

Aus dem Bereich  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **HSA-basierende Nanopartikel zum virusfreien Gentransfer in der Gen- und Zelltherapie**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der  
Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2015*

vorgelegt von: Nadine Wilhelm  
geb. am: 11.03.1985 in Dudweiler (Saarbrücken)



Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. Menger

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. von Briesen

Prof. Dr. Meese

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Gentherapie und Zelltherapie</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Möglichkeiten der Gen- und Zelltherapie .....	5
1.1.2 Anfänge und Probleme der Gentherapie .....	9
<b>1.2 Nicht-virale Alternativen für die Gen- und Zelltherapie</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Die Hürden des nicht-viralen Gentransports</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Eintritt in den Organismus bzw. die Zelle.....	16
1.3.2 Intrazelluläre Verteilung .....	20
<b>1.4 Humanes Serumalbumin als Basis nicht-viraler Alternativen</b> .....	<b>23</b>
1.4.1 HSA-basierende Nanopartikel .....	25
1.4.2 HSA-Nanopartikel zum Transport von Nukleinsäuren .....	26
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	<b>27</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>29</b>
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.2 Chemikalien und Kits .....	30
2.1.3 Antikörper .....	31
2.1.4 Verwendete Medien/Lösungen/Puffer.....	32
2.1.5 Plasmide .....	33
2.1.6 Zelllinien und Bakterien.....	33
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.2.1 Zellkultur.....	34
2.2.2 Molekularbiologische Techniken.....	36
2.2.3 Herstellung und Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln.....	37
2.2.4 Funktionale Analyse der HSA-Nanopartikel.....	42
2.2.5 Transiente Transfektion mittels Standardtransfektionsreagenzien.....	46
2.2.6 Quenchen extrazellulärer Fluoreszenzsignale mittels Trypanblau .....	47
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1 Entwicklung HSA-basierender Gentransfersysteme</b> .....	<b>50</b>
3.1.1 Physikochemische Charakterisierung der HSA-Nanopartikel.....	50
3.1.2 In-vitro-Charakterisierung Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-Nanopartikel .....	51
3.1.3 Hitze-quervernetzte HSA-Nanopartikel .....	71
3.1.4 Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-Nanopartikel .....	75
<b>3.2 Evaluierung der HSA-Nanopartikel für den virusfreien Gentransfer</b> .....	<b>82</b>
3.2.1 Transfektionseffizienzen von Standard-Transfektionsmethoden.....	82
3.2.2 Zytotoxizität im Vergleich zu Standard-Transfektionsmethoden.....	84
<b>3.3 Potentieller Einsatz HSA-basierender Gentransfersystemen zur virusfreien Gen- und Zelltherapie</b> .....	<b>85</b>
3.3.1 Funktionale Analysen der HSA-Nanopartikel in Primär- und Stammzellen.....	85
3.3.2 Verstärkung des Gentransfers in Primär- und Stammzellen mittels Polyethylenimin.....	87

<b>3.4</b>	<b>Etablierung von Trypanblau zum Quenchen extrazellulärer Fluoreszenzsignale.....</b>	<b>90</b>
3.4.1	Etablierung des Trypanblau-Quenchens für die Durchflusszytometrie .....	90
3.4.2	Etablierung des Trypanblau-Quenchens für die Fluoreszenzmikroskopie .....	92
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>94</b>
	<b>Ausblick.....</b>	<b>110</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>122</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>124</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>126</b>

# Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Strategien für die Gen- und Zelltherapie sind in den letzten Jahren Nanopartikel immer stärker in den Vordergrund gerückt. Besonders humanes Serumalbumin stellt aufgrund seiner Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit eine geeignete Basis zur Generierung alternativer Gentransfersysteme dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich nanopartikuläre Gentransfersysteme basierend auf humanem Serumalbumin (HSA-NP) entwickelt. Dabei konnte die Transfektionseffizienz der Plasmid-beladenen HSA-NP durch die Modifizierung mit dem zellpenetrierenden Peptid Tat sowie durch eine geringe Glutaraldehyd-Quervernetzungsrate deutlich gesteigert werden. Zudem wurden mit Hitze- und Disulfidbrückenstabilisierung alternative Quervernetzungsmethoden für HSA-NP identifiziert. Generell stellte sich eine Inkubation der HSA-NP in serumfreien Medien wie OptiMEM® als förderlich für die Genexpressionsrate dar.

Durch die Etablierung des Trypanblau als Quencher der HSA-Autofluoreszenz war die eindeutige Unterscheidung der intra- oder extrazellulären Lokalisation der HSA-NP möglich. Die HSA-NP akkumulierten nach der Internalisierung in Lysosomen, weshalb die Zugabe des lysosomotropischen Reagens Chloroquin die Transfektionseffizienz der HSA-NP in HEK293T-Zellen förderte. Mit Polyethylenamin wurde zudem ein effizientes endosomolytisches Reagenz für Primär- und Stammzellen identifiziert.

Schließlich konnten die Tat-modifizierten HSA-NP als ein geeignetes biokompatibles Gentransfersystem evaluiert werden. Erste Untersuchungen in Primär- und Stammzellen zeigten aber, dass besonders in diesen Zelltypen die Effizienz der HSA-NP weiter gesteigert werden muss, um diese in Zukunft als nicht-virale Alternative in der Gen- und Zelltherapie einsetzen zu können.

## Summary

In search of non-viral strategies for gene and cell therapy, nanoparticles are becoming increasingly at the focus of current research. In particular human serum albumin emerges as an ideal basis for alternative gene delivery systems due to its high biocompatibility and biodegradability.

In the present study, a functional gene delivery system based on human serum albumin (HSA-NP) was developed by the variation of the crosslinking degree and surface modification of the nanoparticles. More precisely, the transfection efficiency was enhanced by the use of the cell penetrating peptide Tat as a surface ligand. In addition, reduction of the glutaraldehyde crosslinking degree markedly improved the intracellular transport of plasmid DNA. Furthermore, alternative crosslinking methods such as heat and disulfide bonds for plasmid-loaded HSA-NP were identified, making the potentially toxic glutaraldehyde redundant. These HSA-NP were serum-sensitive, which was indicated by an enhanced gene expression rate by using the serum-free medium OptiMEM®.

