

Fusogene und endozytotische Liposomen

Vergleichende Untersuchungen zum Wirkstofftransport
am Beispiel von Doxorubicin und Aclacinomycin A

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tobias Braun

aus Siegen

Bonn, 2017

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

Drittgutachter: Prof. Dr. Arne Lützen

Viertgutachter: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Disputation: 10.07.2017

Erscheinungsjahr: 2017

Zusammenfassung

Liposomen sind zum Einschleusen von hydrophilen und hydrophoben Molekülen in Zellen weit verbreitet. Über welchen Mechanismus die Liposomen in Zellen aufgenommen werden, ist entscheidend für die Wirksamkeit der transportierten Inhalte. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Aufnahmemechanismen von fusogenen Liposomen mit endozytotisch aufgenommenen Liposomen verglichen, um ihren Einfluss auf die Wirksamkeit der eingebrachten Moleküle zu untersuchen.

Zunächst wird eine Methode vorgestellt, die anhand der besonderen Fluoreszenzeigenschaften von BODIPY FL die Unterscheidung zwischen Endozytose und Fusion ermöglichte. BODIPY FL bildete bei hohen lokalen Konzentrationen Dimere, welche im Fluoreszenzsignal zu einem zweiten Emissionsmaximum im roten Spektralbereich führten. Während bei einer niedrigeren lokalen Konzentration nur das Monomer-Signal im grünen Spektralbereich detektierbar war. Bei endozytotischer Aufnahme von Liposomen blieb ihre Lipidzusammensetzung weitgehend unverändert. Das Dimer-Signal war daher auch innerhalb der Zellen nachweisbar. Bei der Fusion der Liposomen mit der Plasmamembran wurden die liposomalen Membranbestandteile erheblich verdünnt. Die damit einhergehende, für Fusion charakteristische Verringerung des Dimer-Signals wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie detektiert. Anhand der Analyse des Dimer- und Monomer-Signals wurde eine belastbare Methode etabliert, um Endozytose von Fusion zu unterscheiden.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden zwei chemotherapeutische Wirkstoffe, Doxorubicin (DXR) und Aclacinomycin A (ACL), mittels fusogener Liposomen in Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MDAMB-231 und der epithelialen Zelllinie MCF-10A eingeschleust. ACL ist DXR strukturell recht ähnlich, ist aber deutlich besser in Lipiden löslich. Die Wirksamkeit der chemotherapeutischen Wirkstoffe war abhängig von der intrazellulär akkumulierten Dosis. Durch ihre unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften ließen sich ACL und DXR verschieden effizient in Liposomen verkapseln. In dieser Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme von in Puffer gelöstem ACL und DXR mit der Abgabe durch fusogene Liposomen und durch Polyethylenglycol-modifizierte endozytotischen Liposomen als etabliertes System verglichen. Die subzelluläre Verteilung wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung beider Zelltypen erfasst und die Wirksamkeit der beiden Anthracycline mittels durchflusszytometrischer Methoden bestimmt. Unabhängig vom behandelten Zelltyp war die Wirksamkeit von in endozytotischen Liposomen appliziertem DXR, im Vergleich zu frei in

Puffer gelöstem DXR, deutlich verringert. Durch fusogene Liposomen konnte die höchste Wirksamkeit von DXR erzielt werden. Beide Liposomentypen bewirkten im Vergleich zu frei gelöstem Wirkstoff eine deutliche Steigerung der Aufnahmeseffizienz des lipophileren ACL. Für beide Zelltypen waren fusogene Liposomen das wirksamste Transportsystem für ACL. Sowohl DXR als auch ACL ließen sich erfolgreich in endozytotische und fusogene Liposomen verkapseln. Fusogene Liposomen waren von den verglichenen Formulierungen die wirksamste Methode, um die beiden Daunorubicin-Derivate in Zellen einzuschleusen. Insgesamt gelang es in dieser Arbeit fusogene Liposomen weiter zu entwickeln und als neuartige Transportmethode für pharmazeutische Wirkstoffe vorzustellen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
I. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG ZU LIPIDEN UND LIPOSOMEN	1
1 Lipide und Membranen	1
2 Phasenverhalten von Lipiden	2
3 Liposomen als Modellmembranen und nicht-virale Vektoren	5
4 Fusogene Liposomen und Mechanismen der Membranfusion	6
II. MATERIAL UND METHODEN	11
1 Verwendete Materialien	11
1.1 Chemikalien.....	11
1.2 Puffer und Medien	12
1.3 Verbrauchsmaterialien.....	13
2 Herstellung der Glassubstrate	14
3 Zellkultur	15
3.1 Kulturbedingungen von CHO-K1	15
3.2 Kulturbedingungen für HELA und MEF.....	15
3.3 Kulturbedingungen für HEK-n.....	16
3.4 Kulturbedingungen für MCF-10A.....	16
3.5 Kulturbedingungen MDAMB-231	17
4 Verwendete Lipide	18
5 Experimente mit BODIPY FL-DHPE-haltigen Liposomen	19
5.1 Herstellung von Liposomen mit BODIPY FL-DHPE.....	19
5.2 Grundlagen der Fluoreszenz	20
5.3 Mikroskopie.....	23
5.4 Durchflusszytometrie.....	23
5.5 Fluoreszenzspektroskopie.....	27
5.6 Datenanalyse.....	27
6 Experimente mit Anthracyclin-haltigen Liposomen	28
6.1 Herstellung der Anthracyclin-haltigen Formulierungen.....	28

6.2	Mikroskopie.....	28
6.3	Durchflusszytometrie.....	29
6.4	Fluoreszenzspektroskopie.....	30
6.5	Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC ₅₀).....	31
III.	ETABLIERUNG EINER METHODE ZUR UNTERSCHIEDUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHMEWEGE VON LIPOSOMEN	35
1	Einleitung	35
1.1	Liposomen als Wirkstoffträger.....	35
1.2	Emission von fluoreszenzmarkierten Liposomen nach zellulärer Aufnahme	36
1.3	Modell zur Unterscheidung der Aufnahmemechanismen Fusion und Endozytose...	37
2	Ergebnisse	39
2.1	Mikroskopische Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von Endozytose und Fusion	39
2.2	Analyse der endozytotischen und fusogenen Liposomen im Fluoreszenzspektrometer	41
2.3	Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von Endozytose und Fusion im Durchflusszytometer.....	43
2.4	Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzsignaturen von endozytotischen und fusogenen Liposomen nach Aufnahme durch CHO-K1 Zellen.....	46
2.5	Stoffwechselabhängigkeit von plasmamembranständigem BODIPY FL-DHPE	47
2.6	Anwendung des Assays auf die Zelltypen MEF, HELA und HEK-n	49
3	Diskussion.....	51
IV.	FUSOGENE UND ENDOZYTOTISCHE LIPOSOMEN ALS TRANSPORTMITTEL FÜR ANTHRACYCLINE	57
1	Einleitung	57
1.1	Physikochemische Eigenschaften von Anthracyclinen	57
1.2	Liposomen als nanomedizinische Vehikel	60
1.3	Anthracycline in Liposomen	62
2	Ergebnisse	64
2.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Fluoreszenzsignals von Doxorubicin und Aclacinomycin A	64
2.2	Mikroskopische Untersuchung der zellulären Aufnahme von Anthracyclinen.....	66
2.2.1	Zelluläre Aufnahme von Doxorubicin	67
2.2.2	Zelluläre Aufnahme von Aclacinomycin A	70
2.3	Zytotoxische Effekte von Doxorubicin und Aclacinomycin A	72
2.3.1	IC ₅₀ -Werte von Doxorubicin	72
2.3.2	IC ₅₀ -Werte von Aclacinomycin A	74

2.3.3	Maximalaktivität von Doxorubicin und Aclacinomycin A.....	75
2.4	Einfluss von Anthracyclinen auf Apoptose.....	75
3	Diskussion.....	79
3.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	79
3.2	Zelluläre Aufnahme von Anthracyclinen.....	81
3.3	Zytotoxische Effekte von Doxorubicin und Aclacinomycin A.....	83
V.	AUSBLICK.....	87
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
VII.	ANHANG.....	103
	Lebenslauf.....	105
	Danksagung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ACL	Aclacinomycin A
ATP	Adenosintriphosphat
BODIPY	Bor-Dipyrrromethen
CHO	Chinese hamster ovary cells
cLSM	Confocal laser scanning microscopy
DHPE	Dihexadecanoyl-Phosphatidylethanolamin
DMEM	Dulbeccos modified eagles medium
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DNR	Daunorubicin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoyl-Phosphoethanolamin
DOTAP	Dioleoyl-Trimethyl-Ammonium-Propan
DOTMA	Diocadecenyl-Trimethyl-Ammonium-Propan
DPPE	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
DXR	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EPIR	Epirubicin
EPR	Enhanced permeability and retention
FBS	Fetal bovine serum
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
GUV	Giant unilamellar vesicles
h	Stunde
HEK-n	Normal human keratinocytes
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDA	Idarubicin
IFC	Imaging flow cytometry
LUV	Large unilamellar vesicles
MDR	Multi Drug Resistance
MEF	Mouse embryonic fibroblasts

min	Minute
NPS	Nanopartikelären Systemen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Poly-Ethylen-Glycol
P-Gp	P-Glykoprotein
PM	Plasmamembran
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
sec	Sekunde
SUV	Small unilamellar vesicles

I. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG ZU LIPIDEN UND LIPOSOMEN

1 Lipide und Membranen

Biologische Membranen sind fundamentale Bausteine aller lebenden Organismen. Sie umgeben jede Zelle und trennen so das Zellinnere von ihrer Umwelt ab. Ihre selektive Permeabilität ermöglicht den Aufbau von Gradienten. Durch diese Gradienten sind Organismen in der Lage Stoffwechsel zu betreiben. Membranen kontrollieren und prozessieren den Austausch einer Vielzahl von chemischen und elektrischen Signalen (Watson, 2015).

Gorter und Grendel konnten 1925 erstmals nachweisen, dass Membranen aus einer Lipiddoppelschicht bestehen. Sie extrahierten die Lipide von roten Blutkörperchen und stellten fest, dass die Gesamtheit der Lipide doppelt so viel Fläche einnahm wie die Oberfläche eines Erythrozyten. Rote Blutkörperchen haben keine internen Membranen, deswegen deduzierten sie, dass die Plasmamembran (PM) aus einer Lipiddoppelschicht bestehen muss (Gorter und Grendel, 1925).

Membranbildende Lipide sind amphipatische Moleküle, welche aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoff-Ketten bestehen (Abb. I.1 A, B). In wässriger Umgebung bilden Lipide durch ihre amphipatische Natur spontan Lipiddoppelschichten. In einer Lipiddoppelschicht sind die hydrophilen Köpfe nach Außen, zur wässrigen Umgebung hin gewandt. Die hydrophoben Schwänze der beiden Lipidschichten liegen einander zugewandt im Innern der Membran (Abb. I.1 C). Bei Wasserüberschuss formen Membranlipide spontan mehrschalige (multilamellare) Liposomen aus sphärisch angeordneten Doppelschichten mit einem wassergefüllten Lumen. So angeordnet nehmen die Lipide ihre energetisch günstigste Architektur ein, da alle hydrophilen Köpfe in wässriger Umgebung sind und alle hydrophoben Schwänze im Innern der Membran lokalisiert sind. Die Entstehung solcher geschlossenen Strukturen wurden erstmals von Bangham et al. (1965) beschrieben. In der Forschung werden diese künstlichen Vesikel als Modellmembranen oder nanopartikuläre Systeme angewendet.

Liposomen, die aus nur einer Lipiddoppelschicht bestehen, werden unilamellar genannt (Abb. I.1 E) und anhand ihrer Größe unterschieden. Vesikel mit einem Durchmesser von 20 – 100 nm

heißen kleine unilamellare Vesikel (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV). Bei einer Größe von 100 nm – 1 µm nennt man sie große unilamellare Vesikel (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) und bei einer Größe von > 1 µm gigantische unilamellare Vesikel (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV).

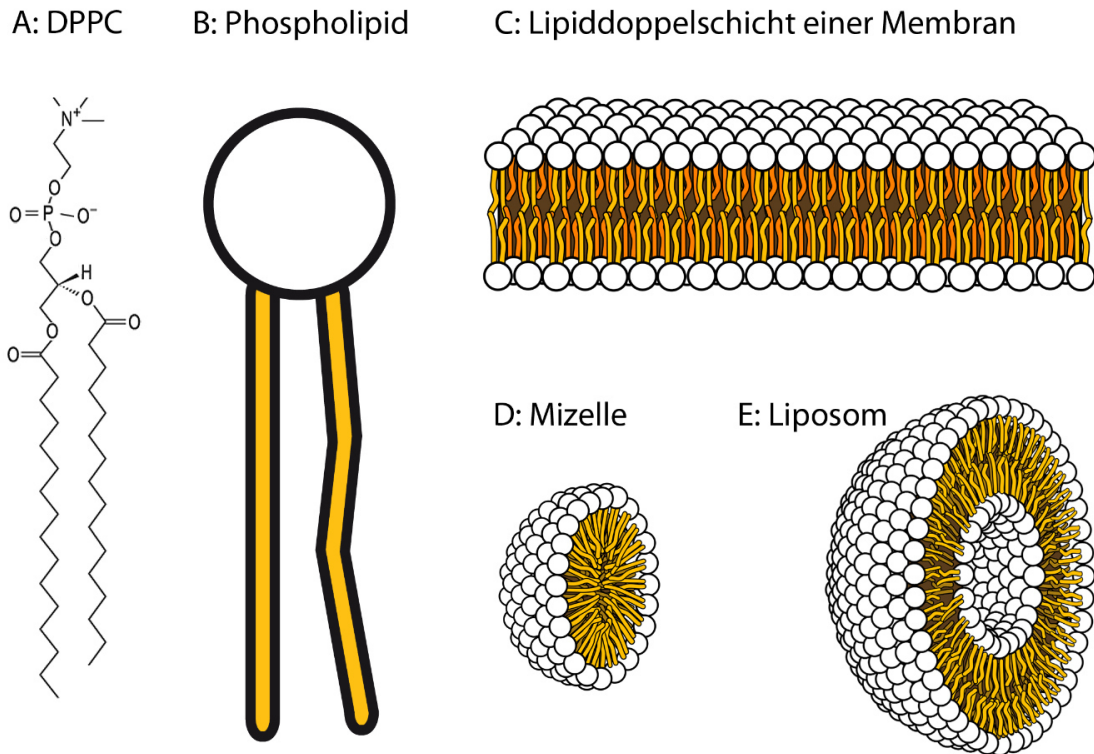


Abb. I.1 A: Strukturformel von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC). B: Schematischer Aufbau eines Phospholipids, einer Lipiddoppelschicht (C), einer Mizelle (D) und eines Liposoms (E). Quelle: www.commonswiki.org

2 Phasenverhalten von Lipiden

Die makroskopische Struktur einer Phospholipidlösung ist von ihrem Wassergehalt und der Art der gelösten Lipide abhängig (lyotroper Polymorphismus). Das temperaturabhängige Phasenverhalten von Phospholipiden nennt man thermotropen Polymorphismus. Es kann am Beispiel des Phospholipids Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) verdeutlicht werden. Ist der Wasseranteil einer DPPC-Lösung größer als 30%, liegt DPPC in multilamellaren Strukturen, also in lamellarer Phase vor. Die lamellaren Phasen von Phospholipiden unterliegen

thermotropen Phasenumwandlungen. Die Anordnung dieser lamellaren Phasen ist in Abb. I.2 schematisch dargestellt.

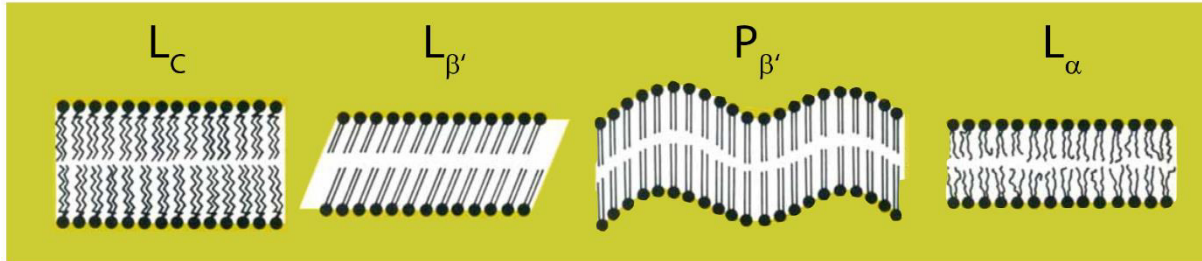


Abb. I.2: Strukturen der lamellaren Phasen von Phospholipiden. **L_C** = kristalline Phase, **L_{β'}** = Gel-Phase, **P_{β'}** = Gel-Phase mit periodischer Wellenstruktur, **L_α** = flüssig-kristalline Phase. Verändert nach Winter (1990).

Unterhalb von 18°C nimmt die DPPC-Lösung die (kristalline) Sub-Gel Phase **L_C** ein. Die Kohlenwasserstoffketten bilden eine kristalline Struktur in orthorhombischer Anordnung, wodurch ihre freie Rotation eingeschränkt ist. Bei einer Temperatur oberhalb von 18°C und unterhalb von 34°C liegt die **L_{β'}**-Phase vor. Die gestreckten Kohlenwasserstoffketten zeigen eine um etwa 30° geneigte Ausrichtung zur Senkrechten der Membranebene. Durch diese geneigte Anordnung wird eine höhere Packungsdichte der DPPC-Moleküle erreicht. Zwischen 34°C und 41°C befinden sich die Moleküle in der **P_{β'}**-Phase. Die Kohlenwasserstoffketten sind gestreckt angeordnet und die Doppellipidschicht nimmt die übergeordnete Struktur periodischer Wellen an. **L_{β'}** und **P_{β'}** werden als Gel-Phasen bezeichnet (Winter, 1990). Oberhalb einer Temperatur von 41°C liegt DPPC in der flüssig-kristallinen (**L_α**-) Phase vor, welche den einzelnen Lipidmolekülen eine hohe laterale Beweglichkeit ermöglicht. Biologische Membranen befinden sich meist in der **L_α**-Phase um die notwendige laterale Beweglichkeit der einzelnen Membrankomponenten, wie z.B. Transmembranproteinen, zu ermöglichen (van Meer et al., 2008).

Die oben beschriebenen thermotropen Phasenumwandlungen sind reversibel und werden durch starke Entropieänderungen angetrieben. Die Umwandlungstemperaturen der lamellaren Phasen sind von Länge und Sättigung der Kohlenwasserstoffketten der membranbildenden Lipide abhängig. Mit wachsender Kettenlänge nehmen die Umwandlungstemperatur und die Enthalpie- bzw. Entropieänderungen zu. Ungesättigte Lipide weisen in der **L_α**- und in den Gel-Phasen **L_{β'}** und **P_{β'}** eine relativ hohe Konformationsunordnung der Lipidketten auf. Mit steigender

Anzahl von Doppelbindungen in den Kohlenwasserstoffketten sinkt die Umwandlungstemperatur der Membran, ihre Fluidität wird somit erhöht (Winter, 1990). Neben den Fettsäureketten spielen die Eigenschaften der Kopfgruppe eine große Rolle bei der Bestimmung des Phasenzustandes einer Membran. Der Austausch einer großen Phosphocholin- durch eine kleinere Phosphatidyl-Ethanolamin-Kopfgruppe (PE) bewirkt eine Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur um etwa 20-30°C (Cevc, 1993).

Die Größe der polaren Kopfgruppe im Verhältnis zum hydrophoben Acyl-Glycerol-Rückgrat beeinflusst darüber hinaus die dreidimensionale Lipidanordnung in wässriger Umgebung. Lipide wie Phosphatidyl-Cholin, Phosphatidyl-Glycerol oder Phosphatidyl-Inositol besitzen eine zylindrische Form und liegen meist in der oben beschriebenen lamellaren Phase vor, bilden also bevorzugt Lipiddoppelschichten (Jouhet, 2013; Frolov et al., 2011)(Abb. I.3).

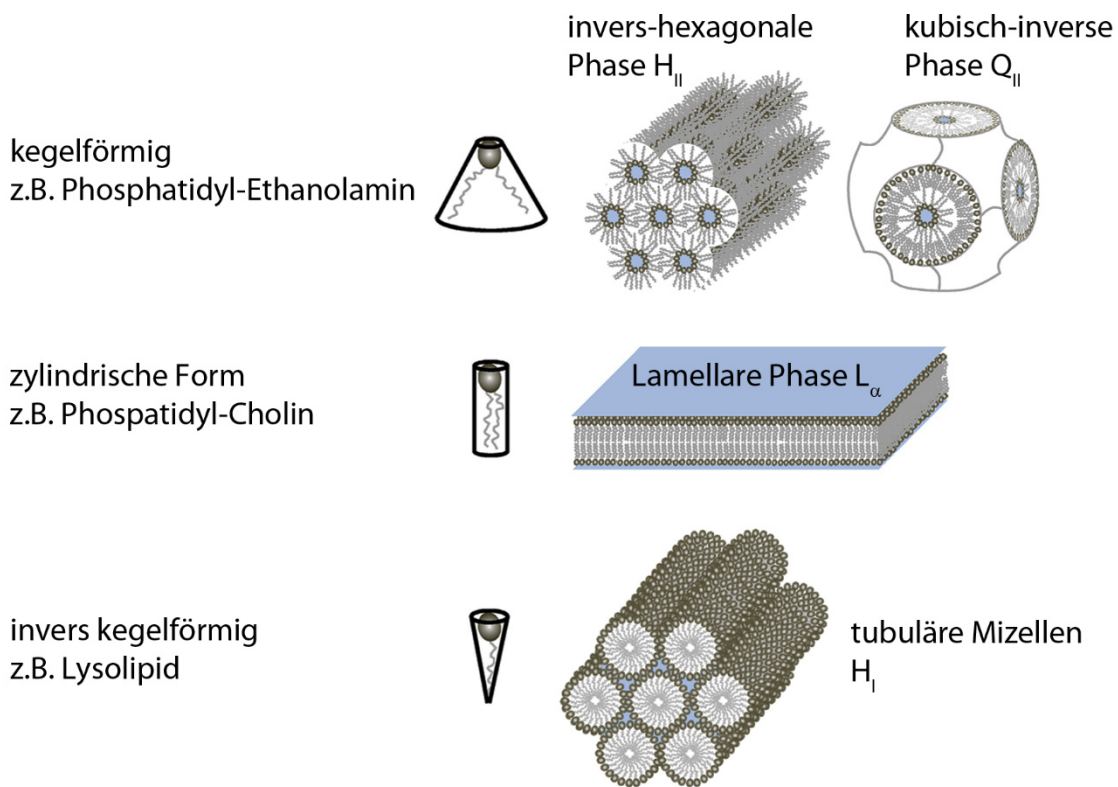


Abb. I.3: Lipidpolymorphismus. Einfluss der Form des Einzelmoleküls auf die Architektur von Lipidaggregaten. Verändert nach Jouhet (2013).

Lipide, wie Phosphatidyl-Ethanolamin oder Phosphatidyl-Serin, mit einer vergleichsweise kleinen Kopfgruppe beschreiben die Form eines abgeschnittenen Kegels. In dieser Form

verursachen sie eine starke negative Krümmung und tendieren zur Bildung von invers-hexagonalen (H_{II}) oder kubischen Strukturen (Q_{II}). Lipide mit einer großen Kopfgruppe und nur einer Fettsäurekette haben die Form eines invertierten Kegels (Abb. I.3, Lysolipid). Sie induzieren eine stark positive Krümmung und tendieren zur Bildung von tubulären (H_I) oder sphärischen Mizellen (Jouhet, 2013; Cullis et al., 1986).

3 Liposomen als Modellmembranen und nicht-virale Vektoren

Liposomen sind sphärisch angeordnete Lipidmembranen, welche einen wässrigen Inhalt umschließen. Die Membran eines Liposoms und die PM einer Zelle sind sich strukturell recht ähnlich. Dadurch bieten sie die Möglichkeit, biologische Prozesse isoliert von den komplexen Vorgängen innerhalb einer Zelle untersuchen zu können. Anhand von liposomalen Modellmembranen können beispielsweise Protein-Lipid Interaktion (Shiffer et al., 1988), Interaktion unter Transmembranproteinen (Losey et al., 2009), virale Mechanismen zur Überwindung der Membranbarriere (Bilek et al., 2007) oder Wirkstoff-Membran Interaktionen (Bilek et al., 2007; Gallois et al., 1996) untersucht werden.

Felgner et al. (1987) benutzten kationische Liposomen aus Dioleoyl-Phosphoethanolamin (DOPE) und Dioctadecenyl-Trimethyl-Ammonium-Propan (DOTMA) erstmalig um Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen. Für die sogenannte Transfektion werden die anionischen Nukleinsäuresequenzen in kationische Liposomen verkapselt und zu adhärenen Zellen gegeben. Wissenschaftliche Arbeiten hatten zuvor beschrieben, dass Liposomen dieser Zusammensetzung durch Membranfusion in die PM von Zellen aufgenommen werden und ihre luminalen Inhalte direkt ins Zytosol ausschütten (Martin und MacDonald, 1976; Hui et al., 1981). Weiterführende Experimente belegten jedoch, dass die Liposomen über den zelleigenen Mechanismus der Endozytose ins Zellinnere aufgenommen werden (Legendre und Szoka, 1992; Wrobel und Collins, 1995).

Um eine erfolgreiche Transfektion mit liposomalen Systemen zu erreichen, müssen die nicht-viralen Vektoren einige kritische Voraussetzungen erfüllen. Die eingesetzten Nukleinsäuren/DNS müssen zunächst erfolgreich in Liposomen verkapselt werden. Die so geformten Liposomen/Lipoplexe müssen von ihren Zielzellen, meist auf dem Weg der Endozytose, aufgenommen werden. Eukaryotische Zellen besitzen mehrere endozytotische Mechanismen um Substrate aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere zu transportieren. Meist wird die Aufnahme von kationischen Lipo- oder Polyplexen dem Weg der

Clathrin-vermittelten Endozytose zugeordnet (Friend et al., 1996; Zuhorn et al., 2002). Allerdings stellen auch Phagozytose und Makropinozytose potentielle Mechanismen zur Aufnahme der Liposomen dar (Labat-Moleur et al., 1996; Matsui et al., 1997).

Unabhängig davon welcher Mechanismus zur Aufnahme der DNS-Lipid-Komplexe führt, befinden sich die eingebrachten Nukleinsäuren anschließend in Endosomen und drohen auf lysosomalem Weg abgebaut zu werden. Somit ist die Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Endosomen ein weiterer kritischer Schritt und entscheidend für die Transfektionseffizienz der gewählten Formulierung. In der Literatur sind verschiedene Strategien zu Destabilisierung der Endosomenmembran beschrieben, welche die Wahrscheinlichkeit der endosomalen Freisetzung erhöhen können (Farhood et al., 1995; Koltover et al., 1998; Smisterova et al., 2001). Die Effizienz einer DNS-Lipidformulierung ist jedoch nicht nur von ihrer Zusammensetzung, sondern auch vom behandelten Zelltyp abhängig. Kim et al. (2015) konnten nachweisen, dass für verschiedene Zelltypen unterschiedliche liposomale Verhältnisse von DOPE zu Dioleoyl-Trimethyl-Ammonium-Propan (DOTAP) als jeweils effizienteste Formulierung funktionieren.

4 Fusogene Liposomen und Mechanismen der Membranfusion

Die von Csiszar et al. (2010) etablierten, fusogenen Liposomen setzen sich, ähnlich wie die oben beschriebenen kationischen Liposomen, aus äquimolaren Anteilen DOPE und DOTAP zusammen. Zusätzlich enthalten sie 5 mol% eines membranständigen Fluorophors. Die veränderte Zusammensetzung der fusogenen Liposomen führt zu einem völlig veränderten zellulären Aufnahmemechanismus. Sie werden bei Kontakt mit der Zelloberfläche nicht auf endozytotischem Weg ins Zellinnere aufgenommen, sondern fusionieren mit der PM der Zelle. Dabei kommt es zur Aufnahme und Vermischung der membranbildenden Bestandteile mit der Zielmembran.

Durch fusogene Liposomen können fluoreszenzmarkierte Lipide effizient in die PM von Zellen interkaliert werden. Die darauf folgenden Transportwege sind abhängig vom Lipidanker des eingebrachten Fluorophors und können mikroskopisch nachverfolgt werden (Kleusch et al., 2012). Die subzelluläre Verteilung solcher fluoreszenzmarkierter Lipide erlaubt Einblicke in den Lipidstoffwechsel einer Zelle. Neben den membranständigen Fluorophoren können auch andere lipophile Moleküle mithilfe der Membranfusion in die PM interkaliert werden. So verwendeten Naumovska et al. (2014) fusogene Liposomen zum Einbau von

Lipopolysacchariden in die PM embryonaler Mausfibroblasten. Hersch et al. (2016) nutzten eine vergleichbare Methode, um die PM von kardialen Fibroblasten durch den Einbau von Biotin zu modifizieren. Die Architektur von Liposomen erlaubt außerdem die Verkapselung wasserlöslicher Bestandteile im Lumen der Vesikel. Fluoreszenzmarkierte Proteine konnten mittels fusogener Liposomen durch direkte Ausschüttung ins Zytosol in Zellen eingebracht werden (Kube et al., 2017).

Biologische Membranen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht. Bei der Fusion kommt es zur Vereinigung zweier Membranen und zur Durchmischung der beiden eingeschlossenen Volumina. Für die Fusion zweier Lipiddoppelschichten müssen sich die beiden Membranen einander stark annähern. Bevor die proximalen Monoschichten miteinander interagieren können, müssen Kräfte der elektrostatischen Abstoßung überwunden werden (Jahn et al., 2003). Darüber hinaus müssen die Doppelschichten destabilisiert werden, um die zur Fusion notwendigen Intermediärzustände einzunehmen (Abb. I.4).

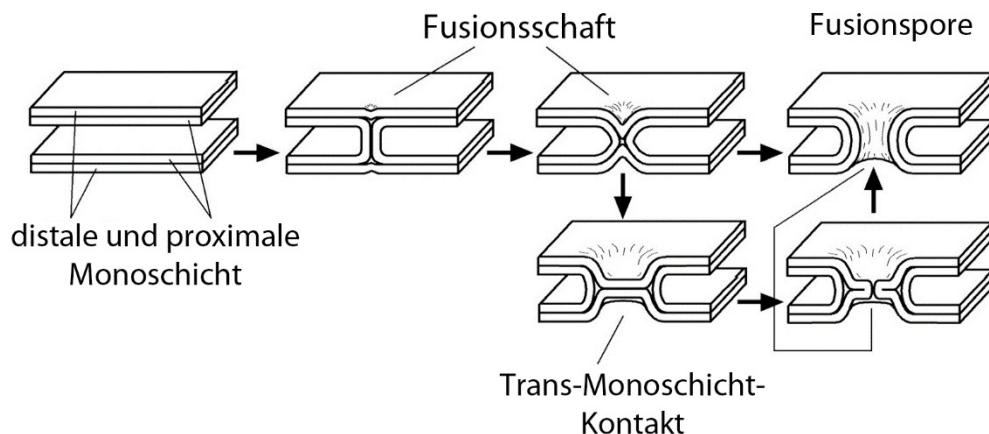


Abb. I.4: Schematische Darstellung der Intermediärzustände während der Membranfusion. Verändert nach (Jahn et al., 2003).

Auf zellulärer Ebene findet eine Vielzahl solcher Membranfusionen statt. Die energetische Barriere wird dabei von fusionsvermittelnden Proteinen überwunden. Viele der beteiligten Proteine werden kurz vor Fusion aus dem Zytosol rekrutiert und können direkt nach Abschluss des Fusionsvorgangs wiederverwendet werden. Die Fusion von intrazellulären Vesikeln und der PM erfordert außerdem spezifische membranständige Fusionsproteine (SNARE-Proteine), die beide Membranen unter Verbrauch von Energie einander soweit annähern, dass die

proximalen Monoschichten miteinander interagieren können (Chernomordik und Kozlov, 2008; Jahn et al., 2003).

Fusogene Liposomen erreichen eine Verschmelzung der liposomalen Membran mit der PM von Zellen ohne Zuhilfenahme von fusionsvermittelten Proteinen. Der molekulare Mechanismus dieser Fusion ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Theoretische Arbeiten zum Phasenverhalten von DOPE von Siegel (1999) und Siegel und Epanand (1997) geben jedoch Hinweise auf die Umstände, welche zur Fusion zweier Membranen notwendig sind.

Während des Übergangs von der lamellaren L_{α} - zur invers-kubischen Q_{II} -Phase wird die Organisation der Doppellipidschichten starken Änderungen unterzogen. DOPE-Liposomen zeigen, unter Bedingungen in welchen Übergänge von der lamellaren zu inversen Phasen beobachtet werden können, intervesikuläre Vermischung der membranbildenden Lipide (Ellens et al., 1986; Siegel et al., 1989). Aufgrund dieser Beobachtung formulierten Siegel und Epanand (1997) die Hypothese, dass die Strukturen, die während eines solchen Phasenübergangs gebildet werden, auch die initialen Strukturen einer Membranfusion sind (Abb. I.5).

