

Aus der Universitätsklinik  
für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

Entwicklung eines nanoliposomalen Trägersystems zur  
gezielten siRNA-Therapie des nicht-kleinzelligen  
Bronchialkarzinoms

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Nemeth, Attila**

**2019**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. h.c. C. Schlensak

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. J. Hetzel

Tag der Disputation:

01.03.2019

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Onkogenese und Onkopathologie	1
1.2	Bronchialkarzinom	2
1.2.1	TNM-Klassifikation	2
1.2.2	Diagnostik	5
1.2.3	Therapie	6
1.2.4	Neue Therapieoptionen	7
1.3	RNA-Interferenz	8
1.3.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	8
1.3.2	Small interfering (si) RNAs	10
1.3.3	Lokale Applikation	12
1.3.4	Systemische Applikation	12
1.4	Liposomen	12
1.5	Nanoliposomen	14
1.5.1	Herstellung von Nanoliposomen	15
1.6	Drug-Targeting	16
1.7	Endothel und Selektine	16
1.8	Immunliposomen	17
1.9	Angiogenese und interzelluläre Adhäsionsmoleküle	18
1.10	Fragestellung und Ziele	19
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Materialien	20
2.2	Methoden	26
2.2.1	Zellkultivierung	26
2.2.2	Extrusion	26
2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	27
2.2.4	Größe der Nanoliposomen	28
2.2.5	Zelltoxizität	28
2.2.6	Liposomenpräparation	28
2.2.7	EPC-Nanoliposomen	29

2.2.8	HSPC-Nanoliposomen.....	29
2.2.9	HSPC-Nanoliposomen – VCAM-1-siRNA .....	30
2.2.10	HSPC-Nanoliposomen – E-Selectin-siRNA .....	31
2.2.11	PEG-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA.....	32
2.2.12	PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA.....	33
2.2.13	PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA(höhere Konzentration).....	34
2.3	Statistische Analyse.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	EPC-Nanoliposomen .....	36
3.2	HSPC-Nanoliposomen.....	37
3.3	HSPC-Nanoliposomen – VCAM-1-siRNA .....	38
3.4	HSPC-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA .....	39
3.5	PEG-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA.....	41
3.6	PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA.....	42
3.7	Zellviabilität .....	44
3.8	Größe der PEG-Nanoliposomen.....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1	Ziel der Arbeit.....	46
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	47
4.2.1	EPC-Nanoliposomen .....	47
4.2.2	HSPC-Nanoliposomen.....	48
4.2.3	HSPC-Nanoliposomen und VCAM-1-siRNA .....	49
4.2.4	HSPC-Nanoliposomen und E-Selektin-siRNA .....	50
4.2.5	PEG-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA.....	51
4.2.6	PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA .....	52
4.2.7	Größe der PEG-Nanoliposomen .....	53
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung zum Eigentel der Dissertationsschrift.....</b>	<b>67</b>

<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>69</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: RNAi Mechanismus
- Abbildung 2: Enkapsulation von Lipophilen und Hydrophilen Arzneistoffen in Liposomen
- Abbildung 3: Zusammensetzung des Mini-Extruder und des Polycarbonatfilter.
- Abbildung 4: Mini-Extruder (avantlipids.com)
- Abbildung 5: Herstellung von Liposomen
- Abbildung 6: Effizienz der Transfektion von EPC-Nanoliposomen ohne siRNA und mit lipophilem Membranfarbstoff DIL.
- Abbildung 7: Effizienz der Transfektion von HSPC-Nanoliposomen Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup> und INTERFERin®
- Abbildung 8: Relative Reduktion der Genexpression mit HSPC-Nanoliposomen und VCAM-1-siRNA.
- Abbildung 9: Relative Reduktion der Genexpression durch HSPC – Nanoliposome mit E-Selektin-siRNA
- Abbildung 10: Effizienz der Transfektion von PEG-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA
- Abbildung 11: Relative Reduktion der Genexpression durch PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA
- Abbildung 12: Relative Reduktion der Genexpression durch PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA
- Abbildung 13: Zellviabilität 24 Stunden nach der Transfektion der Ea.hy926-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von PEG-Nanoliposomen mit Verkapselung der ICAM-1-siRNA.
- Abbildung 14: Größe der PEG-Nanoliposomen
- Abbildung 15: Größe der Nanoliposomen nach Anzahl der Extrusionen

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beschreibung der TNM Stadien nach IASCLC Lung Cancer Staging Project
Tabelle 2:	Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 8
Tabelle 3:	Verwendete Zelllinien
Tabelle 4:	Verwendete Nährmedien
Tabelle 5:	Verwendete Geräte
Tabelle 6:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien
Tabelle 7:	Zusätzlich verwendete Materialien
Tabelle 8:	Verwendete siRNAs
Tabelle 9:	Verwendete Antikörper
Tabelle 10:	Angesetzte Wells mit Endothelzellen und DIL
Tabelle 11:	Angesetzte Wells mit A549-Zellen und siRNA <sup>AF488</sup>
Tabelle 12:	Angesetzte Wells mit Endothelzellen und VCAM-1-siRNA
Tabelle 13:	Angesetzte Wells mit Endothelzellen, E-Selectin-siRNA und SCR-siRNA
Tabelle 14:	Angesetzte Wells mit PEG-Nanoliposomen und E-Selektin-siRNA und SCR-siRNA
Tabelle 15:	Angesetzte Wells mit Ea.hy926-Zellen, ICAM-1-siRNA, SCR-siRNA und PEG-Nanoliposomen
Tabelle 16:	Angesetzte Wells mit Ea.hy926-Zellen, PEG-Nanoliposomen, ICAM-1-siRNA-Nanoliposomen in höherer Dosierung



## Abkürzungsverzeichnis

ALK	anaplastic lymphoma kinase
APC	adenomatous polyposis coli
DCC	deleted in colorectal cancer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DIL	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate
DSPE	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPC	egg phosphatidylcholine
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
HSPC	hydrogenated soy phosphatidyl-choline
IC	Immun-Checkpoint
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
Mal	Maleimid
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
N.	Nervus
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
PEG	Polyethylenglykol
pre-miRNA	precursor micro RNA
pre-shRNA	precursor small hairpin RNA

pri-miRNA	primary micro RNA
pri-shRNA	primary small hairpin RNA
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
SCLC	small cell lung carcinoma
scFv	single chain variable fragment
SCR-siRNA	scrambled siRNA
SD	Standardabweichung
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNS	Trypsin neutralizing solution
VCAM-1	vascular adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Onkogenese und Onkopathologie

Ein Tumor ist durch eine abnorme Gewebsmasse bzw. eine Neubildung (Neoplasie) von Zellen definiert, die sich unkontrolliert vermehren und transformieren. Charakteristisch für Tumorzellen ist eine gesteigerte Mitoserate in Verbindung mit einer reduzierten Apoptose (Böcker 2008). Basierend auf ihren Wachstumseigenschaften werden Tumorerkrankungen in benigne, maligne und semi-maligne Formen unterteilt.

Bei benignen Tumoren handelt es sich um gutartige Tumoren mit langsamen Wachstum. Benigne Tumoren wandern nicht in andere Körperregionen ein und sind gegen das umliegende Gewebe gut abgrenzbar. Maligne oder bösartige Tumoren sind dagegen unscharf begrenzt, wachsen invasiv und zerstören somit das umgebende Gewebe. Weiter kommt es bei malignen Tumoren zu Tumorabsiedlungen in Lymphknoten und ferne Organe (Riede & Werner 2017; Siewert et al. 2012).

Außerdem werden Tumoren anhand des Ursprungsgewebes in epitheliale und mesodermale Tumoren unterteilt. Die malignen epithelialen Tumoren oder Karzinome sind die häufigsten Malignome (Riede & Werner 2017).

Im Rahmen der Karzinogenese haben tumorassoziierte Gene eine relevante Auswirkung auf den Zellstoffwechsel. Durch Mutationen (z.B. Amplifikationen, Punktmutationen, chromosomale Translokationen) in Protoonkogenen entstehen Onkogene, die zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen führe. Diese Veränderungen werden als „gain of function“-Mutation bezeichnet. Tumorsuppressorgene verhindern dagegen die klonale Expansion eines malignen Phänotyps. Der Verlust oder die Mutation („deletion“) von Tumorsuppressorgenen (loss of function) begünstigt eine Transformation. Beispiele für die Tumorsuppresorgene sind das p53 auf Chromosom 17p, APC (adenomatous polyposis coli) und DCC (deleted in colorectal cancer) (Kumar et al. 2009).

## **1.2 Bronchialkarzinom**

Das Bronchialkarzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Durch seine ungünstige Prognose ist diese Entität mit 25% die mit Abstand häufigste Krebstodesursache bei Männern und mit 15% die dritthäufigste bei Frauen. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei 50.000 Personen und die Letalität bei 40.000 Personen (RKI 2016).

Anhand der Histologie unterscheidet man zwischen kleinzelligen (small cell lung carcinoma – SCLC) und nicht-kleinzelligen (non-small cell lung carcinoma – NSCLC) Bronchialkarzinomen. Die NSCLC sind wesentlich häufiger. Sie werden weiter in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome unterteilt (Travis et al. 2015).

### **1.2.1 TNM-Klassifikation**

Die Klassifikation von Bronchialkarzinomen berücksichtigt die Größe und Ausdehnung des Tumors, den Lymphknotenbefall und die Metastasierung (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: TNM-Stadien nach der International Association for the Study of Lung Cancer (IASCLC) Lung Cancer Staging Project (Rami-Porta et al. 2015; Asamura et al. 2015; Eberhardt et al. 2015)**

Kategorie	Stadium	Kurzbeschreibung
T (Tumor)	Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder maligne Zellen im Sputum oder BAL ohne radiologischen oder bronchoskopischen Tumornachweis
	T0	kein Nachweis eines Primärtumors
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	größter Ø < 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
	T1a (mi)	minimal invasives Adenokarzinom
	T1a	größter Ø ≤ 1cm
	T1b	größter Ø > 1 und ≤ 2cm
	T1c	größter Ø > 2 und ≤ 3 cm
	T2	größter Ø > 3 und ≤ 5 cm oder: Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Carina, aber ohne direkte Invasion der Carina; Infiltration der viszeralen Pleura oder tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen, Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen
	T2a	größter Ø > 3 und ≤ 4 cm
	T2b	größter Ø > 4 und ≤ 5 cm
	T3	größter Ø > 5 und ≤ 7 cm, oder Infiltration von Thoraxwand, Nervus (N.) phrenicus, parietales Perikard; oder zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
	T4	größter Ø > 7 cm oder mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina, zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen

<b>N</b> <b>(Lymphknoten)</b>	Nx	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	keine Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und / oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und / oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
	N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und / oder subkarinalen Lymphknoten
	N3	Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateralen tiefzervikalen, supraclaviculären Lymphknoten
<b>M</b> <b>(Metastase)</b>	M0	keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen
	M1a	separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen, Pleura mit knotigem Befall, maligner Pleuraerguss, maligner Perikarderguss
	M1b	isolierte Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ
	M1c	mehrere Fernmetastasen (>1) in einem oder mehreren Organen

Das Tumorstadium ergibt sich aus den TMN-Stadien (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien nach Union for International Cancer Control (UICC) 8 (Goldstraw et al. 2016)**

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA1</b>	T1a (mi)	N0	M0
	T1a	N0	
<b>IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>IB</b>	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0

<b>IIB</b>	T1a-c T2a T2b T3	N1 N1 N1 N0	M0
<b>IIIA</b>	T1a-c T2a-b T3 T4 T4	N2 N2 N1 N0 N1	M0
<b>IIIB</b>	T1a-b T2a-b T3 T4	N3 N3 N2 N2	M0
<b>IIIC</b>	T3 T4	N3 N3	M0
<b>IVA</b>	Jedes T Jedes T	Jedes N Jedes N	M1a M1b
<b>IVB</b>	Jedes T	Jedes N	M1c

### 1.2.2 Diagnostik

Bei neu auftretenden Symptomen ist die Computertomographie (CT) des Thorax die Methode der ersten Wahl zur Diagnostik von Raumforderungen. Als Alternative bietet sich eine Positronenemissionstomographie mit Computertomographie (PET/CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) an. Außerdem kann eine zytologische Untersuchung der pleuralen Flüssigkeit oder des Sputums durchgeführt werden.

Zur Sicherung und Differenzierung einer Raumforderung folgt auf die bildgebende Diagnostik die Biopsie, entweder bronchoskopisch oder transthorakal (Spiro et al. 2007).

### 1.2.3 Therapie

Das Therapiekonzept setzt sich aus einer Kombination aus chirurgischer Resektion, Chemotherapie und Radiotherapie zusammen und unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Histologie und dem Tumorstadium.

#### Therapie bei Tumorstadium I oder II

Die Therapie der Wahl in den Stadien I und II ist die chirurgische Resektion. Anzustreben ist eine Lobektomie mit Entfernung der angrenzenden Lymphknoten über einen minimal-invasiven Zugang. Würde der Patient eine Lobektomie nicht tolerieren, ist eine subtotale Lobektomie durchzuführen. Zusätzlich ist im Stadium II die adjuvante Chemotherapie als Teil des Therapieschemas empfohlen. Eine Nachbestrahlung ist nach R0-Resektion nicht indiziert und nur bei R1- oder R2-Resektion je nach Situation zu erwägen.

Für inoperable Patienten besteht keine gute Datenlage. Für das Stadium I wird die stereotaktische Strahlentherapie und für das Stadium II die Radiochemotherapie (in Analogie zu den Daten für das Stadium III) bevorzugt. (Huber 2011)

#### Therapie bei Stadium III

Das Tumorstadium III umfasst ein heterogenes Spektrum der Tumorausbreitung, so dass die zum Einsatz kommenden Therapiekonzepte sehr unterschiedlich sein können. Generell ist eine aggressive Kombination aus Radio- und Chemotherapie die Methode der Wahl. Auch eine neoadjuvante Chemotherapie in Kombination mit einer chirurgischen Resektion ist bei bestimmten Tumoren vorteilhaft. (Huber 2011)

#### Therapie bei Stadium IV

Im Stadium IV werden palliative Therapiekonzepte zur Verbesserung der Lebensqualität eingesetzt. Moderne Therapiekonzepte mit Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie konnten in den vergangenen Jahrzehnten das Überleben und die Lebensqualität erkrankter Patienten steigern. Inzwischen scheint jedoch ein Plateau der Effektivität der "klassischen" Therapieformen erreicht zu sein, so



dass weitere Modifikationen zu keiner wesentlichen Verbesserung der Prognose führen.

#### **1.2.4 Neue Therapieoptionen**

Ein vielversprechendes Konzept ist eine auf den Phäno- und Genotyp des Tumors zugeschnittene Therapie. Eine derartige Therapie erfordert ein vertieftes molekulares Verständnis der Erkrankung (Longo et al. 2011).

Zielgerichtete Arzneimittel gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR) und die anaplastic lymphoma kinase (ALK) zeigen gute Ergebnisse. Zusätzlich konnten aktivierende Mutationen in den Genen BRAF, KRAS und human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) identifiziert werden, was mögliche therapeutische Ziele für die Zukunft darstellt (Zappa & Mousa 2016).

Einen steigenden Stellenwert hat die Immunotherapie mit dem Ziel den Pfad der Immun-Checkpoints (IC) und somit die IC-Fehlregulation durch zelluläre Tumor-Resistenzmechanismen zu blockieren (Pardoll 2012). Im Rahmen der Immunotherapie werden durch Exposition des Immunsystems auf tumorassoziierte Antigene verschiedene Impfpräparate in Phase III Studien getestet (de Gruijl et al. 2008).

Außerdem ermöglichen besonders die Fortschritte in der Molekularbiologie und Biotechnologie die Entwicklung von auf Nukleinsäuren basierenden Therapeutika. Die Therapeutika wirken gezielt auf die genetischen Alterationen sowie auf molekulare Mechanismen, die für die Tumorgenese beziehungsweise Erhaltung des malignen Phänotyps verantwortlich sind. Eine lokale intratumorale Expression von therapeutischen Proteinen verursacht einen konstanten therapeutischen Effekt im Tumorgewebe ohne eine relevante systemische Toxizität (Yokota 2000; Knudson 2001). Die Wirkung dieser Therapeutika basiert auf der RNA-Interferenz.

### **1.3 RNA-Interferenz**

Das Zellwachstum und der Zelltod werden durch eine Balance zwischen der Aktivität von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen bestimmt. Die Expression kann auf verschiedenen Ebenen (Transkriptions- und Translationskontrolle) erfolgen.

Bei der Ribonukleinsäure-(RNA)-Interferenz (RNAi) kommt es durch kleine doppelsträngige-(ds)-RNAs (sogenannte micro RNAs (miRNAs; (Fire et al. 1998) zur Inhibition (silencing) der komplementären messenger-(m)-RNA (Dillin 2003). Die Translation der mRNA zum Protein wird gehemmt (Fire et al. 1998). Dieser effiziente Prozess eines posttranskriptionalen Gen-Silencing (PTGS), an dem neben der RNA zahlreiche zelluläre Proteine beteiligt sind, ist bei allen Eukaryoten zu beobachten. Er dient als natürlicher Schutz vor Viren und spielt bei der natürlichen Regulation der Genexpression eine bedeutende Rolle. Andrew Fire und Craig Mello beschrieben die RNAi erstmals bei Pflanzen und erhielten für ihr Werk 2006 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Durch die Injektion von spezifischen dsRNAs ist ein silencing von Genen möglich, deren Expression bei Erkrankungen gestört ist (Kurreck 2009).