Establishment of a trypan blue-mediated quenching enabled a clear differentiation between surface-bound and internalized nanoparticles, a constant issue in nanoparticle research. Entrapment of the HSA-NP in lysosomes caused an enhanced gene expression rate was detected after chloroquine treatment in HEK293T cells. Conversely, polyethyleneimine could be identified as an endosomolytic agent for primary and stem cells.

Finally, the Tat-modified HSA-NP were evaluated as an appropriate biocompatible gene delivery system. However, proof-of-concept studies in primary and stem cells showed that the efficiency of the HSA-NP requires optimisation in these cells for a future application in the gene and cell therapy.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
AAV	Adeno-assoziierte Viren
ADA	Adenosin-Desaminase
AK	Antikörper
<i>aqua iniec.</i>	Wasser zur Injektion ( <i>aqua ad iniectabilia</i> )
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Unterscheidungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CLSM	Konfokale Laserraster-Mikroskopie ( <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CPP	Zellpenetrierendes Peptid ( <i>cell penetrating peptide</i> )
d. h.	das heißt
(d)H <sub>2</sub> O	(destilliertes) Wasser
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified essential medium (Basalmedium für die Zellkultur)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-qv-NP	Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-Nanopartikel
dsDNA, ssDNA	doppelsträngige ( <i>double stranded</i> ) DNA, einzelsträngige ( <i>single stranded</i> ) DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
ELP	Elastin-ähnliche Polypeptide ( <i>elastin-like polypeptides</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	Embryonale Stammzellen ( <i>embryonic stem cell</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GALA	Peptid mit der repetitiven Sequenz aus Glu-Ala-Leu-Ala
GA-qv-NP	Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-Nanopartikel
gp	Glykoprotein
GSH	Glutathion
(h)iPS-Zellen	(humane) induzierte pluripotente Stammzellen
(h)MSC	(humane) mesenchymale Stammzellen
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H-qv-NP	Hitze-quervernetzte HSA-Nanopartikel
HSA	Humanes Serumalbumin
HSA-NP	Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin



HSV-TK	Thymidinkinase des <i>Herpes simplex</i> Virus
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
l	Liter
LAMP-1	Lysosomal Assoziierte Membranprotein-1
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium für Bakterien)
LPLD	Lipoprotein-Lipase-Defizienz
LTR	<i>long-terminal-repeat</i>
m	Milli
MEM	<i>minimal essential medium</i> ((Basalmedium für die Zellkultur)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MPG $\alpha$	Mercaptopropionylglycin $\alpha$
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
nm	Nanometer
NVA	nicht-virale Alternativen (für die Gen- und Zelltherapie)
OKSM	Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Klf4, Sox2 und c Myc
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDI	Polydispersindex
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PF488/PF633	PromoFluor488/ PromoFluor633
PFA	Paraformaldehyd
pfu/ml	<i>plaque forming units</i> je Milliliter (Konzentration an infektiösen Viruspartikeln)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RAD	Kontrollsequenz für RGD-vermittelte Aufnahme (Aminosäuren: Arginin-Alanin-Aspartat)
RGD	Erkennungssequenz für Integrine (Aminosäuren: Arginin-Glycin-Aspartat)
RLU	Relative Lichteinheit ( <i>relative light units</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )
STM	Standard-Transfektionsmethoden
Tat	Transaktivator der Transkription des HIV
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
YFP	gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Gentherapie und Zelltherapie

Der klassische Ansatz der Gentherapie beinhaltet, dass ein Gen in eine Zelle eingeführt wird, um dort die beschädigte bzw. mutierte Variante dieses Gens zu ersetzen [1]. Nach dieser Definition können monogenetische Krankheiten, also Krankheiten, bei denen sich die Symptome auf nur ein verändertes Gen zurückführen lassen, mittels Gentherapie behandelt werden. Die Gentherapie kann aber auch bei multifaktoriellen Krankheiten wie zum Beispiel Tumorerkrankungen eingesetzt werden, indem Gene eingefügt werden, deren Genprodukte direkt die Symptomatik der Erkrankung bessern oder entartete Zellen abtöten [2, 3].

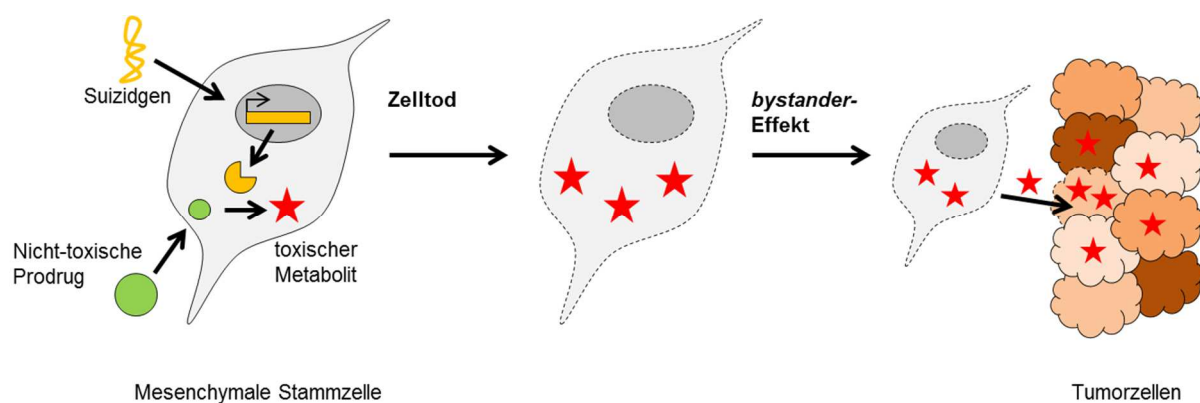
In Deutschland ist ausschließlich die genetische Veränderung somatischer Zellen erlaubt [4]. Hierbei kann unterschieden werden, ob die Veränderung der Zellen außerhalb des Patienten *ex vivo* stattfindet oder *in vivo*. Für die Ex-vivo-Methode werden dem Patienten Zellen entnommen, die in der Zellkultur genetisch verändert und dann wieder dem Patienten zurückgeführt werden. Der Anspruch an das Gentransfersystem steigt im Falle eines Gentransfers *in vivo*: Die Gentransfersysteme müssen nach systemischer oder lokaler Applikation spezifisch die zu ändernden Zellen im Organismus lokalisieren, um einerseits effektiv wirken zu können und um andererseits Nebenwirkungen gering zu halten. Damit ist die Sicherheit im Falle einer Ex-vivo-Gentherapie höher sowie eine Selektionierung erfolgreich modifizierter Zellen möglich. Aber nicht für jeden Zelltyp ist die Entnahme bzw. Änderung *ex vivo* anwendbar.

