und DOPE *in vitro* feststellten. Als Ursache wurde ein abnormales Transkriptionsverhalten der Zellen gefunden. Die Autoren vermuten, dass dabei Veränderungen in der zellulären Membranzusammensetzung durch die Inkubation mit Liposomen eine Rolle spielen. Interessanterweise blieb das Expressionsmuster von ICAM-1 durch die Lipidexposition unbeeinflusst.

Obwohl vergleichbare IC_{50} -Werte festgestellt und äquivalente Lipidkonzentrationen auf die Zellen gegeben wurden, war die VCAM-Expression nach Transfektion mit shRNA-haltigen im Vergleich zu leeren SPLP signifikant stärker herunterreguliert. Demnach kann angenommen werden, dass die Wirkung VCAM-shRNA-haltiger SPLP zumindest teilweise auf einer spezifischen shRNA-basierten posttranskriptionellen Genausschaltung beruht. Allerdings ist die Untersuchung SPLP-vermittelter RNA-Interferenzen an weiteren endothelialen Adhäsionsrezeptoren empfehlenswert, um die Relevanz unspezifischer Effekte durch das Trägersystem besser einschätzen zu können. Außerdem sollte eine SPLP-vermittelte Transfektion eines nicht-kodierenden shRNA-Plasmids durchgeführt werden, so dass Effekte des Plasmidrückgrats ausgeschlossen werden können. Nur so kann die Eignung von SPLP als endothelial gerichtetes Therapeutikum zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen abschließend beurteilt werden.

5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungen ist das vaskuläre Endothel von zentraler Bedeutung: Stimuliert durch Entzündungsmediatoren exprimiert das Endothel eine Reihe proinflammatorischer Adhäsionsrezeptoren, die eine Anhaftung zirkulierender Leukozyten vermitteln und so deren Einwanderung in das geschädigte Gewebe ermöglichen. Daher wird postuliert, dass die Ausschaltung endothelialer Adhäsionsrezeptoren wie *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) eine antiinflammatorische Wirkung zeigt. Diese interessante Option zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen stand im Fokus der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Die (partielle) Ausschaltung von VCAM-1 in murinen bEnd.3-Endothelzellen erfolgte durch posttranskriptionelle Expressionshemmung unter Verwendung von siRNA oder shRNA-kodierenden Plasmiden. Stellvertretend für Leukozyten wurde an Tumorzellen demonstriert, dass durch einen endothelialen VCAM-1-Knockdown eine reduzierte Adhäsion zirkulierender Zellen an immobilisierte Endothelzellen *in vitro* erreicht werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt das Potential der oben vorgestellten Strategie unter Einsatz RNAi-basierter Therapeutika und bildete die Grundlage für die nachfolgende Entwicklung eines nicht-viralen Gentransfersystems, mit dessen Hilfe Nukleinsäuren zur Ausschaltung von VCAM-1 in Endothelzellen eingebracht werden können.

Mit Hinblick auf eine perspektivische Anwendung *in vivo* wurden zunächst sterisch stabilisierte Liposomen mit pH-insensitiven bzw. pH-sensitiven Eigenschaften untersucht, die bekanntermaßen eine gute Pharmakokinetik und Verträglichkeit aufweisen. pH-sensitive Liposomen zeichneten sich im Vergleich mit pH-insensitiven Liposomen durch eine verbesserte intrazelluläre Freisetzung des liposomal verkapselten Materials aus. Durch Verwendung der Dualen Asymmetrischen Zentrifugation konnte sowohl siRNA als auch Plasmid-DNA sehr effizient in Liposomen eingeschlossen werden. In Versuchen zur Integrität und Funktionalität sowie zur zellulären Aufnahme und zur intrazellulären Freisetzung lieferten die liposomal verkapselten Nukleinsäuren positive Resultate. Dennoch konnte weder durch Transfektion von liposomaler siRNA noch durch liposomale shRNA eine RNAi-spezifische Expressionshemmung von

VCAM-1 *in vitro* erreicht werden. Als Ursache wird eine unzureichende intrazelluläre Anreicherung der Nukleinsäuren am Wirkort angenommen. Der Einsatz höherer Konzentrationen Nukleinsäure-haltiger Liposomen zur Transfektion der Endothelzellen war aufgrund toxischer Effekte des Trägersystems nicht möglich.

Als weiteres Lipid-basiertes Gentransfersystem wurden sogenannte *stabilized plasmid-lipid particles* (SPLP) geprüft. Anhand eines GFP-kodierenden Reporterplasmids wurde gezeigt, dass diese im Gegensatz zu Liposomen eine Transfektion von bEnd.3-Zellen vermitteln können. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz von SPLP wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum einen wurde die Lipidzusammensetzung modifiziert, um pH-abhängig die intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäuren zu begünstigen. Jedoch wurde festgestellt, dass die Bildung von SPLP auf einem sensiblen Gleichgewicht kationischer Lipidbestandteile und anionischer DNA beruht, die mit der Einführung einer anionischen pH-sensitiven Lipidhülle trotz diverser Bemühungen nicht vereinbar war. Zum anderen wurden *Immuno-SPLP* für eine verbesserte zelluläre Aufnahme sowie einen zielgerichteten endothelialen Gentransfer hergestellt. Die Funktionalisierung von SPLP mit einem α -Endoglin-Antikörperfragment konnte mithilfe der Postinsertionsmethode erreicht werden. Die gegen Endoglin gerichteten Immuno-SPLP zeigten eine spezifische Bindung an bEnd.3-Zellen und führten zu einer gesteigerten Internalisierung der Partikel. Eine signifikante Verbesserung des *in vitro*-Transfektionspotentials von SPLP wurde dadurch jedoch nicht erzielt. Daher wurde die Transfektion von bEnd.3-Zellen mit VCAM-shRNA zur Ausschaltung von VCAM-1 mithilfe unfunktionalisierter SPLP durchgeführt. Diese resultierte in einer signifikanten Expressionshemmung von VCAM-1. Jedoch bewirkten auch Plasmidfreie SPLP eine deutliche Herunterregulation des Adhäsionsrezeptors. Die Ursache dieser Beobachtung blieb ungeklärt, ein toxischer Effekt des Transfektionssystems konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Diese Arbeit demonstriert das Potential RNAi-basierter Wirkstoffe zur Ausschaltung des endothelialen Adhäsionsrezeptors VCAM-1 als möglichen Ansatz zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen. Gleichzeitig wird die Notwendigkeit sowie die Problematik der Entwicklung eines effizienten Gentransfersystems deutlich. Mithilfe der hier verfolgten Ansätze zur Lipid-basierten Transfektion von Endothelzellen war die posttranskriptionelle Expressionshemmung von VCAM-1 trotz vielversprechender Ergebnisse zur Charakterisierung der Transfektionssysteme nur bedingt möglich.

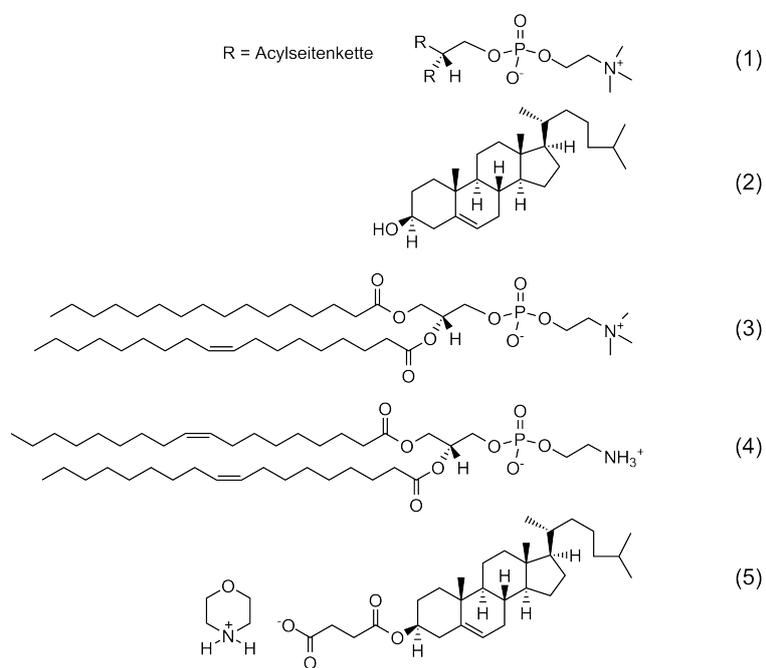


Abb. A.3.: Strukturformeln sonstiger verwendeter Lipide. (1) SPC, (2) Cholesterol, (3) POPC, (4) DOPE, (5) CHEMS.

A.2. GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit



Spin Format (See Reverse for Vacuum Format)

- Preparation:** See Technical Bulletin for Details
 - Add RNase A to the Resuspension Solution
 - Add Ethanol to Wash Solution 2
 - Chill the Neutralization Solution

1 Harvest & Lyse Bacteria

- Pellet 150 ml of an overnight culture at 5,000 x g, 10 min. Discard supernatant.
- Resuspend cells in 12 ml of Resuspension Solution. Pipet up and down, or vortex.
- Add 12 ml of Lysis Solution and gently invert 6-8 times to mix. Do not vortex. Allow to clear, 3-5 min.
- Remove the plunger from a filter syringe and place the barrel in an upright position.

2 Prepare Cleared Lysate

- Add 12 ml of Neutralization Solution to the lysed cells and gently invert 6-8 times to mix.
- Add 9 ml of Binding Solution and gently invert 1-2 times to mix.
- Immediately add the mix to the barrel of the filter syringe and let sit for 5 min.

3 Prepare Column

- Place the binding column into a collection tube provided.
- Add 12 ml of Column Preparation Solution to the column and spin in a swinging bucket rotor at 3,000 x g, 2 min. Discard the flow-through.