#### **1.3.1 Mechanismus der RNA-Interferenz**

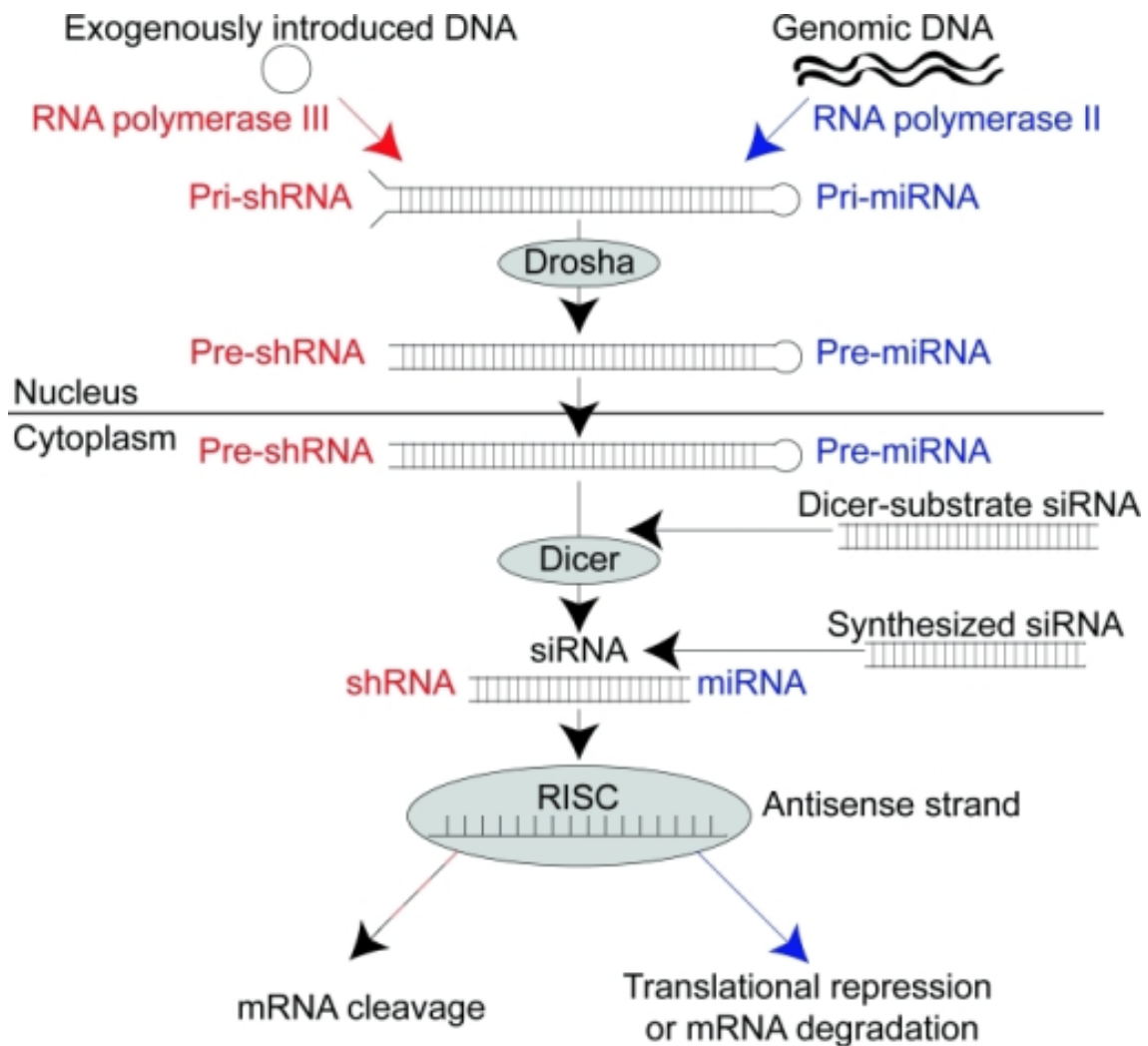
Ausgangspunkt der RNAi ist eine relative lange dsRNA, die entweder von der RNA-Polymerase II aus genomischen Sequenzen transkribiert wird (Pri-miRNA, s. Abb. 1) oder durch die Transkription von extern eingebrachten DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide) entsteht (Pri small hairpin RNA; Pri-shRNA).

Nach einem ersten Prozessierungsschritt verlässt die dsRNA den Zellkern und wird im Zytoplasma durch die Endoribonuklease Dicer zu einer kleinen, 21-23 Basenpaare (bp) langen, dsRNA gespalten. Dicer ist ein RNase-III ähnliches Enzym mit zwei RNase-III Domänen sowie einer PAZ-Domäne. Die Länge der entstehenden small interfering (si) RNAs wird durch den Abstand des Helixbereichs bzw. durch den Abstand zwischen den beiden Domänen bestimmt. Die siRNAs können auch von außen ins Cytoplasma eingebracht werden (siehe unten). Sie bestehen aus einer ca. 19 Nukleotid-langen Helix mit zwei nicht-gepaarten Nukleotiden an jedem 3' Ende (Kurreck 2009).

In einem weiteren Schritt werden die siRNAs in Einzelstränge (sense- und antisense-Strang) gespalten. Der Leitstrang (oder antisense) bildet zusammen mit Argonaut-Proteinen den RNA-induced silencing complex (RISC). Die Aufnahme der siRNA in den RISC erfolgt mithilfe des RISC-Loading complex (RLC), der in Säugetieren aus Dicer und dem TAR RNA binding protein (TRBP) besteht (Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005).

Durch die siRNA wird der RISC zur Ziel-RNA geführt. Die Ziel-RNA wird im Anschluss zentral, 10 Nukleotide vom 5' Ende entfernt gespalten (Elbashir et al. 2001). Eine wichtige Rolle kommt hier dem Protein Argonaut2 (Ago2) zu, welches der RNase H ähnelt und somit die slicer Aktivität ähnlich der DNA/RNA Spaltung ausübt (Liu et al. 2004).

Durch die Spaltung verlieren die Ziel-RNAs das stabile 5' Ende und den Poly-A Schwanz des 3' Endes, wodurch sie destabilisiert und durch die RNase abgebaut werden. Die Folge ist, dass die mRNA nicht translatiert wird und das von ihr kodierte Protein nicht entsteht (Kurreck 2009; Bernstein et al. 2001).



**Abbildung 1: Mechanismus der RNA-Interferenz (Cohen & Xiong 2011)**

DNA – Desoxyribonukleinsäure, RNA – Ribonukleinsäure, shRNA – small hairpin RNA, miRNA – microRNA, Pri-shRNA – primary small hairpin RNA, Pri-miRNA – primary microRNA, Pre-shRNA – precursor small hairpin RNA, Pre-miRNA – precursor microRNA, siRNA – small interfering RNA, mRNA – messenger RNA, RISC – RNA-induced silencing complex

### 1.3.2 Small interfering (si) RNAs

Durch die Entdeckung der RNAi konnten die Techniken des posttranskriptionalen Gen-Silencing (PTGS) erweitert werden. In den vergangenen Jahren ist das Interesse am therapeutischen Einsatz von siRNA-Molekülen stetig gestiegen. Durch die Weiterentwicklung der genetischen Engineering-Prozesse konnte die Affinität der siRNA-Moleküle für die Zielgene verbessert und Kreuzreaktionen mit anderen mRNA-Molekülen reduziert werden (Guo et al. 2012).

Auf siRNAs basierende therapeutische Mittel besitzen eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber konventionellen Medikamenten:

- Der Wirkmechanismus ist gut bekannt.
- Der Wirkmechanismus ist für jede Ziel-RNA identisch.
- Die Identifikation von Leitsubstanzen gelingt relativ schnell-
- Als Ziel kann jede mRNA verwendet werden, auch Transkripte von Targets, die auf Proteinebene für die eine medikamentöse Beeinflussung nicht oder schwer zugänglich sind.

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der siRNA-Moleküle sind vom Standpunkt der pharmazeutischen Entwicklung suboptimal. siRNAs sind bei einer Größe von ca. 13 kDa relativ große Polyanionen mit niedriger Hydrophobie. Diese Eigenschaft erschwert den Transport durch die Zellmembran und führt zu einer elektrostatischen Abstoßung von der negativ geladenen Zelloberfläche. Dennoch sind die siRNAs (<10 nm) ausreichend klein, um die Fenestrations in den Glomeruli zu durchqueren, so dass es zu einer schnellen Clearance der siRNAs durch die renale Filtration kommt (Gao et al. 2009). Zusätzlich begünstigt die schlechte Bindungskapazität der siRNAs an Plasmaproteine die renale Clearance. Außerdem enthalten extrazelluläre Bioflüssigkeiten wie Plasma hohe Konzentrationen an RNasen. Nicht-modifizierte RNA-Duplexe werden schnell, innerhalb von Minuten nach der intravenösen Injektion, hydrolysiert. Aus diesem Grund führt die Injektion von nackten siRNAs nicht zu einem effizienten Gene silencing (Tsui et al. 2002; Dowler et al. 2006; Soutschek et al. 2004).

Die posttranskriptionale Gen-Silencing-Aktivität von siRNAs ist mit wenigen Ausnahmen auf das Zytoplasma beschränkt (Zeng & Cullen 2002; Gagnon et al. 2014). Um in zytoplasmatische RISC inkorporiert zu werden, müssen die über Endozytose aufgenommenen siRNAs aus dem Endosom entweichen. Andernfalls wird die siRNA im Lysosom abgebaut oder durch Exozytose re-exportiert. Diese Mechanismen schränken die Effektivität des Gen-Silencing wesentlich ein (Sahay et al. 2013).

In vivo Lieferung können siRNAs entweder lokal oder systemisch verabreicht werden.

### **1.3.3 Lokale Applikation**

Bis heute wurden bereits verschiedene Ansätze zur lokalen Applikation von siRNA-Molekülen in Tiermodellen getestet. Die Strategie beinhaltet eine Injektion von nackter oder formulierter siRNAs in das Zielgewebe oder Zielorgan. Dabei kommen intranasale, intraokulare, intratumorale, intramuskuläre oder intrazerebrale Applikationsformen zum Einsatz (Bitko et al. 2005; Nakamura et al. n.d.; Pillé et al. 2005; Golzio et al. 2005; Grzelinski et al. 2006).

Bei der lokalen Applikation zirkulieren die siRNA-Moleküle nicht durch den Körper. Eine hohe Bioverfügbarkeit im Zielgewebe kann daher mit einer geringen Dosierung erreicht werden. Bei einer lokalen Applikation können nackte siRNA-Moleküle eingesetzt werden. Trotz der einfachen technischen Durchführbarkeit, der Effizienz und der Selektivität ist die lokale Applikation nur bei invasiv zugänglichen Geweben und damit nur selten einsetzbar (Niu et al. 2006).

### **1.3.4 Systemische Applikation**

Anders als Schleimhäute und subkutane Gewebe sind viele Organe und Gewebe nicht durch eine direkte Verabreichung von siRNA-Molekülen erreichbar. Die alternative systemische Applikation weist verschiedene Hürden auf. Dazu zählen die Gefahr der Phagozytose durch Immunzellen, der Elimination über die Niere und des Abbaus der siRNA sowie die fehlende Membrandurchgängigkeit.

Diese Effekte reduzierten die Wirkeffizienz der siRNA erheblich (Peer & Shimaoka 2009).

## **1.4 Liposomen**

Liposomen sind Vesikel aus einer Phospholipid-Doppelschicht und ähneln in ihrem Aufbau daher natürlichen Zellmembranen. Die konzentrisch angeordneten Phospholipid-Doppelschichten können sowohl hydrophile Stoffe als auch lipophile Stoffe aufnehmen (s. Abb. 2) (Monteiro et al. 2014).

Die Liposomenforschung begann in den 1960er Jahren (Bangham et al. 1965). In den 1970er Jahren wurden Liposomen als Transportsystem (drug delivery system) vorgeschlagen (Gregoriadis 1976; Bangham et al. 1965).

Anhand der Größe und der Anzahl der Lipid-Doppelschichten werden Liposomen in folgende Kategorien aufgeteilt:

- multilamellare Vesikel (MLV)
- unilamellare Vesikel:
  - große unilamellare Vesikel (LUV)
  - kleine unilamellare Vesikel (SUV)

Die unilamellaren Vesikel bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die eine wässrige Lösung umgibt, in welcher hydrophile Stoffe aufgenommen werden können. Die multilamellaren Vesikel zeichnen sich durch eine zwiebelartige Struktur aus, bei der mehrere konzentrische unilamellare Vesikel durch Wasserschichten getrennt sind (Akbarzadeh et al. 2013).

Die Genese der Liposomen basiert auf der Selbstassoziation von Phospholipiden im wässrigen Milieu. Die Hauptbestandteile von Liposomen sind Phospholipide und Cholesterol (Monteiro et al. 2014).

Liposomen verbessern die Pharmakokinetik von Arzneistoffen wie siRNAs. Die Verteilung von in Liposomen verkapseltem Arzneistoffen sind unabhängig von deren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die Umhüllung verhindert jedoch gleichzeitig eine spezifische Interaktion der Arzneistoffe mit den Tumorzellen und ein spezifisches Targeting. Bei ersten Versuchen zur systemischen Applikation zeigte sich eine Anreicherung der Liposomen in Organen (Leber, Milz, Lunge) des Retikulo-endothelialen-Systems (Kimmelberg 1976). Das Retikulo-endotheliale-System ist ein wichtiger Teil des Immunsystems mit der Aufgabe körperfremde Stoffe aus dem Blutkreislauf zu eliminieren. Die Serumstabilität der Liposomen wird von Immunglobulinen, Lipoproteinen und Komplementfaktoren beeinflusst (Bonté et al. 1987). Durch die Phagozytose der Liposomen beträgt ihrer Halbwertszeit in der Zirkulation nur wenige Minuten. Durch eine Verkleinerung der Vesikel und durch eine Erhöhung des Cholesterol-Anteils konnte der Abbau nur geringfügig reduziert werden (Juliano & Stamp 1975). Eine zusätzliche Prädosierung mit leeren, "funktionslosen" Liposomen führte nur zu

einer geringfügigen Verbesserung der Pharmakokinetik (Aragno & Leserman 1986).

Erst die Entwicklung von „Stealth“-Liposomen ermöglichte eine relevante Reduktion der Phagozytose. Durch Beschichtung der Liposomen mit hydrophilen Polymeren wird die Oberflächendichte erhöht und es entsteht eine Barriere, wodurch die Adsorption von Proteinen an die Liposomenoberfläche reduziert ist. Damit werden die Markierung der Liposomen mit Opsoninen und die Phagozytose vermindert (Blume & Cevc 1990; Monteiro et al. 2014).

Zur Verhinderung des Ausflusses des enkapsulierten Materials und zur Erhöhung der Serumstabilität kann der Anteil des Cholesterols erhöht oder hochgradigen, reine, rigide und gesättigte Lipiden verwendet werden (Kirby & Gregoriadis 1980).

## **1.5 Nanoliposomen**

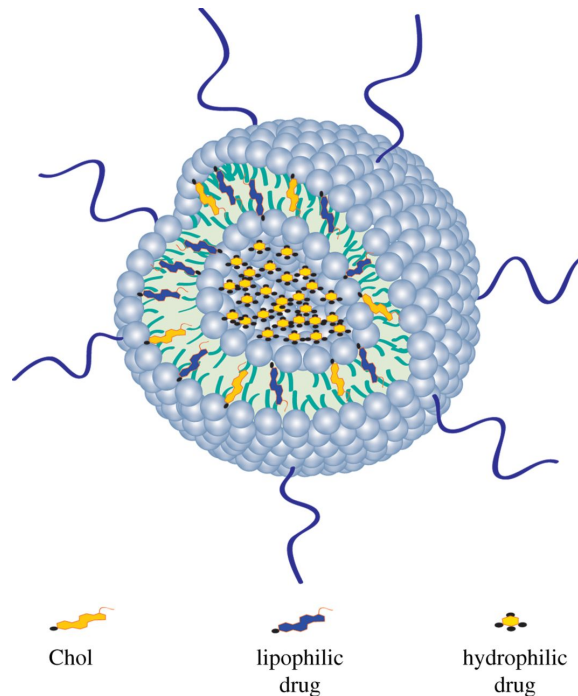
Nanoliposomen sind nanometrische Versionen von Liposomen. Sie besitzen die gleichen chemischen, thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften. Im Vergleich zu Liposomen haben Nanoliposomen jedoch eine größere Oberfläche. Weiter zeichnen sie sich durch eine potentiell bessere Löslichkeit, Bioverfügbarkeit, kontrollierte Freigabe des Arzneimittels und durch ein spezifisches Targeting aus (Mozafari 2009). Das spezifische Targeting wird durch Bindung von Liganden, wie z.B. Antikörper, ermöglicht.

Der chemische Hauptbestandteil von Nanoliposomen sind Lipide und/oder Phospholipide. Lipide bestehen aus verschiedenen Fettsäuren und Kopfgruppeneinheiten. Phospholipide haben den gleichen Grundaufbau wie Triglyzeride. Sie besitzen einen hydrophilen Kopf (Glycerin, Phosphat, Alkohole) und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten. Im Vergleich zu den Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren, die eine erhöhte Fluidität durch die Membranen besitzen, zeigen die Phospholipide mit gesättigten Fettsäuren innerhalb der Membranen eine starre Struktur (Pouton 2000).

Nanoliposomen können neben Lipiden und Phospholipiden andere Moleküle wie z.B. Sterole beinhalten. Auch Sterole sind Bestandteile vieler natürlichen



Membranen. Die Integration von Sterolen in die nanoliposomale Lipid-Doppelschicht verändert die Vesikeleigenschaften.



**Abbildung 2: Enkapsulation von lipophilen und hydrophilen Arzneistoffen in Liposomen.** Der hydrophile Stoff ist im Inneren des Liposoms, der lipophile Stoff in der Lipid-Doppelschicht enkapsuliert. Cholesterol (Chol) und lipophile Stoffe konkurrieren um die Freiräume in der Lipid-Doppelschicht (Monteiro et al. 2014).