Bei der Zelltherapie werden direkt die Zellen zu therapeutischen Zwecken verwendet, wobei man zwischen einer autologen und allogenen Zelltherapie unterscheidet. Bei der autologen Zelltherapie werden dem Patienten Zellen entnommen, modifiziert und wieder demselben Patienten zurückgeführt. Für die allogene Zelltherapie hingegen können die Patienten-fremden Zellen bereits modifiziert gelagert werden, wodurch die Behandlung schneller beginnen kann. Die allogenen Zellen können aber zur Aktivierung des Immunsystems und damit zu Abstoßungsreaktionen führen. Der Übergang zwischen somatischer Gentherapie *ex vivo* und autologer Zelltherapie ist fließend und beide werden oft miteinander kombiniert.

### 1.1.1 Möglichkeiten der Gen- und Zelltherapie

Von den in den letzten 25 Jahren im Bereich der Gentherapie mehr als 2000 durchgeführten klinischen Studien fokussierten über 60 % Tumorerkrankungen und nur 8,7 % monogenetische Krankheiten [5]. Neben den klassischen Ansätzen, die meist das Einbringen von Proto-Onkogenen oder Wildtyp-Tumorsuppressorgenen beinhalten, wurden hoffnungsvolle

alternative Strategien entwickelt, um mittels Gentherapie die Tumorprogression aufzuhalten. Hierzu zählt die Tumortherapie mit genetisch veränderten mesenchymalen Stammzellen. So startete z. B. Apceh 2013 die erste klinische Studie basierend auf einer allogenen Zelltherapie mit genetisch veränderten mesenchymalen Stammzellen (MSC) und untersuchte damit eine Kombination aus Ex-vivo-Gentherapie mit Zelltherapie zur Behandlung von gastrointestinalen Karzinomen. MSC können aus der mononukleären Fraktion von Knochenmark-Aspiraten isoliert und *in vitro* vermehrt werden [6] und zeigten bereits in vielen Studien eine immunsuppressive Wirkung. Ihre immun-privilegierte Rolle wird durch ihr Oberflächenexpressionsmuster deutlich: Sie exprimieren weder CD40, CD80 oder CD86, noch Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse II (*major histocompatibility complex*, MHC) und nur gering MHC der Klasse I [7]. Des Weiteren migrieren MSC *in vivo* zu Orten der Entzündungen oder Wundheilung, welche histologisch Ähnlichkeiten mit Tumorgewebe haben [8]. Knoop *et al.* detektierten eine Tumorspezifische Akkumulation der MSC beim MSC-vermittelten Gentransport des Natrium-Iodid-Symporter zur Behandlung hepatozellulärer Karzinome in Mäusen [9]. Damit stellen MSC die idealen Transportvehikel für therapeutische Gene zur Behandlung von Tumoren dar.

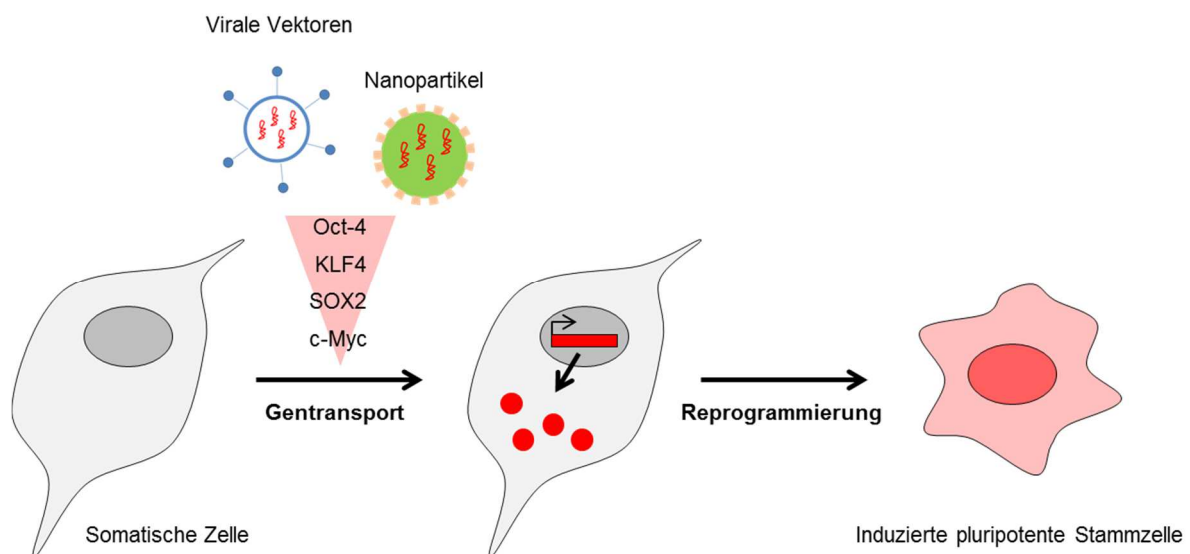


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Suizid-Gentherapie.** Das Suizidgen wird *ex vivo* in die MSC eingebracht und die genetisch modifizierten Zellen in den Patienten injiziert. Behandlung des Patienten mit einer nicht-toxischen Prodrug führt zur Umsetzung dieser in einen toxischen Metabolit, was zur Apoptose der Suizidgen-exprimierenden Zelle führt. Da mesenchymale Stammzellen zu Tumorgewebe bzw. -Zellen hin migrieren und der toxische Metabolit membrangängig ist, werden auch die angrenzenden Tumorzellen abgetötet (*bystander-Effekt*). Abbildung modifiziert nach McCornick [10].