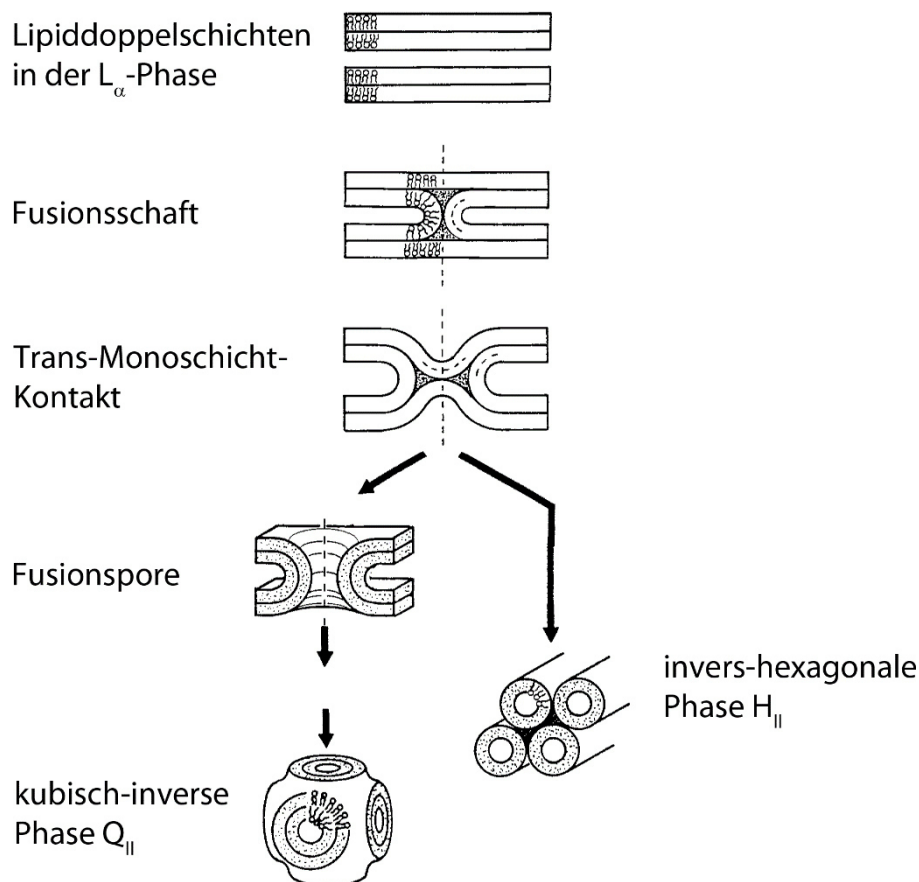


Abb. I.5: Theorie zur Ausbildung von Fusionschäften während des Übergangs aus lamellarer Phase L_{α} in kubisch inverse Phase Q_{II} . Verändert nach Siegel (1999).

Laut der Theorie von Siegel (1999) werden bei der Fusion zweier Membranen zuerst Fusionsschäfte gebildet. Diese verbinden nur die proximalen Monoschichten von zwei gegenüberliegenden Membranen. Innerhalb eines Schafts ist die Monoschicht stark gekrümmt, was einen energetisch sehr ungünstigen Zustand darstellt. Die Krümmungsenergie führt zu einer Ausweitung der Fusionsschäfte und es kommt zum Kontakt der distalen Monoschichten der gegenüberliegenden Membranen und zur Ausbildung einer Hemifusion bzw. eines Trans-Monoschicht-Kontakts. Das Lumen der beiden Vesikel im Zentrum einer solchen Hemifusion wird nur noch durch eine Lipiddoppelschicht voneinander getrennt. Der Bruch dieser Doppelschicht führt zur Ausbildung einer Fusionspore.

Das komplexe Phasenverhalten von DOPE erlaubt die Beobachtungen solcher Phasenumwandlungen (Siegel und Epanand, 1997). Auch wenn die Intermediärzustände „Fusionsschaft“ und „Trans-Monoschicht-Kontakt“ nicht direkt nachgewiesen werden können, sind es doch wahrscheinliche Strukturen während der Fusion zweier Membranen. Das Phasenverhalten von DOPE allein befähigt Liposomen jedoch nicht, mit der PM zu fusionieren. Liposomen, welche ausschließlich aus DOPE sowie 5 mol% eines membranständigen Fluorophors bestehen, werden nicht mittels Fusion in die PM interkaliert. Ersetzt man DOPE durch das kationische DOTAP, besitzen die Liposomen starke fusogene Eigenschaften. Diese fusogenen Eigenschaften bleiben erhalten, wenn man den Liposomen neutrale Helferlipide mit PE-Kopfgruppe hinzufügt (Kleusch, 2013). Die essentiellen Bestandteile der fusogenen Liposomen sind ihre positive Ladung und die Anwesenheit eines membranständigen Fluorophors bzw. eines Moleküls mit aromatischer Struktur wie z.B. Resveratrol (Csiszar et al., 2015). Das Phasenverhalten von DOTAP ist weit weniger gut untersucht als das Phasenverhalten von DOPE. Die von Siegel (1999) aufgestellte Theorie zur Fusion von Membranen aus DOPE lässt sich möglicherweise auf DOTAP übertragen. Beide Moleküle weisen eine relativ kleine Kopfgruppe sowie ungesättigte Fettsäureketten auf. Die Architektur der Moleküle beschreibt die Form eines Kegels und begünstigt somit einen Phasenübergang in die invers-hexagonale Phase H_{II} (Abb. I.3). Diese Tendenz könnte zur Destabilisierung der lamellaren Phase beitragen und die Fusion zweier Membranen begünstigen (Regelin et al., 2000).

Ebenso wie die Transfektionseffizienz kationischer Liposomen hängt auch die Fusionseffizienz der fusogenen Liposomen nicht nur von der Lipidzusammensetzung, sondern auch vom behandelten Zelltyp ab (Csiszar et al., 2010). Es besteht die Hypothese, dass Zellen mit einer

ausgeprägten negativen Glykokalyx mit höherem Anteil an Heparan-Sulfat besser fusionieren als Zellen mit einer weniger negativen Glykokalyx. Diese Hypothese muss noch experimentell untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Verwendete Materialien

1.1 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aclacinomycin A	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Chloroform	Merck Millipore, Darmstadt
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dermalife K Medium	CellSystems, Troisdorf
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DMEM/F12 Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Doxorubicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DRAQ5 Fluorescent Probe Solution	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
EGF (epidermal growth factor), human	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Fibronectin aus humaner Placenta	BD Bioscience, Fernwald
FIX&PERM Solution A	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Fötale Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guava Nexin Reagent	Merck Millipore, Darmstadt
Humanes Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Trypsin/EDTA 0,25%	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

1.2 Puffer und Medien

Zellkultur-Medium

DMEM	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DMEM/F12 Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DermaLife K Medium	Cellsystems, Troisdorf

Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,47 mM KH_2PO_4

8,1 mM Na_2HPO_4

pH = 7,4

1.3 Verbrauchsmaterialien

96-Well Schalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
KimTech Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Irving, TX, USA
Kulturschalen 3 cm, 18 mm Öffnung	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pasteur-Pipetten	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen (div. Größen)	Starlab, Hamburg
Präzisionsdeckgläser 170±5 µm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 15 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Schraubgläser 1 ml	VWR, Darmstadt
Schraubgläser 4 ml	VWR, Darmstadt
Sylgard-184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning, Wiesbaden
Zellkulturflaschen 25 cm ²	BD Bioscience, Fernwald
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Bioscience, Fernwald

2 Herstellung der Glassubstrate

Für die Behandlung mit den verschiedenen Liposomen-Formulierungen wurden alle im Folgenden beschriebenen Zelltypen einen Tag vor Beginn der Experimente in eigenhändig hergestellte Glasbodenschalen ausplattiert. Zu ihrer Herstellung wurden dicken-korrigierte Hochpräzisionsdeckgläser (170 ± 5 μm , 22 x 22 mm; Marienfeld) auf die Unterseite vorgebohrter (Durchmesser der Öffnung: 18 mm) Kunststoff-Kulturschalen (Durchmesser 3 cm, Greiner Bio-One) geklebt. Als Klebemittel wurde kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet, hergestellt aus einem vinylterminierten PDMS-Polymergemisch und einem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer mit Katalysator in einem Mischungsverhältnis von 10:1 w/w (Sylgard 184; Dow Corning Co., MI, USA). Zur vollständigen Kreuzvernetzung wurden die frisch geklebten Glasbodenschalen für mindestens 2 h bei 60°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Glasbodenschalen mit UV-Licht sterilisiert.

3 Zellkultur

Während der Experimente und der Kultivierung aller im Folgenden aufgeführten Zelltypen herrschte eine Umgebungstemperatur von 37°C und eine 5%ige CO₂-Konzentration bei gesättigt feuchter Atmosphäre. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit sterilen Werkzeugen und Lösungen in der keimfreien Umgebung einer Zellkulturwerkbank.

3.1 Kulturbedingungen von CHO-K1

Die immortalisierte Ovarienzelllinie von chinesischen Hamstern, Subtyp K1 (engl. *Chinese hamster ovary cells*, CHO-K1) wurde bei *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassa, VA, USA) erworben. Ihre Kultivierung erfolgte in DMEM-F12 (Sigma-Aldrich), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) und 1% antibiotisch/antimykotischer Penicillin/Streptomycin-Lösung (PenStrep, je 10000 Einheiten/ml; Sigma-Aldrich). Ihre Kultivierung erfolgte in 75 cm²- oder 25 cm²-Kulturflaschen (BD Biosciences) mit 10 bzw. 5 ml Kulturmedium. Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen erfolgte kurz vor Erreichen von 100%iger Konfluenz im Verhältnis 1:10. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,25%, 5 min) vom Kulturflaschenboden gelöst, durch Zentrifugation (180×g, 4 min) pelletiert und zur Weiterkultivierung in frischem Medium aufgenommen. Für die Analyse im Fluoreszenzmikroskop und im Durchflusszytometer wurden einen Tag vor den Experimenten 25000 Zellen auf mit Fibronectin beschichtete (10 µg/ml in PBS; 30 min; BD Biosciences) Glasbodenschalen ausgesät.

3.2 Kulturbedingungen für HELA und MEF

Die Kultivierung von humanen Epithelzellen eines Zervix-Karzinoms (HELA, ATCC, CCL-2) und embryonalen Mausfibroblasten (engl. *mouse embryonic fibroblasts*, MEF; zur Verfügung gestellt von G. van Echten-Deckert, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) erfolgte in *Dulbeccos modified eagles medium* (DMEM), ergänzt durch 10% FBS und 1% PenStrep. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in 25 cm²-Kulturflaschen (BD Biosciences) mit 5 ml Kulturmedium. Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen erfolgte nach dem für CHO-K1 Zellen in Kapitel 3.1 beschriebenen Protokoll.

3.3 Kulturbedingungen für HEK-n

Humane primäre epidermale Keratinozyten (engl. *normal human keratinocytes*, HEK-n; CellSystems, Troisdorf, D) wurden DermaLife K Medium (Complete Kit, CellSystems) ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert. Die Zellen wurden zur Vermehrung in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Bei einer Konfluenz von < 90% wurden sie durch Zugabe von Trypsin-EDTA in Suspension gebracht und zur Weiterkultivierung im Verhältnis 1:5 passagiert. Einen Tag vor den Experimenten wurden je 25000 Keratinozyten auf mit Fibronectin beschichtete (10 µg/ml in PBS; 30 min; BD Biosciences) Glasbodenschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dafür wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2-5 benutzt.

3.4 Kulturbedingungen für MCF-10A

Die epitheliale Zelllinie MCF-10A (ATCC) wurde in DMEM-F12 Medium kultiviert, welches durch die in Tabelle II.1 genannten Zusätze zu Wachstumsmedium wird.

Tabelle II.1 Komponenten des Wachstumsmediums von MCF-10A Zellen

Zusätze	Dosierung
DMEM-F12 Glutamax	ad 500 ml
Choleratoxin	100 ng/ml
EGF	20 ng/ml
Pferde Serum	5%
Hydrokortison	500 ng/ml
Insulin	10 µg/ml
PenStrep	100 Einheiten/ml

Ihre Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen (BD Biosciences) mit 10 ml Kulturmedium. Die adhärent wachsenden Zellen wurden vor Erreichen von 90%iger Konfluenz im Verhältnis 1:10 passagiert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,25%, 5-7 min) vom Kulturflaschenboden gelöst, abzentrifugiert (180×g, 4 min) und zur Weiterkultivierung in frischem Medium aufgenommen. Für die Analyse im Konfokalmikroskop wurden 20000 Zellen einen Tag vor den Experimenten auf mit Fibronectin beschichtete (10 µg/ml in PBS; 30 min; BD Biosciences) Glasbodenschalen ausgesät. Zur Behandlung der Zellen mit anschließender Analyse im Durchflusszytometer wurden

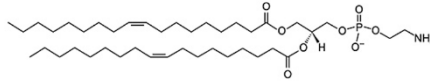
100000 Zellen einen Tag vor den Experimenten auf mit Fibronectin beschichtete (BD Biosciences) Glasbodenschalen ausgesät und unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert.

3.5 Kulturbedingungen MDAMB-231

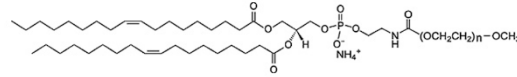
Zellen der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 (ATCC) wurden in DMEM-F12 Medium, supplementiert mit 10% FBS und 1% PenStrep, kultiviert. Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen erfolgte alle 3-4 Tage bei Erreichen von 90%iger Konfluenz im Verhältnis 1:5. Die Probenvorbereitung der Zellen für Analysen im Konfokalmikroskop und Durchflusszytometer erfolgte nach dem in 3.4 beschriebenen Protokoll (MCF-10A Zellen).

4 Verwendete Lipide

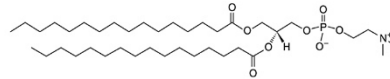
1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin
(DOPE)



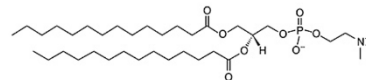
1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-*N*-
[Methoxy(Polyethylenglykol)-2000], Ammonium-Salz
(PEG-DOPE)



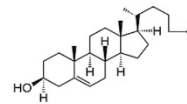
1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin
(DPPC)



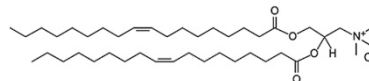
1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin
(DMPC)



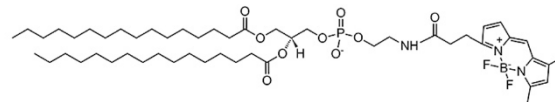
Cholesterol
(Chol)



1,2-Dioleoyl-3-Trimethyl-Ammonium-Propan, Chlorid-Salz
(DOTAP)



N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-*s*-Indacen-3-Propionyl)-
1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin, Triethylammonium-Salz
(BODIPY FL-DHPE)



1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin Iodid
(DiIC₁₈(7))

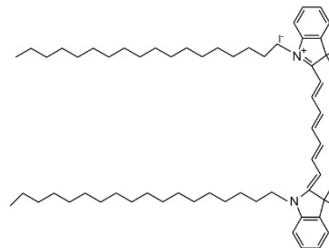


Abb. II.1: Strukturformeln, IUPAC-Namen und Abkürzungen der verwendeten Lipide

Alle Lipide wurden entweder in Chloroform gelöst oder als lyophilisiertes Pulver ausgeliefert und nach Ankunft bei -20°C gelagert. Lyophilisierte Lipide wurden vor Versuchsbeginn ebenfalls in Chloroform gelöst.

5 Experimente mit BODIPY FL-DHPE-haltigen Liposomen

Zur Etablierung des in Kapitel III beschriebenen Assays, wurden die Zelltypen CHO-K1, HELA, MEF und HEK-n mit fusogenen bzw. endozytotischen Liposomen behandelt. Die subzelluläre Verteilung des eingebrachten BODIPY FL-DHPE wurde anschließend im Konfokalmikroskop und Durchflusszytometer untersucht. Zur Behandlung der adhärennten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, durch 500 µl Liposomensuspension (siehe 5.1) ersetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht-fusionierte Liposomen mit auf 37°C vorgewärmten PBS von der Probe gewaschen und die Glasbodenschalen mit vorgewärmten Wachstumsmedium des jeweiligen Zelltyps aufgefüllt.

5.1 Herstellung von Liposomen mit BODIPY FL-DHPE

Zur Herstellung der in Kapitel III genutzten Liposomen wurde das kationische Lipid DOTAP mit dem neutral geladenen DOPE bzw. DMPC im Verhältnis von 1:1 (w/w) und einer Gesamtlipidkonzentration von 1 mg/ml in Chloroform gemischt. Das fluoreszenzmarkierte Lipid BODIPY FL-DHPE wurde der Lipidmischung in einem Gewichtsverhältnis von 0,5-10% zugefügt (Tabelle II.2).

Tabelle II.2: Zusammensetzung der Liposomen in Kapitel III

Komponenten	Mischungsverhältnis
DOPE / DOTAP / BODIPY FL-DHPE	1 / 1 / 0,01-0,2 (w/w)
DMPC / DOTAP / BODIPY FL-DHPE	1 / 1 / 0,01-0,2 (w/w)

Zur Entfernung des Chloroforms wurde die Lipidmischung für mindestens 30 min unter Vakuum evaporiert. Der trockene Lipidfilm wurde anschließend durch Zugabe von 20 mM HEPES-Puffer in einer Gesamtlipid-Konzentration von 2 mg/ml aufgenommen und für 60 sec auf einem Vortex-Mixer homogenisiert. Die so erzeugten multilamellaren Liposomen wurden für 20 min bei 4-5°C im Ultraschallbad (Sonocool SC 255, Bandelin, Berlin) homogenisiert, wodurch größtenteils unilamellare Liposomen entstanden. Die Liposomensuspensionen

wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C für maximal 24 h gelagert. Vor der Anwendung wurden 10 µl der Liposomen-Suspension im Verhältnis 1:50 in PBS verdünnt und erneut für 60 sec auf einem Vortex-Mixer homogenisiert.

5.2 Grundlagen der Fluoreszenz

Molekulare Fluoreszenz tritt typischerweise bei aromatischen Molekülen auf. Diese sogenannten Fluorophore sind in der Lage, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und mit einer größeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Die Prozesse, die zur Absorption und Emission von Licht führen, werden typischerweise in einem Jablonski-Diagramm dargestellt (Abb. II.2).

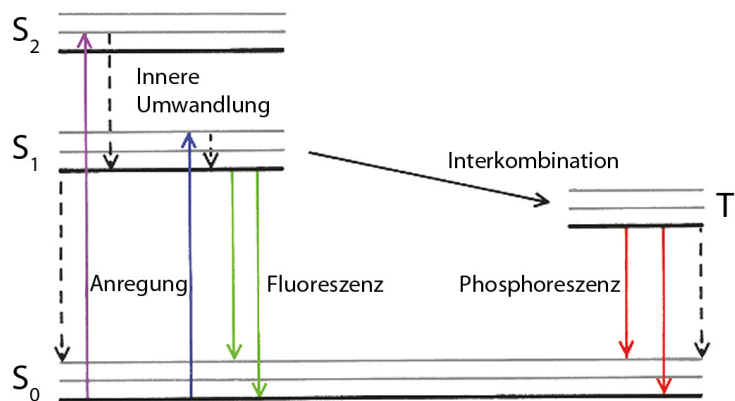


Abb. II.2: Jablonski-Diagramm als vereinfachte Darstellung der elektronischen Energieniveaus eines Fluorophors. Verändert nach Lakowicz (2006).

Ohne Anregung befindet sich ein Fluorophor im Singulett-Grundzustand (S₀) (Lakowicz, 2006). Durch Absorption von Licht kann das fluoreszente Molekül in einen angeregten Singulett-Zustand (S₁ oder S₂) versetzt werden. Bis auf wenige Ausnahmen relaxieren Moleküle auf das niedrigste Schwingungsniveau im ersten angeregten elektronischen Zustand S₁. Dieser strahlungslose Prozess benötigt extrem wenig Zeit ($< 10^{-12}$ s) und wird innere Umwandlung (*internal conversion*) genannt (Lakowicz, 2006). Die Rückkehr aus diesem metastabilen Zustand in den Grundzustand S₀ erfolgt unter spontaner Emission von Fluoreszenz-Strahlung (Atkins und De Paula, 2014). Sie erfolgt in einem Zeitrahmen von 10⁻

10^{-9} s bis 10^{-7} s (Bittrich, 1987). Die Fluoreszenzlebensdauer ist spezifisch für jeden Fluorophor. Die Energie der emittierten Strahlung ist niedriger als die der Absorption, weswegen die Strahlung im Vergleich zur Anregung in einen langwelligeren Spektralbereich verschoben ist. Diese Verschiebung wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet (Stokes, 1853; Lakowicz, 2006).

Bei der Anregung eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau, dem Singulett-Zustand, wird sein Spinzustand beibehalten. Wird sein Spinzustand verändert, kommt es zu einem angeregten Triplett-Zustand (T_1). Moleküle im S_1 -Zustand können auch durch Interkombination (*inter system crossing*) in den T_1 -Zustand überführt werden (Lakowicz, 2006). Die Abgabe von Energie in Form von Strahlung ist in diesem Zustand sehr unwahrscheinlich, weswegen die Rückkehr in den Grundzustand S_0 verlangsamt stattfindet (Halbwertszeiten von 10^{-4} – 10^2 s). Die Emission beim Übergang von T_1 zu S_0 wird Phosphoreszenz genannt, ist im Vergleich zur Fluoreszenz meist zu langwelligeren Emissionen hin verschoben und weist meist extrem kleine Quanteneffizienzen auf (Atkins und De Paula, 2014).

Die Emissionsintensität von Fluorophoren kann durch verschiedenste Prozesse verringert werden. Diese Prozesse werden als Löschung (engl. *quenching*) bezeichnet. Bei steigender Konzentration gelöster Fluorophore steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor im angeregten Zustand mit einem zweiten solchen Fluorophor kollidiert. Bei einer solchen Kollision kann es zum strahlungslosen Übergang in den Grundzustand kommen, wodurch die Fluoreszenzintensität verringert wird. Ein solcher Vorgang wird als Selbst-Löschung (engl. *self-quenching*) bezeichnet (Skoog et al., 1998). Eine Verringerung der Fluoreszenzintensität kann auch von anderen in der Lösung befindlichen Molekülen ausgelöst werden (z.B. molekularer Sauerstoff oder Amine), welche deswegen als *quencher* bezeichnet werden (Lakowicz, 2006). Die Abnahme der Fluoreszenz durch eine solche Fluoreszenz-Löschung ist durch die Stern-Volmer Gleichung beschrieben.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} * [Q]$$

Formel 1 Stern-Volmer Gleichung: F_0 = Intensität des Fluorophors in Abwesenheit eines *quencher*s, F = Intensität des Fluorophors in Anwesenheit eines *quencher*s, $[Q]$ = Konzentration des *quencher*s, K_{SV} = Stern-Volmer-Konstante

Einige aromatische Moleküle, wie zum Beispiel Pyren und Perylen, bilden im angeregten Zustand Elektronen-Transfer-Komplexe mit Aminen, die zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums führen. Diese Komplexbildung von zwei oder mehr verschiedenen angeregten Fluorophoren bezeichnet man als Exciplex (von engl. *excited-state complex*) (Lakowicz, 2006).

Einige Moleküle bilden solche angeregten Komplexe auch untereinander, weswegen sie als Excimer (von engl. *excited-state dimer*) bezeichnet werden (Valeur, 2001). Ein bekanntes Beispiel für ein solches Excimer-bildendes Molekül ist Pyren. Bei einer niedrigen Konzentration gelöster Pyren-Moleküle liegt seine Emission im ultravioletten Spektralbereich. Hohe Konzentrationen des Fluorophors erlauben die Bildung von Excimeren, wodurch die Emission in den langwelligeren Bereich des sichtbaren Lichts verschoben wird ($\lambda_{Em} = 470 \text{ nm}$). Im nicht-angeregten Grundzustand können solche Komplexe jedoch nicht gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Fluorophor BODIPY FL verwendet, welcher bei hohen Konzentrationen ebenfalls Komplexe mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften bildet. Die BODIPY FL-Dimere weisen eine Absorption und Emission auf, die im Vergleich zum Monomer-Signal verschoben ist. Die Natur dieser Dimere unterscheidet sich jedoch von den für Pyren beschriebenen Excimeren. Mikhalyov et al. (2002) beschreibt für BODIPY FL zwei mögliche Formen von Grundzustand-Dimeren (D_I und D_{II}). Wird das Dimer D_I gebildet, besitzt der BODIPY-Komplex nahezu keine Fluoreszenz, bewirkt aber eine Verschiebung des Absorptionsspektrums in kurzwelligere Spektralbereiche. Das Grundzustand-Dimer D_{II} ist fluoreszent. Das Absorptionsspektrum von D_{II} wird in langwelligere Spektralbereiche verschoben und das Emissionsspektrum zeigt ein zweites Intensitätsmaximum im roten Spektralbereich. Bisher wurde nicht genauer untersucht, durch welche Art Dimer-Bildung die in Membranen beobachtete Rot-Verschiebung ausgelöst wird. In der Literatur wird dieser Effekt häufig als Excimer bezeichnet, obwohl dies den Analysen von Mikhalyov et al. (2002) widerspricht.

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet eine besondere Wechselwirkung zwischen einem angeregten Fluorophor und einem zweiten Molekül. Diese Wechselwirkung tritt dann auf, wenn das Emissionsspektrum eines Fluorophors (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines anderen Moleküls (Akzeptor) überlappt (Förster, 1948). Der Energietransfer basiert auf einem strahlungslosen Energieübertrag zwischen Donor und Akzeptor über Coulombsche Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Die FRET-Effizienz bezeichnet den Anteil an Photonen, die vom Donor absorbiert und an den Akzeptor transferiert werden

und ist abhängig vom Überlappungsintegral vom Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Lakowicz, 2006). Darüber hinaus wird der Energietransfer sehr stark von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor beeinflusst. Je kürzer diese Distanz ist, desto höher ist die FRET-Effizienz (Stryer, 1978).

5.3 Mikroskopie

Die mikroskopische Analyse der Proben erfolgte mit einem inversen konfokalen Mikroskop (LSM 710 von Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena), welches mit einem Argon-Ionen-Laser (458/488/514 nm) und zwei Helium-Neon-Lasern (543/633 nm) ausgestattet war. Die Analysen wurden bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 37°C, sowie einer 5%igen CO₂-Konzentration in gesättigt feuchter Atmosphäre durchgeführt (Inkubator XL 2; Carl Zeiss). Die Anregung von BODIPY FL-DHPE erfolgte bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm. Das Monomer-Signal wurde durch einen Bandpass-Filter zwischen 495 nm und 557 nm detektiert (grüner Kanal). Das Dimer-Signal wurde durch einen Langpassfilter oberhalb von 619 nm erfasst (roter Kanal). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl-Objektiv mit Phasenkontrast (Carl Zeiss) getätigt. Das Mikroskop wurde mit der Steuerungssoftware ZEN von Carl Zeiss betrieben.

5.4 Durchflusszytometrie

Fluoreszenzmarkierte Nanopartikel können vor und nach der zellulären Aufnahme nachgewiesen werden. Ihre Detektion kann beispielsweise per Durchflusszytometer, Fluoreszenzmikroskop oder Fluoreszenzspektrometer erfolgen (van der Aa et al., 2007; Huth et al., 2006).

Im Durchflusszytometer werden in Suspension befindliche Zellen durch Einsaugen in eine Kapillare vereinzelt und passieren einen Laserstrahl. Die resultierenden Signale im Vorwärts- (im 10°-Winkel zum Laserstrahl) und Seitwärtsstreulicht (im 90°-Winkel zum Laserstrahl) werden durch Detektoren erfasst und erlauben Rückschlüsse auf die Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen (Abb. II.4, A). Anhand dieser Informationen können intakte Zellen von Zelltrümmern für die weitere Datenverarbeitung getrennt und Zelltypen verschiedener Größe voneinander unterschieden werden. Beispielsweise können bei der Analyse von Blutproben Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten allein anhand ihrer Morphologie identifiziert werden. Oftmals reichen die morphologischen Unterschiede

innerhalb von Zellpopulation jedoch nicht aus um sie hinsichtlich bestimmter Eigenschaften voneinander zu unterscheiden. Um Untersuchungen dennoch zu ermöglichen, werden verschiedenste Phänomene mittels spezifischer Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht.

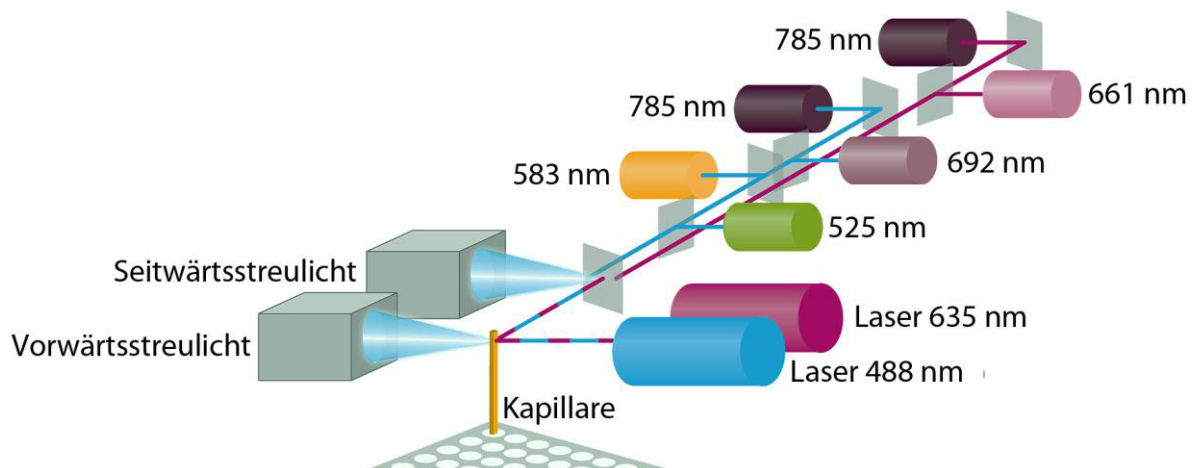


Abb. II.3: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit zwei Laserlinien und Fluoreszenzdetektoren in sechs verschiedenen Spektralbereichen. Quelle: www.millipore.com/flowcytometry

Neben den Signalen im Vorwärts- und Seitwärtsstreuung werden im Durchflusszytometer die Fluoreszenzsignale in mehreren Kanälen detektiert. Das Gerät von Merck Millipore (EasyCyte 8HT), welches für die vorliegenden Experimente genutzt wurde, ermöglicht die Erfassung der emittierten Fluoreszenz nach Anregung zwei verschiedener Laserlinien in sechs verschiedenen Spektralbereichen (Abb. II.3). Die spezifische Markierung wird beispielsweise durch Färbung mit Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen erreicht. Ein weiteres Beispiel ist der Farbstoffe Phycoerythrin, welcher an Annexin V konjugiert mit hoher Spezifität an frühapoptotische Zellen bindet (IV.2.4). Darüber hinaus kann mit dieser Technik bestimmt werden, ob und wie stark die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln erfolgt ist (Abb. II.4, B)(Huth et al., 2006).

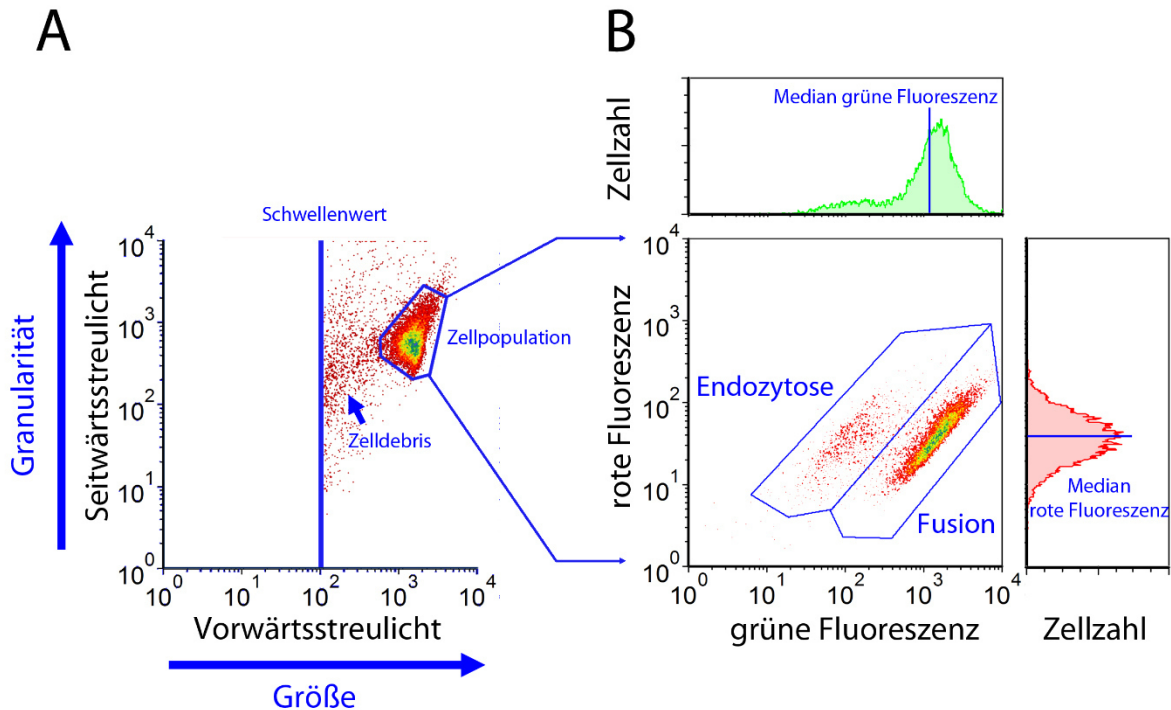


Abb. II.4: Analyse durchflusszytometrischer Daten. **A:** Partikel oberhalb einer Mindestgröße (Schwellenwert) werden anhand ihrer Größe und Granularität im Streudiagramm aufgetragen. Intakte Zellen bilden eine einheitliche Population und werden durch eine definierte Region für die Darstellung in **B** isoliert. **B:** Die zu jeder Zelle detektierten grünen und roten Fluoreszenzintensitäten werden gegeneinander im Streudiagramm aufgetragen. Die Histogramme stellen die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten isoliert dar und dienen der Ermittlung ihres Medians.

Häufige Probleme bei Untersuchungen im Durchflusszytometer sind Autofluoreszenz der Zellen, unspezifische Bindung und spektrale Überlappung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Um eine Fehlinterpretation von Messungen zu vermeiden, muss parallel zu jeder gefärbten Probe eine Negativkontrolle analysiert werden, anhand welcher falsch-negative bzw. falsch-positive Signale identifiziert werden können. Der Vorteil der Untersuchungen von Proben im Durchflusszytometer ist eine automatisierte, multidimensionale Analyse großer Zellzahlen mit geringem Zeitaufwand. Die subzelluläre Verteilung eingebrachter Fluoreszenzmarker kann im Durchflusszytometer jedoch nicht bestimmt werden. Erst die Kombination mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ermöglicht eine belastbare Quantifizierung mikroskopierter Phänomene. Die jüngeren Fortschritte im Bereich der Bilddatenverarbeitung erlaubten die Entwicklung bildgebender Durchflusszytometer (engl. *imaging flow cytometry*, IFC). Sie vereinen die multiparametrische

Analyse der Durchflusszytometrie mit der Fluoreszenzmikroskopie in einem Gerät (Barteneva et al., 2012).