### 1.5.1 Herstellung von Nanoliposomen

Die Phospholipidmoleküle ordnen sich mithilfe von Van-der Waals Kräften und hydrophilen sowie hydrophoben Wechselwirkungen in Form einer Doppelschicht an. Bei diesem Prozess positionieren sich die hydrophilen Kopfgruppen nach außen und die hydrophoben Fettsäuren zeigen zur Mitte der Membran und treten in Kontakt mit den hydrophoben Fettsäuren der gegenüberliegenden Monoschicht. Die Herstellung von Nanoliposomen ist ohne suffiziente Energiezufuhr in Form von Beschallung, Homogenisierung oder Erwärmung nicht möglich (Mozafari 2009). Gute Ergebnisse zeigt die Trockenfilm-Methode, bei welcher aus dem entstandenen Lipidfilm mithilfe eines Ultraschallbades unilamellare Vesikel geformt werden. Die Größe der Nanoliposomen wird durch die anschließende Extrusions-Methode definiert (Michel et al. 2017).

## **1.6 Drug-Targeting**

Beim Drug-Targeting wird zwischen einem passiven und einem aktiven Targeting unterschieden. Beim passiven Targeting kommt es zur Anreicherung der Liposomen als Arzneistoffvehikel in den Organen des Retikulo-endothelialen-Systems. Diese Therapiemethode ist z.B. bei Befall von Leber und Milz sinnvoll (Gilbreath et al. 1985). Das passive Targeting ist zusätzlich bei soliden Tumoren eine Alternative. Die Endothelzellen der neu gebildeten Gefäße in den wachsenden Tumoren besitzen keine Basalmembran und erleichtern somit das Eindringen von Liposomen in das Tumorgewebe.

Beim aktiven Targeting ermöglichen spezifische Oberflächenstrukturen der Liposomen die spezifische Bindung an das Zielgewebe. Für die Funktionalisierung der Liposomen mit spezifischen Oberflächenstrukturen eignen sich beispielsweise Antikörper, da die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen sich durch eine hohe Spezifität und Bindungsaffinität auszeichnet (Gregoriadis 1975). Ein Beispiel des aktiven Targetings ist die Verwendung von tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern in der Krebstherapie (Koning et al. 1999). Bereits 1975 wurde der erste erfolgreiche Versuch eines Antikörpervermittelten Targetings publiziert (Gregoriadis 1975).

Die bestimmenden Faktoren an der Oberfläche der Zielzellen müssen sich qualitativ und quantitativ vom umgebenden Gewebe unterscheiden. Im Idealfall werden sie nur unter pathologischen Bedingungen exprimiert. Beispiele für Moleküle die dies Anforderungen weitgehend erfüllen sind Adhäsionsmoleküle im Entzündungsgebiet. Weiter können morphologische Veränderungen des erkrankten Gewebes Strukturen zugänglich machen. Dazu zählt z.B. Myosin im ischämischen Herzgewebe (Bloemen et al. 1995; Khaw et al. 1995).

## **1.7 Endothel und Selektine**

Bei der systemischen Anwendung von Liposomen stellt die Kompartimentsbeschränkung ein weiteres Problem dar. Die physiologische Barriere des Endothels verhindert eine ungehinderte Extravasation der Vesikel. Als Grenzschicht zwischen Gewebe und Gefäßen bildet das Endothel mithilfe der Schlussleistenkomplexe einen geschlossenen Zellverband. Der

transendotheliale Transport erfolgt über unspezifische und spezifische Prozesse. Im Rahmen der systemischen Applikation von nanoliposomalen Komplexen ist die rezeptorvermittelte Endozytose bedeutsam. Spezifische Rezeptoren auf der luminalen Zelloberfläche der Endothelzellen ermöglichen die Aufnahme von Stoffen.

Im Rahmen einer Entzündung kommt es zur Extravasation von Leukozyten in das betroffene Gewebe. Auch Tumorzellen verbreiten sich über die Blutbahn, treten durch das Endothel und metastasieren so in andere Organe. Für den Durchtritt der Zellen sind Selektine und Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie von großer Bedeutung (Bevilacqua & Nelson 1993).

Selektine sind membrangebundene Glykoproteine; zu ihnen gehören E-Selektin (CD62E), L-Selektin (CD62L) und P-Selektin (CD62P). E-Selektin wird ausschließlich von Endothelzellen nach Aktivierung durch Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Lipopolysacchariden synthetisiert (Kelly et al. 2007).

## **1.8 Immunliposomen**

Bei Immunliposomen werden selektive Strukturen wie Antikörper an die Oberfläche der Liposomen gekoppelt. Zur kovalenten Kopplung werden Ankerproteine, wie das modifizierte Polyethylenglykol-(PEG)-Molekül Maleimid-(Mal)-PEG<sub>2000</sub>-1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-(DSPE), benötigt. Der hydrophobe Teil des PEG-Moleküls ist in der Lipiddoppelschicht verankert. Die PEG-Moleküle tragen gleichzeitig zur Halbwertszeitverlängerung der Liposomen im Körper bei.

Zur Herstellung der Immunliposomen kann entweder die konventionelle oder die Postinsertionsmethode verwendet werden. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht im Zeitpunkt der Kopplung der single-chain variable fragments (scFv) an die Liposomen. Bei der konventionellen Methode werden die scFv an Liposomen gekoppelt, die bereits Mal-PEG<sub>2000</sub>-DSPE enthalten. Bei der Postinsertionsmethode werden die scFv zunächst an Mal-PEG<sub>2000</sub>-DSPE-Mizellen gekoppelt und erst im Anschluss in die Doppelschicht der Liposomen eingebaut (Allen et al. 2002).

Im Rahmen des Drug-Targetings müssen die Liposomen in der Zirkulation ausreichend stabil sein. Im Zielgewebe müssen sie aber den transportierten Wirkstoff in die Zellen abgeben. Das kann entweder über eine aktive Internalisierung oder über eine Zusammenführung von Liposomen und Zellmembran geschehen. Eine zusätzliche Alternative ist die extrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes und die anschließende Aufnahme ins Zytoplasma. Zu den Optimierungsmöglichkeiten gehören die Größe der Liposomen, die Lipidzusammensetzung oder die Nutzung von Controlled-Release-Mechanismen. Temperatur-, pH- und Target-sensitive Liposomen ermöglichen die Steuerung der Stabilität und eine gezielte Freisetzung des Wirkstoffs im Zielgewebe (Ellens et al. 1984).

## **1.9 Angiogenese und interzelluläre Adhäsionsmoleküle**

Die Angiogenese spielt beim Wachstum und bei der Progression von Tumoren eine große Rolle. Zu den angiogenetischen Faktoren zählen der vascular endothelial growth factor (VEGF) und der basic fibroblast growth factor (bFGF) (Folkman 2006). Eine zusätzliche Therapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF zeigte eine höhere Therapiewirkung, ein längeres progressionsfreies Überleben und bessere Überlebensraten als eine alleinige Chemotherapie (Sandler et al. 2006; Bunn et al. 2006).

Zelladhäsionsmoleküle wie das intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und das vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) ermöglichen die Interaktion zwischen Zellen verschiedener Abstammung und sind in pathologische Prozesse wie Atemwegsentzündungen und Tumorwachstum involviert (Fraire et al. 2003). ICAM-1 ist ein Oberflächenprotein auf Endothelzellen, Lymphozyten und Monozyten und ein Ligand für Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) (Witkowska et al. 2016; Dowlati et al. 2008). Durch die Bindung von ICAM-1/LFA-1 können cytotoxische T-Zellen an das Gefäßendothel binden und bei einer Entzündung ins Gewebe einwandern. Außerdem spielt ICAM-1 bei der Interaktion zwischen Antigen-präsentierten Zellen (APC) und T-Zellen eine Rolle. Die Expression von ICAM-1 wird durch Interferon-gamma, den TNF- $\alpha$  und IL-1

induziert (Lawson & Wolf 2009). Studien belegen, dass NSCLC-Zellen ICAM-1 exprimieren. Die Expression war in den Tumorzellen selbst am stärksten, aber auch in den Endothelzellen der Tumoren sowie in stromalen (nicht epithelialen) Zellen konnte eine signifikante Expression verzeichnet werden (Fraire et al. 2003).

Das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende VCAM-1 ist an der Adhäsion von mononukleären Zellen an Endothelzellen beteiligt. Als Adhäsionsfaktor für z.B. Melanomzellen ist VCAM-1 an der metastatischen Ausbreitung von Tumoren (Fraire et al. 2003).

### **1.10 Fragestellung und Ziele**

Aufgrund des limitierten Erfolgs etablierter Therapieverfahren beim Bronchialkarzinom in höheren Stadien bedarf es neuer Therapiekonzepte. Ein vielversprechender Ansatz ist die siRNA-Therapie zur Reduzierung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen am Lungenendothel (Walker et al. 2005). Systemisch applizierte siRNAs haben jedoch aufgrund der raschen Eliminierung (Phagozytose) und der geringen Membranundurchlässigkeit nur eine reduzierte Wirkeffizienz. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Trägersystems für die systemische siRNA-Therapie, das neben dem Schutz vor dem Abbau zusätzlich einen gezielten Transport ins Zielgewebe ermöglicht. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Testung verschiedener Zelllinien zur Etablierung eines geeigneten Modells zur Simulation der zellulären Vorgänge beim Bronchialkarzinom
- Identifizierung von Zielantigenen für einen gezielten Transport der Nanoliposomen,
- Analyse verschiedener Lipidmischungen und der Extrusionsmethode zur Herstellung von Nanoliposomen
- Entwicklung einer Methode mit hoher Transfektionseffizienz bei niedriger Zytotoxizität.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 gelistet.

**Tabelle 3:      Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ea.hy926</b>	ATCC®, Manassas, USA
<b>A549</b>	Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Hämatologie, Deutschland; DSMZ, Braunschweig, Deutschland
<b>HUVEC</b>	

Die Ea.hy926 Zelllinie ist ein Modell für Bronchialkarzinome. Sie ist aus einer Fusion von HUVEC- und humanen A549-Zellen entstanden und wird als in vitro Modellsystem für unterschiedliche physiologische sowie pathologische Prozesse, besonders im Rahmen der Angiogenese, genutzt. (THORNHILL et al. 1993)

Die A549 Zellen sind eine spezifizierte, humane Zelllinie, die aus einem explantierten Lungentumor eines Patienten im Jahr 1972 gewonnen wurden. Die Zelllinie besitzt die Charekteristika von Alveolar-Epithelzellen vom Typ II. (Foster et al. 1998)

HUVEC Zellen sind humane Endothelzellen die aus der Nabelschnurvene isoliert werden und alle spezifischen Marker von Endothelzellen exprimieren. Durch die Eigenschaften stellen die ein gutes Model zur erforschung der Angiogenese, Inflammation und Atherosklerose da. (Lidington et al. 1999)

Die verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 4 gelistet.

**Tabelle 4:      Verwendete Nährmedien**

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Dulbecco's    Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose</b>	PAA, Cölbe, Deutschland
<b>DMEM</b>	Lonza Walkersville Inc., Walkersville, USA

Die aufgeführten Medien wurden mit 50 ml Fetal calf serum (FCS, 10 % Endkonzentration), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, 100 U Pen / 100 µg Strep Endkonzentration und 1 % L-Glutamin ergänzt.

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 gelistet.

**Tabelle 5:      Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Absaugpumpe</b>	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
<b>Autoklav</b>	System DX-23, Wettenberg, Deutschland
<b>Begasungsbrutschrank</b>	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
<b>CASY®-Cellcounter</b>	ABX Micros 60 von AxonLab AG, Reichenbach, Deutschland
<b>Computer</b>	Apple, Cupertino, USA
<b>Extruder mini</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>Extrudorspritzen</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>Fluorescence activated cell     sorting-(FACS)- Gerät</b>	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA
<b>Feinwaage</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Zeiss, Jena, Deutschland

<b>Heizplatte</b>	Thermostat, Bovenden, Deutschland
<b>Inkubator</b>	Binder, Tuttlingen, Deutschland
<b>Inverses Mikroskop Axiovert 135</b>	Zeiss, Jena, Deutschland
<b>Kühlschrank</b>	Liebherr Premium, Kirchdorf, Deutschland
<b>Pipettierhilfe</b>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<b>Rotationsverdampfer</b>	Büchi Labortechnik, Essen, Deutschland
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer compact, Eppendorf AG, München, Deutschland
<b>Tischzentrifuge MiniSpin plus</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Vortex – Bio Vortex V1</b>	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
<b>Waage</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Wasserbad GFL 1083</b>	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
<b>Werkbank</b>	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
<b>Zentrifuge 5415R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Zentrifuge Cryofuge 5500i</b>	Heraeus Instrument GmbH, Osterode, Deutschland

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6 gelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CASY®-ton</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<b>1000 U Pen / 1000 µg Strep / ml</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-treated water</b>	Ambion, Foster City, USA
<b>Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS) ohne Ca<sup>2+</sup> /Mg<sup>2+</sup></b>	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland



<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Ethanol absolut</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>FACSRinse / FACSClean</b>	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA
<b>FCS</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>INTERFERin®</b>	PEQ LAB, Erlangen, Deutschland
<b>L-Glutamin (200 mM)</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trypsin neutralizing solution (TNS; 0,05 % Trypsin-Inhibitor, 0,1 % BSA)</b>	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
<b>Trypan Blue Solution 0,4 %</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>0,04 % Trypsin / 0,03 % EDTA</b>	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
<b>VascuLifeBasal-Medium</b>	Lifeline Cell Technology, Wakersville, USA
<b>Egg phosphatidylcholine (EPC); Mw 768 g/mol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Cholesterol; Mw 386 g/mol</b>	Calbiochem, San Diego, USA
<b>Mal-PEG<sub>2000</sub>-DSPE; Mw 2941,6 g/mol</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetra- methylindo-carbocyanine perchlorate (DIL); Mw 933,87 g/mol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Hydrogenated soy phosphatidyl-choline (HSPC); Mw 783,774 g/mol</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>DSPE; Mw 748,07 g/mol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Cholesterol-PEG</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Chloroform</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

<b>N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl- sulfate (DOTAP); Mw 698,542 g/mol</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine (DOPE); Mw 744,034 g/mol</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
<b>DSPE-PEG<sub>2000</sub>; Mw 2790,486 g/mol</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

DIL ist ein lipophiler Membranfarbstoff (DIL) verwendet, der sich durch laterale Diffusion in der ganzen Zelle ausbreitet. Er ist schwach fluoreszierend, bis er in Membranen eintritt.

Die weiteren verwendeten Materialien sind in Tabelle 7 gelistet.

**Tabelle 7:      Zusätzlich verwendete Materialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>0,5 ml DNA LoBind Tube</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>1,5 ml DNA LoBind Tube</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Cellstar cell culture flasks</b>	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Multiply-pro Gefäß 0,2 ml</b>	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<b>15 ml Cellstar Tube</b>	Greiner Bio-One, International AG, Kremsmünster, Deutschland
<b>50 ml BD Falcon</b>	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>12-well Falcon</b>	Corning Incorporated, New York, USA
<b>UVette 220–1600 nm (RNase-, DNA-, Protein-frei)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Membranen PC 0,05 µm 19 mm</b>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

<b>Pipettenspitzen Dualfilter (PCR clean, steril); 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Safe Lock Tubes 1,5 ml</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Twin.tec PCR plate 96 (wells)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup></b>	Corning Incorporated, New York, USA

Die verwendeten siRNAs sind in Tabelle 8 gelistet.

**Tabelle 8: Verwendete siRNAs**

<b>siRNA</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>SCR (scrambled)</b>	Nicht veröffentlicht, aber der Hersteller garantiert durch Untersuchung mit Micro-Arrays, dass keine Homologie zum menschlichen Transkriptom existiert	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Alexa Fluor (AF488)</b>	Nicht veröffentlicht, aber der Hersteller garantiert durch Untersuchung mit Micro-Arrays, dass keine Homologie zum menschlichen Transkriptom existiert	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>E-Selectin</b>	sense 5'-UUG AGU GGU GCA UUC AAC CTT-3' antisense 5'-GGU UGA AUG CAC CAC UCA ATT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
<b>VCAM-1</b>	sense 5'-AAU GCA ACU CUC ACC UUA ATT-3' antisense 5'-UUA AGG UGA GAG UUG CAU UTT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
<b>ICAM-1</b>	sense 5'-GCC UCA GCA CGU ACC UCU ATT-3' antisense 5'-UAG AGG UAC GUG CUG AAG CTT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 gelistet.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD54E (ICAM-1)</b>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>CD62E (E-Selectin)</b>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>Alexa Flour 488 Mouse anti-Actin (AF488)</b>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>CD106 (VCAM-1)</b>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

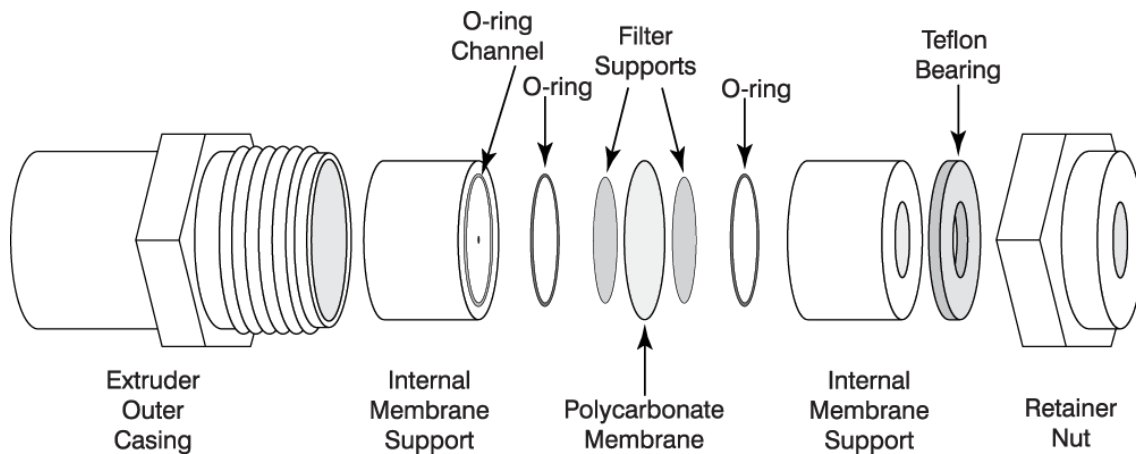
## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultivierung**

Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit den in Tabelle 4 aufgeführten Nährmedien. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von mindestens 80 % wurden die adhärenen Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellkulturen mit 6 ml PBS für 30 Sekunden gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 6 ml Trypsin / EDTA bei 37 °C von der Platte gelöst. Durch Zugabe von 6 ml TNS wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 300 x G zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml Medium resuspendiert. Für die Versuche wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf 12-Well-Platten verteilt.