Für die Behandlung von gastrointestinalen Karzinomen können MSC mit Suizidgenen wie der Thymidinkinase des *Herpes simplex* Virus (HSV-TK) genetisch verändert werden (Abb. 1). Die Expression der HSV-TK führt zur Umsetzung der Prodrug Ganciclovir in einen toxischen Metaboliten. Dieser ist membrangängig, wodurch die MSC und auch angrenzende Zellen abgetötet werden. Aufgrund des *bystander*-Effekts reichte eine Transduktion von 10 % der Zellen mit HSV-TK aus, um eine signifikante Reduktion des Tumors zu bewirken [11]. *In vitro* Ko-Kultivierung von A549-Zellen (Lungenepithel-Karzinom-Zellen) mit murinen MSC, die stabil

die HSV-TK exprimierten, führte nach Ganciclovir-Behandlung in 90 % der Zellen zur Apoptose [12]. Zudem zeigten Uchibori *et al.* [13], dass sich murine MSC, die nach retroviraler Transduktion die HSV-TK exprimierten, nach Injektion im Tumorgewebe von Mäusen anreicherten. Die Behandlung dieser Mäuse mit Ganciclovir führte zur Reduktion der TumorgroÙe, wobei das umgebende gesunde Gewebe nicht beeinträchtigt wurde.

Die allogene Zelltherapie mit genetisch veränderten MSC stellt damit eine erfolgsversprechende Strategie für die gerichtete Tumorbekämpfung dar. Allerdings gibt es bis dato keine effiziente virusfreie Methode, mit der MSC genetisch verändert werden können.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen.** Somatische Zellen können durch die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (z. B. Oct-4, KLF4, SOX2 und c-Myc) zu induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden.

Die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zeigt eine ganz andere Anwendungsmöglichkeit der Gentherapie (Abb. 2). Takahashi und Yamanaka [14] zeigten 2006 erstmals, dass die retrovirale Transduktion muriner Fibroblasten mit den Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Klf4, Sox2 und c-Myc (OKSM) zur Reprogrammierung der Zellen in einen pluripotenten Zustand, also ähnlich dem embryonaler Stammzellen (*embryonic stem cell*, ESC), führte. 2007 wurden die gleichen Transkriptionsfaktoren zur Generierung humaner iPS-Zellen genutzt [15]. Humane iPS-Zellen, die mittels retroviralen Gentransfers generiert wurden, hatten bezüglich ihrer Morphologie, des Oberflächenexpressionsmusters und ihres Methylierungsstatus der Pluripotenz-assoziierten Gene große Ähnlichkeit mit humanen ESC. Nach Injektion muriner iPS-Zellen in Blastozysten mit einem tetraploiden Chromosomensatz entwickelten sich Embryonen, welche damit ausschließlich aus iPS-Zellen entstanden sind. Neben der Pluripotenz ist die Immortalität die zweite herausragende Charakteristik der ESC, die auch iPS-Zellen zeigen.

Die Reprogrammierung bereits ausdifferenzierter Zellen widerlegte die lange geglaubte Hypothese, dass der Prozess der Differenzierung einer Zelle nicht umkehrbar ist. Zugleich ist sie Hoffnungsträger für die regenerative Medizin, da die Verwendung humaner embryonaler Zellen als Quelle pluripotenter Zellen nicht nur ethisch bedenklich, sondern in vielen Ländern verboten ist. Autologe iPS haben gegenüber ESC zusätzlich den Vorteil, dass deren Injektion in Patienten keine Abstoßungsreaktionen auslöst [16].

Problem des Einsatzes der iPS-Zellen in der regenerativen Medizin ist die Reaktivierung des Onkogens c-Myc, was zur erhöhten Kanzerogenität in Chimären führt [17]. Reprogrammierung muriner und humaner Fibroblasten zu iPS-Zellen ohne c-Myc führte einerseits zu einer geringeren Reprogrammierungseffizienz, andererseits hatten die generierten iPS-Zellen durchschnittlich ein höheres Differenzierungspotential [17]. Zudem führten die so generierten iPS-Zellen in Mäusen zu einer deutlich reduzierten Tumorentstehung. Weitere Möglichkeiten wie die Verwendung von Nanog als alternativer Transkriptionsfaktor oder auch die Reprogrammierung humaner neuraler Stammzellen mit nur Oct4 wurden identifiziert [18, 19].

Neben c-Myc, bergen aber auch die Retro- und Lentiviren, die zum Gentransport der Transkriptionsfaktoren genutzt werden, ein erhebliches Sicherheitsrisiko. Die Etablierung eines polycistronischen Vektors, der die vier Transkriptionsfaktoren OKSM codiert, reduzierte mit nur einer Integration ins Genom die Generierung von minderwertigen iPS-Zellen durch die Sicherstellung, dass jede transfizierte Zelle alle Faktoren exprimiert [20].

Darüber hinaus versuchte man durch integrationsfreie Methoden, wie z. B. Sendai-Viren oder episomale Vektoren, die Sicherheit der iPS-Zellen zu erhöhen. Während die Effizienz episomaler Vektoren, die mittels Nukleofektion in die Zelle gelangen, sehr gering ist, erreichen Sendai-virale Vektoren eine Reprogrammierung von bis zu 0,1 % der Zellen [21]. Beide Methoden bergen allerdings ein Restrisiko einer Insertionsmutagenese bzw. verlängerten Virenlast.