4 Bind Plasmid DNA to Column

- Hold the filter syringe over the column and gently insert the plunger to expel half of the cleared lysate. Pull back slightly on the plunger to stop the flow from the syringe.
- Spin in a swinging bucket rotor at 3,000 x g, 2 min. Discard the flow-through.
- Add the remainder of the cleared lysate to the column and repeat the spin. Discard the flow-through.

5 Wash to Remove Contaminants

- Add 12 ml of Wash Solution 1 and spin in a swinging bucket rotor at 3,000 x g, 2 min. Discard the flow-through.
- Add 12 ml of Wash Solution 2 and spin in a swinging bucket rotor at 3,000 x g, 5 min. Discard the flow-through.

6 Elute Purified Plasmid DNA

- Transfer the column to a new collection tube provided.
- For maximum recovery: Add 3 ml of Elution Solution and spin in a swinging bucket rotor at 3,000 x g, 5 min.
- For maximum yield: Add 3 ml of Elution Solution and spin in a swinging bucket rotor at 1,000 x g, 5 min.

Abb. A.4.: Plasmidisolierung mittels GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit. (Abbildung aus [331].)

Literaturverzeichnis

- [1] B. E. Sumpio, J. T. Riley und A. Dardik, Cells in focus: endothelial cell, *Int J Biochem Cell Biol* **2002**, *34*, 1508–12.
- [2] S. D. Rosen, Cell surface lectins in the immune system, *Semin Immunol* **1993**, *5*, 237–47.
- [3] E. L. Berg, M. K. Robinson, O. Mansson, E. C. Butcher und J. L. Magnani, A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1, *J Biol Chem* **1991**, *266*, 14869–72.
- [4] C. Foxall, S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa und B. K. Brandley, The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide, *J Cell Biol* **1992**, *117*, 895–902.
- [5] P. da Costa Martins, J.-J. García-Vallejo, J. V. van Thienen, M. Fernandez-Borja, J. M. van Gils, C. Beckers, A. J. Horrevoets, P. L. Hordijk und J.-J. Zwaginga, P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27*, 1023–9.
- [6] P. S. Frenette, C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber und D. D. Wagner, P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo, *J Exp Med* **2000**, *191*, 1413–22.
- [7] K. L. Moore, Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1, *Leuk Lymphoma* **1998**, *29*, 1–15.
- [8] M. P. Bevilacqua, J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran und M. A. Gimbrone, Jr, Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 9238–42.
- [9] J. G. Geng, M. P. Bevilacqua, K. L. Moore, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, J. M. Kim, G. A. Bliss, G. A. Zimmerman und R. P. McEver, Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140, *Nature* **1990**, *343*, 757–60.
- [10] T. F. Tedder, A. C. Penta, H. B. Levine und A. S. Freedman, Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens, *J Immunol* **1990**, *144*, 532–40.
- [11] U. H. von Andrian und C. R. Mackay, T-cell function and migration. Two sides of the same coin, *N Engl J Med* **2000**, *343*, 1020–34.
- [12] T.-C. Wu, The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion, *Cancer Res* **2007**, *67*, 6003–6.
- [13] G. E. Rice, J. M. Munro, C. Corless und M. P. Bevilacqua, Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues, *Am J Pathol* **1991**, *138*, 385–93.
- [14] I. Kuzu, R. Bicknell, C. D. Fletcher und K. C. Gatter, Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors, *Lab Invest* **1993**, *69*, 322–8.

- [15] M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler und R. R. Lobb, VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site, *Cell* **1990**, *60*, 577–84.
- [16] C. Rüegg, A. A. Postigo, E. E. Sikorski, E. C. Butcher, R. Pytela und D. J. Erle, Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering, *J Cell Biol* **1992**, *117*, 179–89.
- [17] M. H. Grayson, M. Van der Vieren, S. A. Sterbinsky, W. Michael Gallatin, P. A. Hoffman, D. E. Staunton und B. S. Bochner, alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), *J Exp Med* **1998**, *188*, 2187–91.
- [18] S. R. Barthel, D. S. Annis, D. F. Mosher und M. W. Johansson, Differential engagement of modules 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) by integrins alpha4beta1 (CD49d/29) and alphaMbeta2 (CD11b/18) of eosinophils, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 32175–87.
- [19] M. I. Cybulsky, J. W. Fries, A. J. Williams, P. Sultan, V. M. Davis, M. A. Gimbrone, Jr und T. Collins, Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium, *Am J Pathol* **1991**, *138*, 815–20.
- [20] K. J. Garton, P. J. Gough, J. Philalay, P. T. Wille, C. P. Blobel, R. H. Whitehead, P. J. Dempsey und E. W. Raines, Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17), *J Biol Chem* **2003**, *278*, 37459–64.
- [21] A. J. Gearing und W. Newman, Circulating adhesion molecules in disease, *Immunol Today* **1993**, *14*, 506–12.
- [22] P. E. Spronk, P. C. Limburg und C. G. Kallenberg, Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus, *Lupus* **1995**, *4*, 86–94.
- [23] K. Peter, U. Weirich, T. K. Nordt, J. Ruef und C. Bode, Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis, *Thromb Haemost* **1999**, *82 Suppl 1*, 38–43.
- [24] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky und S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 678–89.
- [25] R. O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [26] T. Kinashi, Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes, *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 546–59.
- [27] T. A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* **1994**, *76*, 301–14.
- [28] B. Johnston und E. C. Butcher, Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration, *Semin Immunol* **2002**, *14*, 83–92.
- [29] A. Zlotnik und O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity* **2000**, *12*, 121–7.
- [30] D. S. Harburger und D. A. Calderwood, Integrin signalling at a glance, *J Cell Sci* **2009**, *122*, 159–63.

- [31] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglu, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowski und International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* **2001**, *409*, 860–921.
- [32] H. F. Langer und T. Chavakis, Leukocyte-endothelial interactions in inflammation, *J Cell Mol Med* **2009**, *13*, 1211–20.
- [33] Deutsche Gesellschaft für Autoimmun-Erkrankungen e.V., <http://www.autoimmun.org>, zugegriffen am 13.10.2010.
- [34] J.-F. Bach, The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases, *N Engl J Med* **2002**, *347*, 911–20.
- [35] S. Arihiro, H. Ohtani, M. Suzuki, M. Murata, C. Ejima, M. Oki, Y. Kinouchi, K. Fukushima, I. Sasaki, S. Nakamura, T. Matsumoto, A. Torii, G. Toda und H. Nagura, Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Pathol Int* **2002**, *52*, 367–74.
- [36] H. S. Souza, C. C. Elia, J. Spencer und T. T. MacDonald, Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease, *Gut* **1999**, *45*, 856–63.

- [37] M. Briskin, D. Winsor-Hines, A. Shyjan, N. Cochran, S. Bloom, J. Wilson, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, N. Kassam, C. R. Mackay, W. Newman und D. J. Ringler, Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue, *Am J Pathol* **1997**, *151*, 97–110.
- [38] C. N. Bernstein, M. Sargent und W. M. Gallatin, Beta2 integrin/ICAM expression in Crohn's disease, *Clin Immunol Immunopathol* **1998**, *86*, 147–60.
- [39] D. Veale, S. Rogers und O. Fitzgerald, Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin, *Br J Dermatol* **1995**, *132*, 32–8.
- [40] P. P. Tak, E. W. Thurkow, M. R. Daha, P. M. Kluin, T. J. Smeets, A. E. Meinders und F. C. Breedveld, Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue, *Clin Immunol Immunopathol* **1995**, *77*, 236–42.
- [41] Z. Szekanecz, G. K. Haines, T. R. Lin, L. A. Harlow, S. Goerdts, G. Rayan und A. E. Koch, Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* **1994**, *37*, 221–31.
- [42] A. E. Koch, J. C. Burrows, G. K. Haines, T. M. Carlos, J. M. Harlan und S. J. Leibovich, Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues, *Lab Invest* **1991**, *64*, 313–20.
- [43] B. A. Johnson, G. K. Haines, L. A. Harlow und A. E. Koch, Adhesion molecule expression in human synovial tissue, *Arthritis Rheum* **1993**, *36*, 137–46.
- [44] H. Lassmann, W. Brück und C. F. Lucchinetti, The immunopathology of multiple sclerosis: an overview, *Brain Pathol* **2007**, *17*, 210–8.
- [45] R. Dutta und B. D. Trapp, Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis, *Neurology* **2007**, *68*, 22–31; discussion 43–54.
- [46] R. Washington, J. Burton, R. F. Todd, 3rd, W. Newman, L. Dragovic und P. Dore-Duffy, Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis, *Ann Neurol* **1994**, *35*, 89–97.
- [47] S. M. Kerfoot und P. Kubes, Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* **2002**, *169*, 1000–6.
- [48] B. Cannella und C. S. Raine, The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions, *Ann Neurol* **1995**, *37*, 424–35.
- [49] P. Dore-Duffy, R. Washington und L. Dragovic, Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis, *Adv Exp Med Biol* **1993**, *331*, 243–8.
- [50] J. I. Alvarez, R. Cayrol und A. Prat, Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis, *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1812*, 252–64.
- [51] M. A. Bowen, D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando und U. Francke, Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand, *J Exp Med* **1995**, *181*, 2213–20.