### **2.2.2 Extrusion**

Die Extrusion ist ein Prozess, bei dem mikrometrische Liposomen (z.B. multilamellare Vesikel MLV) zu großen unilamellaren Vesikeln (LUV) oder Nanoliposomen geformt werden. Die Vesikel werden unter Druck durch Polycarbonatfilter mit vordefinierter Porengröße extrudiert (s. Abb. 3 und Abb. 4).



**Abbildung 3: Aufbau des Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids. 2018)**



**Abbildung 4: Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids. 2018)**

### **2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Die FACS-Analyse ist eine leistungsfähige Methode zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden sowie DNA. Die Bestimmung von Oberflächenmolekülen basiert auf einer Antigen-Antikörper Reaktion. Der mit Zellmaterial angereicherte Flüssigkeitsstrom passiert einen fokussierten Laserstrahl und das dabei erzeugte Streu- sowie Fluoreszenzlicht wird detektiert (Komoda & Matsunaga 2015).

## 2.2.4 Größe der Nanoliposomen

Die Größe der Nanoliposomen wurde mit dem Zetasizer Nano ZS gemessen. Dazu wurden die nanoliposomalen Komplexe nach der Extrusion 20 min von 43 °C auf Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluss gemessen.

## 2.2.5 Zelltoxizität

Zur Kontrolle der Zelltoxizität wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers CASY® bestimmt. Die Technologie basiert auf einem elektronischem Kapillarsystem ohne Zählkammer. Die Zellen werden kontinuierlich im Durchfluss durch die Messpore gezählt, wobei die Messung von einer intakten Zellmembran abhängt (OMNI Life Science 2017).

Nach einer 72 h dauernden Transfektion mit den nanoliposomalen-siRNA-Komplexen wurde von den Zellen das Medium abgesaugt und anschließend die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA und TNS abgelöst sowie in DMEM resuspendiert. 50 µl Zellsuspension wurden in einen CASY®-Cup zusammen mit 10 ml CASY®-Ton pipettiert und zur Messung vorbereitet.

## 2.2.6 Liposomenpräparation

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Herstellung von Liposomen verwendet (s. Abb. 5). Dabei wurden die Lipidzusammensetzung und der Gesamtlipidgehalt verändert. Die Zusammensetzungen sind unter den jeweiligen Methoden näher erläutert.

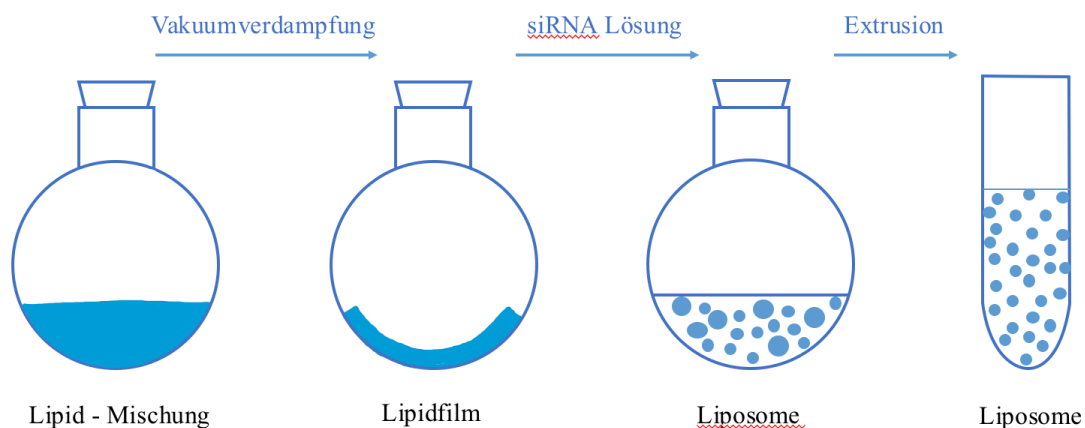


Abbildung 5: Herstellung von Liposomen

### 2.2.7 EPC-Nanoliposomen

EPC, Cholesterol und DSPE wurden in einem molaren Verhältnis von 65 : 30 : 5 (163 µl EPC, 116 µl Cholesterol, 124 µl DSPE Stock für 1 ml) vermischt. Danach wurde DIL (Fluoreszent) im Stoffmengenanteil von 0,3 % (81 µl DIL stock für 1 ml Liposomen) zugegeben. Die Mischung wurde in Chloroform gelöst und für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer gegeben. Anschließend wurden die Lipidfilme für 1 h unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet, in 1 ml 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-(HEPES)-Puffer (pH 6,7) aufgenommen und gevortext, bis alles gelöst war. Die Lösung wurde 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert. Anschließend folgte die Transfektion in einer 12-Well-Platte mit 5 mM oder 10 mM Liposomen auf 120.000 Endothelzellen (HUVEC).

**Tabelle 10: Versuchsansätze mit ESP-Nanoliposomen, Endothelzellen und DIL**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen (µM)	DIL
2	Ohne	Ohne
2	5	Mit
2	10	Mit

Die Inkubationsdauer betrug 8 h mit anschließender Zugabe von 1 ml Vollmedium für 24 h. Die Analyse, der mit DIL gefärbten Zellen, erfolgte mittels FACS im Kanal FI-2.

### 2.2.8 HSPC-Nanoliposomen

In dieser Versuchsreihe wurde anstatt EPC HSPC verwendet. Außerdem wurde die Lipidkonzentration auf 100 nM erhöht.

Die Liposomenmischung wurde mit 342,5 µl HSPC, 29 µl Cholesterol und 31 µl DSPE in doppelter Ausführung vorbereitet. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer gegeben. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet. Jedem Ansatz wurde 30,4 µl einer 20 µM siRNA<sup>AF488</sup> gelöst in HEPES-Puffer (pH 6,7) hinzugefügt. Zusätzlich wurde einem Versuchsansatz 5,54 µl das

Transfektionsreagenz INTERFERin® zugefügt. Dann wurden die Ansätze bis zur Lösung der Bestandteile gevortext. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert und entsprechend den in der Tabelle 11 angegebenen Konzentrationen, auf 150.000 A549-Zellen pro Well gegeben.

**Tabelle 11: Versuchsansätze mit HSPC-Nanoliposomen, A549-Zellen und siRNA<sup>AF488</sup>**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen mit siRNA (µM)	TNF-α	CD106	Nanoliposomen	Transfektionsreagenz
2	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne
2	5	Mit	Mit	Ohne	Ohne
2	5	Mit	Mit	Ohne	INTERFERin®
2	10	Mit	Mit	AF488	Ohne
2	10	Mit	Mit	AF488	INTERFERin®

Die Inkubationsdauer betrug 8 h. Danach wurde 1 ml Vollmedium für 24 h hinzugegeben. Die Analyse der Transfektionseffizienz wurde mittels FACS im Kanal FI-1 durchgeführt.

### 2.2.9 HSPC-Nanoliposomen – VCAM-1-siRNA

Die Liposomenmischung wurde mit 342,5 µl HSPC, 29 µl Cholesterol und 31 µl DSPE in doppelter Ausführung vorbereitet. Anschließend wurde die Mischung für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer gegeben. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet. In jeden Ansatz wurden 30,4 µl VCAM-1-siRNA hinzugefügt. Zum Vergleich der Transfektionsreagenzien wurde ein Versuchsansatz mit 5,54 µl INTERFERin® ergänzt, der andere mit 11,08 µl DOTAP. Anschließend wurden die Ansätze bis zum Lösen aller Bestandteile gevortext. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert und entsprechend den in der Tabelle 12 angegebenen Konzentrationen, auf 150.000 HUVEC-Endothelzellen pro Well gegeben.



**Tabelle 12: Versuchsansätze mit HUVEC-Endothelzellen und VCAM-1-siRNA**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen mit siRNA ( $\mu\text{M}$ )	TNF- $\alpha$	CD106	Nanoliposomen	Transfektionsreagenz
2	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne
2	Ohne	Ohne	Mit	Ohne	Ohne
2	Ohne	Mit	Mit	Ohne	Ohne
2	5	Mit	Mit	VCAM-1	INTERFERin®
2	5	Mit	Mit	VCAM-1	DOTAP
2	10	Mit	Mit	VCAM-1	INTERFERin®
2	10	Mit	Mit	VCAM-1	DOTAP

In dem Versuch wurde VCAM-1-siRNA verwendet. Nach 3 h Inkubation mit den VCAM-1-siRNA-haltigen Nanoliposomen wurden die Komplexe abgesaugt und frisches Medium zugegeben. 6 h später wurden die Endothelzellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  aktiviert. Die Aktivierung der VCAM-1-Expression dauerte 14 h. Am Folgetag wurden die Endothelzellen mit dem VCAM-1-Antikörper CD106 gefärbt und mittels FACS im Kanal FL-2 analysiert.

#### **2.2.10 HSPC-Nanoliposomen – E-Selectin-siRNA**

Die Liposomenmischung wird mit 342,5  $\mu\text{l}$  HSPC, 29  $\mu\text{l}$  Cholesterol und 31  $\mu\text{l}$  DSPE in vierfacher Ausführung vorbereitet. Anschließend wurde die Mischung für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer gegeben. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet.

In jeweils zwei Versuchsansätze wurde 30,4  $\mu\text{l}$  E-Selektin-siRNA oder SCR-siRNA in 1 ml HEPES-Puffer (pH 6,7) gelöst hinzugefügt. Zum Vergleich der Transfektionsreagenzien wurde jeweils einem Versuchsansatz mit E-Selektin- und SCR-siRNA 5,54  $\mu\text{l}$  INTERFERin® oder 11,08  $\mu\text{l}$  DOTAP hinzugefügt. Danach wurden die Ansätze bis zum Lösen aller Bestandteile gevortext. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert und entsprechend den in der Tabelle 13 angegebenen Konzentrationen, auf 150.000 HUVEC-Endothelzellen pro Well gegeben.

**Tabelle 13: Versuchsansätze mit Endothelzellen, E-Selectin-siRNA und SCR-siRNA**

Wells	Antikörper	TNF- $\alpha$	Nanoliposomen (mM)	Nanoliposomen (siRNA)	Transfektionsreagenz
2	Ohne	Ohne	-	ohne	ohne
2	Mit	Ohne	-	ohne	ohne
2	Mit	Mit	-	ohne	ohne
2	Mit	Mit	5	E-Selektin	INTERFERin®
2	Mit	Mit	5	E-Selektin	DOTAP
2	Mit	Mit	5	SCR	INTERFERin®
2	Mit	Mit	5	SCR	DOTAP
2	Mit	Mit	10	E-Selektin	INTERFERin®
2	Mit	Mit	10	E-Selektin	DOTAP
2	Mit	Mit	10	SCR	INTERFERi
2	Mit	Mit	10	SCR	DOTAP

Nach 3 h Inkubation mit den siRNA-haltigen Nanoliposomen wurden die Komplexe abgesaugt und frisches Medium zugegeben. 4 h später wurden die E-Selektin-Genexpression in den Endothelzellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 12 h aktiviert. Am Folgetag wurden die Endothelzellen mit 1,66  $\mu$ l E-Selektin Antikörper CD62E gefärbt und mittels FACS im Kanal FL-3 analysiert.

### 2.2.11 PEG-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA

Die Lipidmischung wurde in einem molaren Verhältnis 47,5 : 47,5 : 5 (240  $\mu$ l DOTAP, 240  $\mu$ l DOPE und 250  $\mu$ l DSPE-PEG in 4 ml Chloroform) vorbereitet. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer verbracht. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet. Danach wurden 2,5  $\mu$ l E-Selektin-siRNA (20 Mm) in 500  $\mu$ l 10 mM HEPES-Puffer pH 6,7 zugegeben. Die Mischung wurde gevortext, bis alle Bestandteile gelöst wurden. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert und entsprechend den in der Tabelle 14 angegebenen Konzentrationen, auf jeweils 150.000 Ea.hy926-Zellen pro Well gegeben.

**Tabelle 14: Versuchsansätze mit PEG-Nanoliposomen und E-Selektin-siRNA**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen ( $\mu\text{M}$ ) mit siRNA	Nanoliposomen
2	Ohne	Ohne
2	10	E-Selektin
2	50	E-Selektin
2	100	E-Selektin
2	500	E-Selektin

Nach 3 h Inkubation mit der E-Selektin-siRNA wurden die Überstände abgesaugt und frisches Medium hinzugegeben. 6 h später wurde die E-Selektin-Expression in den Zellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 12 h aktiviert. Am Folgetag wurden die Ea.hy926-Zellen mit 1,66  $\mu\text{l}$  ICAM-1 (CD54E-PE) Antikörper gefärbt und mittels FACS im Kanal FL-1 analysiert.

### 2.2.12 PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA

Für den Versuch wurden zwei Lipidmischungen aus DOTAP, DOPE und DSPE-PEG in unterschiedlichen Mengen, jedoch im gleichen molaren Verhältnis von 47,5 : 47,5 : 5 vorbereitet. Für die Zubereitung der Nanoliposomen wurden 146 ml der Lipidmischungen mit 14,5 ml Chloroform vermischt. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer verbracht. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet. Eine Lipidmischung wurde mit der unspezifischen SCR-siRNA, die andere mit der ICAM-1-siRNA (jeweils 100  $\mu\text{l}$  siRNA (100 nM) in 1 ml DMEM-Transfektionsmedium) gevortext bis alle Bestandteile gelöst waren. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert. Die in Tabelle 15 angegebenen Konzentrationen der Nanoliposomen wurden mit jeweils 150.000 Ea.hy926-Zellen pro Well inkubiert.

**Tabelle 15: Versuchsansätze mit Ea.hy926-Zellen, PEG-Nanoliposomen, ICAM-1-siRNA und SCR-siRNA**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen mit siRNA ( $\mu\text{M}$ )	TNF- $\alpha$	CD54-PE	Nanoliposomen
2	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne
2	Ohne	Ohne	Mit	Ohne
2	Ohne	Mit	Mit	Ohne
2	1	Mit	Mit	ICAM-1
2	1	Mit	Mit	SCR
2	5	Mit	Mit	ICAM-1
2	5	Mit	Mit	SCR

Nach 3 h Inkubation mit den siRNAs wurden die Überstände abgesaugt und frisches Medium hinzugegeben. 6 h später wurde die ICAM-1-Genexpression Ea.hy926-Zellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 12 h aktiviert. Am Folgetag wurden die Endothelzellen mit dem ICAM-1 Antikörper CD54-PE gefärbt und mittels FACS im Kanal FL-2 analysiert.

### **2.2.13 PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA(höhere Konzentration)**

Für den Versuch wurden insgesamt vier Lipidmischungen aus DOTAP, DOPE und DSPE-PEG in unterschiedlichen Mengen jedoch im gleichen molaren Verhältnis 47,5 : 47,5 : 5 vorbereitet (s. Tab. 16). Für die Zubereitung der 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Nanoliposomen wurden 146 ml der Lipidmischung mit 14,5 ml Chloroform vermischt. Für die Zubereitung der 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  Nanoliposomen wurden 1460 ml der Lipidmischung mit 14,5 ml Chloroform vermischt. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 42°C in den Rotationsverdampfer gegeben. Danach wurden die Lipidfilme bei Raumtemperatur für 1 h unter Vakuum getrocknet. Jeweils zwei Lipidmischungen wurden mit SCR-siRNA (Kontrollmischung) und ICAM-1-siRNA (jeweils 100  $\mu\text{l}$  siRNA (100 nM) in 1 ml DMEM-Transfektionsmedium gevortext bis alle Bestandteile gelöst waren. Die Lösungen wurden anschließend 21 Mal durch einen Polycarbonat-Filter mit 50 nm großen Poren extrudiert. Die Transfektion der EA.hy926-Zellen (150.000 Zellen/Well) erfolgte mit der in der Tabelle 16 angegebenen Menge der Nanoliposomalen-siRNA.

**Tabelle 16: Versuchsansätze mit Ea.hy926-Zellen, ICAM-1-siRNA, SCR-siRNA und PEG-Nanoliposomen in höherer Dosierung**

Anzahl an Wells	Nanoliposomen mit siRNA ( $\mu\text{M}$ )	TNF- $\alpha$	CD54-PE	Nanoliposomen
2	Ohne	Ohne	Ohne	Ohne
2	Ohne	Ohne	Mit	Ohne
2	Ohne	Mit	Mit	Ohne
2	10	Mit	Mit	ICAM-1
2	10	Mit	Mit	SCR
2	50	Mit	Mit	ICAM-1
2	50	Mit	Mit	SCR
2	100	Mit	Mit	ICAM-1
2	100	Mit	Mit	SCR
2	500	Mit	Mit	ICAM-1
2	500	Mit	Mit	SCR

Nach 3 h Inkubation mit den siRNAs wurden die Überstände abgesaugt und frisches Medium hinzugegeben. 6 h später wurde die ICAM-1-Genexpression der EA.hy926-Zellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 12 h aktiviert. Am Folgetag wurden die Endothelzellen mit dem ICAM-1 Antikörper CD54-PE gefärbt und mittels FACS im Kanal FL-2 analysiert.