Versuchsdurchführung

Nach Behandlung der Zellen mit BODIPY FL-DHPE-haltigen endozytotischen und fusogenen Liposomen wurden ihre Fluoreszenzeigenschaften mit dem Durchflusszytometer Guava EasyCyte 8HT (Merck Millipore, Darmstadt, D) analysiert. Das Gerät war mit der Kapillare Guava Flow Cell II (Merck Millipore) und zwei Lasern (488 und 635 nm) ausgestattet (siehe Abb. II.3). Die Anregung von BODIPY FL-DHPE erfolgte mit dem 75 mW Argon-Ionen-Laser bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm. Das Monomer-Signal des Fluorophors wurde mittels des Bandpassfilters des grünen Kanals (GRN; $\lambda_{\text{Em}} = 510\text{-}540$ nm) und das Dimer-Signal mittels des Bandpassfilters des roten Kanals ($\lambda_{\text{Em}} = 665\text{-}715$ nm) detektiert. Von jeder Probe wurden mindestens 2000 Zellen analysiert und die Daten mithilfe des Programms *InCyte Software for EasyCyte HT Systems* (Merck Millipore) erfasst.

Behandelte Zellen wurden durch Zugabe von 200 μl vorgewärmten Trypsin-EDTA (2-3 min) von den Glasbodenschalen gelöst, einmal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im Reagenz FIX&PERM (Solution A, Thermo Fisher Scientific) aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und danach bei Raumtemperatur im Durchflusszytometer analysiert.

Die Population intakter Zellen wurde durch die Signale im Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht identifiziert, wodurch die Fluoreszenzsignale nicht-internalisierter Liposomen für die spätere Auswertung eliminiert wurden. Die Detektoren des roten und grünen Fluoreszenzkanals wurden anhand unbehandelter CHO-K1 Zellen so eingestellt, dass der Median der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in einem Verhältnis von 1:1 vorlag und den Wert 10 nicht überschritten hat. Diese Voreinstellungen waren zelltypabhängig und wurden für die verschiedenen Zelltypen individuell vorgenommen. Zur Analyse der Daten wurde keine Kompensation der Fluoreszenzkanäle durchgeführt. Die rote Signalintensität jeder Zelle wurde gegen ihre grüne Signalintensität in einem zweidimensionalen Punktdiagramm auf logarithmischen Skalen aufgetragen. Die definierte Region für "Endozytose" wurde anhand der Position einer Zellpopulation festgelegt, welche mit endozytotischen Liposomen mit einem BODIPY FL-DHPE-Gehalt von 5 mol% behandelt wurden. Die definierte Region "Fusion" wurde durch mit fusogenen Liposomen (5 mol% BODIPY FL-DHPE) behandelten Zellen festgelegt (Abb. II.4). Im Vorfeld wurden die Aufnahmewege im Konfokalmikroskop identifiziert. Der Quotient

($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) wurde anhand der Mediane beider Fluoreszenzkanäle ermittelt und diente als Grundlage zur Unterscheidung von Fusion und Endozytose. Die graphische Darstellung der Daten in Streudiagrammen wurde mithilfe des Programms FCS Express (De Novo Software, Glendale, CA, USA) angefertigt.

5.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren der Liposomen mit BODIPY FL-DHPE-Konzentrationen von 2-5 mol% wurden im Fluoreszenzspektrometer (Fluorolog-3, HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) detektiert. Wie zur Behandlung der verschiedenen Zelltypen wurden auch hier 10 μ l der Liposomen-Suspension im Verhältnis 1:50 in PBS verdünnt und die Probe anschließend auf einem Vortex-Mixer homogenisiert. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 488$ nm (Spaltbreite 1,5 nm) angeregt, das Emissionsspektrum von $\lambda_{Em} = 500-700$ nm (Spaltbreite 3 nm), in 1 nm-Schritten und bei einer Integrationszeit von 0,5 sec bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Programm Origin 9.0G (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) ausgewertet.

5.6 Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch einen Ein-Weg-ANOVA Test (Townend, 2002). Dabei gilt: (*) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ≤ 5 %; (**) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ≤ 1 % und (***) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 0,1$ %.

6 Experimente mit Anthracyclin-haltigen Liposomen

Die Wirkstoffabgabe von drei verschiedenen Anthracyclin-haltigen Formulierungen wurde anhand der Behandlung von adhärennten MCF-10A und MDAMB-231 Zellen untersucht. Die Wirkstoffe Aclacinomycin A und Doxorubicin wurden dafür in fusogene bzw. endozytotische Liposomen verkapselt oder frei in PBS gelöst. Die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Formulierungen wurden am Fluoreszenzspektrometer ermittelt und ihre zelluläre Aufnahme am cLSM und Durchflusszytometer bestimmt.

6.1 Herstellung der Anthracyclin-haltigen Formulierungen

Zur Herstellung der in Kapitel IV genutzten fusogenen Liposomen wurden die Komponenten DOPE/DOTAP/DiIC₁₈(7) im Verhältnis 1/1/0,05 (w/w) gemischt und in einer Gesamtlipidkonzentration von 1 mg/ml in Chloroform gelöst. Zur Herstellung der endozytotischen Liposomen wurde DPPC/Chol/PEG-DOPE/DiIC₁₈(7) im Verhältnis von 9/3/3/0,5 (w/w) gemischt und in einer Konzentration von 1 mg/ml in Chloroform gelöst. Den in Chloroform gelösten Lipiden wurde so viel Aclacinomycin A (ACL) bzw. Doxorubicin (DXR) beigemischt, dass nach Evaporation des Lösemittels und Aufnahme des trockenen Lipidfilms mit 20 mM HEPES (siehe Kapitel 5.1) eine Liposomensuspension mit 2 mg/ml Gesamtlipidkonzentration und 0,01-15 µM Anthracyclin resultierte. Zur Herstellung der Anthracyclin-Puffer-Lösungen wurde die identische Menge an Aclacinomycin A bzw. Doxorubicin und Chloroform gelöst, das Lösemittel evaporiert und die Wirkstoffe in 20 mM HEPES aufgenommen. Im Anschluss wurden alle hergestellten Formulierungen nach dem identischen Protokoll fertiggestellt. Nach einer 60-sekündigen Homogenisierung auf einem Vortex-Mixer wurden die Formulierungen für 20 min bei 4-5°C im Ultraschallbad behandelt. Vor der Verwendung wurden 10 µl der jeweiligen Suspension im Verhältnis 1:50 in PBS verdünnt und erneut für 60 sec auf einem Vortex-Mixer homogenisiert.

6.2 Mikroskopie

Für die Analyse im Konfokalmikroskop wurden 20000 MCF-10A bzw. MDAMB-231 Zellen einen Tag vor den Experimenten auf mit Fibronectin beschichteten Glasbodenschalen ausgesät. Zur Behandlung der adhärennten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 500 µl der jeweiligen Anthracyclin-haltigen Formulierung ersetzt. Die Applikation erfolgte für 10 min im auf 37°C geheizten Inkubator des Konfokalmikroskops. Anschließend wurden

nicht-fusionierte Liposomen mit PBS von der Probe gewaschen und die Glasbodenschalen mit vorgewärmten Wachstumsmedium des jeweiligen Zelltyps aufgefüllt. Die Aufnahme der Anthracycline wurde sowohl während als auch nach der zehnminütigen Behandlung mikroskopiert. Die Proben wurden mit dem in Kapitel 5.3 beschriebenen inversen konfokalen Mikroskop (cLSM 710 von Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) analysiert. Die Anregung von DiIC₁₈(7) erfolgte bei $\lambda_{\text{EX}} = 633$ nm und seine Emission wurde durch einen Langpass-Filter oberhalb von 665 nm detektiert. Die Anregung der beiden Anthracycline Aclacinomycin A und Doxorubicin folgte bei $\lambda_{\text{EX}} = 488$ nm und ihr Emissionssignal wurde mit einem Bandpass-Filter zwischen 493 nm und 594 nm erfasst. Für die Aufnahmen wurde ein EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Öl-Objektiv mit Phasenkontrast (Ph3, Carl Zeiss) benutzt.

6.3 Durchflusszytometrie

Zur Behandlung der MCF-10A bzw. MDAMB-231 Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer wurden 100000 Zellen einen Tag vor den Experimenten auf mit Fibronectin beschichteten (BD Biosciences) Glasbodenschalen ausgesät. Die verschiedenen Formulierungen wurden für 10 min mit Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Liposomensuspension abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,25%, Thermo Fisher Scientific) geerntet und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 min, 300×g) und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl jeder Probe wurde mit dem Zellzähl-Gerät Moxi Z (Orflo Technologies, Ketchum, ID, USA) bestimmt. Von jeder Probe wurden dreimal 10000 Zellen in 96-Well Platten ausgesät. MCF-10A Zellen wurden für 72 h und MDAMB-231 Zellen für 96 h kultiviert bevor die Proben für die Messung im Durchflusszytometer hergestellt wurden.

Zur Bestimmung der Zellzahl jeder Probe wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen durch 50 µl Trypsin-EDTA in Suspension gebracht. Nach 5-8 min wurde 50 µl frisches Medium des jeweiligen Zelltyps zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Für Ermittlung der IC₅₀-Werte von verschiedenen Behandlungsmethoden wurden die Zellsuspensionen mit Medium auf 200 µl aufgefüllt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Population intakter Zellen wurde im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert und die Zellzahlen zur Bestimmung der IC₅₀-Werte innerhalb dieser Region bestimmt.

Zur Färbung der Zellen mit dem Guava Nexin Assay (Merck Millipore, Darmstadt, D) wurden die Proben mit 100 μ l Färbereagenz aufgefüllt und für 30 min inkubiert. Die Färbung der behandelten Zellen wurde im roten Kanal ($\lambda_{Em} = 690/50$ nm) und im gelben Kanal ($\lambda_{Em} = 583/26$ nm) detektiert. Die Bestimmung der definierten Regionen von vitalen, frühapoptotischen und toten Zellen ist im Kapitel IV.2.4 beschrieben. Die graphische Darstellung der Daten in Streudiagrammen wurde mithilfe des Programms FCS Express (De Novo Software) angefertigt.

6.4 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren der Anthracyclin-haltigen Liposomen wurden im Fluoreszenzspektrometer (Fluorolog-3, HORIBA Jobin Yvon) detektiert. Wie für die Behandlung wurden 10 μ l der Liposomen-Suspension im Verhältnis 1:50 in PBS verdünnt und anschließend auf einem Vortex-Mixer homogenisiert. Die Emissionsspektren wurden bei Raumtemperatur mit zwei verschiedenen Einstellungen detektiert. Erstens wurde die Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 488$ nm (Spaltbreite 3 nm) angeregt und die Emission von $\lambda_{Em} = 510-900$ nm (Spaltbreite 4 nm) aufgezeichnet. Zweitens wurde die Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 633$ nm (Spaltbreite 3 nm) angeregt und das Emissionsspektrum von $\lambda_{Em} = 700-900$ nm (Spaltbreite 4 nm) detektiert. Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Programm Origin 9.0G (OriginLab Corp.) ausgewertet.

6.5 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀)

Zur Untersuchung der zytotoxischen Effekte von Doxorubicin und Aclacinomycin A wurden ihre mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) anhand von MDAMB-231 und MCF-10A bestimmt. Dabei wurden die verschiedenen Formulierungen von frei in PBS gelöstem Wirkstoff mit in endozytotischen und fusogenen Liposomen verkapseltem Wirkstoff verglichen. Adhärente Zellen wurden mit Formulierungen mit aufsteigender (0,01-15 µM) Konzentrationen des jeweiligen Anthracyclins behandelt und wie in 6.3 beschrieben zur Analyse im Durchflusszytometer vorbereitet. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde die Anzahl intakter Zellen nach 72 h (MCF-10A) bzw. 96 h (MDAMB-231) erfasst. Die Aktivität der eingesetzten Konzentration des Wirkstoffs ergab sich aus dem Vergleich mit unbehandelten Zellen.

$$\text{Aktivität } Y = 1 - \frac{\text{Zellzahl nach Behandlung mit Wirkstoffkonzentration } X}{\text{Zellzahl der Negativkontrolle}}$$

Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte wurde die eingesetzte Wirkstoffkonzentration X gegen die Aktivität Y aufgetragen. Die untere Asymptote der sigmoidalen Anpassungskurve (vgl. Abb. II.5) wurde anhand der Negativkontrolle bestimmt. Die absolute Maximalaktivität beschreibt eine Probe, die nach Behandlung und Inkubation keine Zellen mehr aufweist. Die obere Asymptote der Ausgleichskurve beschreibt die Maximalaktivität der eingesetzten Formulierung bzw. Konzentration und liegt für Doxorubicin und Aclacinomycin A unterhalb der absoluten Maximalaktivität. D.h. auch nach Behandlung mit der höchsten eingesetzten Konzentration wuchsen noch Zellen in der Probe (Sebaugh, 2011).

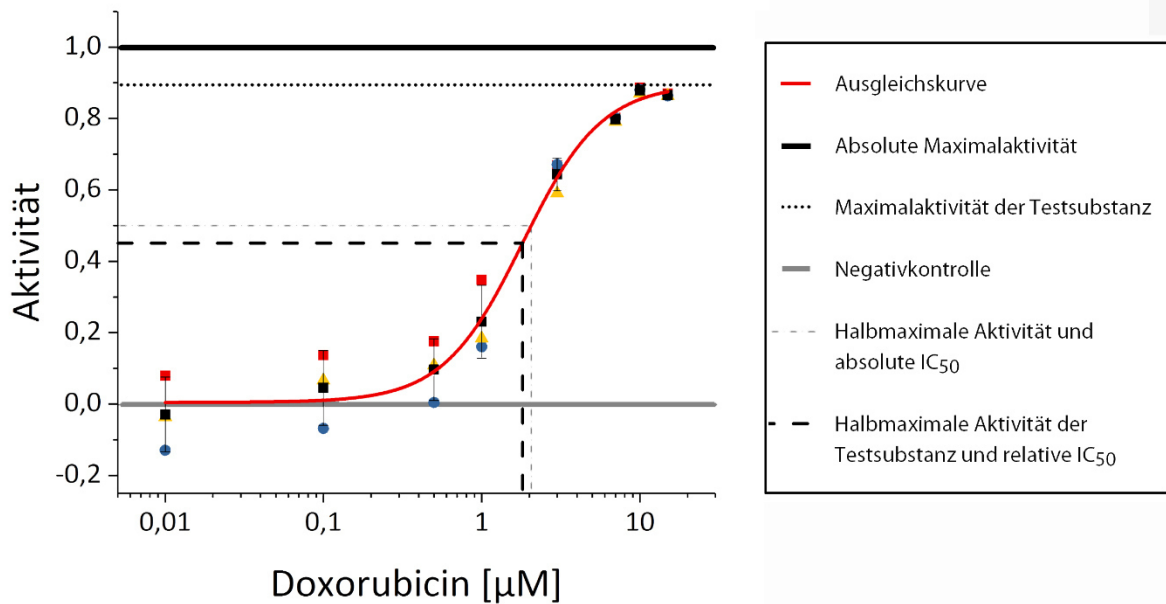


Abb. II.5: Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und der Maximalaktivität der beprobten Testsubstanz. Der Graph zeigt exemplarisch die Daten einer Messreihe von MDAMB-231 Zellen, welche mit Doxorubicin-beladenen, fusogenen Liposomen behandelt wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte einer dreifach angesetzten Behandlungsreihe.

In einer Messung wurden zu jeder Konzentration drei Ansätze ausgezählt. Zur Definition der halbmaximalen Antwort der eingesetzten Formulierung wurden die Daten der drei Ansätze gemittelt und mithilfe einer vierparametrischen Ausgleichskurve gefittet.

$$Y = \frac{a - d}{1 + (X/c)^b} + d$$

Die Ausgleichskurve beschreibt den sigmoidalen Verlauf der Aktivität Y nach Behandlung mit aufsteigender Wirkstoffkonzentration X . Die untere Asymptote a beschreibt die Antwort un behandelter Zellen, die obere Asymptote d die Maximalantwort der eingesetzten Formulierung. Die Steigung des linearen Teils der Kurve wird durch den Steigungsfaktor b repräsentiert. Der Parameter c ist die Konzentration zur Zellantwort auf halber Strecke

MATERIAL UND METHODEN

zwischen a und d und somit die relative halbmaximale Aktivität (IC_{50}) der jeweiligen Testsubstanz und Formulierung.

III. ETABLIERUNG EINER METHODE ZUR UNTERSCHIEDUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHMEWEGE VON LIPOSOMEN

1 Einleitung

1.1 Liposomen als Wirkstoffträger

Nanopartikuläre Systeme (NPS) werden eingesetzt, um Nukleinsäuren oder pharmakologische Wirkstoffe effizient in Zellen einzuschleusen. Neben Liposomen gehören zum Beispiel Lipidbasierte Nanokapseln (Nasr und Abdel-Hamid, 2015; Gregoriadis, 2007), Polymersomen (Hudecz et al., 1999; Grillaud et al., 2014), oberflächenkonjugierte Nanopartikel (Pourcelle et al., 2015; Stella et al., 2000), Lipoplexe und Polyplexe (Tros de Ilarduya et al., 2010) sowie Nanoemulsionen und Nanosuspensionen (Jaiswal et al., 2015) zu den entwickelten Systemen. Zur erfolgreichen Abgabe der transportierten Inhalte müssen Nanopartikel zunächst ihre Zielzellen erreichen und ihre Inhalte durch die Plasmamembran (PM) ins Zytosol geschleust werden. Meist erfolgt die zelluläre Aufnahme auf dem Weg der Endozytose. Um an die vorgesehenen Strukturen binden zu können, müssen die transportierten Inhalte anschließend aus den Endosomen freigesetzt werden, ohne ihre Funktionalität zu verlieren (Gilleron et al., 2013). Transportsysteme wie Viren, mit Fusionsproteinen konjugierte NPS (Levchenko et al., 2003; Kakudo et al., 2004; Herringson und Altin, 2011) und fusogene Liposomen (Csiszar et al., 2010; Kleusch et al., 2012; Naumovska et al., 2014; Kube et al., 2017) werden mittels eines anderen Mechanismus von behandelten Zellen aufgenommen. Die transportierten Inhalte werden durch Fusion mit der PM direkt ins Zytosol der Zelle ausgeschüttet. Die Notwendigkeit der endosomalen Freisetzung wird somit umgangen.

Wie effizient und über welche Route die jeweiligen NPS ins Zellinnere geschleust werden, ist entscheidend für die Wirksamkeit der gewählten Formulierung. Zur Neu- und Weiterentwicklung von NPS ist die Bestimmung und Quantifizierung der genutzten Aufnahmewege also von großem Interesse.

1.2 Emission von fluoreszenzmarkierten Liposomen nach zellulärer Aufnahme

Die von Csiszar et al. (2010) etablierten fusogenen Liposomen beinhalten einen membranständigen Fluoreszenzfarbstoff, welcher nach Fusion mit einer Zelle verteilt in deren PM vorliegt. Die homogene Färbung der PM ist im Konfokalmikroskop (engl. *confocal laser scanning microscope*, cLSM) detektierbar und unterscheidet sich deutlich vom punktförmigen Signal endozytotisch aufgenommener Liposomen. Die Analyse im Durchflusszytometer bestimmt für jede gemessene Zelle nur die Intensität eines interkalierten Farbstoffs. Die subzelluläre Lokalisation dieses Farbstoffs kann dabei nicht bestimmt werden, eine Aufnahme von endozytotischen und fusogenen Liposomen kann also meist nicht unterschieden werden.

Die Fusion zweier Membranen kann durch Einmischen eines Fluoreszenzfarbstoffs von der einen in die andere Membran nachgewiesen werden. Häufig werden zwei Farbstoffe verwendet, zwischen denen ein Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfinden kann. Ein solches FRET-Paar besteht aus einem Donor- und einem Akzeptor-Molekül, welche gemeinsam in die Liposomenmembran eingebaut werden. Durch ihre hohe lokale Konzentration kommt es zu einer verminderten Fluoreszenzsignalintensität des Donor- und einer erhöhten Intensität des Akzeptor-Moleküls. Durch Fusion mit einer zweiten, ungefärbten Membran kommt es zur lokalen Verdünnung der Fluorophore. Die verminderte Interaktion von Donor und Akzeptor des FRET-Paares führt dazu, dass die Signalintensität des Donors steigt (Dequenching) (Struck et al., 1981; Weber et al., 1998) während die Intensität des Akzeptors sinkt. Dieser Effekt könnte auch zur Analyse im Durchflusszytometer verwendet werden.

Ein vergleichbares Nachweissystem könnte auch durch Fluorophore realisiert werden, welche ein konzentrationsabhängiges Emissionsverhalten aufweisen. Fluorophore wie Pyren oder BODIPY FL können bei ausreichender lokaler Konzentration ein Dimer im angeregten Zustand bilden. Im Vergleich zu Pyren reagiert BODIPY FL weniger sensitiv auf Polarität oder pH-Wert des umgebenden Mediums (Johnson et al., 1991) und ist für Zellen besser verträglich. Ein BODIPY FL-Dimer wird bei einer ausreichend hohen lokalen Konzentration gebildet und hat neben dem Hauptmaximum des Monomers bei $\lambda_{Em} = 515$ nm ein zweites Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 625$ nm. Dieses Fluoreszenzverhalten wurde in der zellbiologischen Untersuchungen unter anderem dazu genutzt, die Internalisierung von exogen zugegebenem BODIPY FL in Endosomen nachzuweisen (Chen et al., 1997). Es tritt unabhängig davon auf, ob BODIPY FL in Modellmembranen oder Endosomen vorliegt (Pagano et al., 1999).

1.3 Modell zur Unterscheidung der Aufnahmemechanismen Fusion und Endozytose

Die vorliegende Methode zur Unterscheidung der liposomalen Aufnahmewege durch Endozytose und Fusion erfolgte durch Analyse im Durchflusszytometer. Die Fluoreszenzeigenschaften der eingesetzten Vesikel wurden durch Messung im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Zudem wurde der Aufnahmeweg der beiden Formulierungen im cLSM untersucht. Der dem Assay zugrunde liegende Mechanismus ist in Abb. III.1, A schematisch dargestellt.

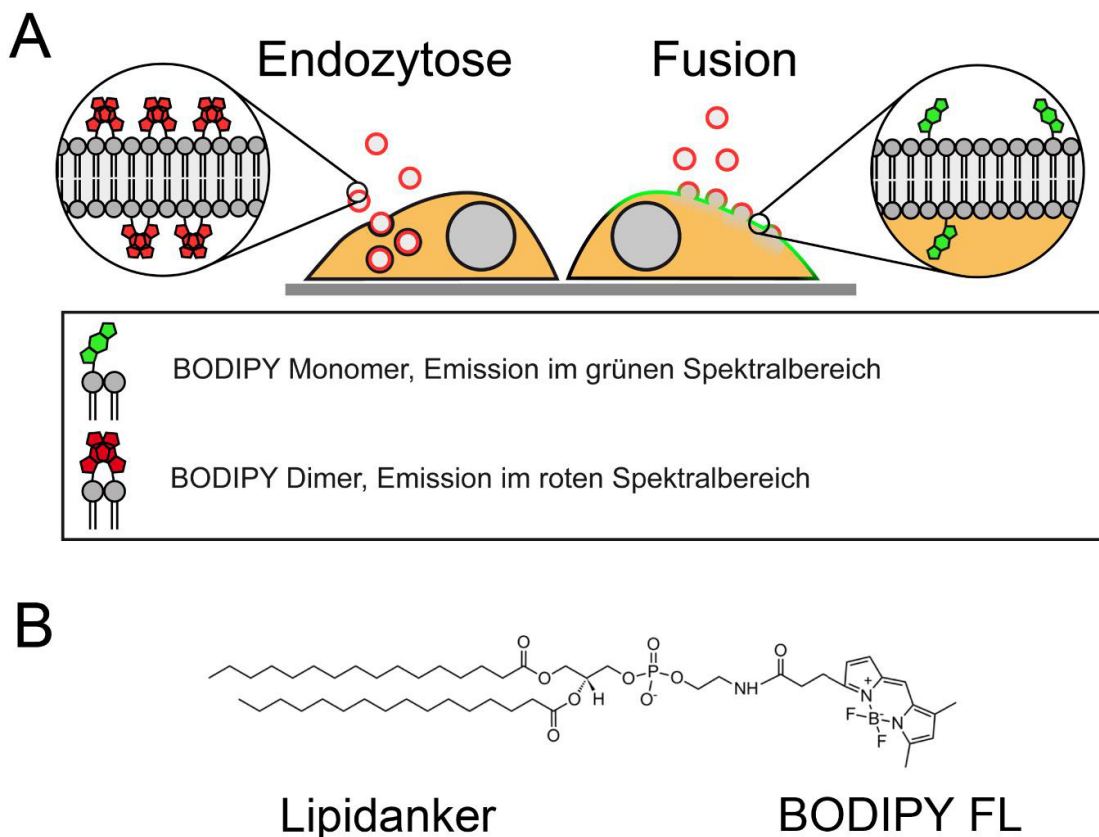


Abb. III.1: **A:** Schematische Darstellung der zwei verschiedenen zellulären Aufnahmemechanismen Endozytose und Fusion. Auf welchem Weg die Liposomen von der Zelle aufgenommen werden, ist abhängig von ihrer Lipidzusammensetzung. Anhand der Fluoreszenzemission von BODIPY FL-DHPE können die Wege voneinander unterschieden werden. **B:** Strukturformel von BODIPY FL-DHPE. Verändert nach Braun et al. (2016).

Kationische Liposomen werden mit einem definierten Anteil durch BODIPY FL markiertem 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin (BODIPY FL-DHPE) präpariert

(Abb. III.1, B). Die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzeigenschaften von BODIPY FL dienen zur Verfolgung der Moleküle innerhalb der Zellen. Bei der Applikation fusogener Liposomen kommt es zur Einmischung des Fluorophors in die PM der Zellen. Die einhergehende lokale Verdünnung von BODIPY FL-DHPE führt zu einem starken Fluoreszenzsignal im grünen Spektralbereich (I_{\max} bei $\lambda_{Em} = 525$ nm). Diese charakteristische Emission tritt auf, wenn die BODIPY FL-Moleküle als Monomere vorliegen. Werden die Liposomen durch Endozytose internalisiert, bleiben die liposomalen Membranbestandteile und damit die lokale Konzentration des eingebrachten Fluorophors unverändert. In der Dimer-Konfiguration zeigt BODIPY FL ein zweites Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 630$ nm. Der Quotient von Dimer- zu Monomer-Signal ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) kann im Durchflusszytometer bestimmt werden und wird zur Unterscheidung der Aufnahmemechanismen herangezogen.

2 Ergebnisse

Abhängig von ihrer Zusammensetzung werden Liposomen durch unterschiedliche Mechanismen von behandelten Zellen aufgenommen. Im Folgenden wurden adhärenente CHO-K1 Zellen mit endozytotischen und fusogenen Liposomen behandelt. Beide Liposomentypen enthielten dieselben Mengen des Fluoreszenzfarbstoffs BODIPY FL-DHPE. Nach einer zehnmütigen Behandlung wurde die subzelluläre Verteilung des fluoreszenten Lipidanalogs innerhalb der Zellen mittels cLSM und Durchflusszytometrie detektiert um die Aufnahmemechanismen Endozytose und Fusion zu unterscheiden.

2.1 Mikroskopische Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von Endozytose und Fusion

Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung des Fluoreszenzsignals von BODIPY FL-DHPE nach Behandlung von CHO-K1 Zellen mit endozytotischen und fusogenen Liposomen wurde am cLSM analysiert. Zur Herstellung der kationischen, endozytotischen Liposomen wurden 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) und 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP) in äquimolaren Mengen eingesetzt. Zudem wurde den Lipiden 5 mol% BODIPY FL-DHPE beigemischt. Adhärenente CHO-K1 Zellen wurden für 10 min mit den Liposomen inkubiert.

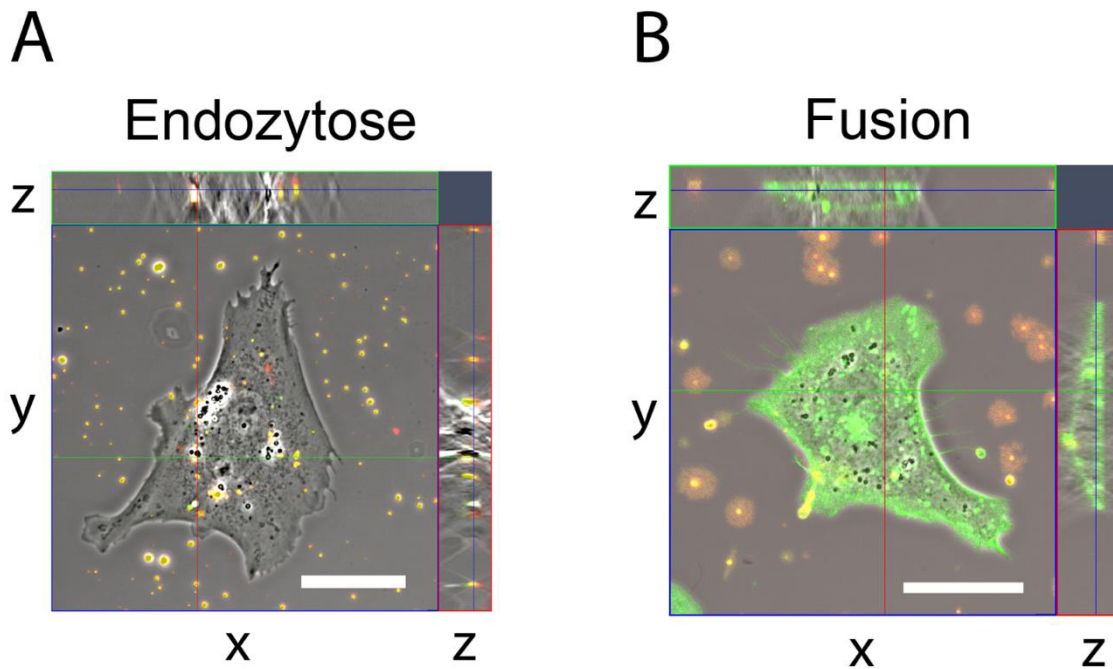


Abb. III.2: Fluoreszenzsignalverteilung nach Endozytose bzw. Fusion. Adhärente CHO-K1 Zellen wurden für 10 min mit endozytotischen (A) oder fusogenen Liposomen (B) behandelt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Überlagerung von Signalen im roten und grünen Spektralbereich sowie das dazugehörige Phasenkontrastbild. Die lateralen Ansichten der Zellen (z) wurden durch Stapeln übereinanderliegender Ebenen zusammengesetzt. Maßstab = 20 μm .

Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden die eingebrachten Liposomen als punktförmige Signale innerhalb der Zellen und auf der umliegenden, zellfreien Glasoberfläche verteilt detektiert (Abb. III.2, A). Durch Übereinanderlegen mehrerer konfokaler Schnitte wurde eine dreidimensionale Darstellung der Zellen zusammengesetzt (*z-stack*), wodurch eine vollständige endosomale Aufnahme einiger Liposomen in das Zytoplasma sichtbar wurde. Die Liposomen zeigten vergleichbar hohe Signalintensitäten im roten und grünen Spektralbereich und erschienen daher gelb. Sowohl die umliegenden als auch die internalisierten Liposomen enthielten somit eine hohe Konzentration an BODIPY FL-DHPE.

Durch eine veränderte Lipidzusammensetzung der Liposomen, nämlich durch Austausch von DMPC durch 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DOPE), konnte ein veränderter Aufnahmemechanismus beobachtet werden. Die liposomale Membran vermischte sich bei Kontakt mit CHO Zellen mit deren PM. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine für Fusion charakteristische, homogene, grüne Färbung der PM aller Zellen. In der

lateralen Ansicht der z-stacks zeigte sich diese Färbung auch in der substratnahen PM an der Unterseite der Zellen (Abb. III.4, B). In zellfreien Bereichen war das punktförmige Signal von nicht-fusionierten Liposomen sichtbar. Für nicht-fusionierte Liposomen konnte eine vergleichbare Signalstärke im grünen und roten Kanal ausgemacht werden.

2.2 Analyse der endozytotischen und fusogenen Liposomen im Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenzeigenschaften von lipophilen Fluorophoren können durch die umliegende Lipidmembran beeinflusst werden. Die Mehrheit der BODIPY-Konjugate ist insensitive gegenüber der Polarität des Lösemittels. In einzelnen Fällen ist jedoch eine Sensitivität des Fluorophors beschrieben (Isaksson et al., 2003). Um auszuschließen, dass die im Durchflusszytometer detektierten Unterschiede für Fusion und Endozytose nicht von den Lipidzusammensetzungen der verschiedenen Liposomentypen beeinflusst wurden, erfolgte eine Analyse der Emissionsspektren von fusogenen und endozytotischen Liposomen mittels Fluoreszenzspektroskopie (Abb. III.3).