- [52] R. Cayrol, K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic und A. Prat, Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system, *Nat Immunol* **2008**, *9*, 137–45.
- [53] J. R. Jackson, M. P. Seed, C. H. Kircher, D. A. Willoughby und J. D. Winkler, The codependence of angiogenesis and chronic inflammation, *FASEB J* **1997**, *11*, 457–65.
- [54] A. W. Griffioen und G. Molema, Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation, *Pharmacol Rev* **2000**, *52*, 237–68.
- [55] Z. Szekanecz, T. Besenyei, A. Szentpétery und A. E. Koch, Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol* **2010**, *22*, 299–306.
- [56] J. Folkman, How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture, *Cancer Res* **1986**, *46*, 467–73.
- [57] R. S. Kerbel, Tumor angiogenesis, *N Engl J Med* **2008**, *358*, 2039–49.
- [58] T. F. Orntoft und E. M. Vestergaard, Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 362–71.
- [59] R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki und N. Kimura, Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci* **2004**, *95*, 377–84.
- [60] H. Okahara, H. Yagita, K. Miyake und K. Okumura, Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis, *Cancer Res* **1994**, *54*, 3233–6.
- [61] A. Garofalo, R. G. Chirivi, C. Foglieni, R. Pigott, R. Mortarini, I. Martin-Padura, A. Anichini, A. J. Gearing, F. Sanchez-Madrid und E. Dejana, Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases, *Cancer Res* **1995**, *55*, 414–9.
- [62] O. V. Glinskii, J. R. Turk, K. J. Pienta, V. H. Huxley und V. V. Glinsky, Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumour cells., *J Physiol* **2004**, *554*, 89–99.
- [63] A.-M. Khatib, P. Auguste, L. Fallavollita, N. Wang, A. Samani, M. Kontogiannea, S. Meterrissian und P. Brodt, Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis, *Am J Pathol* **2005**, *167*, 749–59.
- [64] K. Ley, Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants, *Immunol Res* **2001**, *24*, 87–95.
- [65] A. D. Luster, R. Alon und U. H. von Andrian, Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets, *Nat Immunol* **2005**, *6*, 1182–90.
- [66] C. R. Mackay, Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies, *Nat Immunol* **2008**, *9*, 988–98.
- [67] A. E. I. Proudfoot, C. A. Power und M. K. Schwarz, Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future?, *Expert Opin Investig Drugs* **2010**, *19*, 345–55.
- [68] J. M. Cantor, M. H. Ginsberg und D. M. Rose, Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets, *Immunol Rev* **2008**, *223*, 236–51.

- [69] A. C. Chan und P. J. Carter, Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation, *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, 301–16.
- [70] C. Brostjan, J. Anrather, V. Csizmadia, G. Natarajan und H. Winkler, Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kappaB and not ATF/c-Jun, *J Immunol* **1997**, *158*, 3836–44.
- [71] J. Liden, I. Rafter, M. Truss, J. A. Gustafsson und S. Okret, Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *273*, 1008–14.
- [72] N. Strebe, A. Guse, M. Schüngel, T. Schirrmann, M. Hafner, T. Jostock, M. Hust, W. Müller und S. Dübel, Functional knockdown of VCAM-1 at the posttranslational level with ER retained antibodies, *J Immunol Methods* **2009**, *341*, 30–40.
- [73] R. E. Kontermann, Intrabodies as therapeutic agents, *Methods* **2004**, *34*, 163–70.
- [74] M. Sperandio, C. A. Gleissner und K. Ley, Glycosylation in immune cell trafficking, *Immunol Rev* **2009**, *230*, 97–113.
- [75] Europäische Arzneimittelagentur, Questions and Answers on Recommendation for Refusal of the Marketing Authorisation for Natalizumab Elan Pharma 300 mg (**19.07.2007**), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2009/11/WC500012381.pdf, zugegriffen am 20.10.2010.
- [76] R. E. Bartt, Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy, *Curr Opin Neurol* **2006**, *19*, 341–9.
- [77] Europäische Arzneimittelagentur, European Medicines Agency recommends suspension of the marketing authorisation of Raptiva (efalizumab) (**19.02.2009**), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500014516.pdf, zugegriffen am 20.10.2010.
- [78] U.S. Food and Drug Administration, FDA Approves Resumed Marketing of Tysabri Under a Special Distribution Program (**05.06.2006**), <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108662.htm>, zugegriffen am 20.10.2010.
- [79] P. W. Bedard und N. Kaila, Selectin inhibitors: a patent review, *Expert Opin Ther Pat* **2010**, *20*, 781–93.
- [80] J. E. Pease und R. Horuk, Chemokine receptor antagonists: Part 1, *Expert Opin Ther Pat* **2009**, *19*, 39–58.
- [81] J. E. Pease und R. Horuk, Chemokine receptor antagonists: part 2, *Expert Opin Ther Pat* **2009**, *19*, 199–221.
- [82] D. Cox, M. Brennan und N. Moran, Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities, *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 804–20.
- [83] The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (**Stand Juni 2010**), <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, zugegriffen am 12.11.2010.
- [84] J. Shi und D. Zheng, An update on gene therapy in China, *Curr Opin Mol Ther* **2009**, *11*, 547–53.
- [85] Interdisziplinäre Arbeitsgruppe „Gentechnologiebericht“ der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften (Hrsg.), Genterapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme. (Zusammenfassung), **Oktober 2008**, <http://www.dg-gt.de/docs/gtdeutschland.pdf>, zugegriffen am 12.11.2010.

- [86] D. H. Kim und J. J. Rossi, Strategies for silencing human disease using RNA interference, *Nat Rev Genet* **2007**, *8*, 173–84.
- [87] T. M. Rana, Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 23–36.
- [88] A. M. E. Sidahmed und B. Wilkie, Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective, *Methods Mol Biol* **2010**, *623*, 3–19.
- [89] D. Cojocari, Lentiviral delivery of shRNA expression construct for stable integration and expression of shRNA. ShRNA processing and inhibitory mechanisms., http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ShRNA_Lentivirus.svg, **10.12.2009**, zugegriffen am 12.12.2010.
- [90] C. M. Perry und J. A. Balfour, Fomivirsin, *Drugs* **1999**, *57*, 375–80; discussion 381.
- [91] Europäische Arzneimittelagentur, Public statement on Vitravene (fomivirsin) - Withdrawal from the marketing authorisation in the european union (**August 2002**), http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2009/12/news_detail_000937.jsp&url=menus/news_and_events/news_and_events.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1#, zugegriffen am 15.11.2010.
- [92] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* **1998**, *391*, 806–11.
- [93] B. P. Lewis, C. B. Burge und D. P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell* **2005**, *120*, 15–20.
- [94] Y. Shi, Mammalian RNAi for the masses, *Trends Genet* **2003**, *19*, 9–12.
- [95] D. D. Rao, J. S. Vorhies, N. Senzer und J. Nemunaitis, siRNA vs. shRNA: similarities and differences, *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61*, 746–59.
- [96] K. Tiemann und J. J. Rossi, RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects, *EMBO Mol Med* **2009**, *1*, 142–51.
- [97] C. F. Bennett, T. P. Condon, S. Grimm, H. Chan und M. Y. Chiang, Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides, *J Immunol* **1994**, *152*, 3530–40.
- [98] S. J. H. van Deventer, M. K. Wedel, B. F. Baker, S. Xia, E. Chuang und P. B. Miner, Jr, A phase II dose ranging, double-blind, placebo-controlled study of alicaforsen enema in subjects with acute exacerbation of mild to moderate left-sided ulcerative colitis, *Aliment Pharmacol Ther* **2006**, *23*, 1415–25.
- [99] S. Schreiber, S. Nikolaus, H. Malchow, W. Kruis, H. Lochs, A. Raedler, E. G. Hahn, T. Krummenerl, G. Steinmann und German ICAM-1 Study Group, Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease, *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1339–46.
- [100] B. R. Yacyshyn, W. Y. Chey, J. Goff, B. Salzberg, R. Baerg, A. L. Buchman, J. Tami, R. Yu, E. Gibiansky, W. R. Shanahan und ISIS 2302-CS9 Investigators, Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease, *Gut* **2002**, *51*, 30–6.

- [101] K. J. Myers, D. R. Witchell, M. J. Graham, S. Koo, M. Butler und T. P. Condon, Antisense oligonucleotide blockade of alpha 4 integrin prevents and reverses clinical symptoms in murine experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Neuroimmunol* **2005**, *160*, 12–24.
- [102] Antisense Therapeutics Limited, http://www.antisense.com.au/_116.asp, zugegriffen am 13.12.2010.
- [103] T. Walker, H. P. Wendel, L. Tetzloff, O. Heidenreich und G. Ziemer, Suppression of ICAM-1 in human venous endothelial cells by small interfering RNAs, *Eur J Cardiothorac Surg* **2005**, *28*, 816–20.
- [104] T. Walker, H. P. Wendel, L. Tetzloff, C. Raabe, O. Heidenreich, P. Simon, A. M. Scheule und G. Ziemer, Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection, *J Cell Mol Med* **2007**, *11*, 139–47.
- [105] T. Walker, H. P. Wendel, C. Raabe, P. Wiechnik, L. Spranger, O. Heidenreich, A. M. Scheule, A. Nordheim und G. Ziemer, Graft protection in bypass surgery: siRNA-mediated silencing of adhesion molecules, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 15–21.
- [106] Y. Qu, X. Shi, H. Zhang, W. Sun, S. Han, C. Yu und J. Li, VCAM-1 siRNA reduces neointimal formation after surgical mechanical injury of the rat carotid artery, *J Vasc Surg* **2009**, *50*, 1452–8.
- [107] A. K. M. S. Alam, O. Florey, M. Weber, R. G. Pillai, C. Chan, P. H. Tan, R. I. Lechler, M. O. McClure, D. O. Haskard und A. J. T. George, Knockdown of mouse VCAM-1 by vector-based siRNA, *Transpl Immunol* **2006**, *16*, 185–93.
- [108] A. Takase, T. Yasukawa, A. Kato und Y. Ogura, Suppressive effect of short-interfering RNA on hyperglycemia-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured vascular endothelial cells, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2008**, *246*, 989–92.
- [109] Y. Hirano, E. Sakurai, A. Matsubara und Y. Ogura, Suppression of ICAM-1 in retinal and choroidal endothelial cells by plasmid small-interfering RNAs in vivo, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2010**, *51*, 508–15.
- [110] Y. Nishiwaki, T. Yokota, M. Hiraoka, M. Miyagishi, K. Taira, M. Isobe, H. Mizusawa und M. Yoshida, Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion, *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *310*, 1062–6.
- [111] E. Simone, B.-S. Ding und V. Muzykantov, Targeted delivery of therapeutics to endothelium, *Cell Tissue Res* **2009**, *335*, 283–300.
- [112] M. J. Poznansky und R. L. Juliano, Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review, *Pharmacol Rev* **1984**, *36*, 277–336.
- [113] S. Muro, M. Koval und V. Muzykantov, Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery, *Curr Vasc Pharmacol* **2004**, *2*, 281–99.
- [114] B.-S. Ding, T. Dziubla, V. V. Shuvaev, S. Muro und V. R. Muzykantov, Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium, *Mol Interv* **2006**, *6*, 98–112.
- [115] W. Rubas und H. Schreier, Liposomen: Fortschritte in der Herstellungs-Technologie und Therapie, *Pharmazie in unserer Zeit* **1991**, *6*, 1537–1545.
- [116] R. Nothelle und H.-J. Hamann, Liposomen - Struktur und Herstellung, *Chemie Ingenieur Technik* **1996**, *12*, 255–270.
- [117] M. B. Yatvin und P. I. Lelkes, Clinical prospects for liposomes, *Med Phys* **1982**, *9*, 149–75.