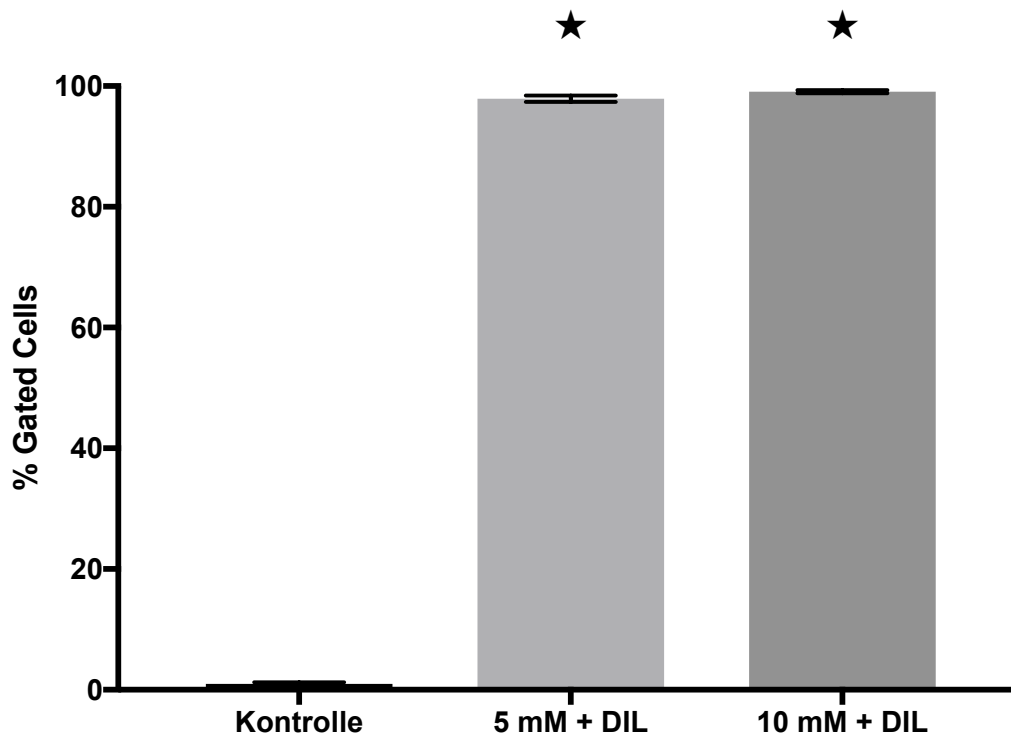
### 2.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) dargestellt. Zur Evaluation einer relevanten Reduktion der Genexpression wurden die Versuche mindestens dreimal unabhängig voneinander mit separat gezüchteten Zelllinien durchgeführt. Die Genexpression der unbehandelten Zellen wurde für die Auswertung als 100 % gewertet. Davon ausgehend wurde die relative Reduktion der Genexpression dargestellt. Mithilfe der Software Graphpad wurde eine Varianzanalyse (One-Way ANOVA) durchgeführt. Zur Darstellung der Größe der Nanoliposomen der paired-t-test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

Für die Entwicklung nanoliposomaler Trägersysteme wurden in verschiedenen Versuchsreihen unterschiedliche Lipidmischungen und siRNAs analysiert. Zunächst wurde die Transfektionseffizienz verschiedener Lipidmischungen und -konzentrationen verglichen. Zur Analyse der Modulation der Genexpression durch die siRNAs wurden parallel SCR-siRNA-transfizierte und unbehandelte Zellen untersucht.

#### 3.1 EPC-Nanoliposomen



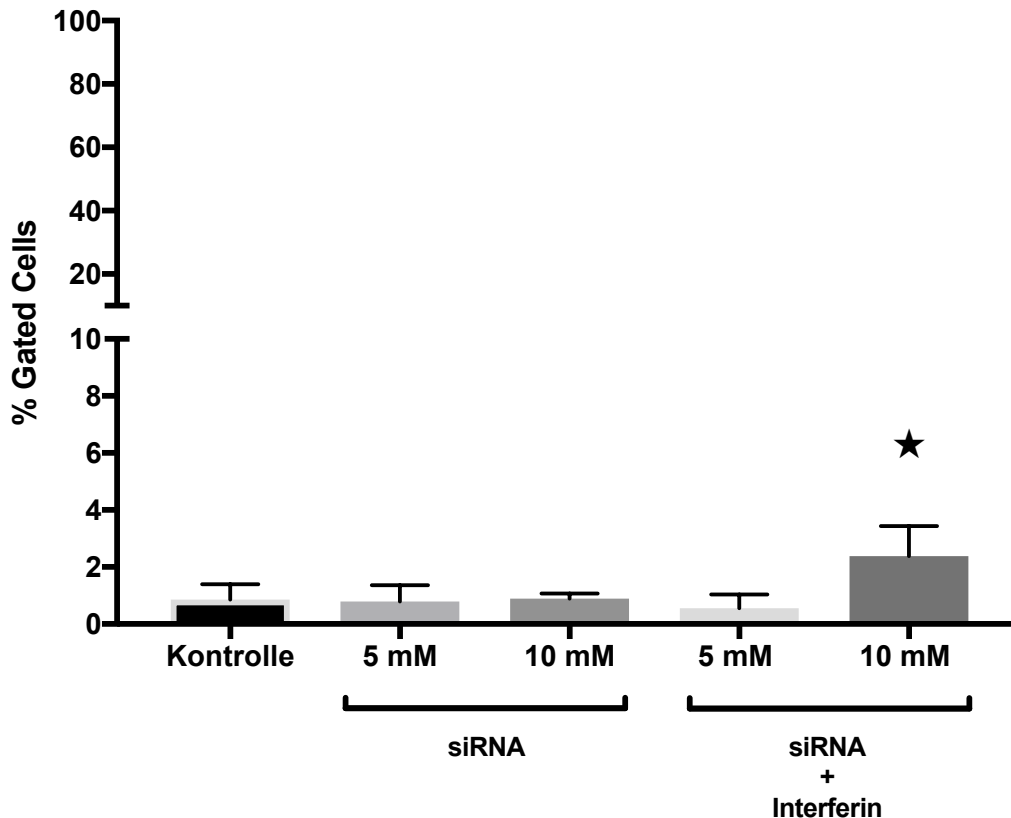
**Abbildung 6: Effizienz der Transfektion (%) von EPC-Nanoliposomen mit lipophilem Membranfarbstoff DIL in HUVEC-Endothelzellen**

Ansätze: nicht transfizierte Kontrolle, mit 5 mM und 10 mM EPC-Nanoliposomen + DIL (Stoffmengenanteil von 0,3%) transfizierte Endothelzellen. Messwerte als MW  $\pm$  SD bei n=4. Signifikant erhöhte Transfektionswerte wurden mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 6 zeigt die Effizienz der Transfektion von EPC-Nanoliposomen (ohne siRNA) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Nanoliposomen enthielten den lipophilen Membranfarbstoff DIL. Alle Versuchsansätze zeigten eine sehr hohe

Transfektionseffizienz. Die Transfektionsrate mit 5 mM EPC-Nanoliposomen betrug 97 % ( $p < 0,0001$ ) und mit 10 mM EPC-Nanoliposomen 99 % ( $p < 0,0001$ ).

### 3.2 HSPC-Nanoliposomen



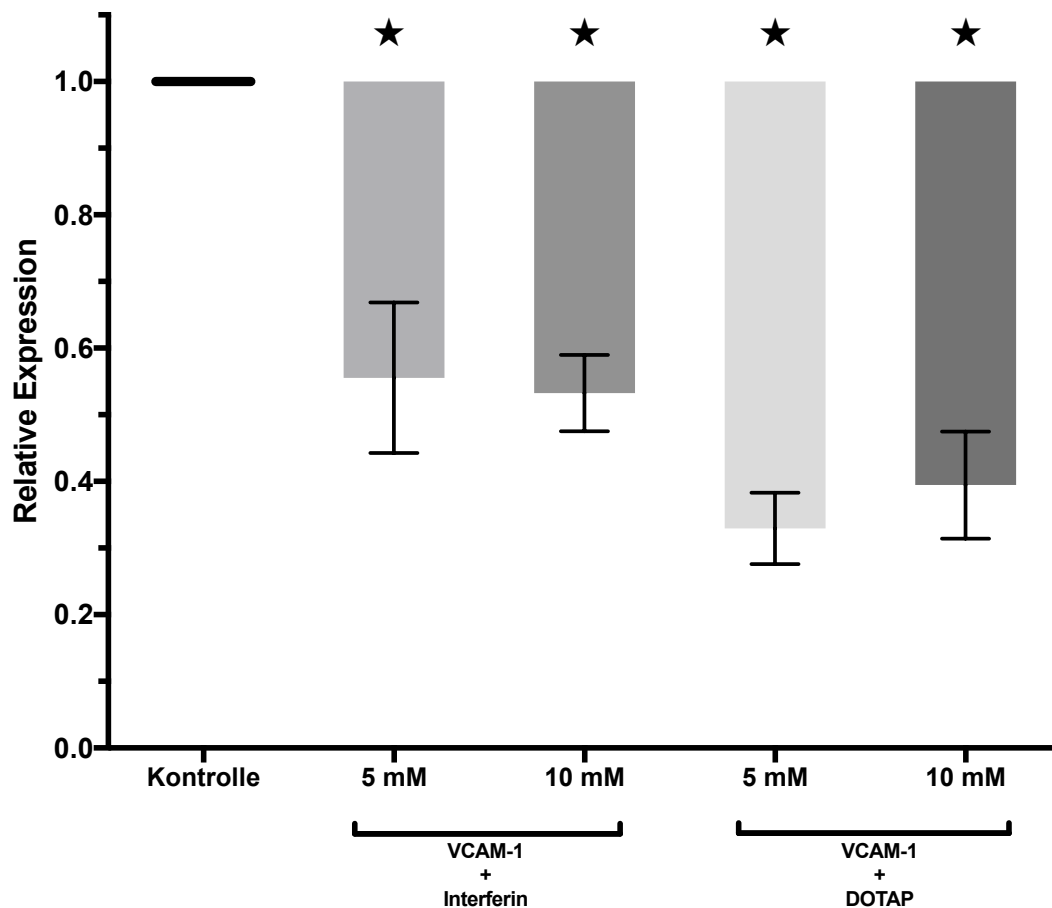
**Abbildung 7: Effizienz der Transfektion (%) von HSPC-Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup> und INTERFERin® in A549-Zellen**

Ansätze: nicht transfizierte Kontrolle, mit HSPC-Nanoliposomen (5 mM und 10 mM) + siRNA<sup>AF488</sup> (20µM) transfizierte Zellen ± INTERFERin®. Messwerte als MW ± SD bei n=3. Signifikant erhöhte Transfektionswerte wurden mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 7 zeigt die Transfektionseffizienz von vier Ansätzen mit HSPC-Nanoliposomen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zwei Proben enthielten zusätzlich das siRNA-Transfektionsreagenz INTERFERin®. Alle Proben zeigten eine sehr niedrige Transfektionseffizienz (5 mM HSPC-Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup>: 0,8 % ( $p=0,9998$ ), Die 10 mM HSPC-Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup>: 0,9 % ( $p>0,9999$ )). Die geringe Transfektionseffizienz konnte durch die Zugabe

von INTERFERin® nicht (5 mM HSPC-Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup>: 0,5 % (p=0,9307)) oder nur geringfügig (10 mM HSPC-Nanoliposomen mit siRNA<sup>AF488</sup>: 2,4 % (p=0,0433)) gesteigert werden.

### 3.3 HSPC-Nanoliposomen – VCAM-1-siRNA



**Abbildung 8: Relative Reduktion der VCAM-1-Genexpression mit HSPC-Nanoliposomen und VCAM-1-siRNA in HUVEC-Endothelzellen**

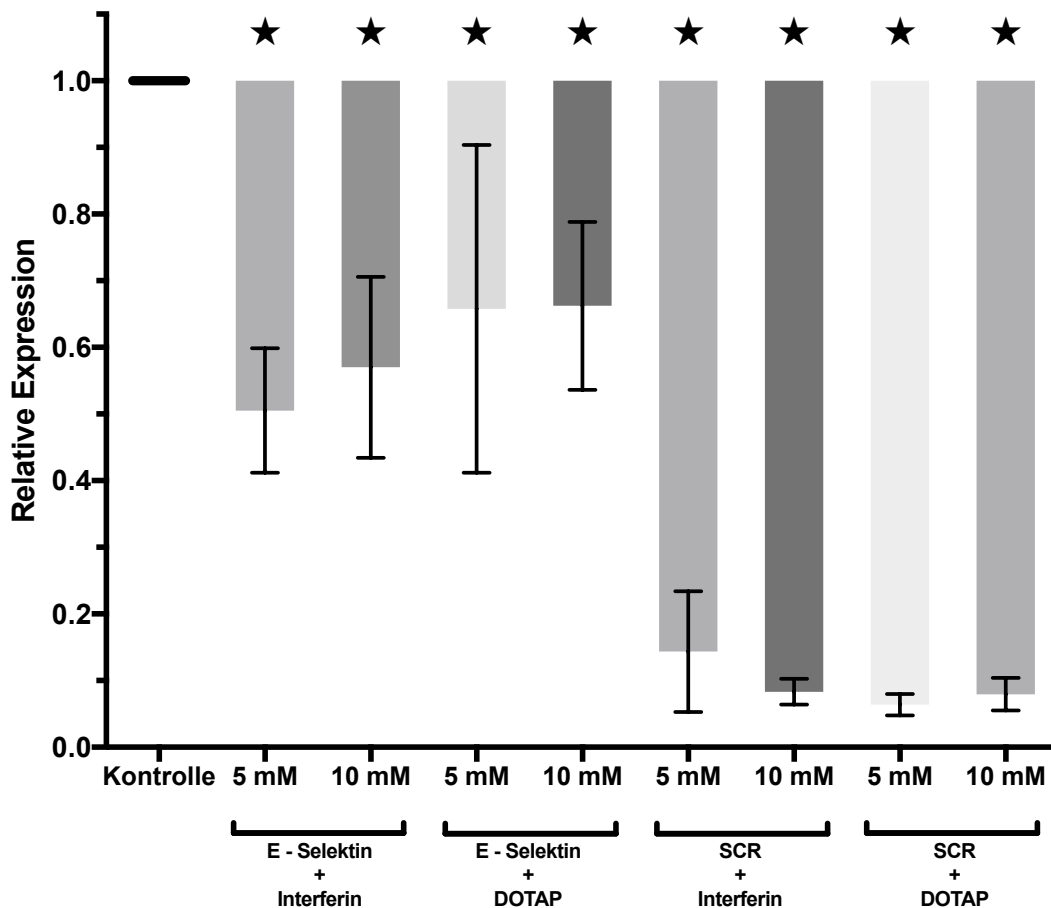
Ansätze: Kontrolle, Ansätze mit HSPC-Nanoliposomen (5 mM und 10 mM), VCAM-1 siRNA (20µM) sowie INTERFERin® oder DOTAP. Alle Ansätze wurden mit TNF-α stimuliert. Messwerte als MW ± SD bei n=4. Eine signifikant reduzierte Genexpression wurde mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 8 zeigt eine signifikante Reduktion der VCAM-1-Genexpression durch die HSPC-Nanoliposomen mit der VCAM-1-siRNA. Hierbei erzielten 5 mM / 10 mM HSPC-Nanoliposomen mit VCAM-1-siRNA und INTERFERin® eine Reduktion der Genexpression um 44 % (p<0,0001) bzw. 47 % (p<0,0001). Die



HSPC-Nanoliposomen mit der VCAM-1-siRNA und dem Transfektionsreagenz DOTAP erwiesen sich als noch effektiver bezüglich der Reduktion der VCAM-1-Genexpression (5 mM HSPC-Nanoliposomen: 67 %( $p < 0,0001$ ), 10 mM HSPC-Nanoliposomen 60 %( $p < 0,0001$ )).