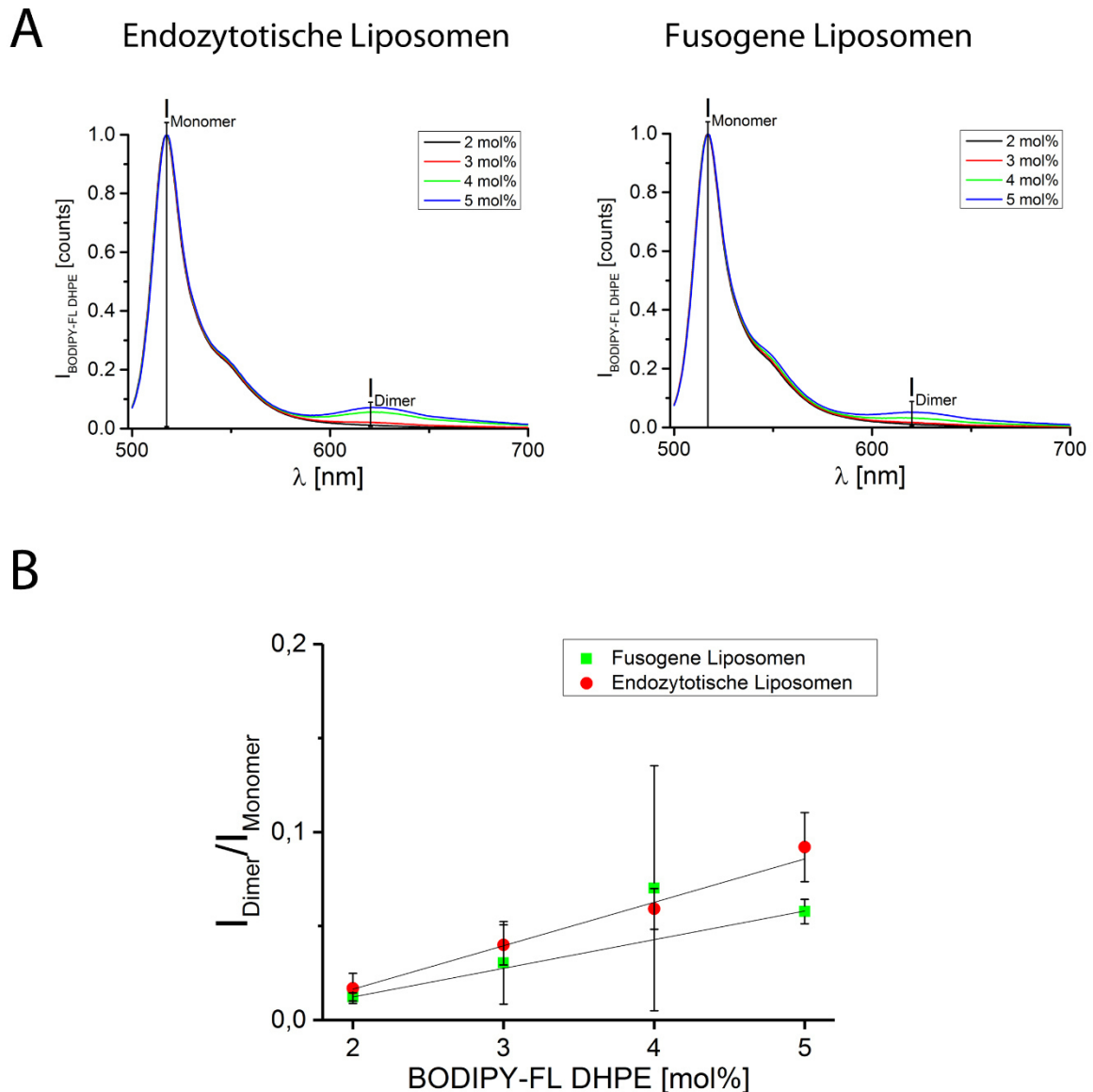


Abb. III.3: Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften von endozytotischen und fusogenen Liposomen. **A:** Emissionsspektren beider Liposomentypen mit BODIPY-FL DHPE Konzentrationen zwischen 2 und 5 mol%. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{Ex} = 488$ nm. **B:** Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) der Fluoreszenzintensitäten von BODIPY FL-DHPE in fusogenen (■) und endozytotischen (●) Liposomen bei $\lambda_{Em} = 620$ nm (Dimer-Signal) und $\lambda_{Em} = 515$ nm (Monomer-Signal). Die linearen Regressionsgeraden beider Messreihen waren signifikant gleich ($p \leq 0,05$).

Bei einer liposomalen BODIPY FL-DHPE-Konzentration ≥ 2 mol% trat in fusogenen und endozytotischen Liposomen ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 515$ nm (Monomer) und ein zweites Maximum bei $\lambda_{Em} = 630$ nm (Dimer) auf. Bei gleicher BODIPY FL-DHPE-Konzentration riefen die verschiedenen Lipidzusammensetzungen von endozytotischen und

fusogenen Liposomen keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Emissionsspektren hervor (Abb. III.3).

Die im Fluoreszenzspektrometer gemessenen Intensitäten bei $\lambda_{Em} = 515$ nm (Monomer) und $\lambda_{Em} = 630$ nm (Dimer) dienten, wie in den durchflusszytometrischen Analysen, zur Bestimmung des Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$). Die Regressionsgeraden der Messpunkte für fusogene bzw. endozytotische Liposomen zeigten Steigungen von 0,015/mol% bzw. 0,023/mol%. Statistische Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geraden.

Die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten beider Formulierungen glichen den Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) von mit endozytotischen Liposomen behandelten CHO-K1 Zellen (siehe Abb. III.5).

2.3 Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von Endozytose und Fusion im Durchflusszytometer

Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde dokumentiert, dass die Behandlung mit endozytotischen und fusogenen Liposomen zu einer unterschiedlichen Verteilung des fluoreszenten Lipidanalogs BODIPY FL-DHPE innerhalb der Zellen führte. Um die internalisierten Liposomen aller Zellen zu detektieren, wurden sie nach der 10-minütigen Behandlung in Suspension gebracht und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Population intakter Zellen wurde durch die Signale im Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht identifiziert, wodurch die Fluoreszenzsignale nicht-internalisierter Liposomen für die spätere Auswertung eliminiert wurden. Die Detektoren des roten ($\lambda_{Em} = 665-715$ nm, Dimersignal) und grünen Fluoreszenzkanals ($\lambda_{Em} = 510-540$ nm, Monomer-Signal) wurden anhand unbehandelter CHO-K1 Zellen so eingestellt, dass der Median der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in einem Verhältnis von 1:1 vorlag (Abb. III.4, C, Durchflusszytometrie). Diese Voreinstellungen wurden zur Analyse der behandelten Zellen beibehalten, sie waren zelltypabhängig und wurden für CHO-, MEF-, HELA- und HEK-n Zellen (Tabelle III.1) individuell vorgenommen.

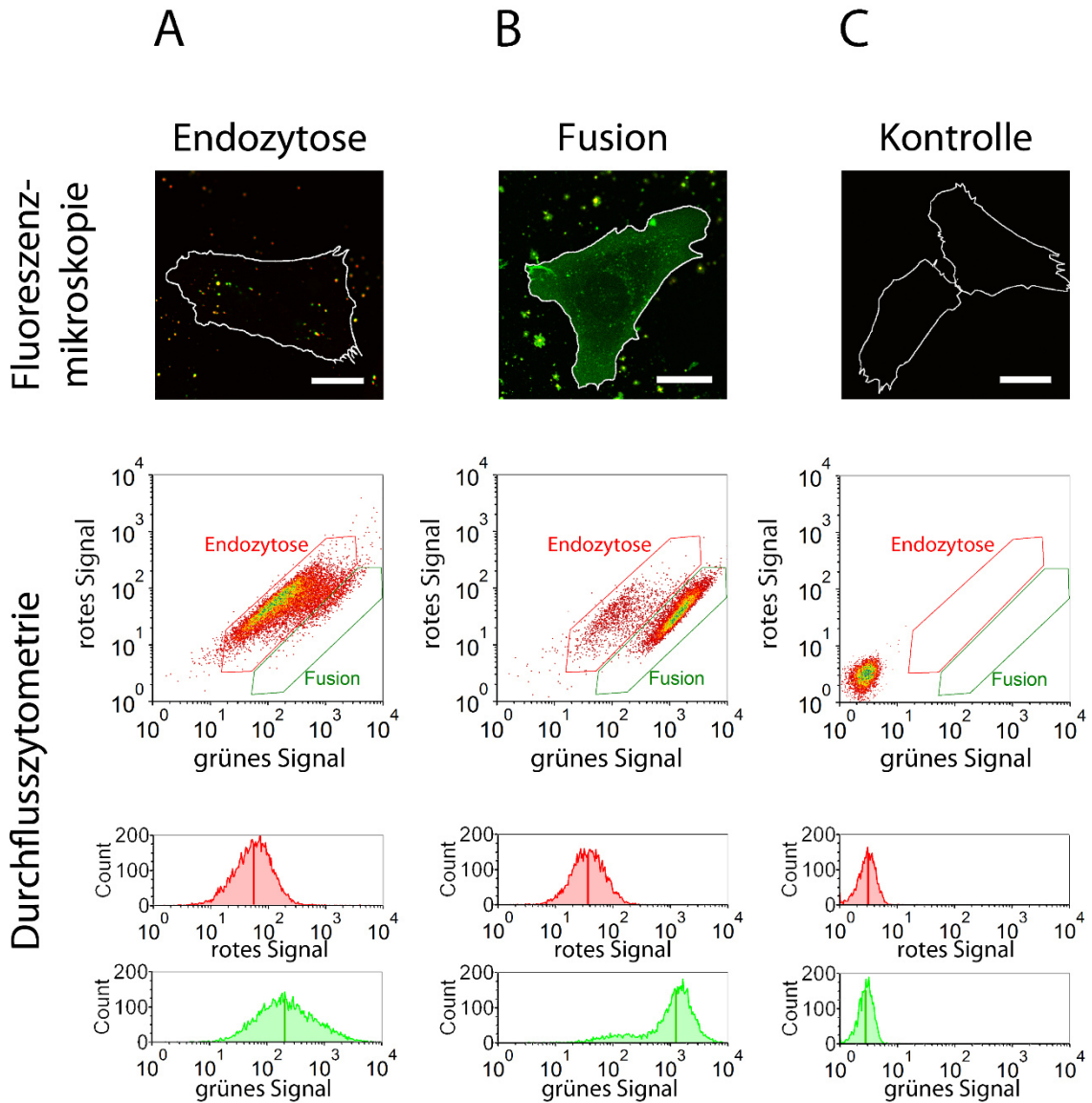


Abb. III.4: Charakteristische Fluoreszenzsignale von Endozytose und Fusion. CHO-K1 Zellen wurden mit endozytotischen (A) und fusogenen (B) Liposomen behandelt, welche die selben Mengen des fluoreszenzmarkierten Lipids BODIPY-FL DHPE enthielten. Die Detektion der Signalintensitäten erfolgte mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie. Als Referenz dienten unbehandelte CHO-K1 Zellen (C). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Überlagerung von Monomer- (grün) und Dimer-Signal (rot). Kolokalisation beider Signale ist durch gelbe Färbung dargestellt. Die Zellumrandungen wurden anhand des jeweiligen Phasenkontrastbildes ermittelt und als weiße Linie nachträglich eingezeichnet (Maßstab = 20 μm). Nach 10-minütiger Behandlung wurden die Zellen in Suspension gebracht und im Durchflusszytometer analysiert. In den Streudiagrammen sind die Intensitätsverteilungen von grüner und roter Fluoreszenz aller gemessener Zellen gegeneinander aufgetragen. Die definierten Regionen für „Endozytose“ und „Fusion“ wurden anhand der Position der detektierten Populationen festgelegt. Die Histogramme zeigen die Intensitätsverteilungen von grüner und roter Fluoreszenz aller gemessenen Zellen. Der eingezeichnete Median der Verteilungen diente zur Ermittlung des Quotienten ($I_{\text{Dimer}}/I_{\text{Monomer}}$).

Die in Abb. III.4 abgebildeten cLSM-Aufnahmen zeigen die Überlagerung von grünem und rotem Kanal, das detektierte Fluoreszenzsignal indizierte ein niedrige (grün, Monomer-Signal) bzw. hohe (rot, Dimersignal) lokale Konzentration von BODIPY FL-DHPE.

Die Analyse von mit endozytotischen Liposomen behandelten CHO-K1 Zellen im Durchflusszytometer ergaben vergleichbar hohe Signalintensitäten im roten und grünen Detektionskanal (Abb. III.4, A). Ein Großteil der gemessenen Zellen bildeten im Streudiagramm eine homogene Population, anhand welcher die definierte Region „Endozytose“ festgelegt wurde (Abb. III.4, A). Die im Durchflusszytometer detektierten Mediane der Signalstärken bei $\lambda_{Em} = 665-715$ nm (Dimersignal) und $\lambda_{Em} = 510-540$ nm (Monomer-Signal) dienten der Bestimmung des Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$). Das Fluoreszenzsignal war charakteristisch für die endozytotische Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Liposomen.

Der durch die veränderte Lipidzusammensetzung der fusogenen Liposomen ausgelöste, veränderte Aufnahmemechanismus konnte sowohl im Fluoreszenzmikroskop, als auch im Durchflusszytometer beobachtet werden. Die liposomale Membran vermischte sich bei Kontakt mit der PM von CHO-K1 Zellen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine für Fusion charakteristische, homogene, grüne Färbung der PM aller Zellen. In zellfreien Bereichen war das punktförmige Signal von nicht-fusionierten Liposomen sichtbar. Für nicht-fusionierte Liposomen konnte eine vergleichbare Signalstärke im grünen und roten Kanal detektiert werden (Abb. III.2, B; Abb. III.4, B).

Die mit fusogenen Liposomen behandelten Zellen wurden trypsiniert und mit unveränderten Detektionsparametern im Durchflusszytometer analysiert. Im Punktdiagramm zeigte sich die Mehrheit der Zellen als eine homogene Population mit einer, im Vergleich zu mit endozytotischen Liposomen behandelten Zellen, leicht verringerten roten und deutlich erhöhten grünen Signalintensität. Anhand der Position dieser Population im Punktdiagramm wurde die definierte Region „Fusion“ festgelegt (Abb. III.4, A). Der ermittelte Quotient ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) war für Zellen innerhalb der Region „Fusion“ somit kleiner als für Zellen innerhalb der Region „Endozytose“ (vgl. Abb. III.5).

2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzsignaturen von endozytotischen und fusogenen Liposomen nach Aufnahme durch CHO-K1 Zellen

Um zu ermitteln, ob der Aufnahmemechanismus der Liposomen in Abhängigkeit der Konzentration des eingesetzten Fluorophors steht, wurden beide Liposomentypen mit BODIPY FL-DHPE-Fraktionen zwischen 1 und 5 mol% präpariert. Nach Behandlung der CHO-K1 Zellen wurden die ausgelösten Fluoreszenzsignale wie in Kapitel 2.3 beschrieben im Durchflusszytometer analysiert. Bei endozytotischer Aufnahme der Liposomen lag der Quotient ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) für alle Konzentrationen oberhalb von 0,05 und wuchs mit steigender BODIPY FL-DHPE-Konzentration (Abb. III.5). Die Messpunkte zwischen 2 mol% und 5 mol% konnten durch eine lineare Regressionsgerade mit einem Y-Achsenabschnitt von 0,01 und der Steigung von 0,028/mol% interpoliert werden. Wurde der Fluorophor durch Fusion in die PM der CHO-K1 Zellen interkaliert, blieb der Quotient unabhängig von der eingesetzten Konzentration bei etwa 0,02. Die dazugehörige Regressionsgerade wies eine leichte Steigung von 0,003/mol% auf.

Zwischen 2 mol% und 5 mol% konnten die Aufnahmemechanismen Fusion und Endozytose anhand des Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) signifikant voneinander unterschieden werden ($p \leq 0,01$).

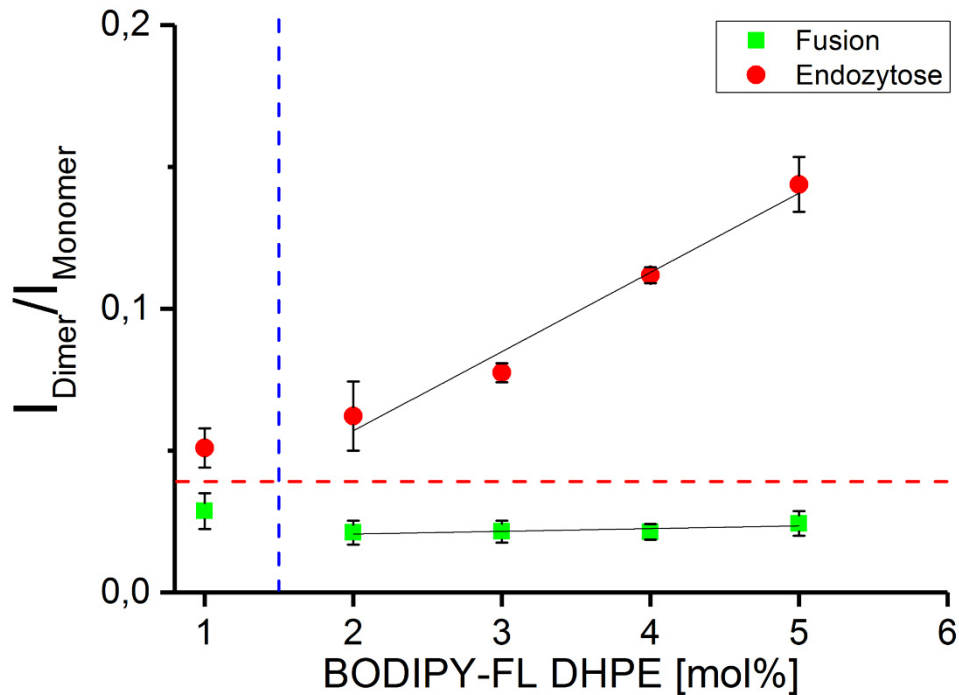


Abb. III.5: Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 690/50 nm (Dimersignal) und 525/30 nm (Monomer-Signal) von BODIPY-FL-DHPE in CHO-K1 Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mittels fusogener (■) und endozytostischer (●) Liposomen in die Zellen eingebracht. Der Median der Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die Regressionsgeraden der Messpunkte unterschieden sich oberhalb von 2 mol% (blaue Linie) signifikant ($p \leq 0,01$).

2.5 Stoffwechselabhängigkeit von plasmamembranständigem BODIPY FL-DHPE

Die PM von Zellen unterliegt einem permanenten Austausch der membranbildenden Lipide. Der auftretende Lipidtransport von der PM ins Zellinnere beeinflusst auch die Verteilung von BODIPY FL-DHPE innerhalb der mit Liposomen behandelten Zellen. Um den Einfluss dieses Transportes zu untersuchen wurde der Fluoreszenzfarbstoff mittels fusogener Liposomen in die PM adhärenter CHO-K1 Zellen interkaliert. Die Veränderungen der Dimer- und Monomer-Signalintensität wurden nach 3 h und 5 h mittels cLSM und Durchflusszytometrie dokumentiert (Abb. III.6).

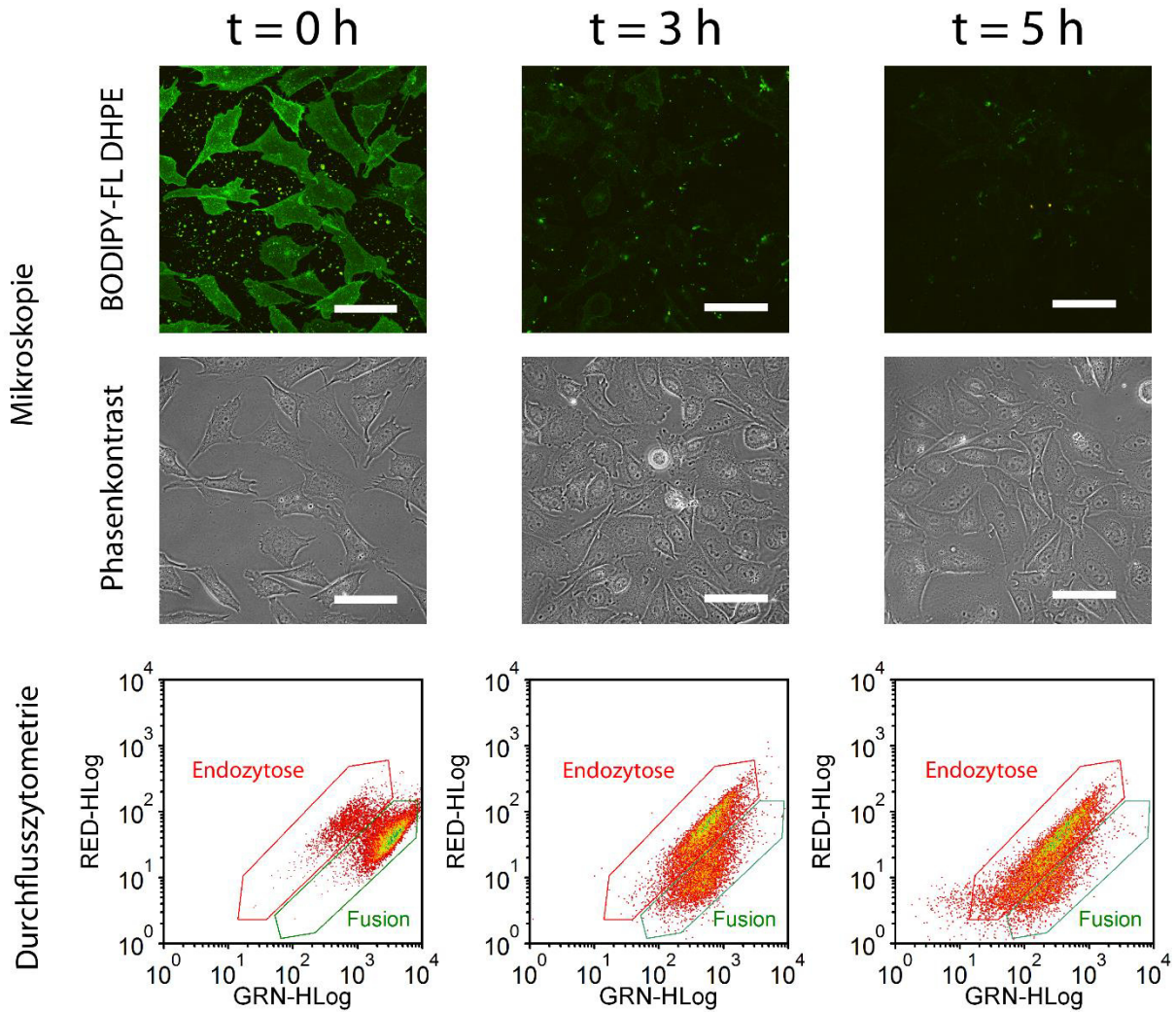


Abb. III.6: Zeitabhängige Lokalisation des Fluoreszenzsignals von BODIPY FL-DHPE in CHO-K1 Zellen. BODIPY FL-DHPE wurde mittels fusogener Liposomen in die Plasmamembran von CHO-K1 Zellen interkaliert ($t = 0 \text{ h}$). Der zeitliche Verlauf der grünen (Monomer-Signal) und roten Fluoreszenz (Dimersignal) von BODIPY FL-DHPE wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie dokumentiert. In der obersten Zeile werden die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle abgebildet, darunter das Phasenkontrastbild des jeweiligen Bildausschnitts. Maßstab = $50 \mu\text{m}$. Die Dichteplots der unteren Zeile zeigen die zeitliche Entwicklung des BODIPY FL-DHPE-Signals in CHO-K1 Zellen nach identischer Behandlung nach Analyse im Durchflusszytometer.

Im Anschluss an die Behandlung mit fusogenen Liposomen war die PM der CHO-K1 Zellen durch das Monomer-Signal von BODIPY FL-DHPE homogen grün gefärbt. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen zeigte eine homogene Population mit starker grüner Fluoreszenz in der als „Fusion“ definierten Region (Abb. III.6, $t = 0 \text{ h}$).

Die cLSM-Aufnahmen von fusionierten Zellen nach dreistündiger Inkubation wiesen ein deutlich vermindertes Fluoreszenzsignal in der PM auf, gleichzeitig konnte ein Auftreten von

zytosolischem BODIPY FL-DHPE-Signal verzeichnet werden. Im Streudiagramm der durchflusszytometrischen Daten bewirkte die sinkende Intensität der grünen Fluoreszenz die Verschiebung einer Teilpopulation in die mit „Endozytose“ bezeichneten Region (Abb. III.6, $t = 3$ h). Dieser Trend setzte sich nach fünfstündiger Inkubation fort. Im cLSM konnte nur noch vereinzelt grünes Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Population der gemessenen Zellen befand sich nach 5 h größtenteils in der Region „Endozytose“ (Abb. III.6, $t = 5$ h).

2.6 Anwendung des Assays auf die Zelltypen MEF, HELA und HEK-n

Um ein breites Anwendungsspektrum der entwickelten Methode nachzuweisen, wurde der Assay auf weitere Zelltypen angewandt. Dafür wurden Zelllinien von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) und humanen Epithelzellen eines Zervix-Karzinoms (HELA) sowie primäre epidermale Keratinozyten (HEK-n) mit fusogenen und endozytotischen Liposomen behandelt. Beide Liposomentypen enthielten 5 mol% BODIPY FL-DHPE. Die Analyse der Zellen erfolgte mit der in Kapitel 2.3 für CHO-K1 Zellen vorgestellten Methode.

Tabelle III.1: Quotienten ($I_{Dimer}/I_{Monomer}$) von BODIPY FL-DHPE nach Einbau durch fusogene und endozytotische Liposomen in verschiedene Zelltypen. Gezeigt werden die Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung σ_x von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zelltyp	Dimer/Monomer					
	Fusion			Endozytose		
	\bar{x}	\pm	σ_x	\bar{x}	\pm	σ_x
MEF	0,08	\pm	0,01	0,60	\pm	0,34
HELA	0,21	\pm	0,06	0,44	\pm	0,16
HEK-n	0,15	\pm	0,02	0,46	\pm	0,19

Die absoluten Messwerte unterlagen zelltypabhängigen Schwankungen. Die Aufnahmemechanismen Fusion und Endozytose konnten jedoch für alle drei Zelltypen voneinander unterschieden werden (siehe Tabelle III.1).

3 Diskussion

Um die Effizienz von Liposomen und anderen nanopartikulären Systemen (NPS) als Wirkstoffträger zu verbessern, ist das Verständnis ihrer Aufnahmemechanismen von großem wissenschaftlichem Interesse. Meist gelangen die NPS durch Endozytose ins Zellinnere, wo der Wirkstoff aus endosomalen Einschlüssen freigesetzt werden muss um die vorgesehenen Bindungspartner zu erreichen (Gilleron et al., 2013; Straubinger et al., 1983). Durch die Entwicklung oberflächenmodifizierter Liposomen, welche ihren Inhalt nach Verschmelzung mit der PM der Zielzelle direkt ins Zytosol ausschütten, kann die vergleichsweise langsame und weniger effiziente zelluläre Aufnahme durch Endozytose umgangen werden (Levchenko et al., 2003; Kakudo et al., 2004). Zur Untersuchung dieser beiden Aufnahmemechanismen werden verschiedene Ansätze verfolgt. Meist werden Fluorophore direkt in die Liposomenmembran interkaliert oder an die Membran gekoppelt um ihre Verteilung vor, während und nach der zellulären Aufnahme zu dokumentieren (Plajnsek et al., 2011; Jacquart et al., 2013; Maier et al., 2002). Das hier vorgestellte Verfahren nutzt erstmalig die besonderen Fluoreszenzeigenschaften von BODIPY FL um die beiden Aufnahmewege voneinander zu unterscheiden. BODIPY FL weist eine hohe Photostabilität und Quanteneffizienz auf (Johnson et al., 1991). Außerdem zeigt sein Emissionsspektrum konzentrationsabhängige Veränderungen. Bei niedrigen Konzentrationen liegt der Farbstoff als Monomer vor und hat ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{Em} = 515$ nm. Durch Dimer-Bildung bei höheren Konzentrationen tritt ein zweites Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 620$ nm auf (siehe Abb. III.3) (Bergstrom et al., 2002). Wenn dieser Farbstoff an Lipidmoleküle wie 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DHPE) kovalent gebunden ist, bekommt das Molekül lipophile Eigenschaften und kann in Liposomen oder Lipidnanopartikeln als fluoreszenter Membranmarker verwendet werden (Chen et al., 1997).

Die mikroskopische Untersuchung von CHO-K1 Zellen, welche mit endozytotischen Liposomen der Zusammensetzung DMPC/DOTAP/BODIPY FL-DHPE = 1/1/0,1 (mol/mol) behandelt wurden, zeigten punktförmige Signale innerhalb der Zellen und auf der Oberfläche des umliegenden Glassubstrates (Abb. III.4, A). Die Internalisierung der applizierten Liposomen bewirkte keine Veränderung ihres Fluoreszenzsignals. Der beobachtete Aufnahmemechanismus belegt Erkenntnisse von Kitagawa et al. (2004), welcher die Aufnahme kationischer Liposomen dem endozytotischen Weg zuschreibt. Die Detektionsparameter wurden am Mikroskop so gewählt, dass Monomer- und Dimersignal durch vergleichbar hohe

Signalintensitäten abgebildet wurden. In der Überlagerung der beiden Kanäle zeigten die Liposomen eine gleichzeitige Emission in beiden Spektralbereichen (gelbe Färbung), was eine hohe lokale Konzentration des eingesetzten Fluorophors indiziert. Betrachtete man im cLSM nur eine einzelne Fokusebene, ließ sich nicht unterscheiden, ob die Liposomen tatsächlich in die Zellen aufgenommen wurden oder noch außerhalb der Zellen an die PM assoziiert vorlagen. Durch Übereinanderlegen mehrerer konfokaler Schnitte konnte eine dreidimensionale Darstellung der Zellen zusammengesetzt werden, wodurch die Lokalisation einiger Liposomen innerhalb der Zellen belegt werden konnte (Abb. III.2). Die Z-Auflösung des cLSMs war für die Bestimmung der Vesikelaufnahme durch Endozytose ausreichend. Die Anzahl untersuchter Zellen reichte jedoch nicht aus, um den Anteil von oberflächenassoziierten Liposomen abzuschätzen. Für eine präzise Quantifizierung empfiehlt sich der Einsatz eines bildgebenden Durchflusszytometers (Vranic et al., 2013; Rajan et al., 2015).

Der Austausch des Lipids DMPC durch DOPE bewirkte eine deutliche Veränderung der zellulären Aufnahme der Liposomen. Die Zusammensetzung von Liposomen durch äquimolare Mengen von DOPE und DOTAP sowie 2-5 mol% eines lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs erlaubt ihre Fusion mit der PM von Zellen (Csiszar et al., 2015; Kleusch et al., 2012; Kube et al., 2017; Naumovska et al., 2014). Vesikel dieser Zusammensetzung wurden von Csiszar et al. (2010) als fusogene Liposomen etabliert. Nach Behandlung mit fusogenen Liposomen zeigte die PM der CHO-K1 Zellen eine homogen grüne Färbung, womit die erfolgreiche Fusion nachgewiesen werden konnte (Abb. III.4, B). Durch die komplette Vermischung der liposomalen Membran mit der PM der adhären Zellen kommt es zu einer lokalen Verdünnung des interkalierten BODIPY FL-DHPE. Eine Kolokalisation von grüner und roter Fluoreszenz konnte in der PM nicht beobachtet werden. Folglich lagen die Fluorophormoleküle in monomerischer Konfiguration vor, wodurch sie keine oder nur schwache Emission im roten Spektralbereich aufwiesen.

Durch die mikroskopische Analyse der einzelnen Behandlungsmethoden konnten die verschiedenen Aufnahmemechanismen unterschieden werden. Um Fusion und Endozytose anhand solcher mikroskopischer Aufnahmen jedoch statistisch auswerten zu können, müsste das Bildmaterial zusätzlich mithilfe eines Bildanalyseprogramms bearbeitet werden, was zeit- und arbeitsintensiv ist. Die Untersuchung der zellulären Aufnahmemechanismen im Durchflusszytometer hingegen erlaubten eine automatisierte, multidimensionale Auswertung hoher Zellzahlen in sehr kurzer Zeit und somit eine weniger zeitintensive und gleichzeitig

belastbare Quantifizierung der untersuchten Phänomene. Vergleichbare Zellzahlen können durch Mikroskopie nicht erreicht werden.

Nachdem CHO-K1 Zellen mit endozytotischen und fusogenen Liposomen mit BODIPY FL-DHPE-Anteilen zwischen 2 mol% und 5 mol% behandelt wurden, unterschieden sich die ermittelten Intensitätsquotienten ($I_{\text{Monomer}}/I_{\text{Dimer}}$) von Endozytose und Fusion signifikant. Bei einem BODIPY FL-DHPE-Anteil unterhalb von 2 mol% können die Aufnahmemechanismen nicht mehr signifikant voneinander unterschieden werden. Ausschlaggebend dafür ist die niedrige Konzentration des Fluorophors, welche schon in Liposomen nicht mehr ausreichte um ein Dimersignal auszulösen (vgl. Abb. III.3). Fusogene Liposomen mit BODIPY FL-DHPE-Konzentrationen oberhalb von 10 mol% beeinflussten die Vitalität von CHO-K1 Zellen, weswegen von ihrem Einsatz abzuraten ist. Möglicherweise ist die Obergrenze abhängig vom behandelten Zelltyp und muss deshalb für andere Zelllinien neu evaluiert werden.

Mit einem Durchmesser unterhalb von 500 nm sind Liposomen in Suspension zu klein um im Durchflusszytometer analysiert zu werden. Um dennoch auszuschließen, dass die ermittelten Quotienten von Fusion und Endozytose nicht durch unterschiedliches Fluoreszenzverhalten von BODIPY FL-DHPE in den verschiedenen Liposomentypen herrührt, wurden ihre Emissionsspektren im Fluoreszenzspektrometer detektiert. Das konzentrationsabhängige Verhältnis von Dimer- zu Monomer-Signal zeigte keine Abhängigkeit von der eingesetzten Liposomenformulierung. Die Regressionsgeraden beider Liposomentypen glichen den Werten von CHO-K1 Zellen, welche mit endozytotischen Liposomen behandelten wurden, was darauf hindeutet, dass die Liposomen im Anschluss an eine endosomale Aufnahme intakt im Zellinnern vorlagen.

Die Grundidee des Assays lässt sich vermutlich auch auf andere membranständige Fluorophore übertragen, die wie BODIPY FL eine konzentrationsabhängige Veränderung ihrer Emissionsspektren aufweisen. Moleküle wie Pyren (Birks, 1975), Naphtalen- (Banerjee et al., 2012b; Banerjee et al., 2012a) oder Rhodamin-basierte Fluorophore (Bergstrom et al., 2002) kommen dafür in Betracht. Des Weiteren könnten membrangebundene FRET-Paare, wie C₁₆DiO (3) und C₁₈DiI (5) (Chen et al., 2008; Lee et al., 2013) zur Unterscheidung der Aufnahmemechanismen herangezogen werden. Es gilt jedoch zu beachten, dass einige Fluoreszenzfarbstoffe nur kurz in der PM zurückgehalten werden und anschließend in spezifischen Zellkompartimenten aufkonzentriert vorliegen.