- [118] J. H. Senior, Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1987**, *3*, 123–93.
- [119] D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic und C. Redemann, Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 11460–4.
- [120] T. Allen, The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1993**, *13*, 285–309.
- [121] D. D. Lasic, F. J. Martin, A. Gabizon, S. K. Huang und D. Papahadjopoulos, Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times, *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1070*, 187–92.
- [122] V. P. Torchilin, V. G. Omelyanenko, M. I. Papisov, A. A. Bogdanov, Jr, V. S. Trubetskoy, J. N. Herron und C. A. Gentry, Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity, *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1195*, 11–20.
- [123] R. Peschka-Süss und R. Schubert, pH-sensitive liposomes. In: V.P. Torchilin und V. Weissig (Hrsg.): Liposomes: a practical approach, *Oxford University Press*, **2003**, 305–18.
- [124] M. Finkelstein und G. Weissmann, The introduction of enzymes into cells by means of liposomes, *J Lipid Res* **1978**, *19*, 289–303.
- [125] R. Peschka-Süss und N. Skalko-Basnet, The association of plain and ligand-bearing neutral and pH-sensitiv liposomes with various cells, *J Liposome Res* **2000**, *10*, 43–59.
- [126] I. S. Zuhorn und D. Hoekstra, On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question?, *J Membr Biol* **2002**, *189*, 167–79.
- [127] U. S. Huth, R. Schubert und R. Peschka-Süss, Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging, *J Control Release* **2006**, *110*, 490–504.
- [128] P. R. Cullis und B. de Kruijff, The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. A 31P NMR study, *Biochim Biophys Acta* **1978**, *513*, 31–42.
- [129] I. M. Hafez und P. R. Cullis, Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery, *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *47*, 139–48.
- [130] I. M. Hafez und P. R. Cullis, Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1463*, 107–14.
- [131] N. Bergstrand, M. C. Arfvidsson, J.-M. Kim, D. H. Thompson und K. Edwards, Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes, *Biophys Chem* **2003**, *104*, 361–79.
- [132] S. Simões, J. N. Moreira, C. Fonseca, N. Düzgüneş und M. C. P. de Lima, On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56*, 947–65.
- [133] A. E. Green und P. G. Rose, Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer, *Int J Nanomedicine* **2006**, *1*, 229–39.
- [134] C. E. Petre und D. P. Dittmer, Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi’s sarcoma, *Int J Nanomedicine* **2007**, *2*, 277–88.
- [135] E. C. van Dalen, E. M. Michiels, H. N. Caron und L. C. Kremer, Different anthracycline derivates for reducing cardiotoxicity in cancer patients, *Cochrane Database Syst Rev* **2010**, *5*, CD005006.

- [136] F. Yuan, M. Leunig, S. K. Huang, D. A. Berk, D. Papahadjopoulos und R. K. Jain, Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft, *Cancer Res* **1994**, *54*, 3352–6.
- [137] N. Z. Wu, D. Da, T. L. Rudoll, D. Needham, A. R. Whorton und M. W. Dewhirst, Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumor tissue, *Cancer Res* **1993**, *53*, 3765–70.
- [138] H. Maeda, G. Y. Bharate und J. Daruwalla, Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect, *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *71*, 409–19.
- [139] L. E. Gerlowski und R. K. Jain, Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues, *Microvasc Res* **1986**, *31*, 288–305.
- [140] R. K. Jain, Transport of molecules in the tumor interstitium: a review, *Cancer Res* **1987**, *47*, 3039–51.
- [141] L. Lesermann, H. Suzuki und P. Machy, Comments on the Application of Liposome Technology to specific Cell Targeting. In: Gredoriadis G. Liposome Technology: Vol. III. Interactions of Liposomes with the Biological Milieu, CRC Press, **1993**, 139–152.
- [142] P. Sapra und T. M. Allen, Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs, *Cancer Res* **2002**, *62*, 7190–4.
- [143] J. W. Park, K. Hong, D. B. Kirpotin, G. Colbern, R. Shalaby, J. Baselga, Y. Shao, U. B. Nielsen, J. D. Marks, D. Moore, D. Papahadjopoulos und C. C. Benz, Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery, *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 1172–81.
- [144] C. B. Hansen, G. Y. Kao, E. H. Moase, S. Zalipsky und T. M. Allen, Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures, *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1239*, 133–44.
- [145] T. Allen, C. Hansen und S. Zalipsky, Antibody-targeted stealth liposomes. In: Lasic D and Martin F. Stealth liposomes, CRC Press, **1995**, 233–44.
- [146] G. Blume, G. Cevc, M. D. Crommelin, I. A. Bakker-Woudenberg, C. Kluft und G. Storm, Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times, *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1149*, 180–4.
- [147] T. Völkel, P. Hölig, T. Merdan, R. Müller und R. E. Kontermann, Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105), *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1663*, 158–66.
- [148] S. K. E. Messerschmidt, A. Kolbe, D. Müller, M. Knoll, J. Pleiss und R. E. Kontermann, Novel single-chain Fv' formats for the generation of immunoliposomes by site-directed coupling, *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 362–9.
- [149] D. L. Iden und T. M. Allen, In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1513*, 207–16.
- [150] T. M. Allen, P. Sapra und E. Moase, Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes, *Cell Mol Biol Lett* **2002**, *7*, 889–94.
- [151] G. A. Koning, H. W. M. Morselt, A. Gorter, T. M. Allen, S. Zalipsky, G. L. Scherphof und J. A. A. M. Kamps, Interaction of differently designed immunoliposomes with colon cancer cells and Kupffer cells. An in vitro comparison, *Pharm Res* **2003**, *20*, 1249–57.

- [152] N. C. Phillips, L. Gagne, C. Tsoukas und J. Dahman, Immunoliposome targeting to murine CD4+ leucocytes is dependent on immune status, *J Immunol* **1994**, *152*, 3168–74.
- [153] J. A. Harding, C. M. Engbers, M. S. Newman, N. I. Goldstein und S. Zalipsky, Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes, *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1327*, 181–92.
- [154] L. Xu, C.-C. Huang, W. Huang, W.-H. Tang, A. Rait, Y. Z. Yin, I. Cruz, L.-M. Xiang, K. F. Pirollo und E. H. Chang, Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes, *Mol Cancer Ther* **2002**, *1*, 337–46.
- [155] U. B. Nielsen, D. B. Kirpotin, E. M. Pickering, K. Hong, J. W. Park, M. Refaat Shalaby, Y. Shao, C. C. Benz und J. D. Marks, Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis, *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1591*, 109–118.
- [156] P. Baum, D. Müller, R. Rüger und R. E. Kontermann, Single-chain Fv immunoliposomes for the targeting of fibroblast activation protein-expressing tumor stromal cells, *J Drug Target* **2007**, *15*, 399–406.
- [157] H. Shmeeda, D. Tzemach, L. Mak und A. Gabizon, Her2-targeted pegylated liposomal doxorubicin: retention of target-specific binding and cytotoxicity after in vivo passage, *J Control Release* **2009**, *136*, 155–60.
- [158] W. W. Cheng und T. M. Allen, The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: an update on immunoliposomal drugs for cancer treatment, *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, *7*, 461–78.
- [159] F. Pastorino, C. Brignole, D. Marimpietri, M. Cilli, C. Gambini, D. Ribatti, R. Longhi, T. M. Allen, A. Corti und M. Ponzoni, Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy, *Cancer Res* **2003**, *63*, 7400–9.
- [160] R. M. Schiffelers, G. A. Koning, T. L. M. ten Hagen, M. H. A. M. Fens, A. J. Schraa, A. P. C. A. Janssen, R. J. Kok, G. Molema und G. Storm, Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin, *J Control Release* **2003**, *91*, 115–22.
- [161] F. Pastorino, C. Brignole, D. Di Paolo, B. Nico, A. Pezzolo, D. Marimpietri, G. Pagnan, F. Piccardi, M. Cilli, R. Longhi, D. Ribatti, A. Corti, T. M. Allen und M. Ponzoni, Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy, *Cancer Res* **2006**, *66*, 10073–82.
- [162] S. Gosk, T. Moos, C. Gottstein und G. Bendas, VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo, *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 854–63.
- [163] S. A. Asgeirsdóttir, J. A. A. M. Kamps, H. I. Bakker, P. J. Zwiers, P. Heeringa, K. van der Weide, H. van Goor, A. H. Petersen, H. Morselt, H. E. Moorlag, E. Steenbergen, C. G. Kallenberg und G. Molema, Site-specific inhibition of glomerulonephritis progression by targeted delivery of dexamethasone to glomerular endothelium, *Mol Pharmacol* **2007**, *72*, 121–31.
- [164] S. A. Asgeirsdóttir, P. J. Zwiers, H. W. Morselt, H. E. Moorlag, H. I. Bakker, P. Heeringa, J. W. Kok, C. G. M. Kallenberg, G. Molema und J. A. A. M. Kamps, Inhibition of proinflammatory genes in anti-GBM glomerulonephritis by targeted dexamethasone-loaded AbEsel liposomes, *Am J Physiol Renal Physiol* **2008**, *294*, F554–61.
- [165] G. A. Koning, R. M. Schiffelers, M. H. M. Wauben, R. J. Kok, E. Mastrobattista, G. Molema, T. L. M. ten Hagen und G. Storm, Targeting of angiogenic endothelial cells at sites of inflammation by dexamethasone phosphate-containing RGD peptide liposomes inhibits experimental arthritis, *Arthritis Rheum* **2006**, *54*, 1198–208.