### 3.4 HSPC-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA



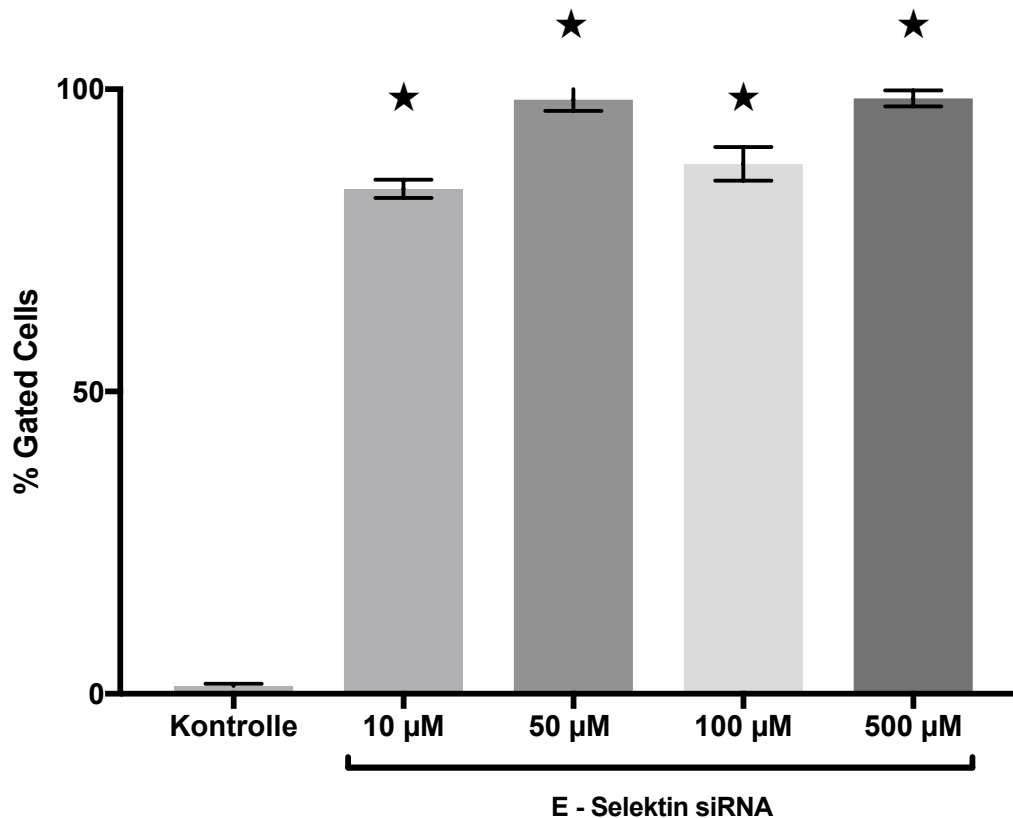
**Abbildung 9: Relative Reduktion der E-Selektin-Genexpression durch HSPC-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA in HUVEC-Endothelzellen**

Ansätze: Kontrolle, Ansätze mit HSPC-Nanoliposomen (5 mM und 10 mM) + E-Selektin-siRNA (20 $\mu$ M) oder SCR-siRNA (20 $\mu$ M) sowie INTERFERin® oder DOTAP. Alle Ansätze wurden mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Messwerte als MW  $\pm$  SD bei n=3. Eine signifikant reduzierte Genexpression wurde mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 9 zeigt die relative Reduktion der E-Selektin-Genexpression durch E-Selektin-siRNA- oder SCR-siRNA-haltige HSPC-Nanoliposomen bei der

Nutzung von INTERFERin® oder DOTAP als Transfektionsreagenz. In den Ansätzen mit der unspezifischen SCR-siRNA war die Reduktion der E-Selektin-Genexpression unabhängig von der Konzentration der Nanoliposomen und vom verwendeten Transfektionsreagenz deutlich größer (5 mM / INTERFERin®: 86 %( $p < 0,0001$ ), 10 mM / INTERFERin®: 92 %( $p < 0,0001$ ), 5 mM / DOTAP: 94 %( $p < 0,0001$ ), 10 mM / DOTAP: 92 %( $p < 0,0001$ )) als in den Ansätzen mit der spezifischen E-Selektin-siRNA. Auch bei den Proben mit der E-Selektin-siRNA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen (5 mM / INTERFERin®: 43 %( $p = 0,0003$ ), 10 mM / INTERFERin®: 49 %( $p = 0,0012$ ), 5 mM / DOTAP: 35 %( $p = 0,0093$ ), 10 mM / DOTAP: 34 %( $p = 0,0104$ )).

### 3.5 PEG-Nanoliposomen – E-Selektin-siRNA

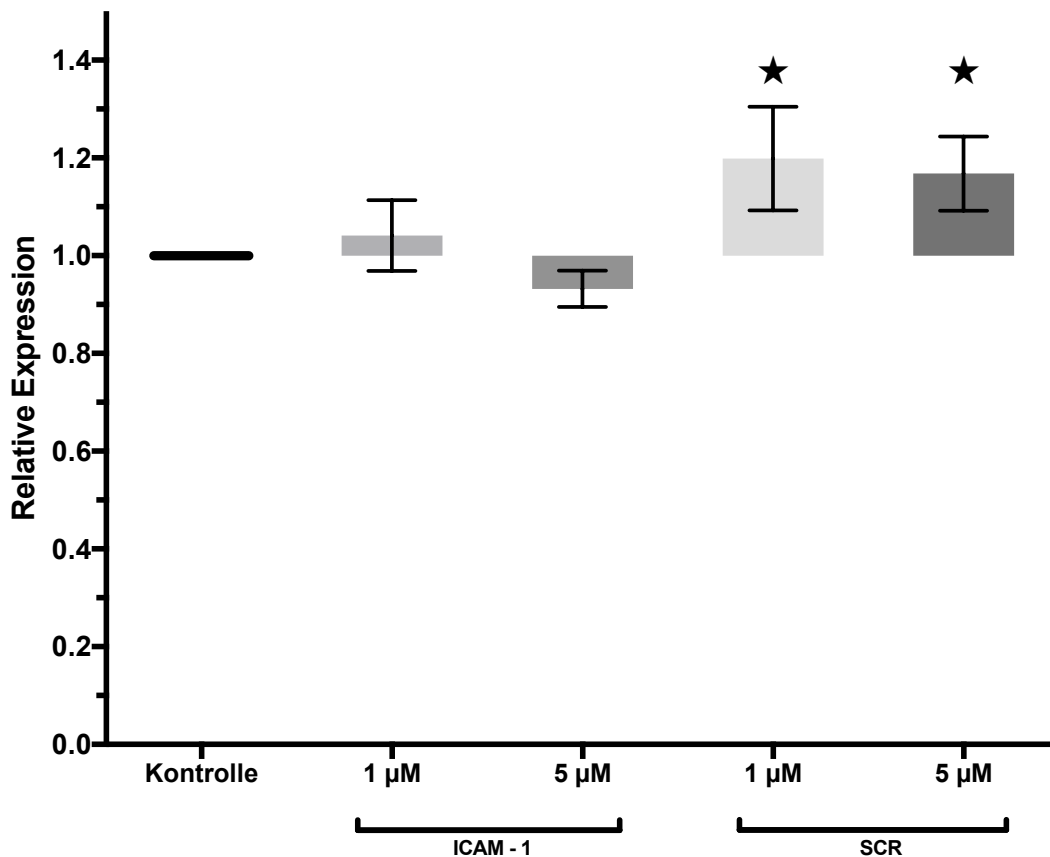


**Abbildung 10: Effizienz der Transfektion (%) von PEG-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA in Ea.hy926 Zellen**

Ansätze: nicht transfizierte Kontrolle, mit PEG-Nanoliposomen (10 µM, 50 µM, 100 µM und 500 µM) + E-Selektin-siRNA transfizierte Zellen. Messwerte als MW  $\pm$  SD bei n=6. Eine signifikante Transfektionseffizienz wurde mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 10 zeigt die Effizienz der Transfektion von PEG-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA. Unabhängig von der verwendeten PEG-Nanoliposomen-Konzentration war die Transfektion erfolgreich. Die besten Transfektionsraten erreichten die Ansätze mit 50 µM (98 %,  $p < 0,0001$ ) und 500 µM (98 %,  $p < 0,0001$ ) PEG-Nanoliposomen. Die Probe mit der niedrigsten PEG-Nanoliposomen-Konzentration (10 µM) zeigte mit 84 % ( $p < 0,0001$ ) die schlechteste Transfektionsrate gefolgt von der 100 µM Probe (88 %,  $p < 0,0001$ ).

### 3.6 PEG-Nanoliposomen – ICAM-1-siRNA

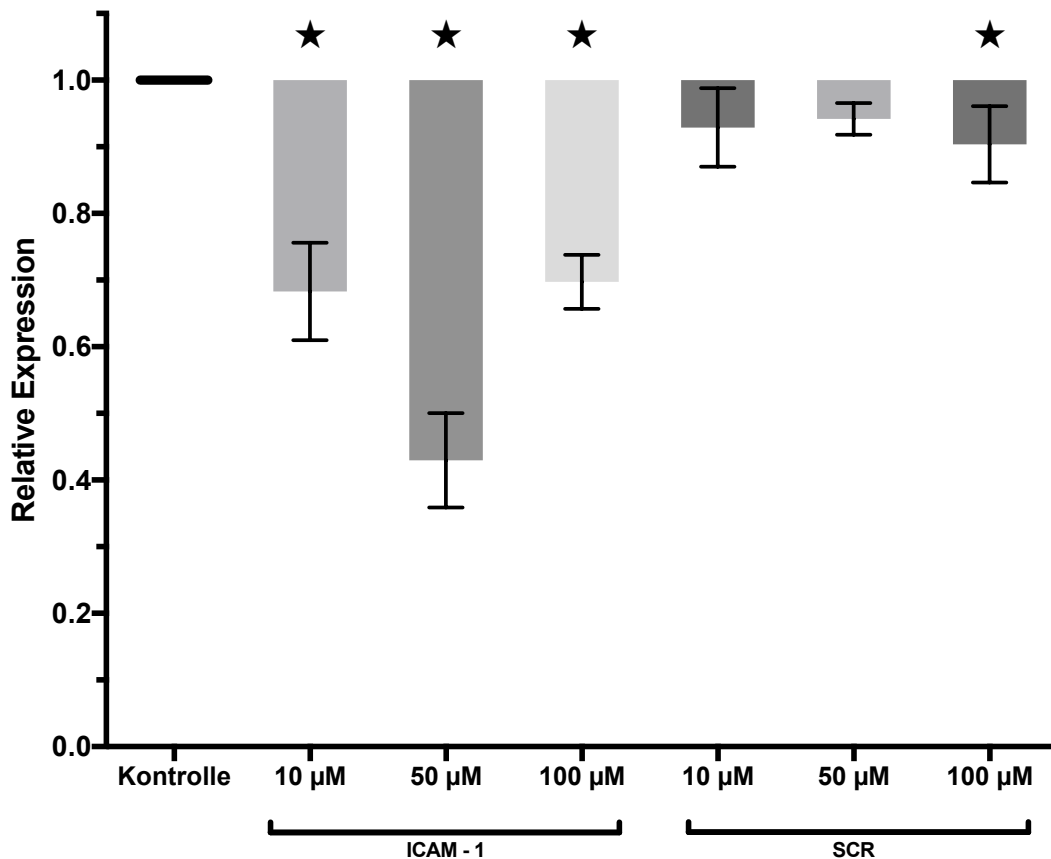


**Abbildung 11: Relative Reduktion der ICAM-1-Genexpression durch PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA in Ea.hy926-Zellen**

Ansätze: Kontrolle, Ansätze mit PEG-Nanoliposomen (1 µM und 5 µM) + ICAM-1-siRNA oder SCR-siRNA. Alle Ansätze wurden mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Messwerte als MW  $\pm$  SD bei n=6. Eine signifikante Veränderung der Genexpression wurde mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 11 zeigt die relative ICAM-1-Genexpression in Ea.hy926-Zellen, die mit ICAM-1-siRNA- oder SCR-siRNA-haltigen PEG-Nanoliposomen behandelt wurden. In drei von vier der behandelten Ansätze war eine erhöhte ICAM-1-Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen. Den höchsten Wert erreichte der Ansatz mit 1 µM PEG-Nanoliposomen und SCR-siRNA (20 % Steigerung,  $p=0,0001$ ) gefolgt vom Ansatz mit 5 µM PEG-Nanoliposomen und SCR-siRNA (17 % Steigerung,  $p=0,0010$ ). Die PEG-Nanoliposomen (1 µM) mit der ICAM-1-siRNA verursachten eine Steigerung der ICAM-1-Genexpression von 4 % ( $p=0,6865$ ). Lediglich in dem Ansatz mit 5 µM

PEG-Nanoliposomen und der ICAM-1-siRNA kam es zu einer Reduktion von 7 % ( $p=0,2796$ ). Im Folgeversuch wurde die PEG-Nanoliposomen-Konzentration erhöht.

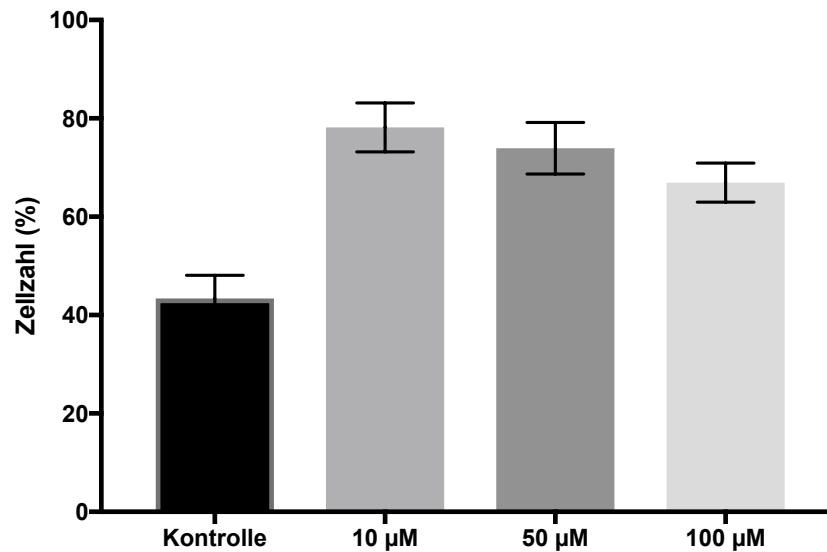


**Abbildung 12: Relative Reduktion der ICAM-1-Genexpression durch PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA in Ea.hy926-Zellen (Erhöhung der PEG-Nanoliposomen-Konzentration)**  
 Ansätze: Kontrolle, Ansätze mit PEG-Nanoliposomen (10 µM, 50 µM, 100 µM) + ICAM-1-siRNA oder SCR-siRNA. Alle Ansätze wurden mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Messwerte als MW  $\pm$  SD bei n=6. Eine signifikante Reduktion der Genexpression wurde mit einem Stern gekennzeichnet, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 12 zeigt eine signifikante Reduktion der ICAM-1-Genexpression durch die PEG-Nanoliposomen mit der ICAM-1-siRNA. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde mit allen drei PEG-Nanoliposomen-Konzentrationen (10 µM: 32 % ( $p<0,0001$ ), 50 µM: 57 % ( $p<0,0001$ ), 100 µM: 30 % ( $p<0,0001$ )) eine Reduktion erzielt. In dem Ansatz mit 50 µM PEG-Nanoliposomen war die größte Reduktion zu verzeichnen. In den Ansätzen mit den PEG-Nanoliposomen und der unspezifischen SCR-siRNA (10 µM und 50

$\mu\text{M}$ ) trat keine signifikante Reduktion der ICAM-1-Genexpression auf (10  $\mu\text{M}$ : 7 % ( $p=0,1088$ ), 50  $\mu\text{M}$ : 6 % ( $p=0,2483$ )). Der gleiche Ansatz mit 100  $\mu\text{M}$  PEG-Nanoliposomen erzeugte eine Reduktion der ICAM-1-Genexpression von 9 % ( $p=0,0155$ ).

### 3.7 Zellviabilität

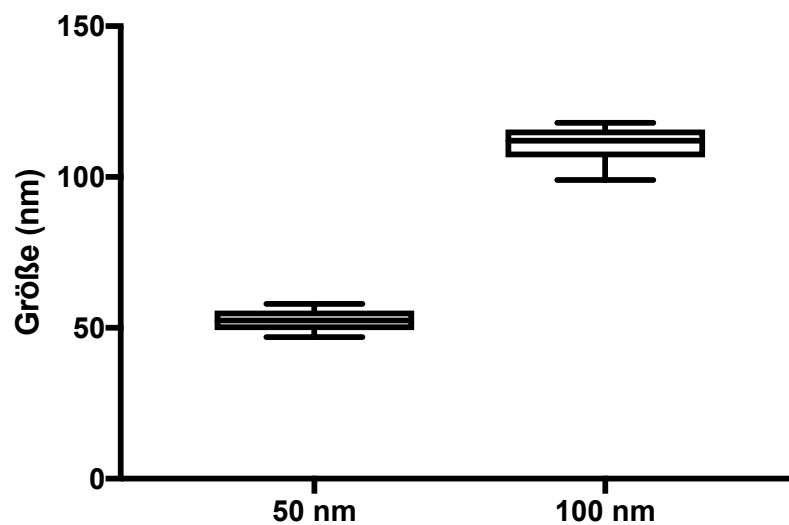


**Abbildung 13: Relative Zellviabilität (%) 24 h nach der Transfektion von Ea.hy926-Zellen mit PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA**

Ansätze: Kontrolle, Ansätze mit PEG-Nanoliposomen (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) + ICAM-1-siRNA. Zellzahl % im Vergleich zur Ausgangszellzahl. Messwerte MW  $\pm$  SD bei  $n=3$ , Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Abbildung 13 zeigt die Zellviabilität der Ea.hy926-Zellen nach Transfektion mit PEG-Nanoliposomen und ICAM-1-siRNA. In der unbehandelten Kontrolle betrug die Zellviabilität nach 24 h 43 %. Die höchste Toxizität wurde bei der Behandlung der Ea.hy926-Zellen mit den 100  $\mu\text{M}$  PEG-Nanoliposomen beobachtet, die niedrigste mit dem 10  $\mu\text{M}$  PEG-Nanoliposomen (10  $\mu\text{M}$ : 78 % ( $p<0,001$ ) Viabilität, 50  $\mu\text{M}$ : 74 % ( $p=0,001$ ), 100  $\mu\text{M}$ : 67 % ( $p=0,008$ )).

### 3.8 Größe der PEG-Nanoliposomen



**Abbildung 14: Größe der PEG-Nanoliposomen (nm)**

Bei der Nanoliposomenpräparation wurden Filter mit verschiedenen Membranporengrößen (50 nm und 100 nm) verwendet. Messwerte MW  $\pm$  SD bei n=6, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

Um die Größe der PEG-Nanoliposomen zu überprüfen, wurden jeweils sechs Proben durch eine Membran mit einer Porengröße von 50 nm bzw. 100 nm extrudiert. Wie Abbildung 14 zeigt, lag bei der Verwendung der 50 nm-Membran die Größe der PEG-Nanoliposomen bei  $53 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$  und bei der Verwendung der 100 nm-Membran bei  $111 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Ziel der Arbeit

Die Therapie des nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinoms stellt trotz zahlreicher Innovationen in der chirurgischen-, Radio- und Chemotherapie auch heute noch eine klinische Herausforderung dar.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung eines nanoliposomalen Trägersystems zur siRNA-Therapie für schwer zu transfizierende mikrovaskuläre Endothelzellen als Modell für Lungentumoren und -gewebe. Die siRNA-Therapie stellt ein innovatives Konzept für verschiedene medizinische Bereiche dar. Im Rahmen von Tumortherapien kann sie zur Reduktion der Genexpression verschiedener Onkogene genutzt werden (ThermoFischer Scientific 2017; Stoleriu et al. 2014).