Die konzentrationsabhängigen Emissionseigenschaften von BODIPY FL sind unabhängig vom Lipidanker des fluoreszenten Farbstoffs (Dahim et al., 2002). Trotzdem eignen sich nicht alle Konjugate zur Analyse von Fusion und Endozytose, denn ein schneller Transport der Lipide von der PM in zytosolische Kompartimente verhindert die rechtzeitige Analyse im Durchflusszytometer. So wird BODIPY FL-C5-Sphingomyelin beispielsweise innerhalb einer Minute via rezeptorvermittelter Endozytose aus der PM in frühe Endosomen transportiert (Chen et al., 1997). Darüber hinaus konnte Kleusch et al. (2012) zeigen, dass mittels fusogener Liposomen interkaliertes BODIPY FL-Sphingomyelin schon während der achtminütigen Behandlung in kernnahen Kompartimenten aufkonzentriert wurde. Die Verwendung eines automatisierten bildgebenden Durchflusszytometers (engl. *imaging flow cytometry*, IFC) könnte von zu schnellem Lipidmetabolismus ausgelösten Komplikationen entgegenwirken. Die Zielzellen könnten in Suspension vorliegen, mit den verschiedenen Liposomentypen behandelt und anschließend sofort analysiert werden.

Das hier verwendete BODIPY FL-DHPE verweilte nach Inkorporation durch Fusion in der PM und wurde vergleichsweise langsam durch den Lipidmetabolismus von Zellen ins Zellinnere transportiert. In der PM von adhärennten CHO-K1 Zellen konnte ein Monomer-Signal bis zu 3 h nach der Behandlung mit fusogenen Liposomen nachgewiesen werden (Abb. III.6). Die Geschwindigkeit, mit welcher die PM einer Zelle erneuert wird ist jedoch auch abhängig vom Zelltyp. Der vorgelegte Assay bietet, bei durch Automatisierung sichergestellter ausreichender zeitlicher Auflösung, einen Ansatz, um die lipid- und zelltypabhängige Geschwindigkeit des Transports aus der PM zu analysieren.

Anstelle eines kopfmarkierten Phosphoethanolamins könnte auch ein kettenmarkiertes Phosphocholinderivat, z.B. β -BODIPY-C₁₂HPC verwendet werden, da es ähnlich lang in der PM verweilt. In diesem Fall sollte das konzentrationsabhängige Emissionsverhalten und der lineare Bereich von $I_{\text{Dimer}}/I_{\text{Monomer}}$ jedoch neu bestimmt werden, da die Konzentrationsgrenze der Dimer-Bildung durch die veränderte Lage des Fluorophors vermutlich verschoben wird. Höhere Konzentrationen des eingesetzten Fluorophors könnten sich dann wiederum auf die Vitalität der Zellen niederschlagen. Meine Analysen zeigen, dass sich kopfmarkierte Lipide schon in geringen Konzentrationen dazu eignen, die Aufnahmemechanismen Endozytose und Fusion voneinander zu trennen.

Die vorgelegte Methode konnte ohne Veränderung der Liposomenzusammensetzung auf die Untersuchung weiterer Zelltypen übertragen werden. Die ermittelten Quotienten ($I_{\text{Monomer}}/I_{\text{Dimer}}$) für MEF- HELA- und HEK-n Zellen unterlagen zwar zelltypabhängigen

Schwankungen, die Aufnahmemechanismen Fusion und Endozytose konnten jedoch für alle drei Zelltypen voneinander unterschieden werden.

Unabhängig davon, welche Messtechnik zur Analyse der behandelten Zellen zum Einsatz kam, zeigte sich der Quotient ($I_{\text{Monomer}}/I_{\text{Dimer}}$) als ein belastbarer Indikator zur Unterscheidung von Membranfusion und Endozytose (Braun et al., 2016). Mit dieser Arbeit wurde somit eine schnelle, reproduzierbare und universelle Methode vorgelegt, um die Aufnahmewege von NPS anhand großer Zellzahlen zu untersuchen.

IV. FUSOGENE UND ENDOZYTOTISCHE LIPOSOMEN ALS TRANSPORTMITTEL FÜR ANTHRACYCLINE

1 Einleitung

1.1 Physikochemische Eigenschaften von Anthracyclinen

Doxorubicin (DXR) und Aclacinomycin A (ACL) sind Derivate von Daunorubicin (DNR) und gehören zu der Stoffklasse der Anthracycline. Sie werden als Zytostatika zur Behandlung von Tumoren und Leukämien eingesetzt. DNR ist das erste beschriebene Anthracyclin und wurde erstmalig 1963 aus *Streptomyces peucetius* isoliert (Grein et al., 1963). Die Isolation von DXR erfolgte nur kurze Zeit später. Es wurde als der effektivere Wirkstoff zur Behandlung von Nephroblastomen, Lymphomen sowie akuter myeloischer und lymphatischer Leukämie im Kindesalter beschrieben (Bonadonna et al., 1969). Zusätzlich zu den für Zytostatika üblichen Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Erbrechen oder Geschwüren in der Mundschleimhaut ist Kardiotoxizität der gravierendste Nebeneffekt der frühen Anthracycline.

Alle Anthracycline bestehen aus einem Anthrachinonchromophor, einer rigiden, planaren, aromatischen Ringstruktur, an welche ein weiterer gesättigter Ring anneliert ist. Letzterer ist durch eine α -glycosidische Bindung an einen Aminozucker vom Typ Daunosamin gebunden (Kizek et al., 2012). Das hydroxy-substituierte Antrachinonchromophor verleiht den Anthracyclinen fluoreszente Eigenschaften. DXR zeigt nach Anregung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 479$ nm zwei Emissionsmaxima bei etwa $\lambda_{\text{Em}} = 560$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 590$ nm (Karukstis et al., 1998). Die Fluoreszenzeigenschaften von Anthracyclinen werden genutzt um ihre Lokalisation in Lipiddoppelschichten und Liposomen oder nach Einbringen in Zellen oder Geweben zu bestimmen (Kania et al., 2007b; Teillaud et al., 1998).

Der einzige Unterschied zwischen DNR und DXR liegt darin, dass die Seitenkette von DXR mit einem primären Alkohol endet. An gleicher Stelle findet sich bei DNR eine Methylgruppe. Dieser Unterschied bewirkt jedoch eine deutliche Veränderung der Wirksamkeit (Minotti et al., 2004). Weitere Derivate von DNR sind neben ACL Epirubicin (EPIR) und Idarubicin (IDA). Ihre strukturellen Unterschiede zu DNR sind in Abb. IV.1 dargestellt.

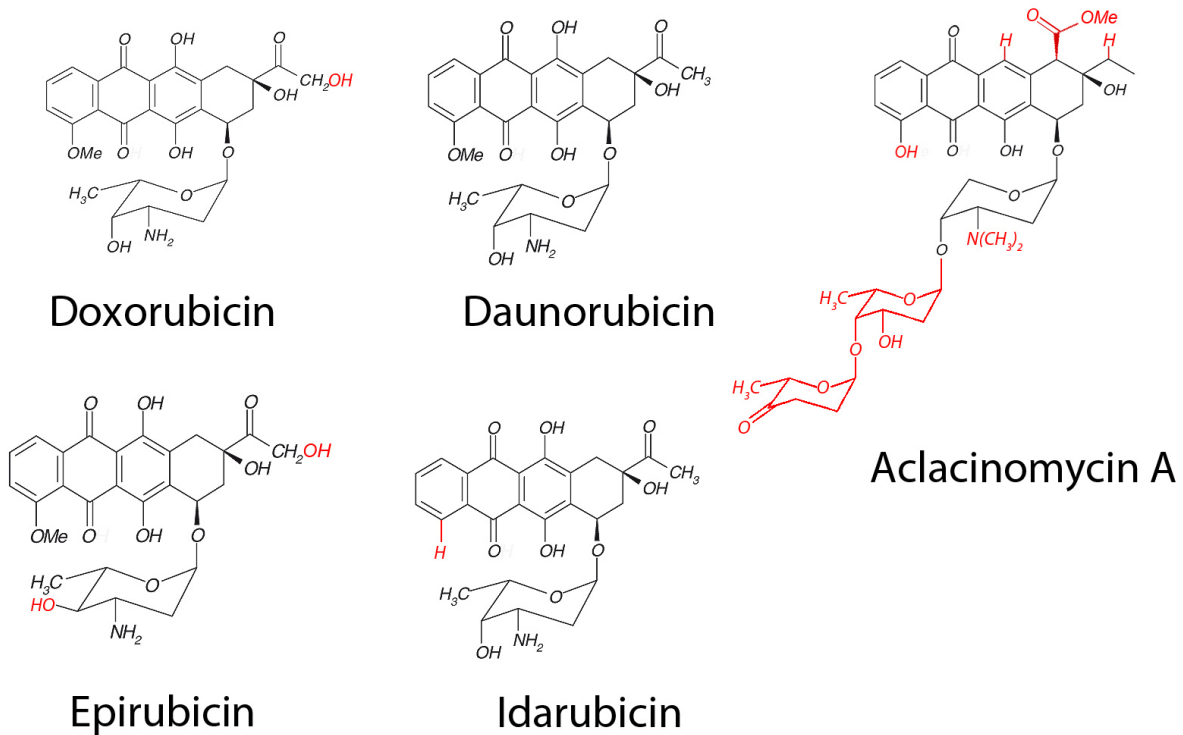


Abb. IV.1: Strukturformeln verschiedener Anthracycline. Die von Daunorubicin abweichenden Gruppen sind rot gezeichnet. Verändert nach Kizek et al. (2012).

Aus den strukturellen Unterschieden der Daunorubicin-Derivate ergeben sich verschiedene Anwendungsgebiete der Zytostatika. Friche et al. (1990) ermittelten für Anthracycline eine Korrelation zwischen Wirksamkeit und Lipophilie. Der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol/Puffer bzw. Pentanol/Puffer ergab, dass EPIR etwa 10-mal und ACL > 200-mal lipidlöslicher ist als DXR. Nach Friche et al. (1990) bedingt eine hohe Lipophilie, wie die von ACL, eine stärkere Bioakkumulation des Wirkstoffs in behandelten Zellen, woraus eine höhere Wirksamkeit resultiert.

Die zytotoxische Wirkung von Anthracyclinen ist vielfach nachgewiesen (Minotti et al., 2004), der zugrunde liegende Mechanismus aber noch nicht gänzlich erforscht. Die zytotoxischen Effekte von DXR basieren auf der Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNS). Der Wirkstoff lagert sich in die DNS der Zellen ein und verhindert dadurch die Neusynthese von DNS,

Ribonukleinsäure (RNS) und letztendlich von Proteinen. Dabei kommt es zu einer Hemmung von Helicase und Topoisomerase II (Minotti et al., 2004). Im Zellkern löst DXR Doppelstrangbrüche aus und bewirkt damit sowohl den apoptotischen als auch nekrotischen Abbau der Zelle. Die mitochondriale DNS stellt ein weiteres Ziel für DXR dar (Toninello, 2014; Galluzzi et al., 2006; Hockenbery, 2010; Fantin und Leder, 2006; Sakhrani und Padh, 2013). Die Schädigung der mitochondrialen DNS führt zu einem Anstieg von freien Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) in den Mitochondrien und somit zu einer verminderten Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) und reduziertem ATP-abhängigen Ausschleusen des Wirkstoffes aus der Zelle (Mallick et al., 2015; Zhou et al., 2013; Han et al., 2011).

Eine anhaltende Behandlung von Patienten mit DXR führt zu einer irreversiblen Schädigung der Herzmuskulatur (Chung et al., 2013; Minotti et al., 2004). Der Mechanismus und die Pathogenese von Anthracyclin-induzierter Kardiotoxizität sind nur wenig erforscht. Typische pathologische Veränderungen in kardialen Myozyten behandelter Patienten sind Degeneration des Sarkoplasmatischen Retikulums, Anschwellen und Platzen der Mitochondrien und Myofilamentdegeneration (Peng et al., 2005). Pathologische Studien zeigten Chromatin-Kondensation in Zellen des Myocardiums, ein Phänomen, welches auch in apoptotischen Zellen zu beobachten ist (Unverferth et al., 1981).

Die molekularen Mechanismen, die zur Schädigung der kardialen Myozyten führen, sind auf mehrere Phänomene zurückzuführen. Die Entstehung von freien Radikalen, die Einlagerung in die DNS und die Inhibition des Enzyms Topoisomerase sind als ausschlaggebend beschrieben und führen zum programmierten Zelltod der Myozyten (Geisberg und Sawyer, 2010).

Der Wirkmechanismus von ACL ist dem anderer Anthracycline in vielen Aspekten ähnlich. Es zeigen sich allerdings auch einige Unterschiede. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde ACL im Gegensatz zu DXR hauptsächlich außerhalb des Nukleus nachgewiesen (Rogalska et al., 2014). Es hemmt die Aktivität von Topoisomerase I und II (Kania et al., 2007a; Dartsch et al., 2002) und löst im Vergleich zu DXR eine stärkere Bildung von ROS innerhalb der Mitochondrien aus (Rogalska et al., 2008). Im Unterschied zu DXR bewirkt ACL eine Herabregulation der Expression der Gene c-myc und c-myb, welche an der Differenzierung von Zellen beteiligt sind (Schaefer et al., 1992; Stocker et al., 1995). Unabhängig vom Wirkmechanismus steht die Toxizität von DXR und ACL im engen Zusammenhang mit der von behandelten Zellen akkumulierten Dosis an Wirkstoff (Rogalska et al., 2014).

Die anhaltende Behandlung mit DXR kann zu einer Wirkstoffresistenz (Multi Drug Resistance, MDR) der behandelten Zellen führen (Minotti et al., 2004). Die Resistenz wird durch zelluläre Transmembranproteine vermittelt, welche Anthracycline unter Verbrauch von ATP aus der Zelle transportieren. P-Glykoprotein (P-Gp) gehört zu der Familie der ABC-Transporter und wurde als erstes Resistenz-relevantes zelluläres Transporterprotein identifiziert (Gottesman und Ling, 2006). Die Überexpression von P-Gp oder anderen Wirkstofftransportern führt zu einem Efflux von DXR aus den Zellen (Schinkel und Jonker, 2003), einer verminderten Akkumulierung von DXR im Nukleus und somit zu einer verminderten Wirksamkeit von DXR (Maraldi et al., 1999; Rajagopal und Simon, 2003). Trotz unterschiedlichster Struktur werden Krebsmedikamente durch Proteine der ABC-Transporter-Familie aus neoplastischen Zellen geschleust (Gottesman und Ling, 2006; El-Awady et al., 2016).

Eine höhere Toxizität ging in MDR Zelllinien mit einer geringeren Bindungsaffinität zu P-Gp einher (Lehne et al., 1996; Coley et al., 1989). Es liegt nahe, dass die Effektivität, mit der P-Gp an Wirkstoffe bindet, das Maß an Resistenz gegen die entsprechenden Moleküle festlegt (Baldissera et al., 2012). DXR hat eine geringere Toxizität als ACL, weil eine höhere Bindungsaffinität von DXR an P-Gp besteht und dadurch eine höhere Expression des Transporterproteins ausgelöst wird (Rogalska et al., 2014). In der vorgelegten Arbeit wird die Wirkung von ACL und DXR anhand der epithelialen Zelllinie MCF-10A und der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 miteinander verglichen.

1.2 Liposomen als nanomedizinische Vehikel

Die Entwicklung von nanopartikulären Systemen (NPS) zum Transport von Medikamenten verfolgt zwei Hauptziele: Die Maximierung der Effektivität eines Wirkstoffs gegen die Krankheit bei gleichzeitiger Minimierung ungewollter Nebenwirkungen. Eine kontrollierte, NPS-vermittelte Abgabe von Medikamenten erlaubt eine Reduktion der eingesetzten Dosis und erhöht die Bioverfügbarkeit des eingesetzten Wirkstoffs.

Zu solchen NPS gehören neben Polymernanopartikeln, Nanoemulsionen, Nanosuspensionen und Lipoplexen auch Liposomen. Der in Kapitel I.1 beschriebene Aufbau von Liposomen erlaubt sowohl den Transport von hydrophilen als auch hydrophoben Molekülen. Die Verkapselung von Wirkstoffen in ihrer aktiven Form schützt sie vor chemischen Prozessen und verlängert somit ihre Stabilität. Ihr Einsatz schützt die Medikamente *in vivo* vor enzymatischem

Abbau und immunologischer Deaktivierung. Dadurch wird vermieden, dass Wirkstoffe metabolisiert werden, bevor sie ihr Zielgewebe erreichen (Bozzuto und Molinari, 2015).

Liposomen fanden als Wirkstoffträger für DXR erstmals klinische Anwendung in der Krebstherapie (Slingerland et al., 2012). Durch die Verkapslung des Anthracyclins wurde eine deutlich verlängerte Zirkulationszeit, bis hin zu wenigen Stunden, erreicht. Seither sind Liposomen die präferierte Methode, um Anthracycline mittels passiven Targeting in Tumorgewebe anzureichern.

Die zielgerichtete Anreicherung eines Wirkstoffs in erkranktem Gewebe wird Targeting genannt. Das passive Targeting der Liposomen basiert auf der anomalen Struktur von Tumorgeweben. In malignen Tumoren kommt es zu Hypervaskularisierung und anomaler vaskularer Architektur, welche zu einer höheren vaskulären Permeabilität führt. Daraus resultiert, dass Liposomen leichter in Tumorgewebe eindiffundieren können als in gesundes Gewebe. Dieses Phänomen wird als EPR-Effekt bezeichnet (engl. *enhanced permeability and retention*) und führt zur einer passiven Anreicherung der Liposomen im Tumorgewebe (Greish, 2010). Durch die Oberflächenmodifizierung der Vesikel mit Poly-Ethylen-Glycol (PEG) konnte die Zirkulationszeit von wenigen Stunden auf drei bis vier Tage gesteigert werden. Die Verlängerung der Zirkulationsdauer der PEG-modifizierten, sogenannten *Stealth*-Liposomen erhöht die Wahrscheinlichkeit der passiven Ansammlung des Wirkstoffs im Tumorgewebe und verursacht weniger ungewollte Nebeneffekte (Gabizon und Martin, 1997).

PEG-modifizierte Liposomen sind mittlerweile gut etabliert. Neuere Strategien zielen auf eine Steigerung ihrer Selektivität durch Anhängen verschiedener Liganden - sogenanntes aktives Targeting. Mit Antikörpern besetzte Liposomen (Immunoliposomen) sind Gegenstand intensiver Forschungen (Paszko und Senge, 2012). Die Antikörper können hierbei direkt an die Lipide der Vesikel oder terminal an die PEG-Moleküle gekoppelt sein. Ein weiteres Beispiel für aktives Targeting ist das Anhängen des Vitamins Folat (Sneider et al., 2017). Die konjugierten Liposomen binden mit höherer Affinität an Krebszellen, welche ein erhöhtes Expressionsniveau des Folatrezeptors aufweisen (Zhang et al., 2014; Necela et al., 2015). Unabhängig davon, ob die Liposomen mittels aktiven oder passiven Targetings zu den Krebszellen gelangen, werden sie nach Adhäsion an die PM auf endozytotischem Wege ins Zellinnere geschleust.

Die Außenseite der PM ermöglicht es Zellen, mit ihrer Umwelt zu interagieren. Die Lipid- und Proteinzusammensetzung der PM unterliegt dafür einer hochdynamischen Regulation.

Endozytose ist die *de novo* Produktion interner, endosomaler Membrankompartimente von der PM. Durch diesen Prozess werden nicht nur Lipide und Transmembranproteine ins Zellinnere gebracht, sondern auch verschiedenste extrazelluläre Moleküle und Aggregate als Fracht innerhalb der abgeschnürten Vesikel internalisiert.

Bei den meisten NPS erfolgt die zelluläre Aufnahme auf dem Weg der Endozytose. Die zelluläre Aufnahme von Liposomen erfolgt nach Adsorption der Vesikel an die Zelloberfläche. Anschließend werden sie durch Clathrin-vermittelte Endozytose von der PM umschlossen und als Endosomen ins Zytosol abgeschnürt (Straubinger et al., 1983; Chin et al., 1989). Zur Freisetzung der liposomal verkapselten Wirkstoffe ins Zytosol, müssen diese nun neben der NPS-eigenen Lipiddoppelschicht noch die Endosomenmembran durchdringen.

Die von Csiszar et al. (2010) entwickelten fusogenen Liposomen bieten eine effiziente Alternative um liposomale Fracht in Zellen einzuschleusen. Im Unterschied zu herkömmlichen Liposomen erfolgt nach Kontakt mit Zellen keine Umschließung der Vesikel mit der PM, sondern eine Fusion der liposomalen mit der zellumschließenden Membran. Diese Fusion bewirkt eine Vermischung der Inhalte des Liposomenlumens mit dem Zytosol der Zelle.

Unter Verwendung dieser fusogenen Liposomen wurden bereits essentielle Membranlipide erfolgreich in Zellen inkorporiert (Kleusch et al., 2012). Später konnten 7-AAD Antibiotika (Deshpande, 2014), Lipopolysaccharide und Resveratrol in tierische Zellen eingebracht werden (Naumovska et al., 2014; Csiszar et al., 2015). Außerdem gelang der Transport funktionaler, wasserlöslicher Proteine (Kube et al., 2017). In der vorgelegten Arbeit werden fusogene Liposomen erstmals als Transportmittel für Anthracycline verwendet.

1.3 Anthracycline in Liposomen

Für chemotherapeutische Anwendungen wird DXR in Liposomen verpackt (Forsen und Tokes, 1983) und als antineoplastischer Wirkstoff verabreicht. Das Interkalieren von Anthracyclinen in Modellmembranen wird hauptsächlich von der Hydrophobie des Moleküls bestimmt (Gallois et al., 1996). Durch die Verkapselung von DXR in Liposomen wird der Anteil an freiem DXR im Blutkreislauf minimiert und die Zirkulationszeit des Wirkstoffs deutlich verlängert (Batist et al., 2002). Zudem war die Entwicklung wirkstoffresistenter Zellen reduziert. Es wird vermutet, dass DXR-beladene Liposomen aufgrund ihrer Größe schlechter in Herzmuskelgewebe eindringen als frei gelöste DNR-Derivate, wodurch sich die verminderte

Kardiotoxizität erklärt (Gill et al., 1995; James et al., 1994). Eine derartige Formulierung ist unter dem Namen Myocet[®] zur Behandlung solider Tumore im klinischen Einsatz.

Neben solchen „nackten“ Liposomen wurden PEG-modifizierte (*Stealth*-) Liposomen, Immunliposomen und PEG-modifizierte Immunliposomen entwickelt (siehe Kapitel I.3). Das Medikament Doxil[®] ist ein prominentes Beispiel für in PEG-modifizierten Liposomen verkapseltes DXR (Allen et al., 1993). Die Oberflächenmodifikation mit PEG bewirkt eine deutlich verlängerte Zirkulationszeit der Liposomen im Blut und vermindert die kardiotoxische Wirkung im Vergleich zu freiem DXR (Safra et al., 2000). Durch die Verwendung von Immunliposomen konnte *in vitro* eine verbesserte spezifische Bindung an Ovarienkrebszelllinien erreicht werden (Vingerhoeds et al., 1996), eine vergleichbare Verbesserung konnte *in vivo* jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Vorteile von verlängerter Zirkulationszeit (durch PEG) mit spezifischerer Bindung an Tumorgewebe (durch Oberflächenfunktionalisierung mit Antikörpern) werden bei PEG-modifizierten Immunliposomen miteinander verbunden. Durch die Funktionalisierung der Liposomen mit Fragmenten eines Antikörpers für Disialogangliosid konnten bereits erste Erfolge bei der Behandlung von Neuroblastomen im Mausmodell erzielt werden (Pastorino et al., 2003).

Die Verwendung von Liposomen zum Transport von ACL ist weit weniger beschrieben als es für DXR der Fall ist. Feng et al. (2015) zeigten kürzlich, dass ACL in PEG-modifizierten Liposomen im Tiermodell eine ebenfalls verlängerte Zirkulationszeit im Blutkreislauf ausweist. Die Liposomenoberfläche wurde zusätzlich mit einer Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure funktionalisiert, wodurch ein verbessertes Targeting und somit eine verbesserte Wirksamkeit erreicht werden konnte.

2 Ergebnisse

Um zu bestimmen, wie effizient Anthracycline aus den verschiedenen Formulierungen in Zellen transportiert werden, erfolgte die Behandlung von adhärenen MCF-10A und MDAMB-231 Zellen mit 0,01 – 10 μ M ACL bzw. 0,01 – 15 μ M DXR. Wirkstoffmatrix waren fusogene Liposomen der Zusammensetzung DOPE/DOTAP/DiR = 1/1/0,05 (w/w). Die mit ACL und DXR präparierten fusogenen Liposomen (FL-ACL bzw. FL-DXR) wurden mit Anthracyclin-gefüllten, endozytotischen Liposomen der Zusammensetzung DPPC/Cholesterol/PEG₂₀₀₀-DOPE/DiR = 9/3/3/0,05 (w/w) (EL-ACL bzw. EL-DXR) sowie frei in PBS gelöstem Wirkstoff verglichen. Um die Lokalisation der verschiedenen Wirkstoffe zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Formulierung mit dem Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die Analyse der zellulären Aufnahme der Anthracycline erfolgte am Konfokalmikroskop und mit dem Durchflusszytometer.

2.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Fluoreszenzsignals von Doxorubicin und Aclacinomycin A

Die fluoreszierenden Anthracycline Doxorubicin (DXR) und Aclacinomycin A (ACL) wurden in Umgebungen unterschiedlicher Polarität verwandt. Sie wurden entweder direkt in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) gelöst oder zusammen mit Liposomen verschiedener Zusammensetzung präpariert. Sowohl die fusogenen als auch endozytotischen Liposomen enthielten mit DiIC₁₈(7) einen Fluoreszenzmembranfarbstoff um die Aufnahmewege der Liposomen zu verfolgen. Abb IV.2 zeigt die Fluoreszenzspektren aller eingesetzten Formulierungen.

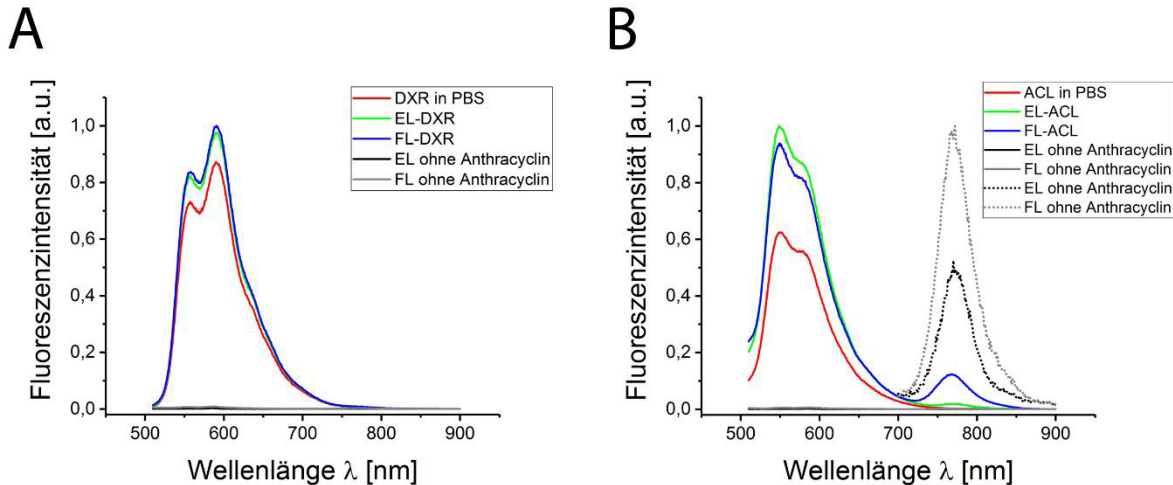


Abb IV.2: Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften von Doxorubicin (DXR) und Aclacinomycin A (ACL) in verschiedenen Umgebungen. **A:** Fluoreszenzspektren von frei in PBS gelöstem Doxorubicin (DXR in PBS), Doxorubicin in endozytotischen Liposomen (EL-DXR) und fusogenen Liposomen (FL-DXR). Zusätzlich wurden die Intensitäten beider Liposomentypen in Abwesenheit der Wirkstoffe detektiert. **B:** Fluoreszenzspektren der verschiedenen Aclacinomycin A Formulierungen (ACL in PBS, EL-ACL und FL-ACL). Die Anregung erfolgte in **A** und **B** bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm, für gepunktet gezeichnete Spektren in **B** bei $\lambda_{\text{Ex}} = 633$ nm.

Nach Anregung wurden bei allen DXR-haltigen Proben zwei Fluoreszenzmaxima beobachtet. Das erste Maximum lag bei $\lambda_{\text{Em}1} = 558$ nm, das zweite Maximum bei $\lambda_{\text{Em}2} = 591$ nm (Abb IV.2, A). Das Verhältnis der zugehörigen Intensitäten $I_{\text{max}1}/I_{\text{max}2}$ lag in allen Proben bei etwa 0,83. Sowohl die Intensitäten als auch die Form der Spektren blieben von den verschiedenen Umgebungen unbeeinflusst. Ohne Anthracyclin in der Probe wurde bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm sowohl für fusogene als auch für endozytotische Liposomen ein Fluoreszenzsignal vergleichbar mit dem PBS-Hintergrundsignal detektiert.

Alle ACL-haltigen Proben zeigten eine Emission zwischen 500 nm und 700 nm. Das Maximum war bei $\lambda_{\text{Em}} = 550$ nm, bei etwa $\lambda_{\text{Em}} = 590$ nm war eine Schulter sichtbar (Abb IV.2, B). Die Fluoreszenzintensitäten von ACL in beiden Liposomentypen wiesen eine zeitliche Abhängigkeit auf (Anhang 1). Die Messung der mit ACL geladenen fusogenen- (FL-ACL) und endozytotischen Liposomen (EL-ACL) zeigte ein weiteres Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{Em}} = 770$ nm. Dieses Maximum im roten Spektralbereich ($\lambda_{\text{Em}} = 770$ nm) wurde für beide DiIC18(7)-haltigen Liposomen auch bei Anregung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 633$ nm detektiert (Abb IV.2, B, gepunktet). Die Intensität des zweiten Maximums war in FL-ACL (Abb IV.2, B, blau) etwa sechsmal höher als in EL-ACL (Abb IV.2, B, grün).

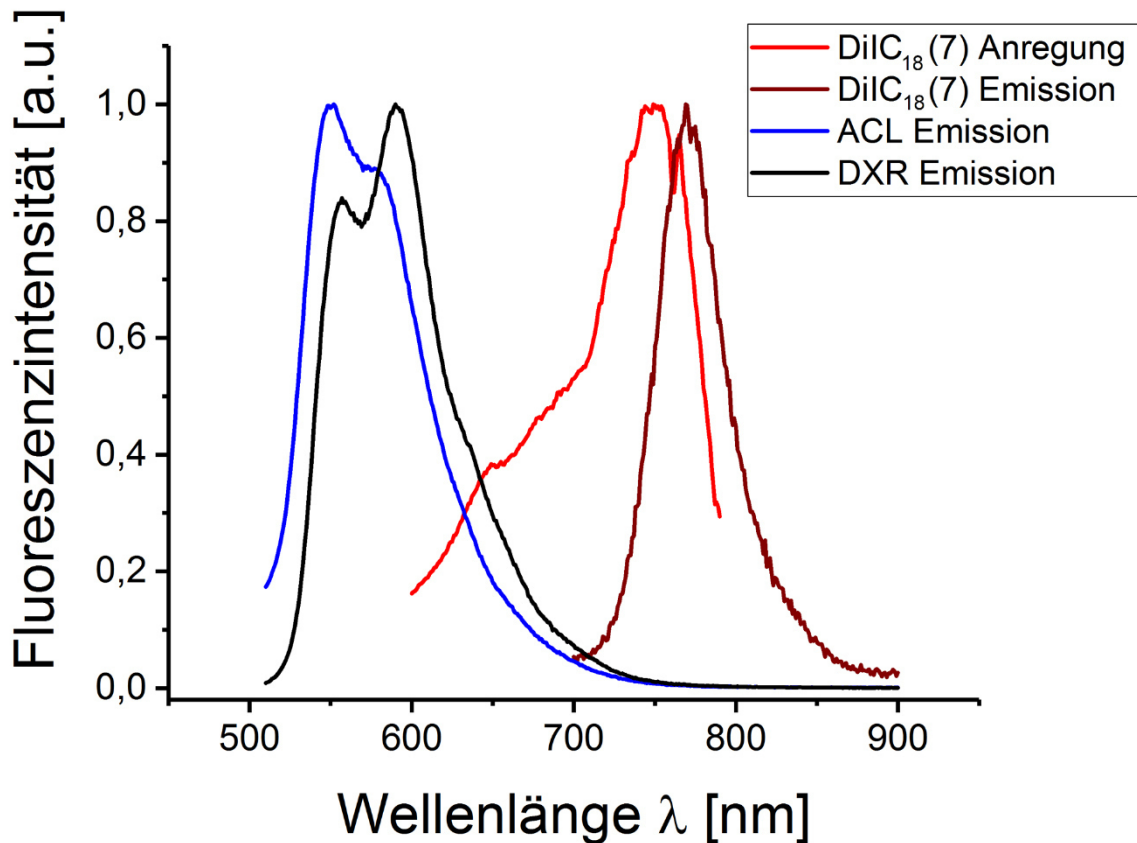


Abb. IV.3: Emissionsspektren von Doxorubicin und Aclacinomycin A, sowie Anregungsspektrum und Emissionsspektrum von DiIC₁₈(7).

Um festzustellen ob ein Energietransfer zwischen den untersuchten Anthracyclinen und dem amphipatischen Fluoreszenzfarbstoff DiIC₁₈(7) möglich ist, wurden die Emissionsspektren von DXR und ACL und das Anregungsspektrum von DiIC₁₈(7) aufgenommen. Wie die Abb. IV.3 zeigt, wurde ein spektraler Überlapp zwischen den Emissionsspektren von DXR und ACL und dem Absorptionsspektrum von DiIC₁₈(7) detektiert.