Von Vorteil ist daher die Verwendung von Transkriptionsfaktoren als rekombinante Proteine zur integrations- und nukleinsäurefreien Reprogrammierung. Um die Proteine erfolgreich in den Zellkern zu transportieren, wurden diese mit zellpenetrierenden Peptiden (*cell penetrating peptides*, CPP) fusioniert [22]. Ein Nachteil dieser Methode ist die geringere Reprogrammierungseffizienz von 0,001 %. Im Vergleich erreichen Lentivirus-basierende Protokolle eine Effizienz von 0,01 % [23]. Damit ist die Effizienz der Reprogrammierung generell sehr gering und wurde in zahllosen Studien versucht durch Einsatz von Chemikalien oder genetischen Faktoren zu steigern [24]. *Small-molecule compounds*, microRNAs, Histon-Demethylasen und Chromatin-modifizierende Enzyme konnten als Modulatoren der Reprogrammierung identifiziert werden [25-28]. Mit einer Kombination aus sieben *small-molecule compounds* konnten iPS-Zellen ohne die Transkriptionsfaktoren OSMK mit einer

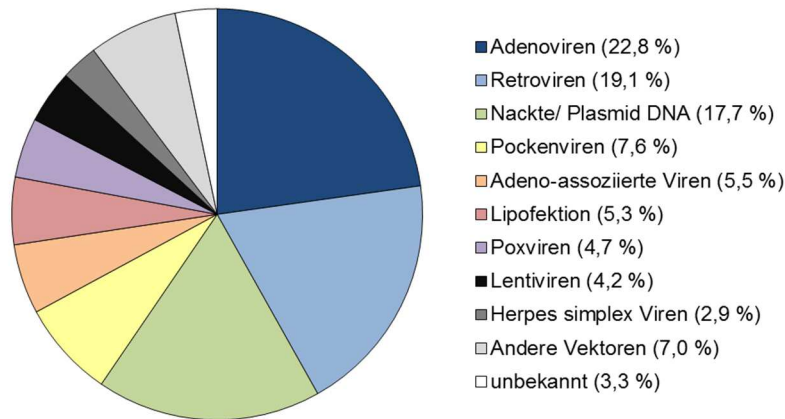
Rate von 0,2 % generiert werden [29]. Am erfolgversprechendsten sind derzeit mRNA-basierende Reprogrammierungsprotokolle. Die Verwendung von mRNA zeichnet sich durch eine sehr hohe Sicherheit und Effizienz von bis zu 1 % aus. Die mRNA muss allerdings bisher mittels chemischer Transfektionsreagenzien oder physikalischen Methoden, wie z. B. Elektroporation, in die Zelle gebracht werden, welche sich negativ auf die Biokompatibilität auswirken können [30, 31].

Damit sind seit Entdeckung der iPS-Zellen viele Fortschritte gemacht worden, um die Reprogrammierung kontrollierter und effizienter ablaufen zu lassen. Da die Ansprüche an Zellen zur weiteren klinischen Verwendung sehr hoch sind, gibt es dennoch weiteren Forschungsbedarf und bis dato wurde noch keine dieser Methoden zum „Gold-Standard“ ernannt.

### 1.1.2 Anfänge und Probleme der Gentherapie

Die erste zugelassene klinische Studie im Bereich der Gentherapie wurde 1990 an zwei Patienten mit schwerem kombinierten Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, SCID) durchgeführt [32]. SCID ist eine monogenetische Krankheit, bei der ein kombinierter Immundefekt durch den Mangel des Enzyms Adenosin-Desaminase (ADA) verursacht wird. Bis 1999 stieg die Anzahl der klinischen Studien rasch an. Verschiedene Todesfälle von Patienten, die an Gentherapiestudien teilnahmen, führten zur Beendigung dieser Studien [33]. Dabei waren die Komplikationen auf die viralen Vektoren zurückzuführen, mit denen die Gene eingeführt wurden, und nicht auf die Gentherapie selbst. Ein Risiko der viralen Vektoren – vor allem bei geschwächten, kranken Patienten – ist einerseits die Virenlast, andererseits besteht die Gefahr, dass sich einige Viren in das Wirtsgenom integrieren können. Die Offenbarung erheblicher Sicherheitsrisiken der viralen Gentransfersysteme führte zur Verlangsamung dieses Forschungsbereiches.

Die größte Gruppe der verwendeten viralen Vektoren besteht aus Adenoviral-basierenden Vektoren (22,8 %; Abb. 3), meist des Serotyps 5 mit deletierter E1a- und E1b-Region, welche in ihrem Replikationsvermögen gestört sind. Der Vorteil der Adenoviren ist sehr effizient selbst nicht-proliferierende Zellen zu infizieren. Da diese sich aber nicht ins Wirtsgenom integrieren, werden die Transgene nur transient exprimiert (Tab. 1). 1999 kam es in einer klinischen Studie nach Injektion von Adenoviren aufgrund von massiven Immun- und Entzündungsreaktionen zum Tod eines Patienten, was den Einsatz dieser Vektoren einschränkte.



**Abbildung 3: Anteil unterschiedlicher Vektoren in klinischen Studien.** Prozentuale Häufigkeit mit der die unterschiedlichen Vektoren in klinischen Studien weltweit verwendet wurden ([5], Stand: Juni 2014; basierend auf 2076 klinischen Studien insgesamt).

Die zweitgrößte Gruppe verwendeter Vektoren in klinischen Studien sind retroviralen Ursprungs (19,1 %; Abb. 3). Retroviren infizieren effizient proliferierende Zellen und sind damit besonders zur Infektion von Tumorzellen geeignet. Sie transportieren allerdings nur Gene mit maximal 8 kb, die sie dann stabil ins Wirtsgenom integrieren. Die Integration der Gene hat den Vorteil einer langfristigen Transgen-Expression, allerdings bringt es auch erhebliche Sicherheitsrisiken mit sich. Integrieren die Viren in den codierenden Bereich oder auch regulatorischen Bereich von Genen, kann beides zu einer gestörten Genexpression führen. 2002 zeigten zwei von zehn Kindern, die zur Behandlung von SCID-X1 (erbliche Form von SCID) mit retroviralen Vektoren behandelt wurden, Leukämie-ähnliche Symptome [34]. Die Integration der Retroviren in der Nähe des *rhomotin-like 1* (LMO2) Proto-Onkogens führte zur veränderten Expression des LMO2-Proteins, welches eine zentrale Rolle in der hämatopoetischen Entwicklung hat [35].