Das ideale siRNA-Trägersystem ist in der Lage die häufigsten pharmakologischen Probleme wie Löslichkeit, in vivo Stabilität, Pharmakokinetik, Spezifität (Aufnahme durch das Tumorgewebe) und Toxizität, zu überwinden. Zusätzlich ist eine hohe Aufnahmekapazität zum Schutz vor dem Abbau der siRNA notwendig (Nasreen et al. 2013).

Als Zielorgan für die medikamentöse Therapie besitzt die Lunge mit dem Lungenendothel eine großes Kapillarnetz bzw. eine große Zelloberfläche und somit ausreichend Kopplungsmöglichkeiten für Arzneistoffe und deren Trägersysteme. Da das gesamte Blutvolumen des Körpers durch die Lunge fließt, haben systemische applizierte Arzneistoffe Zugang zum Lungenendothel. In den Lungenkapillaren ist der Blutstrom außerdem verlangsamt, was die Kontaktzeit der Arzneistoffe mit dem Lungenendothel erhöht.

Für die Entwicklung eines geeigneten Trägersystems wurden verschiedene Lipidmischungen mit unterschiedlichen siRNAs auf unterschiedlichen Zellen (HUVEC, A549, Ea.hy926) getestet.



## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 EPC-Nanoliposomen

Das Ziel der ersten Versuchsreihe war die Herstellung einer Lipidmischung für die folgenden Versuche. Die Transfektionseffizienz der aus EPC, Cholesterol und DSPE bestehenden EPC-Nanoliposomen Konzentrationen (5 mM und 10 mM) in HUVEC betrug 95 % (5 mM) bzw. 97 % (10 mM). Als Tracer wurde keine siRNA, sondern ein lipophiler Membranfarbstoff (DIL) verwendet.

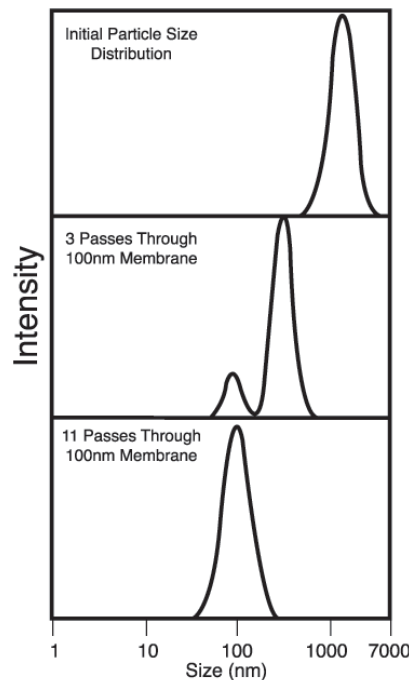
Mit dem Versuch konnte bestätigt werden, dass die Herstellungsmethode der Nanoliposomen erfolgreich und eine Enkapsulierung von Stoffen möglich war.

Die Stabilität von Lipiddoppelschichten hängt von der Temperatur ab. Bei Raumtemperatur sind sie gelartig und oberhalb der Transitionstemperatur flüssig. Im flüssigen Zustand können siRNAs mit der Postinsertionsmethode effektiver verkapselt werden. Die Transitionstemperatur hängt von der Komposition der Nanoliposomen ab. Gesättigte Fettsäuren besitzen eine höhere Transitionstemperatur als ungesättigte Fettsäuren. EPC besteht mehrheitlich aus ungesättigten Fettsäuren; die Transitionstemperatur beträgt 36,6 °C. Oberhalb dieser Temperatur kommt es nicht nur zu einer verbesserten siRNA-Insertion, sondern auch zu einem vermehrten Verlust von bereits enkapsulierter siRNA (Patel 2001). Die Stabilität der Nanoliposomen wurde daher durch die Zugabe von Cholesterol erhöht (Moschetta et al. 2001).

Das für viele Herstellungstechniken von Nanoliposomen erforderliche Chloroform gehört zu den potenziell toxischen Lösungsmitteln. Nanoliposomen können Residuen der benutzten Lösungsmittel enthalten, die potenziell toxisch wirken und die Stabilität der Vesikel beeinflussen. Zusätzlich kommt es bei der Extrusionsmethode zu einer hohen Schubspannung, die die Membran der Vesikel destabilisiert (Mozafari et al. 2007; Vemuri & Rhodes 1995).

Zur Reduktion der Toxizität wurden in der vorliegenden Dissertation eine Kombination aus verschiedenen Methoden zur Herstellung der Liposomen verwendet. Um die Chloroformmenge reduzieren zu können, wurde die Mischung in den Spritzen auf mindestens 43 °C erhitzt. Dies war durch den Aufbau des Extrudors möglich. Bei der Extrusionsmethode ist eine ausreichende Anzahl an

Extrusionen durch den Polycarbonat-Filter wichtig. Abbildung 15 zeigt die Größe der Nanoliposomen in Abhängigkeit von der Anzahl der Extrusionen. Laut Empfehlung des Herstellers sollen die Extrusionen mindestens 11 Mal durchgeführt werden. Das vorliegende Protokoll beinhaltete 21 Extrusionen (Tran et al. 2008).



**Abbildung 15: Größe der Nanoliposomen nach Anzahl der Extrusionen (Avanti Polar Lipids. 2018)**

#### 4.2.2 HSPC-Nanoliposomen

In den nachfolgenden Versuchsreihen wurde zur Erhöhung der Stabilität der Nanoliposomen bei der Herstellung anstatt EPC HSPC verwendet. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde der Transfektionsreagenz INTERFERin® zugegeben. Als Marker diente siRNA<sup>AF488</sup>. Die transfizierten Zellen waren A549-Adenokarzinomzellen der Lunge.

Unabhängig von der Konzentration der Nanoliposomen oder der Zugabe von INTERFERin® war die Transfektion ineffizient. Die höchste Effizienz (2,4 %) wurde mit 10 mM Nanoliposomen und INTERFERin® erzielt.

HSPC besteht mehrheitlich aus gesättigten Fettsäuren, was die Transitionstemperatur und die Stabilität der Nanoliposomen erhöht (Patel 2001).

Trotzdem kam es im Vergleich zu den EPC-Nanoliposomen zu einer deutlich niedrigeren Transfektionseffizienz. Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung verschiedener Zellen. A549-Zellen scheinen im Vergleich zu HUVEC-Zellen unter ähnlichen Transfektionsbedingungen schwieriger zu transfizieren zu sein. HUVEC-Zellen bilden keine passive Barriere und können somit kleine Moleküle, Makromoleküle und Hormone aktiv und leichter transportieren (Bouis et al. 2001; Bachetti & Morbidelli 2000). Warum die Zugabe von INTERFERin® keinen Effekt auf die Transfektionseffizienz zeigte, kann auf der Basis der vorliegenden Versuche nicht geklärt werden. Andere Arbeitsgruppen berichteten über eine erhöhte Transfektionseffizienz bei Verwendung von Lipofectamine als Transfektionsreagenz bei A549-Zellen (Wu et al. 2014; Marcos-Vadillo & García-Sánchez 2016).

#### **4.2.3 HSPC-Nanoliposomen und VCAM-1-siRNA**

Auf der Basis der Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe wurden weitere Versuchsreihen mit Endothelzellen durchgeführt. Neben dem Transfektionsreagenz INTERFERin® wurde DOTAP getestet. Untersucht wurde die Reduktion der VCAM-1-Genexpression nach Inkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  durch Transfektion der Zellen mit VCAM-1-siRNA enthaltenden HSPC-Nanoliposomen. Alle Ansätze zeigten im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion der VCAM-1-Genexpression. In den Ansätzen mit DOTAP war die Reduktion im Vergleich zu den Ansätzen mit INTERFERin® deutlicher und erreichte bis zu 67 %. In vorangegangenen Experimenten in unserem Labor (Nolte et al. 2009) und laut Herstellerangabe beträgt die Transfektionseffizienz mit INTERFERin® über 90 %. Da Nanoliposomen mit DOTAP die VCAM-1-Genexpression stärker inhibierten, kann von einer noch besseren Transfektionseffizienz ausgegangen werden. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Arbeitsgruppen. Neben den verwendeten Transfektionsreagenzien beeinflussen die Lipidkomposition und die Größe der Nanoliposomen die Transfektionseffizienz (Ramezani et al. 2009).

Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl der analysierten Zellen bei der FACS-Analyse kann eine potentiell erhöhte Zelltoxizität, die Ergebnisse der Genexpression verfälscht haben. Die Zelltoxizität ist durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Glukose zu erklären, die aus dem Nährmedium DMEM bei hoher Transfektionseffizienz der Nanoliposomen in die Zelle gelangt. Hierbei zeigen HUVEC-Endothelzellen eine reduzierte Viabilität aufgrund von erhöhten oxidativen Stress und reduzierter NO – Bioverfügbarkeit. (Cao et al. 2017)

Bis zu 40 % der Masse des Lungenparenchyms besteht aus Endothelzellen (Stone et al. 1992). Die Aktivierung des Endothels führt u.a. im Rahmen von chronischen Entzündungsreaktionen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1. Die Stärke der Expression in den peripheren Gefäßen der Lunge unterscheidet sich nicht von der in den zentralen Gefäßen (Ley et al. 2007; Mackay & Imhof 1993). Die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle wurde in mehr als 75 % der Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen, unabhängig vom Tumorstadium oder Histologie. Damit erklärt sich die Beteiligung der Tumorzellen an chronischen Entzündungsprozessen und an der Chemotaxis (Walker et al. 2011).

Somit können mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge effektiv mit kationischen, siRNAs und Antikörper enthaltenden Nanoliposomen transfiziert werden.

Für einen therapeutischen Einsatz der nanoliposomalen Komplexe ist die spezifische Bindung an Zelloberflächen der Zielzellen wichtig. Zum Test der Spezifität wurde bei diesem Versuch der Antikörper CD106 verwendet.

Bei der FACS-Analyse zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle, trotz reduzierter Zellzahl, eine zufriedenstellende Transfektionseffizienz.

#### **4.2.4 HSPC-Nanoliposomen und E-Selektin-siRNA**

In der Versuchsreihe zur Reduktion der Genexpression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin wurden als zusätzliche Kontrolle Ansätze mit einer SCR-siRNA

eingeschlossen. Die HSPC-Nanoliposomen mit der E-Selektin-siRNA zeigten unabhängig vom verwendeten Transfektionsreagenz eine Reduktion der E-Selektin-Genexpression zwischen 34 % und 49 %. Erstaunlicherweise war die Reduktion durch die unspezifische SCR-siRNA mit Werten bis zu 94 % deutlich größer. Außerdem war auch in dieser Versuchsreihe die Gesamtzellzahl in der FACS-Analyse deutlich reduziert, so dass unsere Vermutung der Zelltoxizität bestätigt wurde.

Die Zelltoxizität der Nanoliposomen resultiert aus der Lipidzusammensetzung. Kationische Nanoliposomen können aufgrund der elektrostatischen Interaktion zwischen dem Lipidsystem und der siRNA destabilisieren. Zusätzlich kommt es zur Interaktion mit Serumproteinen, Lipoproteinen und der extrazellulären Matrix, wodurch der siRNA Inhalt in das Zytoplasma gelangen kann. Zwar sind DOTAP-haltige kationische Nanoliposomen Vergleich zu Lipofectamine-haltigen Nanoliposomen weniger toxisch, sie werden jedoch vermehrt durch die Leber und Milz aufgenommen, was ihre Effektivität reduziert (Landen et al. 2005; Spagnou et al. 2004).

#### **4.2.5 PEG-Nanoliposomen mit E-Selektin-siRNA**

Diese Versuchsreihe wurde auf der Basis der Erkenntnisse der vorherigen Versuche mit einer weiterentwickelten Nanoliposomenmischung durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden PEG-Nanoliposomen in vier unterschiedlichen Konzentrationen mit enkapsulierter E-Selektin-siRNA verwendet. Alle Ansätze zeigten eine signifikante Transfektion mit Werten zwischen 84 % (10  $\mu$ M) und 98 % (50  $\mu$ M und 500  $\mu$ M). Neben der neuen Nanoliposomenmischung wurde auch eine neue, die Ea.hy926 Zelllinie eingesetzt. Bei der Ea.hy926-Zelllinie handelt es sich um ein Modell für Bronchialkarzinome (THORNHILL et al. 1993). Nach Aktivierung mit TNF- $\alpha$  exprimieren Ea.hy926-Zellen unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selektin auf der Zelloberfläche (Pellegatta et al. 1994).

Die Zytotoxizität der kationischen DOTAP enthaltenden Nanoliposomen wurde durch die Zugabe von PEG- und DOPE-haltigen Lipiden reduziert (Ozpolat et al.

2014). Dadurch entstehen sogenannte "Solid-lipid nanoparticles" (SLN). Wie auch andere neutrale, hydrophile Polymere erhöht auch PEG bei einer Integration in die Außenschicht der Komplexe die Zirkulationshalbwertszeit beträchtlich. Bei einer gesteigerten Permeabilität des Gefäßsystems von Tumoren kann so die Konzentration des Arzneistoffes im Zielgewebe erhöht werden (Maeda 2001). Im Vergleich zu kationischen Liposomen sind neutrale Liposomen im Serum stabiler und besitzen eine deutlich reduzierte Zytotoxizität (Kim et al. 2008).

#### **4.2.6 PEG-Nanoliposomen mit ICAM-1-siRNA**

In den abschließenden Versuchsreihen wurden zunächst PEG-Nanoliposomen in niedriger Konzentration benutzt. Hier zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zu den Kontrollen mit der SCR-siRNA keine Reduktion der Genexpression bei Verwendung der ICAM-1-siRNA. Die Versuche wurden anschließend mit höheren Konzentrationen der PEG-Nanoliposomen wiederholt.

ICAM-1-siRNA-haltige Nanoliposomen (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) mit einer Kombination aus DOTAP, DOPE und DSPE-PEG konnten eine signifikante Reduktion der ICAM-1-Genexpression erzielen. Die höchste Reduktion von 57 % wurde mit den 50  $\mu$ M PEG-Nanoliposomen erreicht. Die mit 30 % deutlich schlechtere Reduktion in den Ansätzen mit 100  $\mu$ M Nanoliposomen beruht möglicherweise auf einem toxischen Effekt. Mit der Konzentration der Nanoliposomen steigt auch die Enkapsulierungskapazität und damit die Menge an siRNA und die Menge der im Nährmedium enthaltenen Antibiotika und Serummoleküle, die potentiell zelltoxisch wirken. Die vorliegenden Versuche identifizierten eine Nanoliposomenkonzentration von 50  $\mu$ M als optimal.

Die verbesserte Inhibition der Genexpression im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen ist durch die Hinzugabe von PEG-Lipiden zu erklären. Das Hinzufügen von PEG-Lipiden verursacht eine sterische Stabilität der Lipide wird auch als „Stealth-Effekt“ bezeichnet. Die verwendeten PEG-Lipide

hatten Molmassen von 2000. Der molare Anteil am Gesamtlipid betrug 5 % (Maruyama et al. 1991; Allen et al. 1991). Der Effekt der PEG-Lipide beruht auf der parallelen Ausrichtung der gestreckten PEG-Ketten, wodurch eine Schutzhülle um das Liposom entsteht, die zu deren sterischen Stabilisierung beiträgt (Kenworthy et al. 1995; Needham et al. 1992; Woodle et al. 1994). Dadurch reduziert sich die Adsorption opsonierender Proteine an der Liposomenoberfläche und die Opsonin-vermittelte Aufnahme durch Makrophagen der Leber (Dijkstra et al. 1985).

Die Zytotoxizität bei der Verwendung der PEG-Nanoliposomen war insgesamt sehr niedrig. Den höchsten Wert erreichte der 100  $\mu$ M Ansatz mit 33 %. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Reduktion der Genexpression bei den 100  $\mu$ M PEG-Nanoliposomen auf der Zelltoxizität beruht.

#### **4.2.7 Größe der PEG-Nanoliposomen**

Für die Charakterisierung von Nanoliposomen sind die Größe und die Größenverteilung wichtige Faktoren. Die Gewährleistung einer konstanten Größe bzw. Größenverteilung ist ein wichtiges Merkmal für Stabilität der Nanoliposomen. In den vorliegenden Messungen wurden bei der Extrusion Membranporengrößen von 50 nm verwendet. Die Größenkontrolle ergab eine durchschnittliche Größe der PEG-Nanoliposomen von 53 nm. Unterschiedlich große und beschaffene Nanoliposomen nehmen unterschiedliche Mengen an siRNA auf. Inhomogenitäten führen daher zu einer ungleichmäßigen Verteilung der siRNA, schlechten Transfektionsraten und zu unterschiedlichen Wirkstärken in den Zellen. Partikel mit einem Durchmesser von über 100 nm können durch das Retikulo-endotheliale-System in der Leber, Milz, Lunge oder im Knochenmark aufgenommen werden. Kleinere Partikel haben eine längere Zirkulationszeit (Ozpolat et al. 2010).

Die lokale Applikation ist bei Erkrankungen vorteilhaft, bei denen das Zielgewebe (z.B. Haut, Schleimhaut) leicht zugänglich ist. Durch die Vermeidung systemischer Nebenwirkungen und der first-pass Clearance in der Leber,

erhöhen sich die therapeutischen Konzentrationen im Zielgewebe. Auch im Rahmen onkologischer Therapien ist eine lokale Verabreichung möglich (Huang et al. 2009; Yoshizawa et al. 2008).

## **5 Ausblick**

Die vorliegenden Ergebnisse können die Basis für nachfolgende *in vivo* Versuche bilden. Zusätzlich könnten die Nanoliposomen weiter optimiert werden und ggf. andere siRNAs für andere Ziele enkapsuliert werden. Zur Steigerung der klinischen Dosis könnten z.B. extrakorporale Zirkulationssysteme eingesetzt werden. Durch eine isolierte Lungenperfusion wäre eine hochdosierte gezielte siRNA-Therapie möglich.