- [166] J. Minaguchi, T. Oohashi, K. Inagawa, A. Ohtsuka und Y. Ninomiya, Transvascular accumulation of Sialyl Lewis X conjugated liposome in inflamed joints of collagen antibody-induced arthritic (CAIA) mice, *Arch Histol Cytol* **2008**, *71*, 195–203.
- [167] R. M. Schiffelers, G. Molema, T. L. M. ten Hagen, A. P. C. A. Janssen, A. J. Schraa, R. J. Kok, G. A. Koning und G. Storm, Ligand-targeted liposomes directed against pathological vasculature, *J Liposome Res* **2002**, *12*, 129–35.
- [168] R. J. M. G. E. Brandwijk, W. J. M. Mulder, K. Nicolay, K. H. Mayo, V. L. J. L. Thijssen und A. W. Griffioen, Anginex-conjugated liposomes for targeting of angiogenic endothelial cells, *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 785–90.
- [169] M. Kondo, T. Asai, Y. Katanasaka, Y. Sadzuka, H. Tsukada, K. Ogino, T. Taki, K. Baba und N. Oku, Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase, *Int J Cancer* **2004**, *108*, 301–6.
- [170] D. Simberg, T. Duza, J. H. Park, M. Essler, J. Pilch, L. Zhang, A. M. Derfus, M. Yang, R. M. Hoffman, S. Bhatia, M. J. Sailor und E. Ruoslahti, Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 932–6.
- [171] N. Maeda, Y. Takeuchi, M. Takada, Y. Sadzuka, Y. Namba und N. Oku, Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome, *J Control Release* **2004**, *100*, 41–52.
- [172] N. Maeda, S. Miyazawa, K. Shimizu, T. Asai, S. Yonezawa, S. Kitazawa, Y. Namba, H. Tsukada und N. Oku, Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs, *Biol Pharm Bull* **2006**, *29*, 1936–40.
- [173] R. Nallamotheu, G. C. Wood, C. B. Pattillo, R. C. Scott, M. F. Kiani, B. M. Moore und L. A. Thoma, A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: design, characterization, and in vitro evaluation, *AAPS PharmSciTech* **2006**, *7*, E32.
- [174] M. H. A. M. Fens, K. J. Hill, J. Issa, S. E. Ashton, F. R. Westwood, D. C. Blakey, G. Storm, A. J. Ryan und R. M. Schiffelers, Liposomal encapsulation enhances the antitumour efficacy of the vascular disrupting agent ZD6126 in murine B16.F10 melanoma, *Br J Cancer* **2008**, *99*, 1256–64.
- [175] J. E. Adrian, H. W. M. Morselt, R. Süß, S. Barnert, J. W. Kok, S. A. Asgeirsdóttir, M. H. J. Ruiters, G. Molema und J. A. A. M. Kamps, Targeted SAINT-O-Somes for improved intracellular delivery of siRNA and cytotoxic drugs into endothelial cells, *J Control Release* **2010**, *144*, 341–9.
- [176] R. Stahn, C. Grittner, R. Zeisig, U. Karsten, S. B. Felix und K. Wenzel, Sialyl Lewis(x)-liposomes as vehicles for site-directed, E-selectin-mediated drug transfer into activated endothelial cells, *Cell Mol Life Sci* **2001**, *58*, 141–7.
- [177] D. D. Spragg, D. R. Alford, R. Greferath, C. E. Larsen, K. D. Lee, G. C. Gurtner, M. I. Cybulsky, P. F. Tosi, C. Nicolau und M. A. Gimbrone, Jr, Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 8795–800.
- [178] S. Kessner, A. Krause, U. Rothe und G. Bendas, Investigation of the cellular uptake of E-Selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1514*, 177–90.

- [179] M. Everts, G. A. Koning, R. J. Kok, S. A. Asgeirsdóttir, D. Vestweber, D. K. F. Meijer, G. Storm und G. Molema, In vitro cellular handling and in vivo targeting of E-selectin-directed immunoconjugates and immunoliposomes used for drug delivery to inflamed endothelium, *Pharm Res* **2003**, *20*, 64–72.
- [180] S. D. Tiukinhoy, M. E. Mahowald, V. P. Shively, A. Nagaraj, B. J. Kane, M. E. Klegerman, R. C. MacDonald, D. D. McPherson und J. S. Matsumura, Development of echogenic, plasmid-incorporated, tissue-targeted cationic liposomes that can be used for directed gene delivery, *Invest Radiol* **2000**, *35*, 732–8.
- [181] T. Murohara, J. Margiotta, L. M. Phillips, J. C. Paulson, S. DeFrees, S. Zalipsky, L. S. Guo und A. M. Lefer, Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewisx-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury, *Cardiovasc Res* **1995**, *30*, 965–74.
- [182] R. C. Scott, B. Wang, R. Nallamothu, C. B. Pattillo, G. Perez-Liz, A. Issekutz, L. Del Valle, G. C. Wood und M. F. Kiani, Targeted delivery of antibody conjugated liposomal drug carriers to rat myocardial infarction, *Biotechnol Bioeng* **2007**, *96*, 795–802.
- [183] R. C. Scott, J. M. Rosano, Z. Ivanov, B. Wang, P. L.-G. Chong, A. C. Issekutz, D. L. Crabbe und M. F. Kiani, Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function, *FASEB J* **2009**, *23*, 3361–7.
- [184] P. G. Bloemen, P. A. Henricks, L. van Bloois, M. C. van den Tweel, A. C. Bloem, F. P. Nijkamp, D. J. Crommelin und G. Storm, Adhesion molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug delivery, *FEBS Lett* **1995**, *357*, 140–4.
- [185] E. Mastrobattista, G. Storm, L. van Bloois, R. Reszka, P. G. Bloemen, D. J. Crommelin und P. A. Henricks, Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells, *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1419*, 353–63.
- [186] R. C. Gunawan und D. T. Auguste, The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes, *Biomaterials* **2010**, *31*, 900–7.
- [187] G. N. C. Chiu, M. B. Bally und L. D. Mayer, Targeting of antibody conjugated, phosphatidylserine-containing liposomes to vascular cell adhesion molecule 1 for controlled thrombogenesis, *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1613*, 115–21.
- [188] M. Voinea, I. Manduteanu, E. Dragomir, M. Capraru und M. Simionescu, Immunoliposomes directed toward VCAM-1 interact specifically with activated endothelial cells—a potential tool for specific drug delivery, *Pharm Res* **2005**, *22*, 1906–17.
- [189] P. Benzinger, G. Martiny-Baron, P. Reusch, G. Siemeister, J. T. Kley, D. Marmé, C. Unger und U. Massing, Targeting of endothelial KDR receptors with 3G2 immunoliposomes in vitro, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1466*, 71–8.
- [190] A. P. C. A. Janssen, R. M. Schiffelers, T. L. M. ten Hagen, G. A. Koning, A. J. Schraa, R. J. Kok, G. Storm und G. Molema, Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy, *Int J Pharm* **2003**, *254*, 55–8.
- [191] P. Roth, C. Hammer, A.-C. Piguet, M. Ledermann, J.-F. Dufour und E. Waelti, Effects on hepatocellular carcinoma of doxorubicin-loaded immunoliposomes designed to target the VEGFR-2, *J Drug Target* **2007**, *15*, 623–31.
- [192] G. A. Koning, M. M. Fretz, U. Woroniecka, G. Storm und G. C. Krijger, Targeting liposomes to tumor endothelial cells for neutron capture therapy, *Appl Radiat Isot* **2004**, *61*, 963–7.
- [193] T.-Y. Lee, C.-T. Lin, S.-Y. Kuo, D.-K. Chang und H.-C. Wu, Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery, *Cancer Res* **2007**, *67*, 10958–65.