2.2 Mikroskopische Untersuchung der zellulären Aufnahme von Anthracyclinen

DXR und ACL zeigten bei Anregung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm eine Emission zwischen 500 nm und 700 nm. Mithilfe dieser Eigenschaft lässt sich mikroskopisch untersuchen, wo sich der jeweilige Wirkstoff nach der Zugabe innerhalb einer Zelle anreichert (Teillaud et al., 1998). Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ACL und DXR in fusogenen Liposomen der Zusammensetzung DOPE/DOTAP/DiIC₁₈(7) im Verhältnis von 1:1:0,05 (w/w) präpariert und Zellen der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 behandelt. Während dieser zehnmütigen

Behandlung wurde die erfolgreiche Fusion der Liposomen anhand einer homogenen Färbung der PM der Zellen durch DiIC₁₈(7) identifiziert. Die Ergebnisse von FL-DXR, bzw. FL-ACL wurden mit der Behandlung durch in PBS gelöstem Anthracyclin verglichen. Die eingesetzten Konzentrationen für DXR (7,5 µM) bzw. ACL (3 µM) lagen über den für MDAMB-231 Zellen ermittelten IC₅₀-Werten von 3,3 (DXR in PBS, siehe Abb. II.5) bzw. 1,4 (ACL in PBS, siehe Abb. IV.9) und waren mit dem Konfokalmikroskop (engl. *confocal laser scanning microscope*, cLSM) gut detektierbar. Die Versuche dienten zur Dokumentation der Aufnahme von ACL und DXR und ihrer subzellulären Lokalisation. Außerdem sollte der Einfluss der fusogenen Liposomen auf die Aufnahme der Wirkstoffe gezeigt werden.

2.2.1 Zelluläre Aufnahme von Doxorubicin

Die Zugabe von DXR in PBS bzw. FL-DXR zu adhärenen MDAMB-231 Zellen erfolgte bei zeitgleicher Beobachtung im cLSM. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die jeweilige Formulierung durch frisches Medium ersetzt und die Probe nach 24 h erneut mikroskopiert.

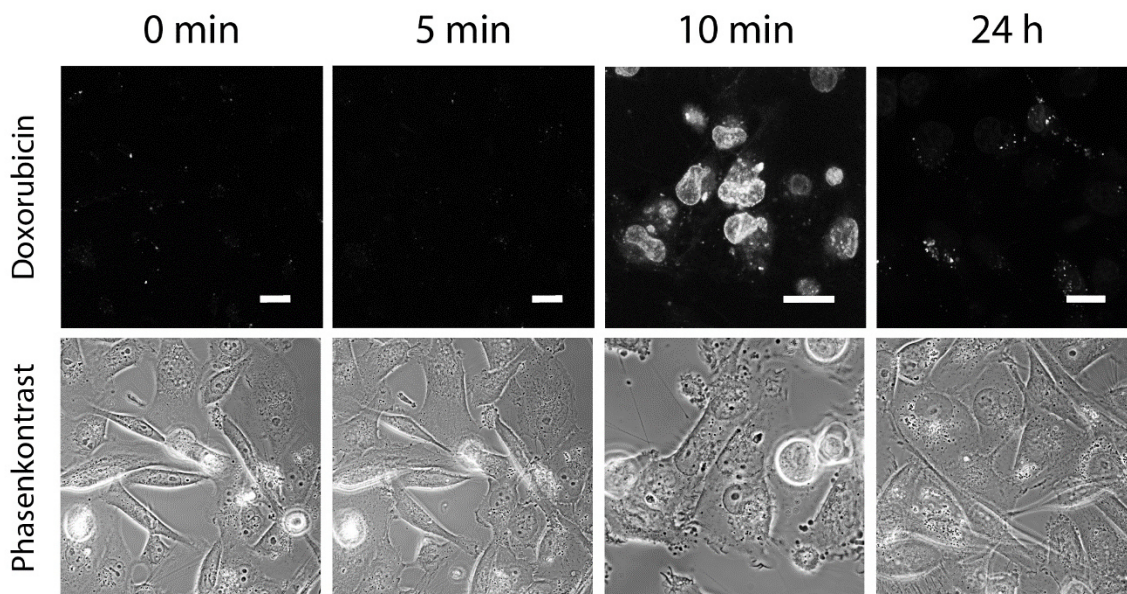


Abb IV.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Anthracyclin-Signals vor (0 min), während (5 min) und nach (10 min, 24 h) der Behandlung durch in PBS gelöstem Doxorubicin (DRX). Nach der Inkubation (10 min) konnte eine Anreicherung des DRX im Nukleus beobachtet werden. 24 h nach der Behandlung zeigt sich eine Anreicherung in vesikulären Einschlüssen der MDAMB-231 Zellen. Maßstab = 20 µm.

Die zur Detektion von DXR notwendigen Einstellungen des cLSM wurden durch Vorexperimente ermittelt. Schon vor Zugabe von DXR waren eine schwache, punktförmige Autofluoreszenz in den Zellen zu sehen (Abb IV.4, 0 min). Auch nach 5 min, also während der Applikation von 7,5 μ M DXR in PBS konnte kein zusätzliches grün-fluoreszentes Signal innerhalb der Zellen detektiert werden (Abb IV.4, 5 min). Nach einer Inkubationszeit von 10 min und dem Austausch der DXR-Lösung mit frischem Medium zeigte sich ein starkes Signal im Zellkern (Abb IV.4, 10 min). Darüber hinaus konnte eine Einlagerung in direkter Umgebung des Zellkerns beobachtet werden. Im Zytosol verteilt traten vermehrt punktförmige Signale in vesikulären Einschlüssen auf. Nach 24 h wies die Fluoreszenz innerhalb dieser Einschlüsse eine verstärkte Intensität auf. Die Färbung der Zellkerne war nur noch schwach oder nicht mehr detektierbar (Abb IV.4, 24 h).

Die Mikroskopaufnahmen in Abb IV.5 zeigen die Wirkstoffaufnahme durch FL-DXR. Die Einstellungen des Mikroskops wurden gegenüber der in Abb IV.4 gezeigten Aufnahmen nicht verändert. Die Fokusebene wurde erneut so gewählt, dass sowohl der Nukleus als auch die PM der MDAMB-231 Zellen sichtbar waren.

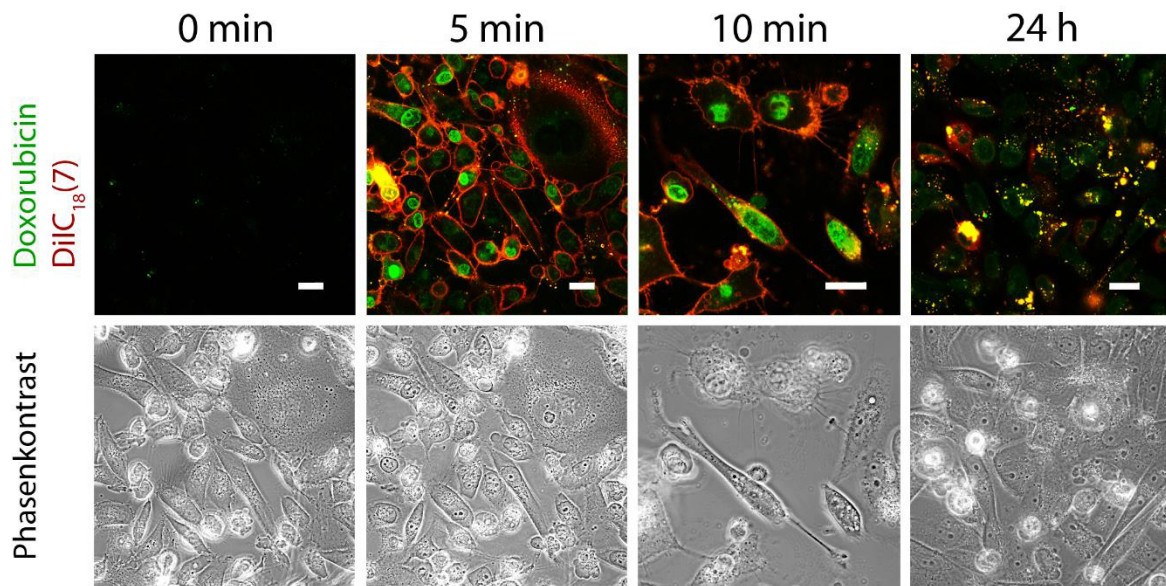


Abb IV.5: Fusogene Liposomen zum Transport von Doxorubicin. Adhärenente MDAMB-231 Zellen wurden durch Zugabe der Liposomensuspension mit $7,5 \mu\text{M}$ Doxorubicin für 10 min behandelt. Die obere Zeile zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von DiIC₁₈(7) (rot) und Doxorubicin (grün). Kolokalisation der beiden Signale werden durch gelbe Färbung dargestellt. Die untere Zeile zeigt die zugehörigen Bildausschnitte im Phasenkontrast. Sowohl während (5 min) als auch direkt nach der Inkubation (10 min) zeigte sich eine grüne Färbung der Nuklei und eine rote Färbung der zellulären Plasmamembranen. Nach 24 h konnte eine abgeschwächte Doxorubicin-Färbung des Zellkerns, sowie ein kolokalisiertes Fluoreszenzsignal mit DiIC₁₈(7) in vesikulären Einschlüssen beobachtet werden. Maßstab = $20 \mu\text{m}$.

Schon wenige Sekunden nach Zugabe der DXR-geladenen Liposomen konnten die ersten Fusionsereignisse mit der PM der adhärenente MDAMB-231 Zellen detektiert werden (Abb. im Anhang.). Nach 5 min Behandlung wies die PM aller Zellen eine homogene rote Färbung auf (Abb IV.5, 5 min). Diese Signalverteilung ist charakteristisch für die erfolgreiche Membranfusion (Csiszar et al., 2010; Braun et al., 2016; Kleusch et al., 2012). Im Anschluss eines Fusionsereignisses konnte beobachtet werden, dass das DXR- Fluoreszenzsignal zuerst in kernnahe Strukturen aufgenommen wurde, worauf eine deutliche Aufkonzentration im Nukleus folgte. Nach Ersetzen der Liposomensuspension mit frischem Nährmedium zeigten die MDAMB-231 Zellen im Emissionsbereich von DXR eine intensive Färbung der Zellkerne und eine im Vergleich schwächere Färbung zytosolischer Strukturen nahe des Zellkerns. Darüber hinaus war die PM der Zellen mit einer homogenen Färbung im tiefroten Bereich versehen (Abb IV.5, 10 min). 24 h nach der Behandlung deutete die gelbe Färbung in der Überlagerung der beiden Detektionskanäle auf eine Kolokalisation von DiIC₁₈(7) und DXR hin. Diese trat überwiegend punktförmig, in endosomalen Einschlüssen auf. Des Weiteren

konnte DXR in den Kernen der adhärenen MDAMB-231 Zellen visualisiert werden (Abb IV.5, 24 h).

Unabhängig von der Behandlungsmethode konnte beobachtet werden, dass MDAMB-231 Zellen keine starke Verbindung zum Substrat aufwiesen und mehrfaches Wechseln der umgebenden Flüssigkeiten zu leichtem Ablösen der Zellen vom Untergrund führte. Wenige Stunden nach solchen Medienwechseln konnte die erneute Aufspaltung der Zellen auf dem Glassubstrat beobachtet werden. Nach zehnminütiger Behandlung mit EL-DXR konnten weder in MCF-10A noch in MDAMB-231 Zellen aufgenommene Liposomen beobachtet werden.

2.2.2 Zelluläre Aufnahme von Aclacinomycin A

Zur Verfolgung des Fluoreszenzsignals von ACL wurden 3 μ M des Zytostatikums in PBS gelöst, bzw. zusammen mit fusogenen Liposomen präpariert. Nach zehnminütiger Applikation auf adhärenente Zellen der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 wurde die Flüssigkeit durch Nährmedium ersetzt. Während und nach der Behandlung wurden die eingebrachten Fluorophore mit dem cLSM detektiert.

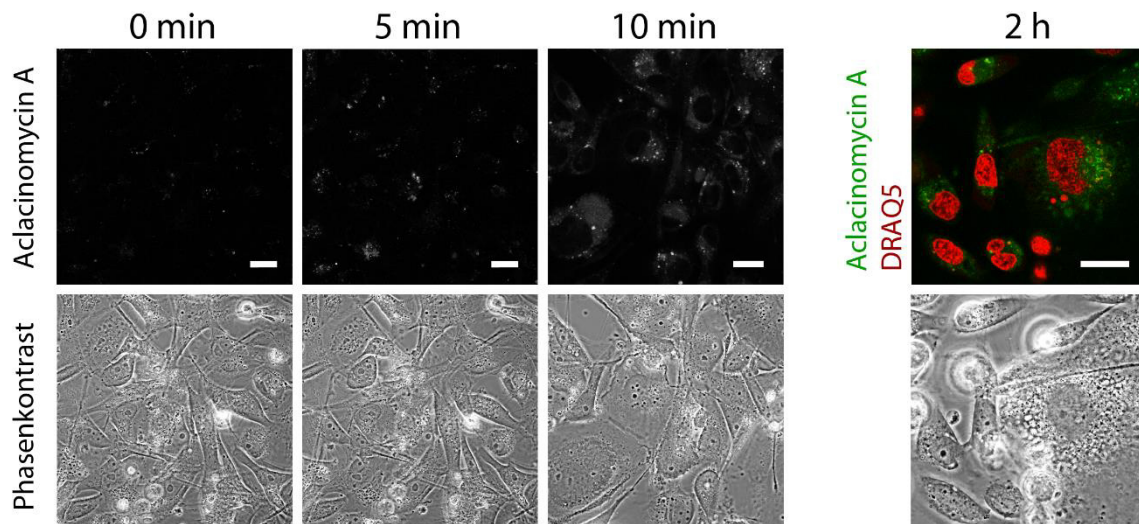


Abb. IV.6: Lokalisierung des Fluoreszenzsignals von Aclacinomycin A vor (0 min), während (5 min) und nach (10 min, 2 h) der Behandlung von MDAMB-231 Zellen durch in PBS gelöstes Aclacinomycin A. Die obere Zeile zeigt den Fluoreszenzkanal von Aclacinomycin A, bzw die Überlagerung von Aclacinomycin A und der Kernfärbung durch DRAQ5 (2 h, rot). Die untere Zeile zeigt die zugehörigen Bildausschnitte im Phasenkontrast. Kolokalisation der Signale von Aclacinomycin A und DRAQ5 wird durch gelbe Färbung dargestellt. Maßstab = 20 μ m.

Vor der Zugabe von ACL in PBS konnten vereinzelt punktförmige Autofluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. IV.6, 0 min). Während der Behandlung mit der ACL-Lösung stieg das intrazelluläre Fluoreszenzsignal an. Nach dem Austausch mit Medium konnte eine homogene grüne Färbung eines kernnahen Organells, sowie punktförmige, im Zytosol verteilte Signale festgestellt werden (Abb. IV.6, 10 min). Nach 2 h wurde der Kern durch Färbung mit DRAQ5 markiert (Abb. IV.6, 2 h). In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von ACL und DRAQ5 sind kaum gelbe Bereiche zu sehen. Eine Lokalisation von ACL im Nukleus lag demnach nicht vor.

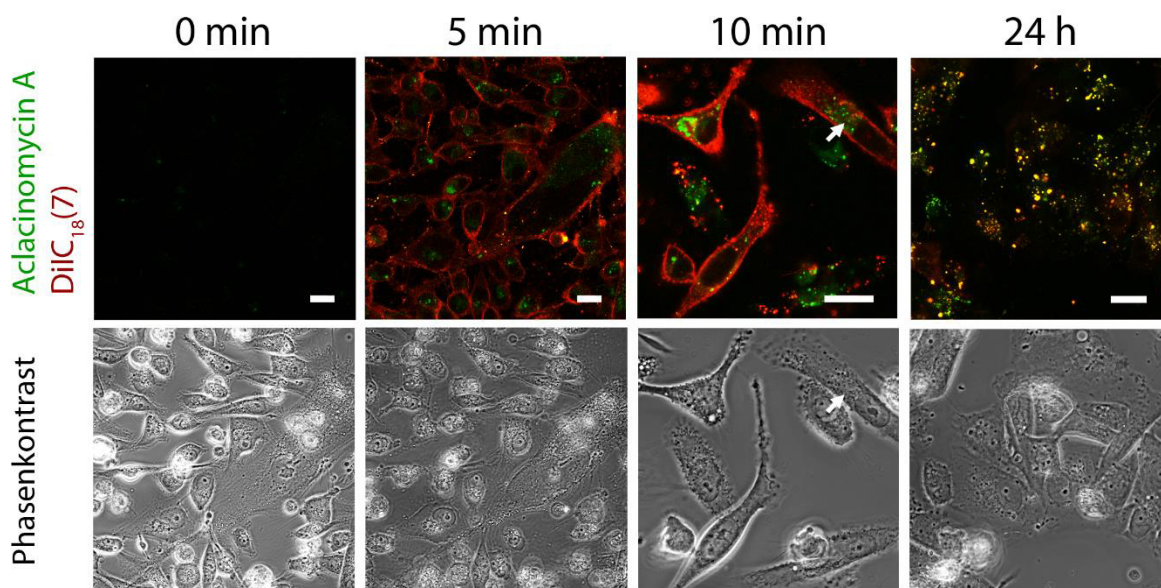


Abb. IV.7: Transport von Aclacinomycin A durch fusogene Liposomen in adhärenente MDAMB-231 Zellen. Die obere Zeile zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle von Aclacinomycin A (grün) und DiIC₁₈(7) (rot). Lokale Überlagerungen der beiden Kanäle werden in gelber Farbe dargestellt. Die untere Zeile zeigt die entsprechende Bildausschnitte im Phasenkontrast. Im Anschluss an die Behandlung wurde eine Anreicherung des Anthracyclins in einem dem Nukleus vorgelagertem Kompartiment sichtbar (10 min, weißer Pfeil). Nach 24 h konnte ein kolokalisiertes Fluoreszenzsignal von ACL mit DiIC₁₈(7) in vesikulären Einschlüssen beobachtet werden. Maßstab = 20 μ m.

Noch während Behandlung der Brustkrebszellen der Linie MDAMB-231 mit FL-ACL konnten viele Fusionsereignisse beobachtet werden. Dadurch wurde die PM aller Zellen gleichmäßig rot gefärbt (Abb. IV.7, 5 min). Die Zellen wiesen nur selten DiIC₁₈(7) und ACL-Signal an gleicher Stelle auf. ACL war überwiegend im Zytosol der Zellen lokalisiert. Im Anschluss an die Behandlung konzentrierte sich das ACL-Signal in einer dem Kern vorgelagerten Struktur

(Abb. IV.7, 10 min, weißer Pfeil). Nach 24 h wurden DiIC₁₈(7)- und ACL-Signal vermehrt kolokalisiert in vesikulären Einschlüssen detektiert.

2.3 Zytotoxische Effekte von Doxorubicin und Aclacinomycin A

Die zytotoxischen Effekte von DXR und ACL auf MDAMB-231 und MCF-10A Zellen wurden anhand der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) der verschiedenen Behandlungsmethoden untersucht. Die IC₅₀-Werte wurden mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Alle im Folgenden dargestellten IC₅₀-Werte sind die relative halbmaximale Konzentration der jeweiligen Testsubstanz.

2.3.1 IC₅₀-Werte von Doxorubicin

Nach Behandlung von MCF-10A Zellen mit DXR in PBS konnte ein IC₅₀-Wert von $2,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) ermittelt werden. Der IC₅₀-Wert für EL-DXR ($3,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$) lag leicht oberhalb, der für FL-DXR ($1,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$) unterhalb der nicht-liposomalen Wirkstofflösung. Die IC₅₀-Werte von mit DXR behandelten MDAMB-231 Zellen lagen bei $3,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (DXR in PBS), $5,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (EL-DXR) und $2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (FL-DXR) und folgten somit einem vergleichbaren Trend (Abb IV.8).

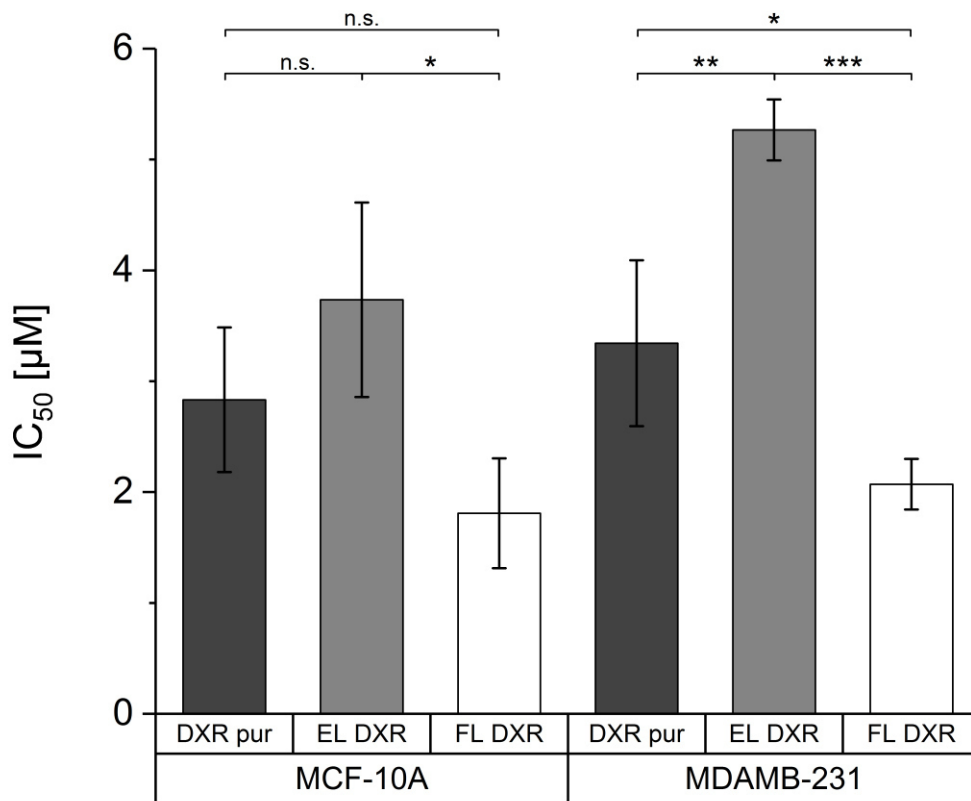


Abb IV.8: Zytotoxizitätsvergleich verschiedener Doxorubicin-Formulierungen nach Behandlung der Zelllinien MCF-10A und MDAMB-231. Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) von frei in PBS gelöstem Doxorubicin (DXR pur), Doxorubicin in endozytotischen Liposomen (EL-DXR) und Doxorubicin in fusogenen Liposomen (FL-DXR). Gezeigt werden die Mittelwerte \bar{x} von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung σ_x an.

Sowohl MCF-10A als auch MDAMB-231 Zellen zeigten nach einer zehnminütigen Behandlung eine niedrigere Sensitivität gegenüber EL-DXR, als gegenüber in PBS gelöstem DXR. Die inhibitorischen Konzentrationen für MDAMB-231 Zellen unterschieden sich signifikant ($p \leq 0,01$). Das Verhältnis der IC_{50} -Werte von DXR in PBS : EL DXR betrug etwa 0,63 (MDAMB-231) bzw. 0,75 (MCF-10A); das Verhältnis von DXR in PBS : FL-DXR lag für beide Zelltypen bei etwa 1,6. Beide Zelllinien reagierten somit auf die Behandlung mit FL-DXR, DXR in PBS und EL-DXR mit absteigender Sensitivität. Im Vergleich zeigten MDAMB-231 Zellen eine höhere Resistenz gegenüber DXR als MCF-10A Zellen.

2.3.2 IC₅₀-Werte von Aclacinomycin A

Die anhand MCF-10A Zellen ermittelte halbmaximalen Aktivitäten von ACL lagen bei Konzentrationen von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (ACL in PBS), $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (EL-ACL) und $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (FL-ACL). Die IC₅₀-Werte von MDAMB-231 Zellen entsprachen $1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (ACL in PBS), $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (EL-ACL) und $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (FL-ACL) (Abb. IV.9).

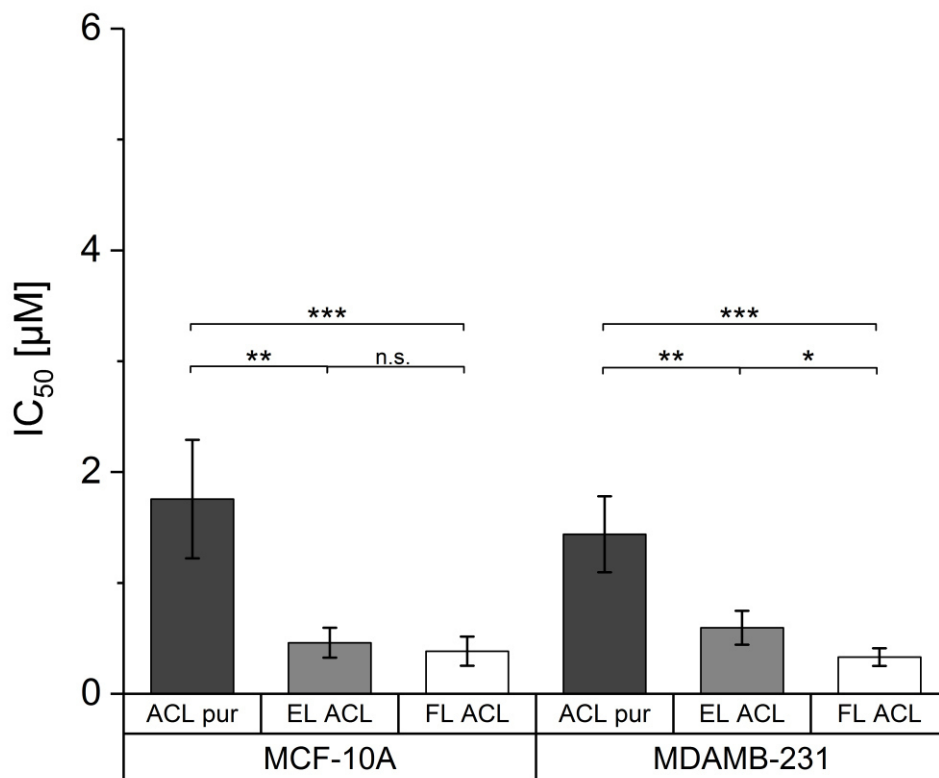


Abb. IV.9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) von frei in PBS gelöstem Aclacinomycin A (ACL in PBS), Aclacinomycin A in endozytotischen Liposomen (EL-ACL) und in fusogenen Liposomen (FL-ACL). Gezeigt werden die Mittelwerte \bar{x} von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen σ_x an.

Für die Zelllinien MCF-10A und MDAMB-231 konnten vergleichbare Sensitivitäten gegenüber ACL festgestellt werden. Die verschiedenen Formulierungen von ACL waren jedoch signifikant unterschiedlich. Für MCF-10A Zellen lag der IC_{50} -Wert von ACL in PBS etwa 3,8-mal höher als für EL-ACL bzw. 4,6-mal höher als für FL-ACL (Abb. IV.9, links; $p < 0,01$ für EL-ACL; $p < 0,001$ für FL-ACL). Die Zellen der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 zeigten verglichen mit ACL in PBS eine etwa 2,4-mal höhere Sensitivität für EL-ACL bzw. eine etwa

4,4-mal höhere Sensitivität für FL-ACL (Abb. IV.9, rechts). Die Resistenz der MDAMB-231 Zellen gegen ACL in PBS ist somit signifikant höher als gegen EL-ACL ($p < 0,01$) und FL-ACL ($p < 0,001$). Die IC_{50} -Werte von FL-ACL sind außerdem signifikant niedriger als die von EL-ACL ($p < 0,05$).

Beide Zelllinien zeigten eine höhere Resistenz gegen DXR als gegen ACL. Außerdem waren beiden Zelllinien sensitiver gegenüber in fusogenen Liposomen präpariertem, als frei in PBS gelöstem Anthracyclin. Sowohl für MCF-10A, als auch MDAMB-231 Zellen zeigt FL-ACL die größte Wirksamkeit.

2.3.3 Maximalaktivität von Doxorubicin und Aclacinomycin A

Die hier eingesetzten Anthracyclinkonzentrationen zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $15 \mu\text{M}$ führten nach der beprobten Zeit weder bei MCF-10A noch bei MDAMB-231 Zellen zur Annäherung an die absolute Maximalaktivität. Unabhängig von der Formulierung schwankte die Maximalaktivität von DXR um 0,82 bei MDAMB-231 Zellen, bzw. 0,88 bei MCF-10A Zellen. Die Maximalaktivität von ACL schwankte um 0,76 bei MDAMB-231 Zellen, bzw. um 0,84 bei MCF-10A Zellen (Tabelle IV.1).

Tabelle IV.1: Maximalaktivität von Doxorubicin und Aclacinomycin A in PBS, fusogenen Liposomen und endozytotischen Liposomen nach Behandlung der Zelllinien MCF-10A und MDAMB-231. Angegeben sind die Mittelwerte \bar{x} von mindestens drei unabhängigen Experimenten, sowie die Standardabweichung σ_x .

Formulierung	Maximalaktivität Doxorubicin				Maximalaktivität Aclacinomycin A			
	MDAMB-231		MCF-10A		MDAMB-231		MCF-10A	
	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x
Gelöst in PBS	0,83	± 0,027	0,87	± 0,041	0,75	± 0,066	0,83	± 0,064
Endozytotische Liposomen	0,78	± 0,092	0,91	± 0,015	0,71	± 0,008	0,81	± 0,052
Fusogene Liposomen	0,84	± 0,044	0,87	± 0,034	0,81	± 0,022	0,88	± 0,067

2.4 Einfluss von Anthracyclinen auf Apoptose

Sowohl DXR als auch ACL löste in MCF-10A und in MDAMB-231 Zellen Apoptose aus. Die damit einhergehenden Veränderungen wurden mithilfe des Guava Nexin Assays gefärbt im

Durchflusszytometer quantifiziert. Die Zellen wurden dazu zeitgleich mit zwei verschiedenen Farbstoffen gefärbt. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, welches in frühen Stadien der Apoptose auf die extrazelluläre Seite der PM transferiert wird. Diese frühapoptotischen Zellen wurden mit an Annexin V konjugiertes Phycoerythrin (PE) markiert. Bei einer starken Färbung der Zellen wurde eine Verschiebung der Population im gelben Kanal sichtbar. 7-Aminoactinomycin-D (7-AAD) ist ein Fluorophor, welcher nur in Zellen mit durchlässiger Membran eindringen kann. Bei spätapoptotischen und toten Zellen geht die PM-Integrität verloren, weswegen diese Zellen durch 7-AAD mit roter Fluoreszenz gefärbt werden (Abb. IV.10, Gating). Da auch unbehandelte Zellpopulationen apoptotische Anteile aufweisen, wurden die Ergebnisse von behandelten und unbehandelten Zellen miteinander verglichen.

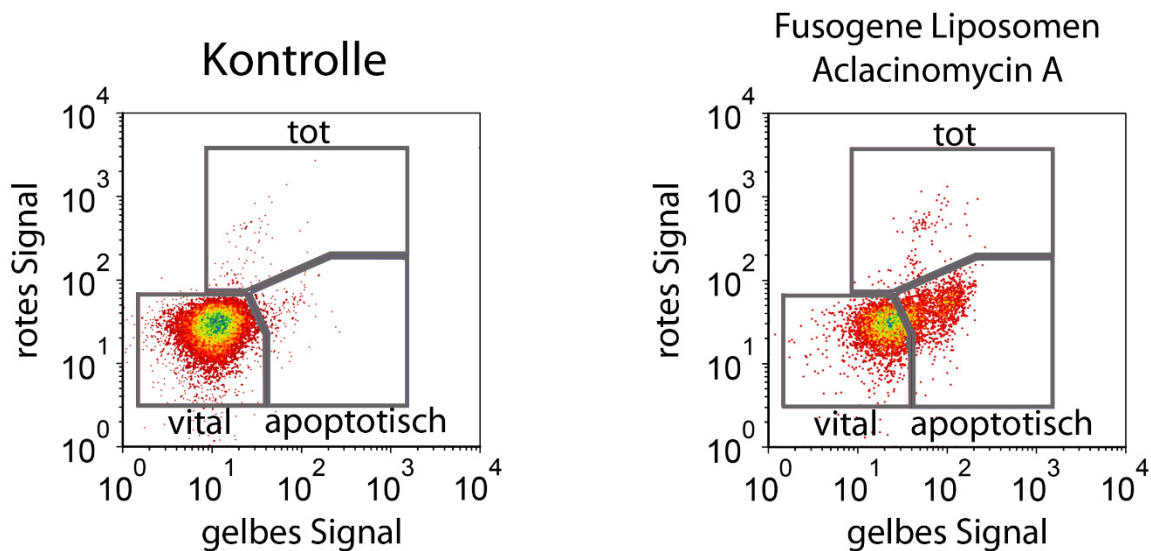


Abb. IV.10: Durchflusszytometrische Analyse der Guava Nexin-Färbung. Abgebildet sind repräsentative Dichtediagramme von unbehandelten MCF-10A Zellen (links) und mit in fusogenen Liposomen verkapseltem Aclacinomycin A behandelten MCF-10A Zellen (rechts). Die definierte Region für gesunde Zellen wurde anhand einer unbehandelten aber Guava Nexin-gefärbten Population bestimmt (Region „vital“). Ansteigende gelbe Fluoreszenz indiziert die Markierung apoptotischer Zellen durch Annexin V (Region „apoptotisch“). Spätapoptotische und tote Zellen wurden durch die rotfluoreszente Markierung mit 7-Aminoactinomycin-D detektiert (Region „tot“).

Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte der verschiedenen Formulierungen wurde DXR und ACL in Konzentrationen zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $15 \mu\text{M}$ eingesetzt. Für jede eingesetzte Konzentration wurde das Ausmaß der ausgelösten Apoptose mittels Guava Nexin Färbung bestimmt (Abb.

IV.11). Der Anteil 7-AAD-positiv markierter Zellen blieb unabhängig von der eingesetzten DXR- und ACL-Konzentration unter 5%.