Lentiviren sind behüllte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren und bilden eine Gattung innerhalb der Retroviren. Die lentiviralen Vektoren stammen in der Regel von dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder anderen nicht-humanen Lentiviren ab. HIV-basierende Vektoren tragen < 5 % des parentalen Genoms, was die Wahrscheinlichkeit von Reversionen kompetenter HI-Viren gering hält. Zusätzlich wurde die Sicherheit durch Selbst-inaktivierende Vektoren (SIN-Vektoren) erhöht, da diese durch Deletion der U3-Region der 3'-*long-terminal-repeat* (LTR) Sequenz die darin enthaltene Promotor- und Enhancer-Eigenschaften verloren haben. Dies schränkt einerseits die Aktivierung benachbarter zellulärer Gene ein und nach einem Replikationszyklus wird die Deletion auf die 5'-LTR-Sequenz übertragen und damit die Vektorexpression komplett abgeschaltet.

Die Gentherapie stellt einen wichtigen und hoffnungsvollen Ansatz zur Behandlung verschiedenster Krankheiten dar. Daher wurde an alternativen Gentransfersystemen geforscht, um die Sicherheit der Gentherapie und Akzeptanz in der Bevölkerung zu erhöhen.

Seit 2004 gibt es einen erneuten Anstieg an klinischen Studien, basierend auf den Fortschritten, die auf den Ersatz der viralen Genfähren abzielen. Die positive Entwicklung wurde auch anhand der ersten Empfehlung der Europäischen Kommission 2012 zur Behandlung von familiärer Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD) mit einem Gentherapeutikum deutlich [36]. Familiäre LPLD ist eine seltene autosomal-rezessive Krankheit, bei der es aufgrund einer gestörten Lipasefunktion zur Anreicherung von Triglyceriden im Plasma kommt, was zur Pankreatitis führen kann. Patienten, die trotz fettarmer Ernährung Symptome zeigen und für die es keine andere Behandlungsmöglichkeit gibt, dürfen mit dem Gentherapeutikum Glybera® therapiert werden. Dabei basiert Glybera® auf Adeno-assoziierten Viren (AAV), die eine funktionale Kopie des LPL-Gens in Pankreas-Zellen transportieren. AAV gelten als effiziente und sichere virale Vektoren, da sie Gene in nicht-proliferierende Zellen transportieren können und nicht ins Genom integrieren. Bis dato wurden keine Nebenwirkungen aufgrund der verwendeten AAV-Vektoren bekannt. Obwohl bisher acht unterschiedliche AAV-Serotypen identifiziert wurden, die unterschiedliche Zelltypen mit unterschiedlichen Effizienzen infizieren, stammen die meisten von AAV2 ab [37-39]. Die größte Einschränkung der Effizienz der AAV-Vektoren wird der Tatsache zugeschrieben, dass diese einzelsträngige DNA transportieren, welche in der Zelle erst in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden muss. Zudem sind AAV-basierte Vektoren nur für den Transport maximal 2,4 kb großer DNA-Stücke geeignet, was deren Einsatz für alternative Anwendungen einschränkt [40].

**Tabelle 1:** Eigenschaften der Hauptgruppen der viralen Vektoren zum Gentransport. Modifiziert nach Ibraheem *et al.* [41].

	<b>Adenoviren</b> (unbehüllt, dsDNA)	<b>Adeno-assoziierten Viren</b> (unbehüllt, ssDNA)	<b>Lentiviren</b> (behüllt, RNA)	<b>Retroviren</b> (behüllt, RNA)
<b>Gengröße</b>	30 kb	4 kb	7,5 kb	7,5kb
<b>Tropismus</b>	Breit (proliferierende und nicht-proliferierende Zellen)	Breit (keine hämatop. Zellen)	Breit (proliferierende und nicht-proliferierende Zellen)	Nur proliferierende Zellen
<b>Immunogenität</b>	Hoch	Gering	Gering	Gering
<b>Vektorgenomformen</b>	Episomal	Episomal (90%), Integration (10%)	Integration ins Wirtsgenom	Integration ins Wirtsgenom (ungerichtet)
<b>Hauptvorteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Transduktionseffizienz</li> <li>• Einfache Produktion hoher Titer (<math>10^{12}</math> pfu/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration in humanes Chromosom 19 (nur Wildtyp)</li> <li>• Latente Infektion</li> <li>• Anhaltende Expression</li> <li>• Kleines Genom, keine viralen Gene</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anhaltende Expression in den meisten Zelltypen/Geweben</li> <li>• Relativ hohe Titer (<math>10^6</math>-<math>10^7</math> pfu/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anhaltende Expression</li> <li>• Relativ hoher Titer (<math>10^6</math>-<math>10^7</math> pfu/ml)</li> </ul>
<b>Hauptnachteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transiente Expression</li> <li>• Potentielle Replikationskompetenz</li> <li>• Capsid-vermittelte Aktivierung des Immunsystems</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unzureichend charakterisiert</li> <li>• Potentielle Insertions-Mutagenese</li> <li>• Schwierige Produktion</li> <li>• Aktivierung des Immunsystems möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sicherheitsbedenken wegen Herkunft</li> <li>• Insertions-Mutagenese (HIV integriert in aktive Gene)</li> <li>• Schwierige Herstellung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ineffiziente Transduktion</li> <li>• Insertions-Mutagenese</li> <li>• Potentielle Replikationskompetenz</li> </ul>

Das Beispiel Glybera® verdeutlicht, dass viele der aktuellen Studien immer noch auf viralen Vektoren basieren (Abb. 3), da diese die zellulären Hürden effizient überwinden können. Aufgrund der bisherigen Studien können neben der Effizienz weitere Ansprüche für einen erfolgreichen Gentransfer formuliert werden.