- [194] D.-K. Chang, C.-Y. Chiu, S.-Y. Kuo, W.-C. Lin, A. Lo, Y.-P. Wang, P.-C. Li und H.-C. Wu, Antiangiogenic targeting liposomes increase therapeutic efficacy for solid tumors, *J Biol Chem* **2009**, *284*, 12905–16.
- [195] A. Gougos und M. Letarte, Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells, *J Biol Chem* **1990**, *265*, 8361–4.
- [196] O. Llorca, A. Trujillo, F. J. Blanco und C. Bernabeu, Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia, *J Mol Biol* **2007**, *365*, 694–705.
- [197] P. Lastres, J. Martín-Perez, C. Langa und C. Bernabéu, Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin, *Biochem J* **1994**, *301* (Pt 3), 765–8.
- [198] T. Bellón, A. Corbí, P. Lastres, C. Calés, M. Cebrián, S. Vera, S. Cheifetz, J. Massague, M. Letarte und C. Bernabéu, Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions, *Eur J Immunol* **1993**, *23*, 2340–5.
- [199] E. Pérez-Gómez, N. Eleno, J. M. López-Novoa, J. R. Ramirez, B. Velasco, M. Letarte, C. Bernabéu und M. Quintanilla, Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development, *Oncogene* **2005**, *24*, 4450–61.
- [200] M. Jerkic, J. V. Rivas-Elena, M. Prieto, R. Carrón, F. Sanz-Rodríguez, F. Pérez-Barriocanal, A. Rodríguez-Barbero, C. Bernabéu und J. M. López-Novoa, Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation, *FASEB J* **2004**, *18*, 609–11.
- [201] D. Y. Li, L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak und D. P. Wendel, Defective angiogenesis in mice lacking endoglin, *Science* **1999**, *284*, 1534–7.
- [202] V. Barresi, G. Maddalena, V. Enrica, T. Onofrio und B. Gaetano, Endoglin (CD105) expression in the human heart throughout gestation: an immunohistochemical study, *Reprod Sci* **2008**, *15*, 1018–26.
- [203] E. Jirillo, L. Amati, P. Suppressa, D. Cirimele, E. Guastamacchia, V. Covelli, E. Tafaro und C. Sabbà, Involvement of the transforming growth factor beta in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Curr Pharm Des* **2006**, *12*, 1195–200.
- [204] M.-J. Goumans, G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras und P. ten Dijke, Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors, *EMBO J* **2002**, *21*, 1743–53.
- [205] F. Lebrin, M.-J. Goumans, L. Jonker, R. L. C. Carvalho, G. Valdimarsdottir, M. Thorikay, C. Mummery, H. M. Arthur und P. ten Dijke, Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction, *EMBO J* **2004**, *23*, 4018–28.
- [206] E. Fonsatti, H. J. M. Nicolay, M. Altomonte, A. Covre und M. Maio, Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours, *Cardiovasc Res* **2010**, *86*, 12–9.
- [207] N. P. Barbara, J. L. Wrana und M. Letarte, Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 584–94.
- [208] C. Li, I. N. Hampson, L. Hampson, P. Kumar, C. Bernabeu und S. Kumar, CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells, *FASEB J* **2000**, *14*, 55–64.

- [209] J. M. Wang, S. Kumar, D. Pye, A. J. van Agthoven, J. Krupinski und R. D. Hunter, A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues, *Int J Cancer* **1993**, *54*, 363–70.
- [210] F. J. Burrows, E. J. Derbyshire, P. L. Tazzari, P. Amlot, A. F. Gazdar, S. W. King, M. Letarte, E. S. Vitetta und P. E. Thorpe, Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy, *Clin Cancer Res* **1995**, *1*, 1623–34.
- [211] D. W. Miller, W. Graulich, B. Karges, S. Stahl, M. Ernst, A. Ramaswamy, H. H. Sedlacek, R. Müller und J. Adamkiewicz, Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells, *Int J Cancer* **1999**, *81*, 568–72.
- [212] E. Torsney, R. Charlton, D. Parums, M. Collis und H. M. Arthur, Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo, *Inflamm Res* **2002**, *51*, 464–70.
- [213] N. A. Dallas, S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim und L. M. Ellis, Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy, *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 1931–7.
- [214] M. L. Read, A. Logan und L. W. Seymour, Barriers to Gene Delivery Using Synthetic Vectors, *Adv Genet* **2005**, *53PA*, 19–46.
- [215] M. Bartsch, A. H. Weeke-Klump, D. K. F. Meijer, G. L. Scherphof und J. A. A. M. Kamps, Cell-specific targeting of lipid-based carriers for ODN and DNA, *J Liposome Res* **2005**, *15*, 59–92.
- [216] M. Ruponen, S. Ylä-Herttua und A. Urtti, Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies, *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1415*, 331–41.
- [217] I. MacLachlan, Liposomal formulations for nucleic acid delivery. In: S.T. Crooke (Hrsg.): Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications, CRC Press, **2008**, 237–70.
- [218] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 7413–7.
- [219] C. Tros de Ilarduya, L. García und N. Düzgünes, Liposomes and lipopolymeric carriers for gene delivery, *J Microencapsul* **2010**, *27*, 602–8.
- [220] R. W. Horobin und V. Weissig, A QSAR-modeling perspective on cationic transfection lipids. 1. Predicting efficiency and understanding mechanisms, *J Gene Med* **2005**, *7*, 1023–34.
- [221] J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin und P. L. Felgner, Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 2550–61.
- [222] K. W. Mok und P. R. Cullis, Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA, *Biophys J* **1997**, *73*, 2534–45.
- [223] I. S. Zuhorn, U. Bakowsky, E. Polushkin, W. H. Visser, M. C. A. Stuart, J. B. F. N. Engberts und D. Hoekstra, Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency, *Mol Ther* **2005**, *11*, 801–10.
- [224] B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe und C. R. Middaugh, Thermodynamic analysis of binding and protonation in DOTAP/DOPE (1:1): DNA complexes using isothermal titration calorimetry, *Biophys Chem* **2003**, *104*, 67–78.

- [225] V. Pector, J. Backmann, D. Maes, M. Vandenbranden und J. M. Ruyschaert, Biophysical and structural properties of DNA.diC(14)-amidine complexes. Influence of the DNA/lipid ratio, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 29533–8.
- [226] I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler und C. R. Safinya, An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- [227] J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt und C. R. Safinya, Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, *Science* **1997**, *275*, 810–4.
- [228] D. D. Lasic, H. Strey, M. C. A. Stuart, R. Podgornik und P. M. Frederik, The Structure of DNA-Liposome Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*.
- [229] B. Ma, S. Zhang, H. Jiang, B. Zhao und H. Lv, Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery, *J Control Release* **2007**, *123*, 184–94.
- [230] B. Barteau, R. Chèvre, E. Letrou-Bonneval, R. Labas, O. Lambert und B. Pitard, Physico-chemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency, *Curr Gene Ther* **2008**, *8*, 313–23.
- [231] M. C. Filion und N. C. Phillips, Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery, *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *162*, 159–170.
- [232] J.-S. Zhang, F. Liu und L. Huang, Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity, *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57*, 689–98.
- [233] C. R. Dass, Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection, *J Mol Med* **2004**, *82*, 579–91.
- [234] Cullis, Chonn und Semple, Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo, *Adv Drug Deliv Rev* **1998**, *32*, 3–17.
- [235] J. G. Lewis, K. Y. Lin, A. Kothavale, W. M. Flanagan, M. D. Matteucci, R. B. DePrince, R. A. Mook, Jr, R. W. Hendren und R. W. Wagner, A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 3176–81.
- [236] K. Crook, B. J. Stevenson, M. Dubouchet und D. J. Porteous, Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum, *Gene Ther* **1998**, *5*, 137–43.
- [237] R. I. Mahato, K. Kawabata, Y. Takakura und M. Hashida, In vivo disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes, *J Drug Target* **1995**, *3*, 149–57.
- [238] D. C. Litzinger, J. M. Brown, I. Wala, S. A. Kaufman, G. Y. Van, C. L. Farrell und D. Collins, Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo, *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1281*, 139–49.
- [239] R. Niven, R. Pearlman, T. Wedeking, J. Mackeigan, P. Noker, L. Simpson-Herren und J. G. Smith, Biodistribution of radiolabeled lipid-DNA complexes and DNA in mice, *J Pharm Sci* **1998**, *87*, 1292–9.
- [240] Y. Liu, L. C. Mounkes, H. D. Liggitt, C. S. Brown, I. Solodin, T. D. Heath und R. J. Debs, Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery, *Nat Biotechnol* **1997**, *15*, 167–73.

- [241] K. Hong, W. Zheng, A. Baker und D. Papahadjopoulos, Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery, *FEBS Lett* **1997**, *400*, 233–7.
- [242] L. Y. Song, Q. F. Ahkong, Q. Rong, Z. Wang, S. Ansell, M. J. Hope und B. Mui, Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1558*, 1–13.
- [243] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzter, P. Mailhe, D. Scherman und M. Bessodes, pH-sensitive PEG lipids containing orthoester linkers: new potential tools for nonviral gene delivery, *J Control Release* **2004**, *99*, 423–34.
- [244] N. Mignet, C. Richard, J. Seguin, C. Largeau, M. Bessodes und D. Scherman, Anionic pH-sensitive pegylated lipoplexes to deliver DNA to tumors, *Int J Pharm* **2008**, *361*, 194–201.
- [245] T. Gjetting, N. S. Arildsen, C. L. Christensen, T. T. Poulsen, J. A. Roth, V. N. Handlos und H. S. Poulsen, In vitro and in vivo effects of polyethylene glycol (PEG)-modified lipid in DOTAP/cholesterol-mediated gene transfection, *Int J Nanomedicine* **2010**, *5*, 371–83.
- [246] N. M. Rao, Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic, *Chem Phys Lipids* **2010**, *163*, 245–52.
- [247] J. S. Choi, E. J. Lee, H. S. Jang und J. S. Park, New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity, *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 108–13.
- [248] T. Montier, T. Benvegnu, P.-A. Jaffrès, J.-J. Yaouanc und P. Lehn, Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example, *Curr Gene Ther* **2008**, *8*, 296–312.
- [249] R. Labas, F. Beilvert, B. Barteau, S. David, R. Chèvre und B. Pitard, Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis, *Genetica* **2010**, *138*, 153–68.
- [250] M. Hirsch, V. Zirolì, M. Helm und U. Massing, Preparation of small amounts of sterile siRNA-liposomes with high entrapping efficiency by dual asymmetric centrifugation (DAC), *J Control Release* **2009**, *135*, 80–8.
- [251] G. J. Dimitriadis, Entrapment of plasmid DNA in liposomes, *Nucleic Acids Res* **1979**, *6*, 2697–705.
- [252] A. B. Mukherjee, S. Orloff, J. D. Butler, T. Triche, P. Lalley und J. D. Schulman, Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): carrier potential in gene transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75*, 1361–5.
- [253] D. H. Wreschner, G. Gregoriadis, D. B. Gunner und R. R. Dourmashkin, Entrapment of mRNA and rRNA into large monolamellar liposomes derived from hybrid small monolamellar liposomes, *Biochem Soc Trans* **1978**, *6*, 930–3.
- [254] C. Nicolau, A. Le Pape, P. Soriano, F. Fargette und M. F. Juhel, In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1983**, *80*, 1068–72.
- [255] T. Wilson, D. Papahadjopoulos und R. Taber, The introduction of poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes), *Cell* **1979**, *17*, 77–84.
- [256] J. P. Leonetti, P. Machy, G. Degols, B. Lebleu und L. Leserman, Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 2448–51.