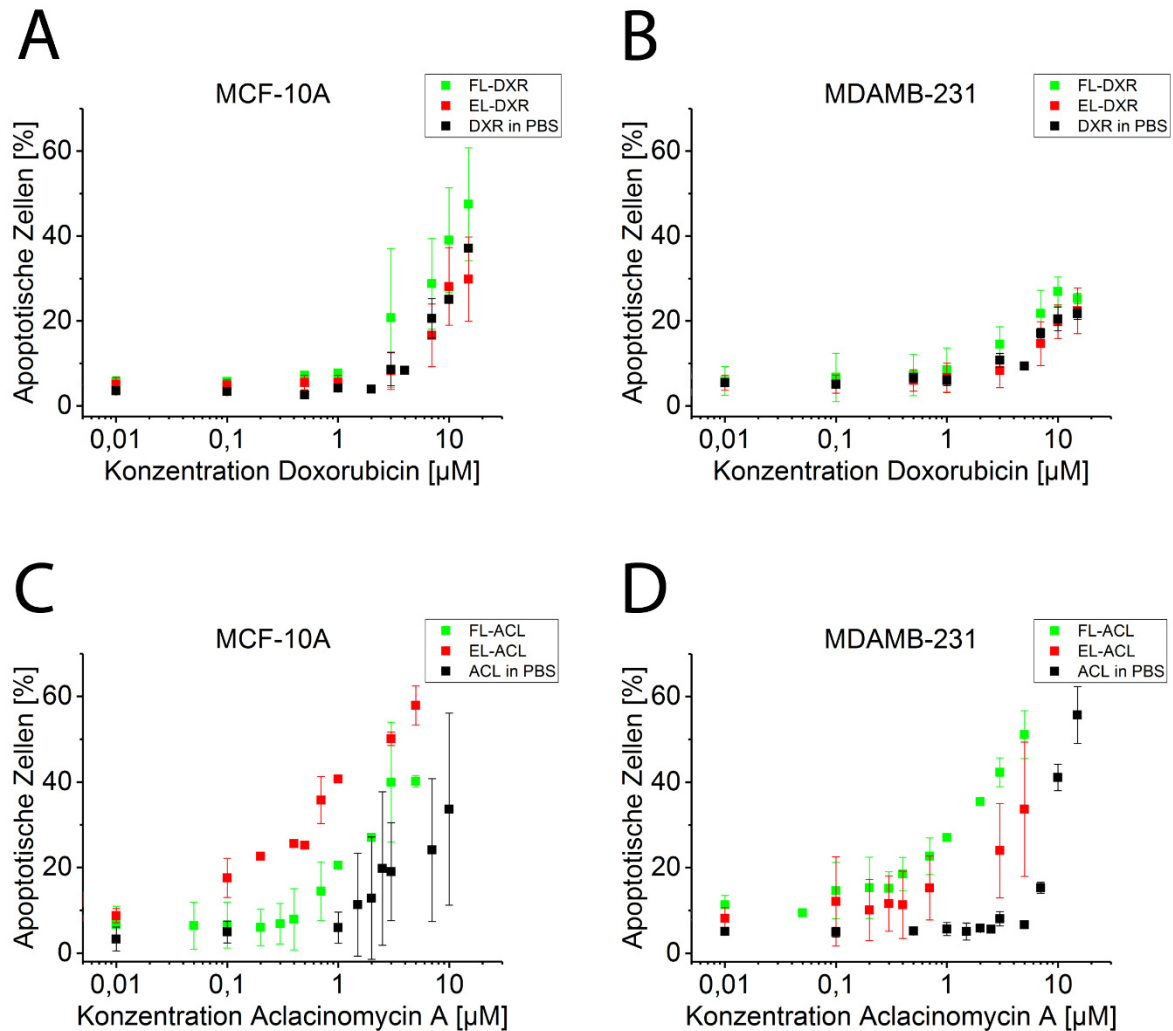


Abb. IV.11: Einfluss von Doxorubicin und Aclacinomycin A auf die Apoptose von MCF-10A (A, C) und MDAMB-231 Zellen (B, D). Annexin V-positiv markierte Zellen nach Behandlung mit in endozytotischen und fusogenen Liposomen präpariertem, sowie frei gelöstem Doxorubicin (A, B) und Aclacinomycin A (C, D).

Jede der eingesetzten Formulierungen löste mit ansteigender DXR-Konzentration eine wachsende Apoptoseantwort von MCF-10A und MDAMB-231 Zellen aus. Die Behandlung von MCF-10A Zellen mit FL-DXR, EL-DXR und DXR zeigten vergleichbare Apoptoseantworten von bis zu $48 \pm 13\%$ (FL-DXR). Die Wirkung der drei Formulierungen unterschied sich nicht signifikant (Abb. IV.11, A). Mit gleicher Formulierungsstrategie

behandelte MDAMB-231 Zellen zeigten ebenfalls nicht signifikant unterschiedliche Apoptoseantworten. Der maximale Anteil an apoptotischen Zellen lag bei $25 \pm 1\%$ (Abb. IV.11, B). MDAMB-231 Zellen wiesen also eine geringere Sensitivität gegenüber DXR auf als MCF-10A Zellen. Unabhängig von Formulierung und Zelltyp konnten erst ab einer DXR-Konzentration von $3 \mu\text{M}$ ansteigende Anteile apoptotischer Zellen detektiert werden.

Die epitheliale Zelllinie MCF-10A zeigte die größte Sensitivität gegenüber EL-ACL. Bei einer eingesetzten Konzentration von $0,7 \mu\text{M}$ waren $36 \pm 5\%$ der Zellen apoptotisch. Bei gleicher Konzentration in FL-DXR lag der Wert bei $15 \pm 7\%$. In PBS gelöstes ACL zeigte erst oberhalb von $1 \mu\text{M}$ ansteigende Wirkung auf die Apoptoseantwort (Abb. IV.11, C). Wurde die Brustkrebszelllinie MDAMB-231 mit in PBS gelöstem ACL behandelt, konnten erst ab $7 \mu\text{M}$ Wirkstoff ansteigende Fraktionen apoptotischer Zellen detektiert werden. Die Sensitivität für FL-ACL lag über der für EL-ACL. Nach Verkapselung von $3 \mu\text{M}$ Wirkstoff bewirkten FL-ACL $42 \pm 3\%$ und EL-ACL $24 \pm 11\%$ apoptotische Zellantworten. Die gleiche Menge ACL in PBS resultierte in $8 \pm 2\%$ apoptotische Zellen, ein vergleichbarer Wert konnte bei unbehandelten Zellen detektiert werden ($7 \pm 2\%$) (Abb. IV.11, D).

Im Vergleich zeigte die Zelllinie MDAMB-231 eine größere Resistenz gegenüber ACL als MCF-10A. Durch Behandlung von MCF-10A Zellen mit EL-ACL wurde eine stärkere Apoptose ausgelöst als mit FL-ACL.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurden fusogene Liposomen dazu verwendet, die beiden Anthracycline Doxorubicin (DXR) und Aclacinomycin A (ACL) in Zellen vom Typ MCF-10A und MDAMB-231 einzuschleusen. Friche et al. (1990) zeigten anhand von Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol/Puffer bzw. Pentanol/Puffer, dass DXR trotz ähnlicher molekularer Struktur deutlich weniger lipophil als ACL ist. Die physikalischen Eigenschaften der beiden Anthracycline lassen darauf schließen, dass ACL effektiv in die Lipiddoppelschicht interkaliert, während sich DXR an die Grenzfläche zwischen Lipiden und wässriger Umgebung assoziiert (de Wolf et al., 1991). Ziel dieser Arbeit ist es zu vergleichen, wie effizient die Wirkstoffe mithilfe von fusogenen und endozytotischen Liposomen sowie aus einer Pufferlösung in Zellen eingeschleust werden.

Endozytotische Liposomen werden nach Applikation von der PM der Zielzelle umschlossen und ins Zytosol abgeschnürt. Um die Wirkung verkapselter Stoffe zu ermöglichen, müssen sie anschließend durch die Endosomenmembran ins Zytosol gelangen (Gilleron et al., 2013). Der Gebrauch solcher Liposomen ist *in vivo* und *in vitro* etabliert und dient beispielsweise zum Transport von hydrophoben Wirkstoffen, wie z.B. DXR (Allen et al., 1993). Die Aufnahme fusogener Liposomen folgt einem anderen Prinzip. Bei Kontakt mit der Zelle werden die Lipide von Liposomenmembran und PM durch Fusion miteinander gemischt (Csiszar et al., 2010). Der Liposomeninhalt kann dadurch direkt ins Zytosol ausgeschüttet werden. Die Aufnahme der Liposomen durch Fusion folgt einer deutlich schnelleren Kinetik als die Aufnahme durch Endozytose (Levchenko et al., 2003; Kakudo et al., 2004; Kleusch et al., 2012).

3.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Emissionsspektren der verwendeten Anthracyclin-Formulierungen erlauben Rückschlüsse auf die Lokalisation von ACL und DXR in FL bzw. EL. Beide Liposomentypen enthielten dieselben Anteile des membranständigen Fluoreszenzfarbstoffs DiIC₁₈(7). Alle ACL-haltigen Proben zeigten nach Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{Em}} = 550$ nm. Obwohl die Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm außerhalb des Anregungsspektrums von DiIC₁₈(7) lag, konnte bei FL-ACL und EL-ACL ein zweites Maximum bei $\lambda_{\text{Em}} = 770$ nm detektiert werden (Abb IV.2, B). Der Überlapp des Emissionsspektrums von ACL mit dem Anregungsspektrum von DiIC₁₈(7) (Abb. IV.3) ermöglicht einen Energietransfer. Voraussetzung hierfür ist direkte räumliche Nähe (maximal 10 nm) von Donor (ACL) und

Akzeptor (DiIC₁₈(7)) (Stryer, 1978; Förster, 1948). Die höhere Intensität des zweiten Emissionsmaximums in FL-ACL legt nahe, dass die Lipidzusammensetzung der FL eine effizientere Einmischung von ACL in die Membran erlaubt, als es bei EL-ACL der Fall ist.

Unabhängig von Position und Intensität des zweiten Emissionsmaximums konnte eine zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von ACL in Liposomen als Trägermatrix beobachtet werden. Ein vergleichbares Phänomen ist in der Literatur nicht beschrieben. Um eine Hypothese zur Ursache zu formulieren sind weitere Untersuchungen notwendig. Möglicherweise ist der Einfluss von ACL auf das Emissionsspektrum der beladenen Liposomen abhängig von der eingesetzten ACL-Konzentration.

DXR-haltige Liposomen zeigten keine zeitliche Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals. Die beiden Emissionsmaxima von DXR lagen bei 558 nm (λ_{Em1}) und 591 nm (λ_{Em2} ; Abb IV.2, A). Der Quotient der zugehörigen Intensitäten I_{max1}/I_{max2} lag bei etwa 0,8. Dieses Verhältnis deutet darauf hin, dass sich die Moleküle in wässriger Umgebung befinden (Karukstis et al., 1998). Obwohl die Spektren von DXR und DiIC₁₈(7) stärker als die von ACL und DiIC₁₈(7) überlappen, konnte weder bei FL-DXR noch bei EL DXR ein Energietransfer beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass sich DXR weiter weg von DiIC₁₈(7) befindet als ACL. Beide Ergebnisse lassen vermuten, dass DXR nicht hydrophob genug ist um in großen Mengen in die Lipiddoppelschicht der Liposomen eingemischt zu werden. Gestützt werden diese Vermutungen durch Untersuchungen von Friche et al. (1990) welche für ACL eine mehr als 200-mal höhere Löslichkeit im lipophilen Lösemittel Octanol ermittelten als für DXR.

Bei den von Harrigan et al. (1993) beschriebenen DXR-haltigen Liposomen wird die Einschlusseffizienz des Wirkstoffs gesteigert, indem ein pH-Gradient zwischen dem Lumen der Vesikel und dem umgebenden Puffer eingestellt wird. Der pH-Wert des umgebenden Puffers ist hierbei so gewählt, dass der Wirkstoff ungeladen und deshalb lipophiler ist. Der im Liposomeninneren gewählte pH-Wert bedingt die ionische Form des Anthracyclins, wodurch ein Austreten durch die Lipiddoppelschicht verhindert wird. Um den Anteil an membrangebundenem Anthracyclin zu maximieren, wurden in den hier beschriebenen Versuchen alle Bestandteile von fusogenen oder endozytotischen Liposomen zusammen mit der eingesetzten Menge Wirkstoff im apolaren Lösemittel Chloroform aufgenommen. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum abgezogen und der entstandene Film direkt mit Puffer hydratisiert.

Diese Präparationsmethode erlaubt keine Vorhersage darüber, wo sich DXR- oder ACL-Moleküle nach Schwellen der Liposomen befinden. Die hier diskutierten Ergebnisse lassen die These zu, dass DXR sowohl innerhalb der Liposomen als auch im umgebenden Puffer zu finden ist. In der Literatur ist DXR auch als membranständig beschrieben (Gallois et al., 1996; de Wolf et al., 1991). Die hier gezeigten Ergebnisse können diese Aussage jedoch nicht bestätigen. Möglicherweise ist die Menge der DXR-Moleküle, die an die Membran der Liposomen assoziiert ist, nicht ausreichend um ein Energietransfersignal auszulösen. Durch die höhere Lipidlöslichkeit von ACL ist davon auszugehen, dass nach Präparation der Liposomen verglichen mit DXR mehr ACL in der Liposomenmembran zu finden ist.

3.2 Zelluläre Aufnahme von Anthracyclinen

Das zweite Ziel dieser Arbeit, neben dem Vergleich unterschiedlicher Formulierungen von ACL und DXR, ist es, die Wirksamkeit dieser Formulierungen anhand der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 und der epithelialen Zelllinie MCF-10A zu bestimmen. Durch Konfokalmikroskopie kann DXR anhand seiner Fluoreszenz innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Da die Wirksamkeit der Anthracycline abhängig von der aufgenommenen Dosis ist (Rogalska et al., 2010), wird hier die zelluläre Aufnahmeeffizienz von DXR durch eine zehnmütigen Behandlung untersucht. Die eingesetzte DXR-Konzentration von 7,5 μM lag deutlich über dem für DXR in PBS ermittelten IC_{50} -Wert (3,3 μM , Abb. II.5). Somit konnte sichergestellt werden, dass nach Behandlung mit FL-DXR, EL-DXR und DXR in PBS genug Wirkstoff eingebracht wurde um die zur Verlangsamung der Proliferation notwendigen Mechanismen auszulösen. Zudem war die Konzentration ausreichend um das Fluoreszenzsignal im cLSM zu detektieren. Sowohl durch Behandlung mit frei in PBS gelöstem DXR, als auch durch Inkubation mit FL-DXR konnte genug Wirkstoff in MDAMB-231 Zellen eingebracht werden, um die Zellkerne stark zu färben. Darüber hinaus war DXR in einem dem Kern vorgelagerten Kompartiment detektierbar. Die Färbung war hier jedoch weniger intensiv. Die Anreicherung außerhalb des Kerns liegt möglicherweise in den Mitochondrien vor. Für A549 und MDAMB-231 Zellen konnte eine solche DXR-Anreicherung in Zellkern und Mitochondrien nachgewiesen werden (Song et al., 2015). Nach 24 h war das kernlokalisierte DXR-Signal nur abgeschwächt detektierbar und größtenteils in vesikulären Einschlüssen im Zytosol zu finden. Durch die Anwendung von FL-DXR konnten, im Unterschied zu freiem DXR, schon früh in der zehnmütigen Behandlung DXR-gefärbte Zellkerne ausgemacht werden. Die erfolgreiche Fusion der fusogenen Liposomen konnte anhand einer homogenen

Färbung der PM mit DiIC₁₈(7) nachgewiesen werden. Mittels fusogener Liposomen konnte DXR mit einer höheren Geschwindigkeit in die Zellen eingebracht werden. Nach 24 h war im Vergleich deutlich mehr DXR-Signal innerhalb der Zellen detektierbar, dies deutet auf eine höhere eingebrachte Dosis oder auf einen verlangsamten Abbau der eingebrachten Wirkstoffe hin.

Obwohl durch die Fluoreszenzspektroskopie keine Lokalisation von DXR in der Membran der fusogenen Liposomen nachgewiesen werden konnte, steigerten die fusogenen Liposomen die zelluläre Aufnahme von DXR. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte hier nicht näher aufgeklärt werden. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass ausreichend DXR mit der liposomalen Membran assoziiert ist oder im Lumen der Vesikel verkapselt ist, um mit der Fusion ins Zellinnere zu gelangen. Möglicherweise löst die Fusion der fusogenen Liposomen auch eine Perforation der PM der Zellen aus (Kube et al., 2017) und erleichtert so das Eindringen von freiem DXR.

Die cLSM-Aufnahmen der behandelten MDAMB-231 Zellen nach Zugabe von freiem ACL oder FL-ACL zeigten, in welchen Kompartimenten der Zelle Anthracyclin angereichert wurde. Schon während der zehnminütigen Behandlung konnte eine ansteigende grüne Fluoreszenz im Zytosol der behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. IV.6, 5 min; Abb. IV.7, 5 min). Im Gegensatz zu DXR reichte sich ACL nicht im Nukleus der Zellen an. Diese Lokalisation außerhalb des Zellkerns stimmt mit Ergebnissen von Kania et al. (2007a) und Egorin et al. (1979) überein. Die in Abb. IV.7 gezeigten Aufnahmen erlauben keine Aussage zur genauen zytosolischen Verteilung von ACL. Die von Rogalska et al. (2010) beschriebene Bildung von ROS innerhalb von Tumorzellen legt eine Wirkung in den Mitochondrien nahe, experimentelle Untersuchungen zur Lokalisation von ACL sind meines Wissens jedoch nicht beschrieben. Obwohl sich ACL nicht im Nukleus anreichert, wird dem Wirkstoff eine inhibitorische Wirkung auf Topoisomerase II zugeschrieben (Hajji et al., 2005). Das Protein ist an Prozessen wie der Replikation, Transkription und Chromosomenkondensation beteiligt (Lyu et al., 2006). Wahrscheinlich kommt es durch ACL zu einer indirekten Inhibition des kernlokalisierten Proteins. Die detektierten Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten von ACL ließen keinen Rückschluss darauf zu, durch welche der beiden Formulierungsstrategien (ACL in PBS und FL-ACL) mehr Wirkstoff in die Zellen eingebracht werden konnte.

3.3 Zytotoxische Effekte von Doxorubicin und Aclacinomycin A

Um die zytotoxischen Effekte von ACL und DXR auf die Zelllinien MCF-10A und MDAMB-231 zu ermitteln wurden sie mit aufsteigenden Konzentrationen beider Anthracycline behandelt. Aufgrund der verschiedenen Proliferationsraten von MCF-10A und MDAMB-231 Zellen wurde die Konzentration bei halbmaximaler Aktivität der beiden Anthracycline nach 72 h (MCF-10A) bzw. 96 h (MDAMB-231) bestimmt. Mit dem Vergleich verschiedener Anwendungsformulierungen (frei in PBS, in fusogenen Liposomen und in endozytotischen Liposomen) sollte untersucht werden, wie effizient die Wirkstoffe in die Zellen eingebracht werden konnten.

Unabhängig vom behandelten Zelltyp lag der IC_{50} -Wert von EL-DXR über dem von DXR in PBS (Abb IV.8), die Verkapselung in endozytotische Liposomen bewirkt also eine Verringerung der Wirksamkeit von DXR. Möglicherweise reicht die Behandlungszeit von 10 min nicht aus um DXR genauso wirksam in Zellen zu schleusen wie frei in PBS gelöstes DXR. Die PEG-basierte Modifikation zur Stabilisierung von Liposomen (Allen et al., 1993) führt *in vitro* also zu einer verringerten Abgabe von DXR ins Zytosol. In vergleichbaren Experimenten zeigte Wiles et al. (1997), dass der Einsatz von PEG-modifizierten Liposomen auch nach 48-stündiger Applikation eine substanziell (~200x) niedrigere Toxizität gegenüber MDAMB-231 und anderen Krebszelllinien aufwies als im Nährmedium gelöstes DXR. *In vivo* liegt der Vorteil der sogenannten Stealth-Liposomen in ihrer verlängerten Zirkulation im Blutkreislauf. Die injizierten Liposomen haben somit mehr Zeit um durch passives Targeting im Tumorgewebe zu akkumulieren.

Durch den Einsatz von fusogenen Liposomen wurde die DXR-Zytotoxizität gegenüber MCF-10A und MDAMB-231 auf das 1,6-fache (verglichen mit DXR in PBS) gesteigert. Sowohl die erhöhte Aufnahmeeffizienz durch FL-DXR als auch die verringerte Aufnahmeeffizienz von EL-DXR deutet darauf hin, dass mindestens ein Teil des DXR liposomal verkapselt ist. Auch wenn durch die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen keine Einlagerung von DXR in die Liposomenmembran nachgewiesen werden konnte, kann von einer Assoziation des Wirkstoffs innerhalb des Liposoms oder an die Außenseite des Liposoms ausgegangen werden.

Durch Verkapselung von ACL in endozytotische Liposomen wurde die Wirksamkeit des Anthracyclins im Vergleich zu frei gelöstem ACL deutlich gesteigert. Die gleiche liposomale Zusammensetzung führte zu einer deutlichen Verringerung der Wirksamkeit von DXR. Wahrscheinlich wird durch die Einlagerung von ACL in die Membran endozytotischer

Liposomen deren Aufnahmemechanismus verändert. Möglicherweise bewirkt ACL eine Veränderung der Membraneigenschaften und erleichtert so den Transfer in das Zytosol der behandelten Zellen.

Der IC_{50} -Wert von FL-ACL liegt für MDAMB-231 Zellen signifikant niedriger als bei EL-ACL ($p < 0,05$) und ACL in PBS ($p < 0,001$) (Abb. IV.9). Durch fusogene Liposomen können somit die höchsten Anthracyclin-Aufnahmeeffizienzen erzielt werden. Neben positiver Ladung ist ein delokalisiertes π -Elektronensystem essenziell für den fusogenen Charakter der von Csiszar et al. (2010) etablierten fusogenen Liposomen. In FL-ACL kann neben DiIC₁₈(7) auch die planare, aromatische Ringstruktur des Anthracyclins als ein solches π -Elektronensystem fungieren. Um genug Raum für Interaktionen zwischen DiIC₁₈(7) und ACL zuzulassen, wurde der Anteil von DiIC₁₈(7) im Vergleich zu bisher beschriebenen fusogenen Liposomen um die Hälfte auf 2,5 mol% reduziert. Die Anwesenheit von ACL in der Liposomenmembran konnte die Fusionseffizienz möglicherweise noch erhöhen und somit den Transport in die Zielzellen verbessern.

MDAMB-231 Zellen zeigen eine höhere Resistenz gegenüber DXR als MCF-10A Zellen. Die Zytotoxizität von ACL ist beiden Zelllinien gegenüber höher als die von DXR. Eine andauernde Behandlung der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 mit DXR führt zu einer wachsenden Resistenz gegenüber dem Wirkstoff (Minotti et al., 2004). DXR verursacht eine verstärkte Expression des ABC-Transporterproteins P-Gp, woraus ein wachsender DXR-Efflux aus der Zelle resultiert (Schinkel und Jonker, 2003). Die wirksame Dosis von DXR wird infolgedessen verringert. Die Bindungsaffinität von ACL an P-Gp ist geringer als die von DXR, weswegen die Entwicklung einer Resistenz gegenüber ACL ausbleibt (Rogalska et al., 2014).

Ähnlich wie ACL zeigt auch Idarubicin sowohl eine geringere Bindungsaffinität an ABC-Transporterproteine (Kizek et al., 2012) als auch eine höhere Lipidlöslichkeit als DXR. Ein weiteres Anthracyclin mit hoher Lipidlöslichkeit ist Carminomycin (Friche et al., 1990). Durch ihre physikalischen Eigenschaften können die Wirkstoffe, wie auch ACL, effizient in Liposomen verkapselt werden. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass fusogene Liposomen auch Idarubicin und Carminomycin effizient in Zellen einschleusen können.

Die verzeichneten Maximalaktivitäten von ACL und DXR zeigten sich unabhängig von der Formulierungsstrategie. Da die Werte nur von Wirkstoff und Zelltyp abhängig sind, ist davon auszugehen, dass die Wirkstoffträger zwar die Wirkstoffaufnahme, nicht aber den eigentlichen Wirkmechanismus der Anthracycline innerhalb der Zellen beeinflussen. Darüber hinaus lässt

sich schlussfolgern, dass die eingebrachten Konzentrationen liposomaler Bestandteile und die verwendeten Pufferlösungen keine toxische Wirkung auf die Zellen haben.

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte beruht auf der Erfassung aller vitalen Zellen nach Behandlung der zu testenden Substanz. Frühapoptotische Zellen werden in einer solchen Zählung nicht aussortiert. Um die Auswirkungen von ACL und DXR auf die Apoptose von MCF-10A und MDAMB-231 Zellen zu untersuchen, wurden die früh- und spät-apoptotischen Zellen mittels Annexin V (und 7-AAD) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil an 7-AAD-positiv markierten Zellen blieb ungeachtet der eingesetzten ACL- oder DXR-Konzentration weitgehend unverändert. Gleichzeitig waren die Zellzahlen der behandelten Zelllinien jedoch stark abhängig von der eingesetzten Anthracyclin-Konzentration (vgl. IC_{50} -Ergebnisse: Abb IV.8, Abb. IV.9). Da der Versuchsablauf eine Messung nach 72 h (MCF-10A) bzw. 96 h (MDAMB-231) vorsah, konnten Veränderungen vor oder nach dem gewählten Zeitpunkt nicht festgehalten werden.

DXR löste sowohl in MCF-10A als auch in MDAMB-231 Zellen erst oberhalb von 1 μ M wachsende Anteile apoptotischer Zellen auf. In den Versuchen zur Ermittlung der IC_{50} -Werte von ACL und DXR konnten beide Wirkstoffe schon unterhalb dieser Grenze verringerte Zellzahlen auslösen. Dies deutet darauf hin, dass Apoptose und Nekrose nicht allein ausschlaggebend für die reduzierten Zellzahlen nach 72 h (MCF-10A) bzw. 96 h (MDAMB-231) sind. Möglicherweise könnte eine Anthracyclin-induzierte verlangsamte Proliferation der Zellen Einfluss auf die Populationsgröße nehmen.

Rogalska et al. (2010) konnten anhand der Behandlung verschiedener Zelllinien (A549, HepG2, MCF-7) mit ACL innerhalb von 72 h zeitabhängige Aktivitätsänderungen der an Apoptose beteiligten Proteine Caspase-3 und Caspase-8 nachweisen. Um den Einfluss von Apoptose und Proliferationsgeschwindigkeit genauer zu untersuchen, müssten weitere Zeitpunkte innerhalb der mehrtägigen Kultivierung beprobt werden.

Der Transport von DXR in fusogenen Liposomen konnte den Anstieg apoptotischer Zellen im Vergleich zu DXR in PBS und EL-DXR zu geringeren Konzentrationen hin verschieben (Abb. IV.11 A und B). Da die Toxizität des Wirkstoffs von der in Zellen eingebrachten Dosis abhängt (Rogalska et al., 2014), lässt sich schlussfolgern, dass DXR durch fusogene Liposomen effizienter in Zellen eingeschleust wurde als durch EL-DXR und DXR in PBS. Die niedrigen IC_{50} -Werte von FL-DXR unterstützen diese Aussage. Im Vergleich von frei gelöstem ACL mit liposomal verkapseltem ACL zeigt sich dieser Unterschied noch deutlicher. Die Behandlung

von MDAMB-231 Zellen mit FL-ACL konnte die größte Verschiebung des Apoptose-Anstiegs zu niedrigeren Konzentrationen hin verursachen. Der deutlichere Unterschied zwischen freiem und liposomalem ACL ist durch seine ausgeprägtere Lipophilie begründet. Die größte Fraktion apoptotischer MCF-10A Zellen wurde durch die Behandlung mit EL-ACL ausgelöst. Die IC_{50} -Werte von EL-ACL und FL-ACL liegen signifikant niedriger als der von ACL in PBS, jedoch konnte zwischen fusogenen und endozytotischen Liposomen kein Unterschied festgestellt werden. Die ausgelösten Apoptosewerte und die ermittelten IC_{50} -Werte verdeutlichen, dass die Wirkung von Anthracyclinen nicht allein auf das Auslösen von Apoptose beschränkt sein kann. Ein Zusammenspiel von Mechanismen wie veränderte Proliferationsgeschwindigkeiten oder Zellsterben durch Nekrose sind wahrscheinlich.

Die Brustkrebszelllinie MDAMB-231 zeigte nach Behandlung mit ACL deutlich höher Anteile apoptotische Zellen als nach Behandlung mit DXR. Innerhalb der verschiedenen Formulierungsstrategien erwies sich FL-ACL als effizienteste Wirkstoffmatrix. Die Wirksamkeit der verschiedenen Formulierungen und der eingesetzten Anthracycline ist jedoch zelltypabhängig. Unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Anthracyclinen ergeben sich beispielsweise aus dem Expressionsniveau resistenzvermittelnder ABC-Transporterproteine, dem Differenzierungsgrad und den Proliferationsraten von verschiedenen Zelltypen.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen eine effiziente Verkapselung von ACL in fusogene Liposomen. Sowohl ACL als auch DXR konnten durch fusogene Liposomen effizienter in Zellen eingebracht werden als durch Aufnahme aus einer Pufferlösung. Trotz der geringeren Lipophilie von DXR wiesen die verbesserten Aufnahmeeffizienzen von FL-DXR auf eine Assoziation des Anthracyclins an die Liposomenmembran hin. Bei der Behandlung der Brustkrebszelllinie MDAMB-231 zeigte FL-ACL die höchste Effizienz aller eingesetzten Formulierungsstrategien. Fusogene Liposomen stellen eine wirksame Methode zur Einbringung lipophiler Moleküle in die PM von Zellen dar. In dieser Arbeit wurden sie erstmalig dafür verwendet Anthracycline in eine Krebsmodellzelllinie einzuschleusen.

V. AUSBLICK

Fusogene Liposomen konnten in der Vergangenheit als Transportmittel für verschiedenste hydrophile und hydrophobe Inhalte genutzt werden. Der molekulare Mechanismus zur Fusion der liposomalen Membran mit der Plasmamembran von Zellen ist jedoch noch nicht in allen Details verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, welche die Fluoreszenzeigenschaften von BODIPY FL-DHPE dazu nutzt, Endozytose von Fusion zu unterscheiden. Das Assay bietet die Möglichkeit, durch systematischen Austausch der liposomalen Komponenten die essentiellen Voraussetzungen zur Erhaltung des fusogenen Charakters der Liposomen zu untersuchen. Gegenwärtig wird in unserer Arbeitsgruppe eine umfassende Versuchsreihe dazu durchgeführt.

Darüber hinaus könnte die Methode dazu dienen, den Einfluss der beiden verschiedenen Aufnahmemechanismen auf die Wirksamkeit nicht-fluoreszenter Inhalte zu untersuchen. So könnten beispielsweise Nukleinsäuresequenzen in fusogenen und endozytotischen Liposomen verkapselt werden und ihre Transfektionseffizienzen miteinander verglichen werden. Möglicherweise könnte die Methode auch auf Untersuchungen zur proteinvermittelten Fusion von Liposomen übertragen werden.

In dieser Arbeit konnte der Einfluss von verschiedenen Liposomen-Formulierungen auf den Transport von Anthracyclinen untersucht werden. Die verschiedenen Lipidlöslichkeiten von Aclacinomycin A und Doxorubicin nahmen dabei großen Einfluss auf ihre erfolgreiche Verkapselung in Liposomen. Weitere fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen könnten die Lokalisation der Wirkstoffe innerhalb der Liposomen näher bestimmen. Die Experimente könnten dafür um weitere Daunorubicin-Derivate erweitert werden, um den Einfluss ihrer Lipidlöslichkeit noch besser zu verstehen.

Fusogene Liposomen interkalieren mit verschiedenen Geschwindigkeiten in die Plasmamembran unterschiedlicher Zelltypen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die verschiedene Zusammensetzung der Gykokalyx unterschiedlicher Zelltypen. Ihre hohe Fusionseffizienz konnte jedoch anhand einer Vielzahl verschiedener Zelltypen experimentell bestätigt werden. Für die Abgabe von therapeutischen Wirkstoffen wäre eine spezifische Fusion mit ausgewählten Zielzellen (z.B. Krebszellen) von Vorteil. Durch Oberflächenmodifikation der Liposomen könnte diese spezifische Abgabe der liposomalen Inhalte an Zielzellen erreicht

AUSBLICK

werden. Möglichweiser könnte die Funktionalisierung mit Folat eine gesteigerte Fusion mit Krebszellen bewirken.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, T. M.; Hansen, C. B. und Guo, L. S. (1993): Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochimica et biophysica acta* (1150), 9-16.
- Atkins, P. W. und De Paula, J. (2014): *Atkins' Physical chemistry*. Tenth edition. ed, Oxford ; New York: Oxford University Press, xxv, 1008 pages.
- Baldissera, V. D.; De Mattos, A. A.; Coral, G. P.; De Araujo, F. B.; Marroni, C. A.; De Mello Brandao, A. B.; Ott Fontes, P. R.; Schmidt Cerski, C. T.; Hartmann, A. A. und Kretzmann Filho, N. A. (2012): Evaluation of the C3435T polymorphism in the MDR1 gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Annals of hepatology* (11), 899-906.
- Banerjee, A.; Sahana, A.; Das, S.; Lohar, S.; Guha, S.; Sarkar, B.; Mukhopadhyay, S. K.; Mukherjee, A. K. und Das, D. (2012a): A naphthalene exciplex based Al³⁺ selective on-type fluorescent probe for living cells at the physiological pH range: experimental and computational studies. *The Analyst* (137), 2166-2175.
- Banerjee, A.; Sahana, A.; Guha, S.; Lohar, S.; Hauli, I.; Mukhopadhyay, S. K.; Sanmartin Matalobos, J. und Das, D. (2012b): Nickel(II)-induced excimer formation of a naphthalene-based fluorescent probe for living cell imaging. *Inorganic chemistry* (51), 5699-5704.
- Bangham, A. D.; Standish, M. M. und Watkins, J. C. (1965): Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* (13), 238-252.
- Barteneva, N. S.; Fasler-Kan, E. und Vorobjev, I. A. (2012): Imaging Flow Cytometry: Coping with Heterogeneity in Biological Systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (60), 723-733.
- Batist, G.; Barton, J.; Chaikin, P.; Swenson, C. und Welles, L. (2002): Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy* (3), 1739-1751.
- Bergstrom, F.; Mikhalyov, I.; Hagglof, P.; Wortmann, R.; Ny, T. und Johansson, L. B. (2002): Dimers of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applications in chemistry and biology. *Journal of the American Chemical Society* (124), 196-204.
- Bilek, G.; Kremser, L.; Wruss, J.; Blaas, D. und Kenndler, E. (2007): Mimicking early events of virus infection: capillary electrophoretic analysis of virus attachment to receptor-decorated liposomes. *Analytical chemistry* (79), 1620-1625.