Der ideale Gentransporter für Gen- und Zelltherapien (modifiziert nach [42]):



- hat eine hohe Transfektions-/Transduktionseffizienz,
- infiziert proliferierende und ruhende Zellen,
- ist spezifisch für bestimmte Zelltypen,
- ist nicht immunogen,
- erlaubt nachhaltige Expression des therapeutischen Gens,
- integriert nicht ins Wirtsgenom und
- unterstützt die Regulierbarkeit der Expression.

Des Weiteren muss aber auch die Patientensicherheit im Fokus der Entwicklung neuer Gentransfersysteme stehen. Daher ist die Etablierung nicht-viraler Alternativen (NVA) anzustreben.

## 1.2 Nicht-virale Alternativen für die Gen- und Zelltherapie

Der Schlüssel der Gentherapie liegt in dem erfolgreichen Transport der Nukleinsäuren bis hin zum Zellkern. Obwohl aber die Effizienz des Gentransports mit Viren bzw. viralen Vektoren sehr hoch ist, versucht man nicht-virale alternative Gentransportsysteme zu etablieren, da Viren diverse Nachteile mit sich bringen. Einerseits können sie zu einer Stimulierung des Immunsystems führen, andererseits besteht die Gefahr, dass sie ins Genom integrieren, was zur Aktivierung von Onkogenen führen kann. Zudem haben viele virale Vektoren hohe Produktionskosten oder können nur Gene mit einer begrenzten Größe transportieren. Bei den nicht-viralen Alternativen (NVA), die bereits entwickelt wurden, versuchte man diese Schwachstellen zu umgehen (Tab. 2).

Den größten Anteil der nicht-viralen Genfähren bildet bisher die „nackte“ DNA (17,7 %; Abb. 3). Diese einfachste Form der nicht-viralen Gensysteme basiert auf der direkten Injektion des genetischen Materials *in vitro* in die Zelle oder *in vivo* in das Gewebe, meist Muskelgewebe. Dies schränkt die Anwendung auf die In-vivo-Gentherapie ein und ist bezüglich der Effizienz dem viralen System weit unterlegen, da fremde Nukleinsäuren innerhalb weniger Minuten von Nukleasen degradiert und nur selten von der Zelle internalisiert werden [43, 44]. Um die zellulären Hürden zu überwinden und die Nukleinsäuren zum Zellkern zu transportieren, müssen daher effiziente nicht-virale Gentransportsysteme entwickelt werden, die auch eine Behandlung *ex vivo* ermöglichen.

Die bisher etablierten nicht-viralen Gentransportsysteme können in physikalische, anorganische und organische Vehikel unterteilt werden. Zu den physikalischen Transportern bzw. Methoden werden z. B. Nadel-basierte Methoden, Elektroporation oder Sonoporation gezählt. Bei der Elektroporation wird neben der Zellmembran auch die Nukleusmembran poriert, wodurch die Nukleinsäuren direkt in den Zellkern gelangen können. Dies führt zu hohen Transfektionseffizienzen, selbst bei schwer zu transfizierenden Zellen, wie Primär- und Stammzellen [45]. Gleichzeitig wird dadurch die Zelle beschädigt und führt zu hohen

Toxizitätsraten [46]. Zudem sind die physikalischen Methoden in der Regel auf Ex-vivo-Anwendung beschränkt, wodurch sie keine universellen nicht-viralen Alternativen darstellen können.

Die gebräuchlichsten anorganischen NVA basieren auf Calcium-Phosphat, Silikon oder Gold [47]. Sie könnten *in vivo* eingesetzt werden, doch akkumulieren die anorganischen NVA häufig in den Zellen, da sie eine geringe Biodegradierbarkeit haben. Calcium-Phosphat-basierende Transporter sind im Gegensatz zu Gold intrazellulär biodegradierbar und wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt [48]. Ihre geringe Effizienz und geringe Stabilität hindern jedoch die Verbreitung dieser NVA.

Die Gruppe der organischen NVA umfasst unter anderem die Lipoplexe, Polyplexe und Dendrimere. Sie zeichnen sich durch ihre Biodegradierbarkeit und geringe Immunogenität aus [47]. Die Biokompatibilität und Effizienz hängen dagegen stark von dem eingesetzten Vektor ab. Lipoplexe und Polyplexe, also Lipide und Polymere, die aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit der DNA interagieren, stellen neben der „nackten“ DNA die größten Gruppen an NVA dar [49]. Lipoplexe bestehen in der Regel aus kationischen Lipiden mit einem positiv geladenen hydrophilen Kopf und hydrophoben Schwanz, welche über eine Linker-Struktur miteinander verbunden sind. Die Stabilität der Lipoplexe in serumhaltigem Medium ist gering, wodurch auch die In-vivo-Anwendung beschränkt ist [50]. Eine PEGylierung der Lipoplexe erhöht die Stabilität, führt gleichzeitig aber auch zu einer geringeren Internalisierung und damit wiederum zu einer niedrigeren Transfektionseffizienz [51]. Zur Ausbildung von Polyplexen werden am häufigsten die kationischen Polymere Polyethylenimin (PEI), Chitosan, Polymethylacrylat oder Polyamidoamin (PAMAM) verwendet. PEI-basierende Polyplexe wurden bereits erfolgreich für die Transfektion verschiedener Zelllinien *in vitro* und *in vivo* eingesetzt, da sie hohe Transfektionseffizienzen erreichen [52-54]. Dies liegt hauptsächlich an ihrer Fähigkeit, einer Einlagerung bzw. Degradierung im Lysosom zu entkommen, einem Hauptknotenpunkt des intrazellulären Transports. Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften ist die Verwendung von PEI besonders *in vivo* kritisch zu sehen [55]. Nach Injektion von PEI-Polyplexen in Mäuse wurden beschädigte Körperstrukturen sowie erhöhte Mortalitätsraten beobachtet [56, 57]. Merdan *et al.* zeigten, dass intravenös injizierte Polyplexe sich aufgrund einer Albumin-induzierten Aggregation in der Lunge anreicherten [58]. Die Zytotoxizität der Lipoplexe und Polyplexe wird von dem Verhältnis der Lipide bzw. Polymere zu den Nukleinsäuren bestimmt. Ein Überschuss an kationischen Lipiden bzw. Polymeren führt einerseits zu einer hohen Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran, andererseits können dadurch irreparable Löcher in der Zellmembran entstehen, was zur Apoptose oder auch Nekrose der Zelle führen kann [59].