- [257] D. D. Stuart und T. M. Allen, A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size, high incorporation efficiency and good stability, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1463*, 219–29.
- [258] D. T. Auguste, K. Furman, A. Wong, J. Fuller, S. P. Armes, T. J. Deming und R. Langer, Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes, *J Control Release* **2008**, *130*, 266–74.
- [259] X. Zheng, C. Vladau, X. Zhang, M. Suzuki, T. E. Ichim, Z.-X. Zhang, M. Li, E. Carrier, B. Garcia, A. M. Jevnikar und W.-P. Min, A novel in vivo siRNA delivery system specifically targeting dendritic cells and silencing CD40 genes for immunomodulation, *Blood* **2009**, *113*, 2646–54.
- [260] M. Rothdiener, D. Müller, P. G. Castro, A. Scholz, M. Schwemmlin, G. Fey, O. Heidenreich und R. E. Kontermann, Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems, *J Control Release* **2010**, *144*, 251–8.
- [261] C. Y. Wang und L. Huang, Highly efficient DNA delivery mediated by pH-sensitive immunoliposomes, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9508–14.
- [262] J. Y. Legendre und F. C. Szoka, Jr, Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes, *Pharm Res* **1992**, *9*, 1235–42.
- [263] C. Zhang, N. Tang, X. Liu, W. Liang, W. Xu und V. P. Torchilin, siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene, *J Control Release* **2006**, *112*, 229–39.
- [264] C. Foged, H. M. Nielsen und S. Frokjaer, Liposomes for phospholipase A2 triggered siRNA release: preparation and in vitro test, *Int J Pharm* **2007**, *331*, 160–6.
- [265] D. T. Auguste, K. Furman, A. Wong, J. Fuller, S. P. Armes, T. J. Deming und R. Langer, Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes, *J Control Release* **2008**, *130*, 266–74.
- [266] C. N. Landen, Jr, A. Chavez-Reyes, C. Bucana, R. Schmandt, M. T. Deavers, G. Lopez-Berestein und A. K. Sood, Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery, *Cancer Res* **2005**, *65*, 6910–8.
- [267] C. N. Landen, W. M. Merritt, L. S. Mangala, A. M. Sanguino, C. Bucana, C. Lu, Y. G. Lin, L. Y. Han, A. A. Kamat, R. Schmandt, R. L. Coleman, D. M. Gershenson, G. Lopez-Berestein und A. K. Sood, Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer, *Cancer Biol Ther* **2006**, *5*, 1708–13.
- [268] J. Halder, A. A. Kamat, C. N. Landen, Jr, L. Y. Han, S. K. Lutgendorf, Y. G. Lin, W. M. Merritt, N. B. Jennings, A. Chavez-Reyes, R. L. Coleman, D. M. Gershenson, R. Schmandt, S. W. Cole, G. Lopez-Berestein und A. K. Sood, Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy, *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4916–24.
- [269] W. M. Merritt, Y. G. Lin, W. A. Spannuth, M. S. Fletcher, A. A. Kamat, L. Y. Han, C. N. Landen, N. Jennings, K. De Geest, R. R. Langley, G. Villares, A. Sanguino, S. K. Lutgendorf, G. Lopez-Berestein, M. M. Bar-Eli und A. K. Sood, Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth, *J Natl Cancer Inst* **2008**, *100*, 359–72.
- [270] G. J. Villares, M. Zigler, H. Wang, V. O. Melnikova, H. Wu, R. Friedman, M. C. Leslie, P. E. Vivas-Mejia, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood und M. Bar-Eli, Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA, *Cancer Res* **2008**, *68*, 9078–86.

- [271] M. M. K. Shahzad, C. Lu, J.-W. Lee, R. L. Stone, R. Mitra, L. S. Mangala, Y. Lu, K. A. Baggerly, C. G. Danes, A. M. Nick, J. Halder, H.-S. Kim, P. Vivas-Mejia, C. N. Landen, G. Lopez-Berestein, R. L. Coleman und A. K. Sood, Dual targeting of EphA2 and FAK in ovarian carcinoma, *Cancer Biol Ther* **2009**, *8*, 1027–34.
- [272] X. Zheng, C. Vladau, A. Shunner und W.-P. Min, siRNA specific delivery system for targeting dendritic cells, *Methods Mol Biol* **2010**, *623*, 173–88.
- [273] J. J. Wheeler, L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R. W. Graham, Y. P. Zhang, M. J. Hope, P. Scherrer und P. R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization., *Gene Ther* **1999**, *6*, 271–281.
- [274] I. MacLachlan und P. Cullis, Diffusible-PEG-lipid stabilized plasmid lipid particles, *Adv Genet* **2005**, *53*, 157–188.
- [275] Y. P. Zhang, L. Sekirov, E. G. Saravolac, J. J. Wheeler, P. Tardi, K. Clow, E. Leng, R. Sun, P. R. Cullis und P. Scherrer, Stabilized plasmid-lipid particles for regional gene therapy: formulation and transfection properties, *Gene Ther* **1999**, *6*, 1438–47.
- [276] D. B. Fenske, I. MacLachlan und P. R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: a systemic gene therapy vector., *Methods Enzymol* **2002**, *346*, 36–71.
- [277] L. B. Jeffs, L. R. Palmer, E. G. Ambegia, C. Giesbrecht, S. Ewanick und I. MacLachlan, A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA., *Pharm Res* **2005**, *22*, 362–372.
- [278] K. W. Mok, A. M. Lam und P. R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: factors influencing plasmid entrapment and transfection properties., *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1419*, 137–150.
- [279] X. Guo und F. C. Szoka, Jr, Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG–diortho ester–lipid conjugate, *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 291–300.
- [280] J. S. Choi, J. A. MacKay und F. C. J. Szoka, Low-pH-sensitive PEG-stabilized plasmid-lipid nanoparticles: preparation and characterization., *Bioconjug Chem* **2003**, *14*, 420–429.
- [281] W. Li, Z. Huang, J. A. MacKay, S. Grube und F. C. Szoka, Jr, 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* **2005**, *7*, 67–79.
- [282] E. G. Saravolac, O. Ludkovski, R. Skirrow, M. Ossanlou, Y. P. Zhang, C. Giesbrecht, J. Thompson, S. Thomas, H. Stark, P. R. Cullis und P. Scherrer, Encapsulation of plasmid DNA in stabilized plasmid-lipid particles composed of different cationic lipid concentration for optimal transfection activity., *J Drug Target* **2000**, *7*, 423–437.
- [283] M. A. Monck, A. Mori, D. Lee, P. Tam, J. J. Wheeler, P. R. Cullis und P. Scherrer, Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection, *J Drug Target* **2000**, *7*, 439–52.
- [284] P. Tam, M. Monck, D. Lee, O. Ludkovski, E. C. Leng, K. Clow, H. Stark, P. Scherrer, R. W. Graham und P. R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy, *Gene Ther* **2000 Nov**, *7*, 1867–1874.
- [285] A. H. Weeke-Klimp, M. Bartsch, H. W. M. Morselt, I. Van Veen-Hof, D. K. F. Meijer, G. L. Scherphof und J. A. A. M. Kamps, Targeting of stabilized plasmid lipid particles to hepatocytes in vivo by means of coupled lactoferrin, *J Drug Target* **2007**, *15*, 585–94.
- [286] S. C. Semple, S. K. Klimuk, T. O. Harasym und M. J. Hope, Lipid-based formulations of antisense oligonucleotides for systemic delivery applications, *Methods Enzymol* **2000**, *313*, 322–41.