LITERATURVERZEICHNIS

- Birks, J. B. (1975): Excimers. *Reports on Progress in Physics* (38), 903.
- Bittrich, H. J. (1987): Geworkjan, R.G., Klose, G.: *Physik*. 575 S., 319 Abb., 33 Tab. Berlin: Akademie-Verlag 1986. 58.00 M. *Journal für Praktische Chemie* (329), 1038-1038.
- Bonadonna, G.; Monfardini, S.; De Lena, M. und Fossati-Bellani, F. (1969): Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumour antibiotic. *British medical journal* (3), 503-506.
- Bozzuto, G. und Molinari, A. (2015): Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine* (10), 975-999.
- Braun, T.; Kleusch, C.; Naumovska, E.; Merkel, R. und Csiszar, A. (2016): A bioanalytical assay to distinguish cellular uptake routes for liposomes. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* (89), 301-308.
- Cevc, G. (1993): *Phospholipids handbook*. New York: Marcel Dekker, Inc., xi, 988 p.
- Chen, C. S.; Martin, O. C. und Pagano, R. E. (1997): Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells. *Biophysical journal* (72), 37-50.
- Chen, H.; Kim, S.; Li, L.; Wang, S.; Park, K. und Cheng, J. X. (2008): Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (105), 6596-6601.
- Chernomordik, L. V. und Kozlov, M. M. (2008): Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* (15), 675-683.
- Chin, D. J.; Straubinger, R. M.; Acton, S.; Nathke, I. und Brodsky, F. M. (1989): 100-kDa polypeptides in peripheral clathrin-coated vesicles are required for receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (86), 9289-9293.
- Chung, W. B.; Yi, J. E.; Jin, J. Y.; Choi, Y. S.; Park, C. S.; Park, W. C.; Song, B. J. und Youn, H. J. (2013): Early cardiac function monitoring for detection of subclinical Doxorubicin cardiotoxicity in young adult patients with breast cancer. *Journal of breast cancer* (16), 178-183.
- Coley, H. M.; Twentyman, P. R. und Workman, P. (1989): Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporin A. *Biochemical pharmacology* (38), 4467-4475.
- Csiszar, A.; Csiszar, A.; Pinto, J. T.; Gautam, T.; Kleusch, C.; Hoffmann, B.; Tucsek, Z.; Toth, P.; Sonntag, W. E. und Ungvari, Z. (2015): Resveratrol encapsulated in novel fusogenic liposomes activates Nrf2 and attenuates oxidative stress in cerebrovascular

- endothelial cells from aged rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* (70), 303-313.
- Csiszar, A.; Hersch, N.; Dieluweit, S.; Biehl, R.; Merkel, R. und Hoffmann, B. (2010): Novel fusogenic liposomes for fluorescent cell labeling and membrane modification. *Bioconjugate chemistry* (21), 537-543.
- Cullis, P. R.; Hope, M. J. und Tilcock, C. P. (1986): Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chemistry and physics of lipids* (40), 127-144.
- Dahim, M.; Mizuno, N. K.; Li, X. M.; Momsen, W. E.; Momsen, M. M. und Brockman, H. L. (2002): Physical and photophysical characterization of a BODIPY phosphatidylcholine as a membrane probe. *Biophysical journal* (83), 1511-1524.
- Dartsch, D. C.; Schaefer, A.; Boldt, S.; Kolch, W. und Marquardt, H. (2002): Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* (7), 537-548.
- De Wolf, F. A.; Demel, R. A.; Bets, D.; Van Kats, C. und De Kruijff, B. (1991): Characterization of the interaction of doxorubicin with (poly)phosphoinositides in model systems. Evidence for specific interaction with phosphatidylinositol-monophosphate and -diphosphate. *FEBS letters* (288), 237-240.
- Deshpande, D. (2014): Selective Chemotherapeutics Delivery to Rhabdomyosarkoma Cells Using Fusogenic Liposomes as Drug Delivery System. Master Thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Egorin, M. J.; Clawson, R. E.; Ross, L. A.; Schlossberger, N. M. und Bachur, N. R. (1979): Cellular accumulation and disposition of aclacinomycin A. *Cancer research* (39), 4396-4400.
- El-Awady, R.; Saleh, E.; Hashim, A.; Soliman, N.; Dallah, A.; Elrasheed, A. und Elakraa, G. (2016): The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Frontiers in pharmacology* (7), 535.
- Ellens, H.; Bentz, J. und Szoka, F. C. (1986): Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of the L alpha-HII phase transition. *Biochemistry* (25), 4141-4147.
- Fantin, V. R. und Leder, P. (2006): Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* (25), 4787-4797.
- Farhood, H.; Serbina, N. und Huang, L. (1995): The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et biophysica acta* (1235), 289-295.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-

- mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (84), 7413-7417.
- Feng, C.; Li, X.; Dong, C.; Zhang, X.; Zhang, X. und Gao, Y. (2015): RGD-modified liposomes enhance efficiency of aclacinomycin A delivery: evaluation of their effect in lung cancer. *Drug design, development and therapy* (9), 4613-4620.
- Forsen, E. A. und Tokes, Z. A. (1983): Attenuation of dermal toxicity of doxorubicin by liposome encapsulation. *Cancer treatment reports* (67), 481-484.
- Förster, T. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* (437), 55-75.
- Friche, E.; Jensen, P. B.; Roed, H.; Skovsgaard, T. und Nissen, N. I. (1990): In vitro circumvention of anthracycline--resistance in Ehrlich ascites tumour by anthracycline analogues. *Biochemical pharmacology* (39), 1721-1726.
- Friend, D. S.; Papahadjopoulos, D. und Debs, R. J. (1996): Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et biophysica acta* (1278), 41-50.
- Frolov, V. A.; Shnyrova, A. V. und Zimmerberg, J. (2011): Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (3), a004747.
- Gabizon, A. und Martin, F. (1997): Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* (54 Suppl 4), 15-21.
- Gallois, L.; Fiallo, M.; Laigle, A.; Priebe, W. und Garnier-Suillerot, A. (1996): The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of anionic phospholipids. *European journal of biochemistry* (241), 879-887.
- Galluzzi, L.; Larochette, N.; Zamzami, N. und Kroemer, G. (2006): Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* (25), 4812-4830.
- Geisberg, C. A. und Sawyer, D. B. (2010): Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Current hypertension reports* (12), 404-410.
- Gill, P. S.; Espina, B. M.; Muggia, F.; Cabriales, S.; Tulpule, A.; Esplin, J. A.; Liebman, H. A.; Forsen, E.; Ross, M. E. und Levine, A. M. (1995): Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (13), 996-1003.
- Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manyoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stoter, M.; Epstein-Barash, H.; Zhang, L.; Koteliansky, V.; Fitzgerald, K.; Fava, E.; Bickle, M.; Kalaidzidis, Y.; Akinc, A.; Maier, M. und Zerial, M. (2013): Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature biotechnology* (31), 638-646.

- Gorter, E. und Grendel, F. (1925): On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of experimental medicine* (41), 439-443.
- Gottesman, M. M. und Ling, V. (2006): The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS letters* (580), 998-1009.
- Gregoriadis, G. (2007): *Liposome technology*. 3rd ed, New York: Informa Healthcare, v. <1-3>.
- Grein, A.; Spalla, C.; Di Marco, A. und Canevazzi, G. (1963): Descrizione e classificazione di un attinomicete (*Streptomyces peucetius* sp. nova). Produttore di una sostanza ad attivit antitumorale: la daunomicina. *Giorn Microbiol* (11), 109-118.
- Greish, K. (2010): Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods in molecular biology* (624), 25-37.
- Grillaud, M.; Russier, J. und Bianco, A. (2014): Polycationic adamantane-based dendrons of different generations display high cellular uptake without triggering cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society* (136), 810-819.
- Hajji, N.; Mateos, S.; Pastor, N.; Dominguez, I. und Cortes, F. (2005): Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor. *Mutation research* (583), 26-35.
- Han, M.; Diao, Y. Y.; Jiang, H. L.; Ying, X. Y.; Chen, D. W.; Liang, W. Q. und Gao, J. Q. (2011): Molecular mechanism study of chemosensitization of doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia cells induced by a composite polymer micelle. *International journal of pharmaceutics* (420), 404-411.
- Harrigan, P. R.; Wong, K. F.; Redelmeier, T. E.; Wheeler, J. J. und Cullis, P. R. (1993): Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients. *Biochimica et biophysica acta* (1149), 329-338.
- Herringson, T. P. und Altin, J. G. (2011): Increasing the antitumor efficacy of doxorubicin-loaded liposomes with peptides anchored via a chelator lipid. *Journal of drug targeting* (19), 681-689.
- Hersch, N.; Wolters, B.; Ungvari, Z.; Gautam, T.; Deshpande, D.; Merkel, R.; Csiszar, A.; Hoffmann, B. und Csiszar, A. (2016): Biotin-conjugated fusogenic liposomes for high-quality cell purification. *Journal of biomaterials applications* (30), 846-856.
- Hockenbery, D. M. (2010): Targeting mitochondria for cancer therapy. *Environmental and molecular mutagenesis* (51), 476-489.
- Hudecz, F.; Pimm, M. V.; Rajnavolgyi, E.; Mezo, G.; Fabra, A.; Gaal, D.; Kovacs, A. L.; Horvath, A. und Szekerke, M. (1999): Carrier design: new generation of polycationic

- branched polypeptides containing OH groups with prolonged blood survival and diminished in vitro cytotoxicity. *Bioconjugate chemistry* (10), 781-790.
- Hui, S. W.; Stewart, T. P.; Boni, L. T. und Yeagle, P. L. (1981): Membrane fusion through point defects in bilayers. *Science* (212), 921-923.
- Huth, U. S.; Schubert, R. und Peschka-Suss, R. (2006): Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* (110), 490-504.
- Isaksson, M.; Kalinin, S.; Lobov, S.; Ny, T. und Johansson, L. B.-Å. (2003): An Environmental-Sensitive BODIPY®-Derivative with Bioapplication: Spectral and Photophysical Properties. *Journal of Fluorescence* (13), 379-384.
- Jacquart, A.; Keramidas, M.; Vollaire, J.; Boisgard, R.; Pottier, G.; Rustique, E.; Mittler, F.; Navarro, F. P.; Boutet, J.; Coll, J. L. und Texier, I. (2013): LipImage 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics* (18), 101311.
- Jahn, R.; Lang, T. und Sudhof, T. C. (2003): Membrane fusion. *Cell* (112), 519-533.
- Jaiswal, M.; Dudhe, R. und Sharma, P. K. (2015): Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* (5), 123-127.
- James, N. D.; Coker, R. J.; Tomlinson, D.; Harris, J. R.; Gompels, M.; Pinching, A. J. und Stewart, J. S. (1994): Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clinical oncology* (6), 294-296.
- Johnson, I. D.; Kang, H. C. und Haugland, R. P. (1991): Fluorescent membrane probes incorporating dipyrrometheneboron difluoride fluorophores. *Analytical biochemistry* (198), 228-237.
- Jouhet, J. (2013): Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in plant science* (4), 494.
- Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Nakase, I.; Akaji, K.; Kawakami, T.; Maruyama, K.; Kamiya, H. und Harashima, H. (2004): Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* (43), 5618-5628.
- Kania, K.; Matlawska-Wasowska, K.; Osiecka, R. und Jozwiak, Z. (2007a): Analysis of aclarubicin-induced cell death in human fibroblasts. *Cell biology international* (31), 1049-1056.
- Kania, K.; Zych, A. und Jozwiak, Z. (2007b): Involvement of reactive oxygen species in aclarubicin-induced death of human trisomic and diabetic fibroblasts. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* (21), 1010-1019.

- Karukstis, K. K.; Thompson, E. H.; Whiles, J. A. und Rosenfeld, R. J. (1998): Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical chemistry* (73), 249-263.
- Kim, B. K.; Hwang, G. B.; Seu, Y. B.; Choi, J. S.; Jin, K. S. und Doh, K. O. (2015): DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. *Biochimica et biophysica acta* (1848), 1996-2001.
- Kitagawa, S.; Kasamaki, M. und Hyodo, M. (2004): Cationic vesicles consisting of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) and phosphatidylcholines and their interaction with erythrocyte membrane. *Chemical & pharmaceutical bulletin* (52), 451-453.
- Kizek, R.; Adam, V.; Hrabeta, J.; Eckschlager, T.; Smutny, S.; Burda, J. V.; Frei, E. und Stiborova, M. (2012): Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacology & therapeutics* (133), 26-39.
- Kleusch, C. (2013): Etablierung neuartiger fusogener Liposomen zur Lipidinterkalation in tierische Plasmamembranen - Analyse mittels zeitlich und räumlich hochauflösender lichtmikroskopischer Methoden. PhD Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kleusch, C.; Hersch, N.; Hoffmann, B.; Merkel, R. und Csiszar, A. (2012): Fluorescent lipids: functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization. *Molecules* (17), 1055-1073.
- Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O. und Safinya, C. R. (1998): An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* (281), 78-81.
- Kube, S.; Hersch, N.; Naumovska, E.; Gensch, T.; Hendriks, J.; Franzen, A.; Landvogt, L.; Siebrasse, J. P.; Kubitscheck, U.; Hoffmann, B.; Merkel, R. und Csiszar, A. (2017): Fusogenic Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of Intracellular Proteins. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* (33), 1051-1059.
- Labat-Moleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E. und Behr, J. P. (1996): An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene therapy* (3), 1010-1017.
- Lakowicz, J. R. (2006): Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed, New York: Springer, xxvi, 954 p.
- Lee, S. Y.; Tyler, J. Y.; Kim, S.; Park, K. und Cheng, J. X. (2013): FRET imaging reveals different cellular entry routes of self-assembled and disulfide bonded polymeric micelles. *Molecular pharmaceutics* (10), 3497-3506.

- Legendre, J. Y. und Szoka, F. C., Jr. (1992): Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharmaceutical research* (9), 1235-1242.
- Lehne, G.; De Angelis, P.; Clausen, O. P. und Rugstad, H. E. (1996): Human hepatoma cells rich in P-glycoprotein are sensitive to aclarubicin and resistant to three other anthracyclines. *British journal of cancer* (74), 1719-1729.
- Levchenko, T. S.; Rammohan, R.; Volodina, N. und Torchilin, V. P. (2003): Tat peptide-mediated intracellular delivery of liposomes. *Methods in enzymology* (372), 339-349.
- Losey, E. A.; Smith, M. D.; Meng, M. und Best, M. D. (2009): Microplate-based analysis of protein-membrane binding interactions via immobilization of whole liposomes containing a biotinylated anchor. *Bioconjugate chemistry* (20), 376-383.
- Lyu, Y. L.; Lin, C. P.; Azarova, A. M.; Cai, L.; Wang, J. C. und Liu, L. F. (2006): Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and cellular biology* (26), 7929-7941.
- Maier, O.; Oberle, V. und Hoekstra, D. (2002): Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chemistry and physics of lipids* (116), 3-18.
- Mallick, A.; More, P.; Ghosh, S.; Chippalkatti, R.; Chopade, B. A.; Lahiri, M. und Basu, S. (2015): Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells. *ACS applied materials & interfaces* (7), 7584-7598.
- Maraldi, N. M.; Zini, N.; Santi, S.; Scotlandi, K.; Serra, M. und Baldini, N. (1999): P-glycoprotein subcellular localization and cell morphotype in MDR1 gene-transfected human osteosarcoma cells. *Biology of the cell* (91), 17-28.
- Martin, F. J. und Macdonald, R. C. (1976): Lipid vesicle-cell interactions. II. Induction of cell fusion. *The Journal of cell biology* (70), 506-514.
- Matsui, H.; Johnson, L. G.; Randell, S. H. und Boucher, R. C. (1997): Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* (272), 1117-1126.
- Mikhalyov, I.; Gretskaya, N.; Bergstrom, F. und Johansson, L. B. A. (2002): Electronic ground and excited state properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY): Dimers with application to biosciences. *Physical Chemistry Chemical Physics* (4), 5663-5670.
- Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G. und Gianni, L. (2004): Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews* (56), 185-229.
- Nasr, M. und Abdel-Hamid, S. (2015): Lipid based nanocapsules: a multitude of biomedical applications. *Current pharmaceutical biotechnology* (16), 322-332.

- Naumovska, E.; Ludwanowski, S.; Hersch, N.; Braun, T.; Merkel, R.; Hoffmann, B. und Csiszar, A. (2014): Plasma membrane functionalization using highly fusogenic immune activator liposomes. *Acta biomaterialia* (10), 1403-1411.
- Necela, B. M.; Crozier, J. A.; Andorfer, C. A.; Lewis-Tuffin, L.; Kachergus, J. M.; Geiger, X. J.; Kalari, K. R.; Serie, D. J.; Sun, Z.; Moreno-Aspitia, A.; O'shannessy, D. J.; Maltzman, J. D.; Mccullough, A. E.; Pockaj, B. A.; Cunliffe, H. E.; Ballman, K. V.; Thompson, E. A. und Perez, E. A. (2015): Folate receptor-alpha (FOLR1) expression and function in triple negative tumors. *PloS one* (10).
- Pagano, R. E.; Watanabe, R.; Wheatley, C. und Chen, C. S. (1999): Use of N-[5-(5,7-dimethyl boron dipyrromethene difluoride-sphingomyelin to study membrane traffic along the endocytic pathway. *Chemistry and physics of lipids* (102), 55-63.
- Pastorino, F.; Brignole, C.; Marimpietri, D.; Sapra, P.; Moase, E. H.; Allen, T. M. und Ponzoni, M. (2003): Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer research* (63), 86-92.
- Paszko, E. und Senge, M. O. (2012): Immunoliposomes. *Current medicinal chemistry* (19), 5239-5277.
- Peng, X.; Chen, B.; Lim, C. C. und Sawyer, D. B. (2005): The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: translating molecular mechanism into preventative medicine. *Molecular interventions* (5), 163-171.
- Plajnsek, K. T.; Pajk, S.; Govedarica, B.; Pecar, S.; Srcic, S. und Kristl, J. (2011): A novel fluorescent probe for more effective monitoring of nanosized drug delivery systems within the cells. *International journal of pharmaceutics* (416), 384-393.
- Pourcelle, V.; Laurent, S.; Welle, A.; Vriamont, N.; Stanicki, D.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. und Marchand-Brynaert, J. (2015): Functionalization of the PEG Corona of Nanoparticles by Click Photochemistry in Water: Application to the Grafting of RGD Ligands on PEGylated USPIO Imaging Agent. *Bioconjugate chemistry* (26), 822-829.
- Rajagopal, A. und Simon, S. M. (2003): Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Molecular biology of the cell* (14), 3389-3399.
- Rajan, R.; Karbowniczek, M.; Pugsley, H. R.; Sabnani, M. K.; Astrinidis, A. und La-Beck, N. M. (2015): Quantifying autophagosomes and autolysosomes in cells using imaging flow cytometry. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* (87), 451-458.
- Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; Von Kiedrowski, G. und Massing, U. (2000): Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* (1464), 151-164.

- Rogalska, A.; Koceva-Chyla, A. und Jozwiak, Z. (2008): Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chemico-biological interactions* (176), 58-70.
- Rogalska, A.; Szwed, M. und Jozwiak, Z. (2010): Aclarubicin-induced apoptosis and necrosis in cells derived from human solid tumours. *Mutation research* (700), 1-10.
- Rogalska, A.; Szwed, M. und Rychlik, B. (2014): The connection between the toxicity of anthracyclines and their ability to modulate the P-glycoprotein-mediated transport in A549, HepG2, and MCF-7 cells. *TheScientificWorldJournal* (2014), 819548.
- Safra, T.; Muggia, F.; Jeffers, S.; Tsao-Wei, D. D.; Groshen, S.; Lyass, O.; Henderson, R.; Berry, G. und Gabizon, A. (2000): Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* (11), 1029-1033.
- Sakhrani, N. M. und Padh, H. (2013): Organelle targeting: third level of drug targeting. *Drug design, development and therapy* (7), 585-599.
- Schaefer, A.; Dressel, A.; Lingelbach, K.; Schmidt, C. A.; Steinheider, G. und Marquardt, H. (1992): Induction of differentiation in Friend-erythroleukemia cells by aclacinomycin A: early transient decrease in c-myc and c-myb mRNA levels. *Leukemia* (6), 828-833.
- Schinkel, A. H. und Jonker, J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews* (55), 3-29.
- Sebaugh, J. L. (2011): Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics* (10), 128-134.
- Shiffer, K. A.; Goerke, J.; Duzgunes, N.; Fedor, J. und Shohet, S. B. (1988): Interaction of erythrocyte protein 4.1 with phospholipids. A monolayer and liposome study. *Biochimica et biophysica acta* (937), 269-280.
- Siegel, D. P. (1999): The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophysical journal* (76), 291-313.
- Siegel, D. P.; Banschbach, J.; Alford, D.; Ellens, H.; Lis, L. J.; Quinn, P. J.; Yeagle, P. L. und Bentz, J. (1989): Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases. *Biochemistry* (28), 3703-3709.
- Siegel, D. P. und Epand, R. M. (1997): The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biophysical journal* (73), 3089-3111.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J. und Nieman, T. A. (1998): *Principles of instrumental analysis*. 5th ed.

- Slingerland, M.; Guchelaar, H. J. und Gelderblom, H. (2012): Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug discovery today* (17), 160-166.
- Smisterova, J.; Wagenaar, A.; Stuart, M. C.; Polushkin, E.; Ten Brinke, G.; Hulst, R.; Engberts, J. B. und Hoekstra, D. (2001): Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *The Journal of biological chemistry* (276), 47615-47622.
- Sneider, A.; Jadia, R.; Piel, B.; Vandyke, D.; Tsiros, C. und Rai, P. (2017): Engineering Remotely Triggered Liposomes to Target Triple Negative Breast Cancer. *Oncomedicine* (2), 1-13.
- Song, Y. F.; Liu, D. Z.; Cheng, Y.; Liu, M.; Ye, W. L.; Zhang, B. L.; Liu, X. Y. und Zhou, S. Y. (2015): Dual subcellular compartment delivery of doxorubicin to overcome drug resistant and enhance antitumor activity. *Scientific reports* (5), 16125.
- Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaele, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'angelo, J.; Cattel, L. und Couvreur, P. (2000): Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of pharmaceutical sciences* (89), 1452-1464.
- Stocker, U.; Schaefer, A. und Marquardt, H. (1995): DMSO-like rapid decrease in c-myc and c-myb mRNA levels and induction of differentiation in HL-60 cells by the anthracycline antitumor antibiotic aclarubicin. *Leukemia* (9), 146-154.
- Stokes, G. G. (1853): On the Change of Refrangibility of Light. No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (143), 385-396.
- Straubinger, R. M.; Hong, K.; Friend, D. S. und Papahadjopoulos, D. (1983): Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell* (32), 1069-1079.
- Struck, D. K.; Hoekstra, D. und Pagano, R. E. (1981): Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* (20), 4093-4099.
- Stryer, L. (1978): Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry* (47), 819-846.
- Teillaud, J. L.; Gruel, N.; Moncuit, J.; Mishal, Z.; Fridman, W. H.; Lampidis, T. J. und Tapiero, H. (1998): Structurally different anthracyclines provoke different effects on cell cycle and tumor B cell differentiation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* (52), 282-290.
- Toninello, A. (2014): Editorial: Mitochondria and subcellular organelles as treatment targets against pathological conditions. *Current pharmaceutical design* (20), 153-154.
- Townend, J. (2002): *Practical statistics for environmental and biological scientists*. Chichester ; New York: Wiley, x, 276 p.

- Tros De Ilarduya, C.; Sun, Y. und Duzgunes, N. (2010): Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* (40), 159-170.
- Unverferth, D. V.; Magorien, R. D.; Unverferth, B. P.; Talley, R. L.; Balcerzak, S. P. und Baba, N. (1981): Human myocardial morphologic and functional changes in the first 24 hours after doxorubicin administration. *Cancer treatment reports* (65), 1093-1097.
- Valeur, B. (2001): Effects of Intermolecular Photophysical Processes on Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence: Wiley-VCH Verlag GmbH*, 72-124.
- Van Der Aa, M. A.; Huth, U. S.; Hafele, S. Y.; Schubert, R.; Oosting, R. S.; Mastrobattista, E.; Hennink, W. E.; Peschka-Suss, R.; Koning, G. A. und Crommelin, D. J. (2007): Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells. *Pharmaceutical research* (24), 1590-1598.
- Van Meer, G.; Voelker, D. R. und Feigenson, G. W. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology* (9), 112-124.
- Vingerhoeds, M. H.; Steerenberg, P. A.; Hendriks, J. J.; Dekker, L. C.; Van Hoesel, Q. G.; Crommelin, D. J. und Storm, G. (1996): Immunoliposome-mediated targeting of doxorubicin to human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *British journal of cancer* (74), 1023-1029.
- Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F.; Baeza-Squiban, A. und Boland, S. (2013): Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Particle and fibre toxicology* (10), 2.
- Watson, H. (2015): Biological membranes. *Essays in biochemistry* (59), 43-69.
- Weber, T.; Zemelman, B. V.; Mcnew, J. A.; Westermann, B.; Gmachl, M.; Parlati, F.; Sollner, T. H. und Rothman, J. E. (1998): SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* (92), 759-772.
- Wiles, M. E.; Bell, C.; Landfair, D.; Lynam, E. und Bendele, R. A. (1997): Anthracycline Efficacy in vitro: Cytotoxicity of Liposomal/Nonliposomal Daunorubicin and Doxorubicin for Multiple Tumor Cell Types. *Drug delivery* (4), 255-262.
- Winter, R. (1990): Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen. *Chemie in unserer Zeit* (24), 71-81.
- Wrobel, I. und Collins, D. (1995): Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et biophysica acta* (1235), 296-304.
- Zhang, Z.; Wang, J.; Tacha, D. E.; Li, P.; Bremer, R. E.; Chen, H.; Wei, B.; Xiao, X.; Da, J.; Skinner, K.; Hicks, D. G.; Bu, H. und Tang, P. (2014): Folate receptor alpha associated

LITERATURVERZEICHNIS

- with triple-negative breast cancer and poor prognosis. *Archives of pathology & laboratory medicine* (138), 890-895.
- Zhou, J.; Zhao, W. Y.; Ma, X.; Ju, R. J.; Li, X. Y.; Li, N.; Sun, M. G.; Shi, J. F.; Zhang, C. X. und Lu, W. L. (2013): The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer. *Biomaterials* (34), 3626-3638.
- Zuhorn, I. S.; Kalicharan, R. und Hoekstra, D. (2002): Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *The Journal of biological chemistry* (277), 18021-18028.

VII. ANHANG

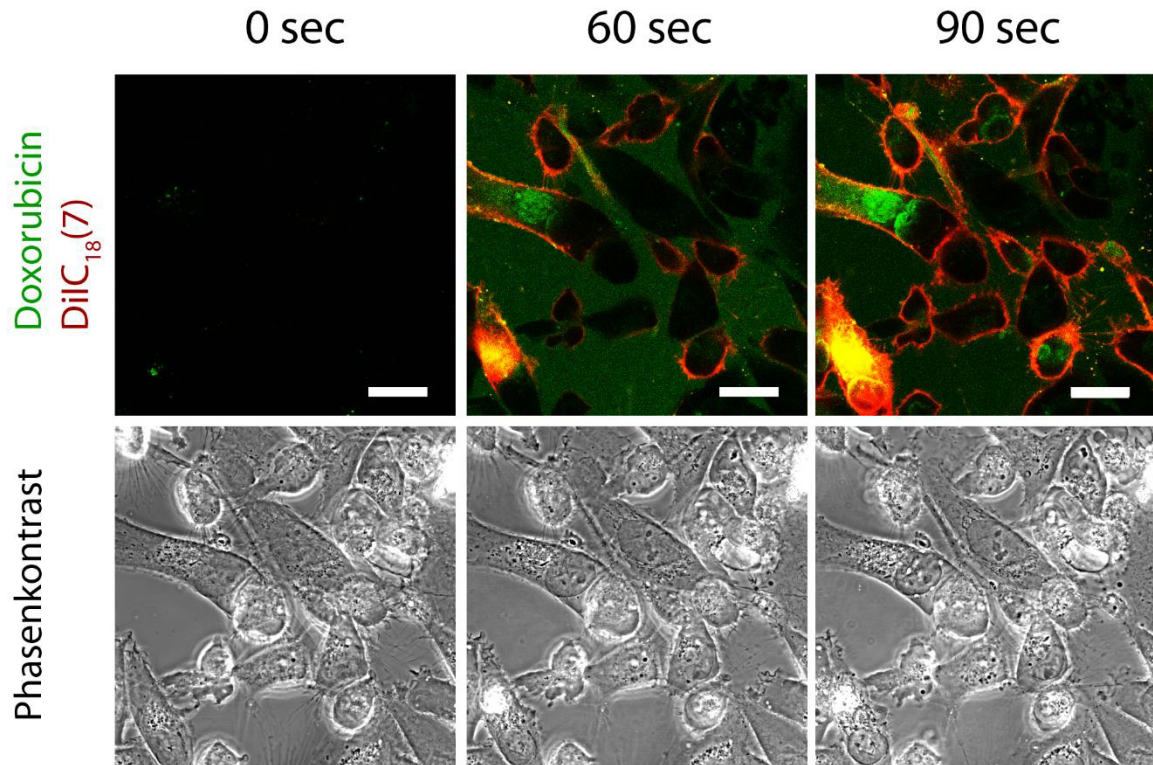


Abb. VII.1: Doxorubicinabgabe durch fusogene Liposomen. Adhärenente MDAMB-231 Zellen wurden durch Zugabe der Liposomensuspension mit $7,5 \mu\text{M}$ Doxorubicin für 10 min behandelt und währenddessen mikroskopiert. Die Temperaturunterschiede von Liposomensuspension und Probe verursachten einen zwischen 0 sec und 60 sec einen Fokusdrift. Danach war die Fokusebene stabil. Die obere Zeile zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von DiIC₁₈(7) (rot) und Doxorubicin (grün). Colokalisation der beiden Signale werden durch gelbe Färbung dargestellt. Die untere Zeile zeigt die zugehörigen Bildausschnitte im Phasenkontrast. Innerhalb einer Minute nach Zugabe der DXR-geladenen Liposomen konnten die ersten Fusionsevents mit der PM der adhärenente MDAMB-231 Zellen detektiert werden. Maßstab = $20 \mu\text{m}$.

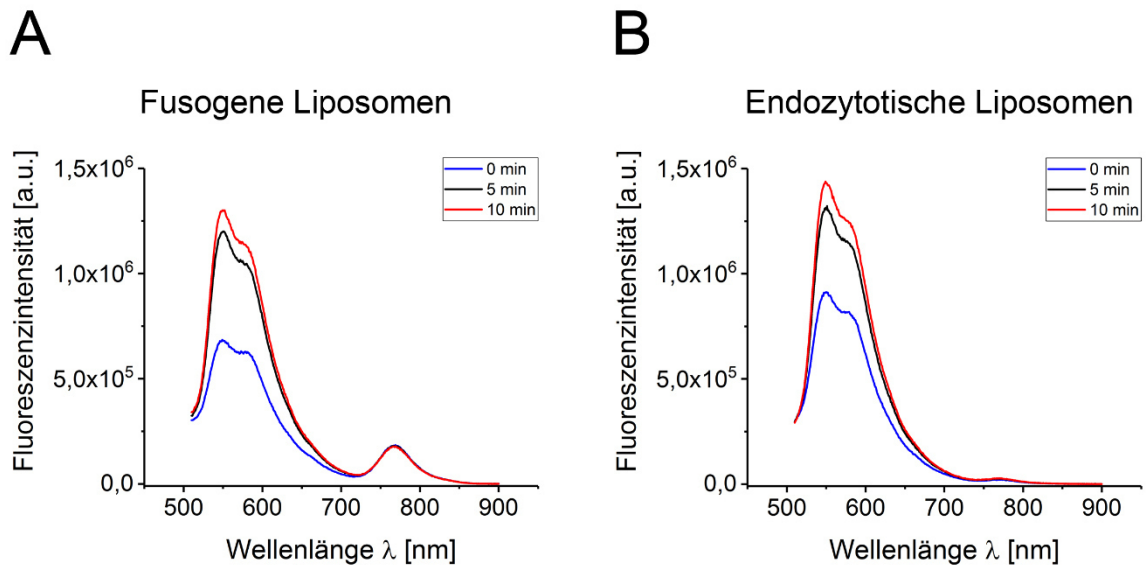


Abb. VII.2: Fluoreszenzeigenschaften von liposomalem Aclacinomycin A. Fluoreszenzspektren Aclacinomycin A in fusogenen (A) und endozytotischen Liposomen (B) direkt nach der Verdünnung der Liposomenstammlösung in PBS. Die jeweilige Probe blieb im Gerät und wurde in Abständen von 5 min dreimal gemessen. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ganz spezieller Dank gilt meinen Betreuern Prof. Dr. Rudolf Merkel und Dr. Agnes Csiszár, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an diesem Institut anfertigen zu können und für die tolle Unterstützung während dieser Zeit. Agnes, vielen Dank für die exzellente Betreuung, für die vielen Gespräche und Diskussionen und deine immer offene Tür!

Herrn Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden sowie an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des ICS-7 für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Ich habe mich im Institut immer sehr wohl gefühlt und diese Arbeit wäre ohne eure Hilfe nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich Aljona Gaiko-Shcherbak für Rat und Unterstützung im 3D-Zellkulturlabor, vor allem aber für die gute Zeit im Büro danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Geschwistern, Großeltern, Onkel und Tanten und auch meinen Freunden. Danke für eure stete Rückendeckung in allen Lebenslagen!

Der größte Dank gilt meiner Freundin Melanie für ihre unglaubliche Unterstützung seit über einem Jahrzehnt.