Eine weitere Option zur Verbesserung des Transportes von Nanoliposomen wäre die Induktion einer lokalen Hyperthermie mit einer daraus folgenden Erhöhung der vaskulären Permeabilität und der mikrozirkulatorischen Dynamik. Dadurch wird die Extravasation der Nanoliposomen begünstigt. Ein ähnliches Modell wird derzeit im Tierversuch getestet. Dort wird zur Behandlung von Brustwandmetastasen die Akkumulation der intravenös applizierten Liposomen durch eine Radiatio im subkutanen Gewebe erhöht (Park et al. n.d.; Matteucci et al. 2000).



## 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Das Bronchialkarzinom ist mit einer Inzidenz über 50.000 jährlich die häufigste Krebserkrankung in Deutschland. Die aktuellen multimodalen Therapieschemata führen zu keiner wesentlichen Prognoseverbesserung. Ein vielversprechendes innovatives Konzept sind Therapien auf der Basis der RNA-Interferenz. Die Applikation von small interfering RNAs (siRNA) kann die Expression von an der Tumorgenese beteiligten Genen gezielt inhibieren. Aktuell ist jedoch die Gewährleistung der Bioverfügbarkeit der siRNAs in den Tumoren problematisch. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines nanoliposomalen Trägersystems für die siRNA-Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms.

**Methodik:** In den vorliegenden Versuchen wurden unterschiedliche Lipidmischung für die Nanoliposomen (egg phosphatidylcholine (EPC)-, hydrogenated soy phosphatidyl-choline (HSPC)-, Polyethylenglykol (PEG) und Transfektionsreagenzien (INTERFERin®, DOTAP) auf verschiedenen Zelllinien (HUVEC, A549-Zellen, Ea.hy926-Zellen) getestet. Untersucht wurde die Transfektionseffizienz und die Reduktion der Genexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle (vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1), E-Selektin und intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)) durch spezifische enkapsulierte siRNAs. Zur Kontrolle wurden zusätzlich die Zellviabilität und die Größe der Nanoliposomen überprüft.

**Ergebnisse:** Die PEG-Nanoliposomen (50 µM) mit der enkapsulierten ICAM-1-siRNA erzielten mit einer 57 % Reduktion der ICAM-1-Genexpression, im Vergleich zu anderen getesteten Nanoliposomenmischungen, die besten Effekte. Die durchschnittliche Größe der Nanoliposomen betrug 53 nm. Die Zellviabilität lag abhängig von der Konzentration der PEG-Nanoliposomen zwischen 67 % und 78 %. Zusätzlich erzielten HSPC-Nanoliposomen (10mM) mit enkapsulierter VCAM-1 siRNA eine maximale Reduktion der VCAM-1-Genexpression von 67%, jedoch mit einer signifikant erhöhten Zelltoxizität.

**Schlussfolgerung:** Die Versuche zeigen, dass die Genexpression in humanen Endothelzellen durch siRNA-tragende Nanoliposomen signifikant und spezifisch reduziert werden kann. Das entwickelte Trägersystem ist für die systemische

Applikation von spezifischen siRNAs geeignet, die die Chemotaxis und damit die Ausbreitung von Tumorzellen stören. Daraus ergeben sich neue multimodale Therapiemöglichkeiten im Rahmen der Lungenkrebs-Therapie.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akbarzadeh, A. et al., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), p.102.
- Allen, T.M. et al., 2002. Adventures in targeting. *Journal of liposome research*, 12(1-2), pp.5–12.
- Allen, T.M. et al., 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochimica et biophysica acta*, 1066(1), pp.29–36.
- Aragno, D. & Leserman, L.D., 1986. Immune clearance of liposomes inhibited by an anti-Fc receptor antibody in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), pp.2699–2703.
- Asamura, H. et al., 2015. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(12), pp.1675–1684.
- Bachetti, T. & Morbidelli, L., 2000. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacological research*, 42(1), pp.9–19.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. & Miller, N., 1965. Cation permeability of phospholipid model membranes: effect of narcotics. *Nature*, 208(5017), pp.1295–1297.
- Bernstein, E. et al., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), pp.363–366.
- Bevilacqua, M.P. & Nelson, R.M., 1993. Selectins. *The Journal of clinical investigation*, 91(2), pp.379–387.
- Bitko, V. et al., 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine*, 11(1), pp.50–55.
- Bloemen, P.G. et al., 1995. Adhesion molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug delivery. *FEBS letters*, 357(2), pp.140–144.
- Bonté, F. et al., 1987. Interactions of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blood components: relevance to biocompatibility. *Biochimica et biophysica acta*, 900(1), pp.1–9.

- Bouïs, D. et al., 2001. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4(2), pp.91–102.
- Böcker, W., 2008. *Pathologie*, Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Bunn, P.A. et al., 2006. Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(12), pp.3652–3656.
- Cao, Y. et al., 2017. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of applied toxicology : JAT*, 37(12), pp.1359–1369.
- Cohen, H.C. & Xiong, M.P., 2011. Non-cell-autonomous RNA interference in mammalian cells: Implications for in vivo cell-based RNAi delivery. *Journal of RNAi and gene silencing : an international journal of RNA and gene targeting research*, 7, pp.456–463.
- de Gruijl, T.D. et al., 2008. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 57(10), pp.1569–1577.
- Dijkstra, J., van Galen, M. & Scherphof, G., 1985. Influence of liposome charge on the association of liposomes with Kupffer cells in vitro. Effects of divalent cations and competition with latex particles. *Biochimica et biophysica acta*, 813(2), pp.287–297.
- Dillin, A., 2003. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp.6289–6291.
- Dowlati, A. et al., 2008. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), pp.1407–1412.
- Dowler, T. et al., 2006. Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic acids research*, 34(6), pp.1669–1675.
- Eberhardt, W.E.E. et al., 2015. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of thoracic*

- oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(11), pp.1515–1522.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, 15(2), pp.188–200.
- Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F.C., 1984. pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact. *Biochemistry*, 23(7), pp.1532–1538.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–811.
- Folkman, J., 2006. Angiogenesis. *Annual review of medicine*, 57(1), pp.1–18.
- Foster, K.A. et al., 1998. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, 243(2), pp.359–366.
- Fraire, A.E. et al., 2003. Intercellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1) in adenocarcinoma of lung. Technical aspects. *Methods in molecular medicine*, 74, pp.243–249.
- Gagnon, K.T. et al., 2014. RNAi Factors Are Present and Active in Human Cell Nuclei. *Cell Reports*, 6(1), pp.211–221.
- Gao, S. et al., 2009. The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(7), pp.1225–1233.
- Gilbreath, M.J. et al., 1985. Macrophage activation for microbicidal activity against *Leishmania major*: inhibition of lymphokine activation by phosphatidylcholine-phosphatidylserine liposomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(5), pp.3420–3425.
- Goldstraw, P. et al., 2016. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(1), pp.39–51.
- Golzio, M. et al., 2005. Inhibition of gene expression in mice muscle by *in vivo* electrically mediated siRNA delivery. *Gene Therapy*, 12(3), pp.246–251.
- Gregoriadis, G., 1975. Homing of liposomes to target cells. *Biochemical Society transactions*, 3(5), pp.613–618.

- Gregoriadis, G., 1976. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *The New England journal of medicine*, 295(13), pp.704–710.
- Grzelinski, M. et al., 2006. RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Human gene therapy*, 17(7), pp.751–766.
- Guo, P. et al., 2012. Uniqueness, advantages, challenges, solutions, and perspectives in therapeutics applying RNA nanotechnology. *Nucleic acid therapeutics*, 22(4), pp.226–245.
- Huang, Y.-H. et al., 2009. Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp.3426–3430.
- Huber, R., 2011. *Tumoren der Lunge und des Mediastinums*,
- Juliano, R.L. & Stamp, D., 1975. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 63(3), pp.651–658.
- Kelly, M., Hwang, J.M. & Kubes, P., 2007. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(1), pp.3–10.
- Kenworthy, A.K., Simon, S.A. & McIntosh, T.J., 1995. Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophysical journal*, 68(5), pp.1903–1920.
- Khaw, B.A. et al., 1995. Plug and seal: prevention of hypoxic cardiocyte death by sealing membrane lesions with antimyosin-liposomes. *Nature Medicine*, 1(11), pp.1195–1198.
- Kim, H.R. et al., 2008. Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), pp.622–631.
- Kimelberg, H.K., 1976. Protein-liposome interactions and their relevance to the structure and function of cell membranes. *Molecular and cellular biochemistry*, 10(3), pp.171–190.
- Kirby, C. & Gregoriadis, G., 1980. The effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on the fate of their lipid components in vitro. *Life sciences*, 27(23), pp.2223–2230.
- Knudson, A.G., 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(2), pp.157–162.

- Komoda, T. & Matsunaga, T., 2015. Biotechnological Study. In *Biochemistry for Medical Professionals*. Elsevier, pp. 75–92.
- Koning, G.A. et al., 1999. Antiproliferative effect of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells. *British journal of cancer*, 80(11), pp.1718–1725.
- Kumar, V. et al., 2009. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition*, Elsevier Health Sciences.
- Kurreck, J., 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(8), pp.1378–1398.
- Landen, C.N. et al., 2005. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Research*, 65(15), pp.6910–6918.
- Lawson, C. & Wolf, S., 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 61(1), pp.22–32.
- Ley, K. et al., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), pp.678–689.
- Lidington, E.A. et al., 1999. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant Immunology*, 7(4), pp.239–246.
- Liu, J. et al., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), pp.1437–1441.
- Longo, D. et al., 2011. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition*, McGraw Hill Professional.
- Mackay, C.R. & Imhof, B.A., 1993. Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today*, 14(3), pp.99–102.
- Maeda, H., 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in enzyme regulation*, 41, pp.189–207.
- Marcos-Vadillo, E. & García-Sánchez, A., 2016. Protocol for Lipid-Mediated Transient Transfection in A549 Epithelial Lung Cell Line. In *Liposomes. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, pp. 185–197.
- Maruyama, K. et al., 1991. Effect of molecular weight in amphipathic polyethyleneglycol on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 39(6), pp.1620–1622.

- Matranga, C. et al., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), pp.607–620.
- Matteucci, M.L. et al., 2000. Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(9), pp.3748–3755.
- Michel, T. et al., 2017. Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 8, pp.459–468.
- Monteiro, N. et al., 2014. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(101), pp.20140459–20140459.
- Moschetta, A. et al., 2001. Cholesterol crystallization in model bile: effects of bile salt and phospholipid species composition. *Journal of lipid research*, 42(8), pp.1273–1281.
- Mozafari, M.R., 2009. Nanoliposomes: Preparation and Analysis. In *Liposomes. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 29–50.
- Mozafari, M.R., Reed, C.J. & Rostron, C., 2007. Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents. *Die Pharmazie*, 62(3), pp.205–209.
- Nakamura, H. et al., RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *molvis.org*
- Nasreen, N. et al., 2013. Targeted delivery of let-7a microRNA encapsulated ephrin-A1 conjugated liposomal nanoparticles inhibit tumor growth in lung cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 8(1), pp.4481–4494.
- Needham, D., McIntosh, T.J. & Lasic, D.D., 1992. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1108(1), pp.40–48.
- Niu, X.-Y. et al., 2006. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 16(2), pp.743–751.
- Nolte, A. et al., 2009. Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells. *Oligonucleotides*, 19(2), pp.141–150.



OMNI Life Science, <http://www.ols-bio.de>. Available at: <http://www.ols-bio.de> [Accessed December 17, 2017].

- Ozpolat, B., Sood, A.K. & Lopez-Berestein, G., 2014. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 66, pp.110–116.
- Ozpolat, B., Sood, A.K. & Lopez-Berestein, G., 2010. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *Journal of Internal Medicine*, 267(1), pp.44–53.
- Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.252–264.
- Park, J.W. et al., *Phase I/II study of sequential hyperthermia+ Doxil® for the treatment of breast cancer metastatic to the chest wall*,
- Patel, H.M., 2001. Liposomes: A practical approach. *FEBS letters*, 275(1-2), pp.242–243.
- Peer, D. & Shimaoka, M., 2009. Systemic siRNA delivery to leukocyte-implicated diseases. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(6), pp.853–859.
- Pellegatta, F. et al., 1994. Inducible Nitric Oxide Synthase Modulates Fibronectin Production in the EA.hy926 Cell Line and Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 24(6), pp.1014–1019.
- Pillé, J.-Y. et al., 2005. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(2), pp.267–274.
- Pouton, C.W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 11 Suppl 2, pp.S93–8.
- Ramezani, M. et al., 2009. The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), pp.1–5.
- Rami-Porta, R. et al., 2015. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(7), pp.990–1003.

- Rand, T.A. et al., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), pp.621–629.
- Riede, U.-N. & Werner, M., 2017. *Allgemeine und Spezielle Pathologie* U.-N. Riede & M. Werner, eds., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- RKI, R.K.-I., 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. pp.1–274.
- Sahay, G. et al., 2013. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nature biotechnology*, 31(7), pp.653–658.
- Sandler, A. et al., 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 355(24), pp.2542–2550.
- Siewert, J.R., Rothmund, M. & Schumpelick, V., 2012. *Praxis der Viszeralchirurgie* J. R. Siewert, M. Rothmund, & V. Schumpelick, eds., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Soutschek, J. et al., 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.173–178.
- Spagnou, S., Miller, A.D. & Keller, M., 2004. Lipidic Carriers of siRNA: Differences in the Formulation, Cellular Uptake, and Delivery with Plasmid DNA †. *Biochemistry*, 43(42), pp.13348–13356.
- Spiro, S.G. et al., 2007. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), pp.149S–160S.
- Stoleriu, M.G. et al., 2014. A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 46(5), pp.877–886.
- Stone, K.C. et al., 1992. Distribution of Lung Cell Numbers and Volumes between Alveolar and Nonalveolar Tissue. *American Review of Respiratory Disease*, 146(2), pp.454–456.
- ThermoFischer Scientific, Dil Stain (1,1'-Diocetadecyl-3,3',3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('Dil'; DilC18(3))). Available at: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D282>.
- THORNHILL, M.H., LI, J. & HASKARD, D.O., 1993. Leucocyte Endothelial Cell Adhesion: a Study comparing Human Umbilical Vein Endothelial Cells and

- the Endothelial Cell Line EA-hy-926. *Scandinavian Journal of Immunology*, 38(3), pp.279–286.
- Tran, M.A. et al., 2008. Targeting V600E-B-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Research*, 68(18), pp.7638–7649.
- Travis, W.D. et al., 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(9), pp.1243–1260.
- Tsui, N.B.Y., Ng, E.K.O. & Lo, Y.M.D., 2002. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical chemistry*, 48(10), pp.1647–1653.
- Vemuri, S. & Rhodes, C.T., 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica acta Helveticae*, 70(2), pp.95–111.
- Walker, T. et al., 2005. Gene silencing of adhesion molecules in venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 53(S 01), p.V52.
- Walker, T. et al., 2011. Small Interfering RNA Efficiently Suppresses Adhesion Molecule Expression on Pulmonary Microvascular Endothelium. *Journal of Nucleic Acids*, 2011(5), pp.1–10.
- Witkowska, A.M. et al., 2016. Serum Levels of Biomarkers of Immune Activation and Associations With Neurological Impairment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients During Remission. *Biological research for nursing*, 18(1), pp.113–119.
- Woodle, M.C., Newman, M.S. & Cohen, J.A., 1994. Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *Journal of drug targeting*, 2(5), pp.397–403.
- Wu, Z. et al., 2014. Targeting A549 lung adenocarcinoma cell growth and invasion with protease-activated receptor-1 siRNA. *Molecular medicine reports*, 9(5), pp.1787–1793.
- Yokota, J., 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), pp.497–503.
- Yoshizawa, T. et al., 2008. Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 70(3), pp.718–725.

Zappa, C. & Mousa, S.A., 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), pp.288–300.

Zeng, Y. & Cullen, B.R., 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(7), pp.855–860.

## **8 Erklärung zum Eigenteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Schlensak durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hans Peter Wendel, Leiter des Forschungslabors der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Andrea Nolte) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits bei Kongressen vorgestellt und in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Nemeth A, Nolte A, Stoleriu MG, Mustafi M, Steger V, Schlensak C, Wendel HP, Walker T - Targeting von humanen Endothelzellen mit einem vielversprechenden nanoliposomalen Transportsystem – Zentrallblatt für Chirurgie – 2015 – S01 – 140 FV31

Nemeth A, Nolte A, Stoleriu MG, Mustafi M, Steger V, Schlensak C, Wendel HP, Walker T - Nanoliposomal-Mediated Sirna Targeting Of Ea.Hy926: A Promising Delivery Method – Interactive Cardiovascular and Thoracic Journal – 2014 – 19 – S85

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank folgenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Prof. Dr. Dr. h.c. C. Schlensak danke ich sehr herzlich für die vielseitige und engagierte Unterstützung, für das Vertrauen, das er mir und meiner Arbeit stets entgegengebracht hat und für die Förderung sowohl meiner akademischen als auch chirurgischen Laufbahn.

Herrn Prof. Dr. H.P. Wendel und Prof. Dr. T. Walker danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und Hilfsbereitschaft sowie für die stets "offene Tür" für Diskussionen.

Besonderen Dank an Frau Dr. rer. nat. Andrea Nolte für die umfangreiche Betreuung und Anleitung, viele wertvolle Anregungen und die Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Beim gesamten Team des THG-Labors für die tolle Zeit und Zusammenarbeit.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner Verlobten, Marie, die mir die Energie gegeben, immer Verständnis gezeigt und mir den Rücken freigehalten hat, so dass ich neben der Fachärztlichen Weiterbildung meine Promotion abschließen konnte.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen lieben Eltern, die mich stets unterstützt haben, mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten, und denen ich diese Arbeit widme.