- [287] S. C. Semple, S. K. Klimuk, T. O. Harasym, N. Dos Santos, S. M. Ansell, K. F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P. R. Cullis, M. J. Hope und P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1510*, 152–66.
- [288] D. V. Morrissey, J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan und B. Polisky, Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs, *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1002–7.
- [289] T. W. Geisbert, L. E. Hensley, E. Kagan, E. Z. Yu, J. B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E. A. Fritz, P. B. Jahrling, K. McClintock, J. R. Phelps, A. C. H. Lee, A. Judge, L. B. Jeffs und I. MacLachlan, Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference, *J Infect Dis* **2006**, *193*, 1650–7.
- [290] A. D. Judge, M. Robbins, I. Tavakoli, J. Levi, L. Hu, A. Fronda, E. Ambegia, K. McClintock und I. MacLachlan, Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice, *J Clin Invest* **2009**, *119*, 661–73.
- [291] T. S. Zimmermann, A. C. H. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.-P. Vornlocher und I. MacLachlan, RNAi-mediated gene silencing in non-human primates, *Nature* **2006**, *441*, 111–4.
- [292] D. Müller, G. Trunk, A. Sichelstiel, K. A. Zettlitz, M. Quintanilla und R. E. Kontermann, Murine endoglin-specific single-chain Fv fragments for the analysis of vascular targeting strategies in mice, *J Immunol Methods* **2008**, *339*, 90–8.
- [293] R. Montesano, M. S. Pepper, U. Möhle-Steinlein, W. Risau, E. F. Wagner und L. Orci, Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene, *Cell* **1990**, *62*, 435–45.
- [294] M. Hahne, U. Jäger, S. Isenmann, R. Hallmann und D. Vestweber, Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes, *J Cell Biol* **1993**, *121*, 655–64.
- [295] E. E. Sikorski, R. Hallmann, E. L. Berg und E. C. Butcher, The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1, *J Immunol* **1993**, *151*, 5239–50.
- [296] I. J. Fidler, Selection of successive tumour lines for metastasis, *Nat New Biol* **1973**, *242*, 148–9.
- [297] J. Fritzsche, D. Simonis und G. Bendas, Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches, *Thromb Haemost* **2008**, *100*, 1166–75.
- [298] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [299] J. N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal und W. A. Hagins, Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science* **1977**, *195*, 489–92.
- [300] G. Bendas, J. Vogel, U. Bakowski, A. Krause, J. Müller und U. Rothe, A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion, *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1325*, 297–308.

- [301] U. Gerber und T. Ross, VCAM-1 Knockdown in der Endothelzelllinie bEnd.3: Transfektion mit shRNA und funktionelle Untersuchung der transfizierten Mutanten, Bericht im Rahmen des Wahlpflichtfaches Pharmazeutische Chemie (unveröff.), Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2010**.
- [302] E. G. Bligh und W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37*, 911–7.
- [303] D. Kang, Y. S. Gho, M. Suh und C. Kang, Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1511–1512.
- [304] R. A. Carter, I. K. Campbell, K. L. O'Donnell und I. P. Wicks, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking, *Clin Exp Immunol* **2002**, *128*, 44–51.
- [305] A. Soriano, A. Salas, A. Salas, M. Sans, M. Gironella, M. Elena, D. C. Anderson, J. M. Piqué und J. Panés, VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice, *Lab Invest* **2000**, *80*, 1541–51.
- [306] E. Rijcken, C. F. Krieglstein, C. Anthoni, M. G. Laukoetter, R. Mennigen, H. U. Spiegel, N. Senninger, C. F. Bennett und G. Schuermann, ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease, *Gut* **2002**, *51*, 529–35.
- [307] G. Jurisic, J. P. Sundberg, A. Bleich, E. H. Leiter, K. W. Broman, G. Buechler, L. Alley, D. Vestweber und M. Detmar, Quantitative lymphatic vessel trait analysis suggests Vcam1 as candidate modifier gene of inflammatory bowel disease, *Genes Immun* **2010**, *11*, 219–31.
- [308] L. Chen, S.-x. Lin, S. Amin, L. Overbergh, G. Maggolino und L. S. Chan, VCAM-1 blockade delays disease onset, reduces disease severity and inflammatory cells in an atopic dermatitis model, *Immunol Cell Biol* **2010**, *88*, 334–42.
- [309] E. Mastrobattista, R. H. Kapel, M. H. Eggenhuisen, P. J. Roholl, D. J. Crommelin, W. E. Hennink und G. Storm, Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells, *Cancer Gene Ther* **2001**, *8*, 405–13.
- [310] B. Romberg, W. E. Hennink und G. Storm, Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles, *Pharm Res* **2008**, *25*, 55–71.
- [311] M. Meyer und E. Wagner, pH-responsive shielding of non-viral gene vectors, *Expert Opin Drug Deliv* **2006**, *3*, 563–71.
- [312] S. Simões, V. Slepishkin, N. Düzgünes und M. C. Pedroso de Lima, On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1515*, 23–37.
- [313] V. Slepishkin, S. Simões, M. C. P. de Lima und N. Düzgünes, Sterically stabilized pH-sensitive liposomes, *Methods Enzymol* **2004**, *387*, 134–47.
- [314] D. Layton, G. A. Luckenbach, R. Andreesen und P. G. Munder, The interaction of liposomes with cells: the relation of cell specific toxicity to lipid composition, *Eur J Cancer* **1980**, *16*, 1529–38.
- [315] V. Centis und P. Vermette, Physico-chemical properties and cytotoxicity assessment of PEG-modified liposomes containing human hemoglobin, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2008**, *65*, 239–46.

- [316] E. Pupo, A. Padrón, E. Santana, J. Sotolongo, D. Quintana, S. Dueñas, C. Duarte, M. C. de la Rosa und E. Hardy, Preparation of plasmid DNA-containing liposomes using a high-pressure homogenization–extrusion technique, *J Control Release* **2005**, *104*, 379–96.
- [317] J. Y. Cherng, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, W. Jiskoot, H. Talsma, N. J. Zuidam, W. E. Hennink und D. J. Crommelin, Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes, *J Control Release* **1999**, *60*, 343–53.
- [318] I. MacLachlan, P. Cullis und R. W. Graham, Progress towards a synthetic virus for systemic gene therapy, *Curr Opin Mol Ther* **1999**, *1*, 252–9.
- [319] S. G. Martin und J. C. Murray, Gene-transfer systems for human endothelial cells. ste-wart.martin@nottingham.ac.uk, *Adv Drug Deliv Rev* **2000**, *41*, 223–33.
- [320] K. Kiefer, J. Clement, P. Garidel und R. Peschka-Süss, Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells, *Pharm Res* **2004**, *21*, 1009–17.
- [321] G. Thurston, J. W. McLean, M. Rizen, P. Baluk, A. Haskell, T. J. Murphy, D. Hanahan und D. M. McDonald, Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice, *J Clin Invest* **1998**, *101*, 1401–13.
- [322] E. G. Nabel, G. Plautz und G. J. Nabel, Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall, *Science* **1990**, *249*, 1285–8.
- [323] J. S. Matsumura, R. Kim, V. P. Shively, R. C. MacDonald und W. H. Pearce, Characterization of vascular gene transfer using a novel cationic lipid, *J Surg Res* **1999**, *85*, 339–45.
- [324] A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Löffler, M. Fechner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel und J. Kaufmann, A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium, *Gene Ther* **2006**, *13*, 1222–34.
- [325] N. D. Andersen, T. S. Monahan, J. Y. Malek, M. Jain, S. Daniel, L. D. Caron, L. Pradhan, C. Ferran und F. W. Logerfo, Comparison of gene silencing in human vascular cells using small interfering RNAs, *J Am Coll Surg* **2007**, *204*, 399–408.
- [326] S. A. Asgeirsdóttir, E. G. Talman, I. A. de Graaf, J. A. A. M. Kamps, S. C. Satchell, P. W. Mathieson, M. H. J. Ruiters und G. Molema, Targeted transfection increases siRNA uptake and gene silencing of primary endothelial cells in vitro—a quantitative study, *J Control Release* **2010**, *141*, 241–51.
- [327] V. Budker, V. Gurevich, J. E. Hagstrom, F. Bortzov und J. A. Wolff, pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector, *Nat Biotechnol* **1996**, *14*, 760–4.
- [328] S. Rasheed, W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein und M. B. Gardner, Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080), *Cancer* **1974**, *33*, 1027–33.
- [329] D. B. Fenske, L. R. Palmer, T. Chen, K. F. Wong und P. R. Cullis, Cationic poly(ethyleneglycol) lipids incorporated into pre-formed vesicles enhance binding and uptake to BHK cells, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1512*, 259–72.
- [330] U. Maus, S. Rosseau, N. Mandrakas, R. Schlingensiepen, R. Maus, H. Muth, F. Grimminger, W. Seeger und J. Lohmeyer, Cationic lipids employed for antisense oligodeoxynucleotide transport may inhibit vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells: a word of caution, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **1999**, *9*, 71–80.
- [331] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Anleitung zum GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit, eingefügt am 16.01.2011.

Publikationen

Buchbeiträge

A. Hartung und G. Bendas, Half-life extension with pharmaceutical formulations: liposomes, In: R.E. Kontermann: Therapeutic Proteins: Strategies to modulate their plasma half-life, *Wiley VCH* **2011**, *akzeptiert*

Poster und Kongressbeiträge

A. Hartung, C. Ulbrich, A. Kolbe, R.E. Kontermann und G. Bendas, Lipidbasierte zielgerichtete Gentransfersysteme, *Molecular Targeting Meeting auf Schloss Rauischholzhausen*, Ebsdorfergrund, **2007**, (Vortrag)

A. Hartung, C. Ulbrich, R.E. Kontermann und G. Bendas, Improvement of lipid-based targeted systems for gene delivery, *DPhG-Jahrestagung*, Bonn, **2008**, (Poster)

A. Hartung, R.E. Kontermann, U. Massing und G. Bendas, Endothelial targeting of lipid-based gene vectors to influence the activity of adhesion receptors, *20th Mountain/Sea Liposome Workshop*, Ameland (NL), **2009**, (Vortrag)

A. Hartung, M. Schlesinger, U. Massing und G. Bendas, Lipid-based gene vectors for a VCAM-1-knockdown in endothelial cells, *DPhG-Jahrestagung*, Braunschweig, **2010**, (Vortrag)

Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, April 2011

Astrid Hartung