Protein-basierte Gentransfersysteme spielen bis dato nur eine untergeordnete Rolle bei der nicht-viralen Gen- und Zelltherapie. Aufgrund ihrer Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und

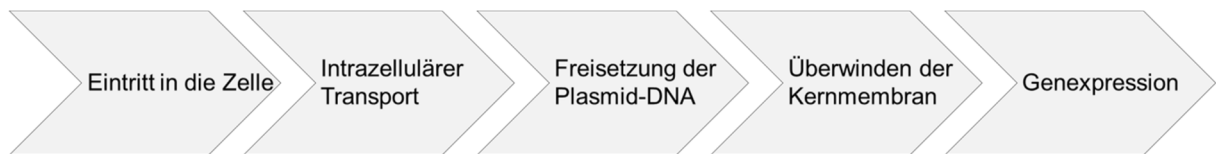
fehlenden Immunogenität stellen sie dennoch eine attraktive Basis für den nicht-viralen Gentransport dar. Besonders Kollagen und Elastin-ähnliche Polypeptide (*elastin-like polypeptides*; ELP) wurden bereits bezüglich ihres Potentials zum Gentransfer untersucht [47]. Die Sequenz des ELP stammt von Tropoelastin ab und ist in der Zusammensetzung Kollagen ähnlich, enthält aber kein Hydroxylysin und ist elastisch dehnbar. Beschichtung von Molekülen mit ELP reduzierte die Immunogenität, was das Potential von ELP für In-vivo-Anwendungen widerspiegelt [60]. Aber nur wenige Studien ermittelten bisher die Anwendbarkeit dieser NVA für die Gen- und Zelltherapie.

**Tabelle 2:** Nicht-virale Alternativen für die Gentherapie. Modifiziert nach Ramamoorth et al. [47].

Gentransfer	Mechanismus	Anwendungsbereich	Vorteil	Nachteil
<b>Nackte DNA/Plasmid-DNA – direkter Gentransfer</b>	Endozytose	(Herz-)Muskel, Haut, Leber, solide Tumore	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sicher</li> <li>• Einfach</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Effizienz</li> </ul>
<b>Genkanone</b>	Hochdruck-Heliumstrom	Ovarial-Tumorzelllinie (in vitro und in vivo präklinisches Model)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flexibel</li> <li>• Geringe Zytotoxizität</li> <li>• Gute Effizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Eindringtiefe</li> </ul>
<b>Elektroporation</b>	Vergößerung der Zellmembran-Permeabilität	Haut, Muskel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gute Effizienz</li> <li>• Mehrfachanwendungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebeschäden</li> <li>• Geringe Erreichbarkeit innerer Organe mit Elektrode</li> </ul>
<b>Ultraschall/ Micro bubble</b>	Vergößerung der Zellmembran-Permeabilität	Gehirn, Cornea, Leber, Niere, Muskel, Herz, Peritonealhöhle, vaskuläre Zellen,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sicher</li> <li>• Flexibel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Effizienz</li> </ul>
<b>Magnetofektion</b>	Pinozytose, Endozytose	Primärzellen und schwer zu transfizierende Zellen (nur in vitro)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Zytotoxizität</li> <li>• Flexibel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transiente Transfektion</li> </ul>
<b>Anorganische Moleküle</b>	Endozytose	In vitro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfache Herstellung</li> <li>• Lagerstabilität</li> <li>• Oberflächenfunktionalisierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Effizienz</li> </ul>
<b>Lipoplexe</b>	Endozytose, Kondensation der DNA	Epithelzellen der Atemwege, Endothelzellen, Hepatozyten, Muskelzellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sicher</li> <li>• Geringe Zytotoxizität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe/mittlere Effizienz</li> <li>• Potentiell immunogen</li> </ul>
<b>Polyplexe und Dendrimere</b>	Endozytose, Kondensation der DNA, Protonenschwamm-Effekt	Lunge, Mundhöhle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Immunogenität</li> <li>• Mittlere Effizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplementaktivierung</li> <li>• Geringe Effizienz</li> <li>• Zytotoxizität</li> </ul>

### 1.3 Die Hürden des nicht-viralen Gentransports

Damit ein größerer Patientenkreis Zugang zu den vielversprechenden Ansätzen der Gentherapie erhält, müssen die Sicherheit der Gentransfersysteme weiter erhöht und die Zellen virusfrei genetisch verändert werden. Obwohl aber seit über zehn Jahren an nicht-viralen Gentransfersystemen geforscht wird, kommen bis dato keine alternativen Systeme zum Einsatz. Keine dieser NVA hat zu diesem Zeitpunkt eine FDA-Zulassung. Dies zeigt, dass die derzeitigen Vektoren noch nicht für den effizienten Nukleinsäuretransport *in vivo* geeignet sind [61].



**Abbildung 4: Übersicht über den mehrstufigen Prozess des Gentransports.**

Der Transport von Nukleinsäuren ist ein mehrstufiger Prozess und die Ineffizienz jeder einzelnen Stufe resultiert in einem dramatischen Rückgang der Gesamteffizienz (Abb. 4). Der Eintritt in den Organismus bis hin zur Zielzelle ist die erste Hürde, die überwunden werden muss. Dort angekommen, müssen die Genfähren an die Zelle binden und internalisiert werden. Je nach Aufnahmemechanismus gelangen sie entweder direkt ins Zytoplasma oder müssen vom Endosom ins Zytoplasma freigesetzt werden. Vom Zytoplasma müssen sie in den Zellkern gelangen, um dort entweder ihr genetisches Material ins Genom zu integrieren oder direkt mit der Replikation zu beginnen.

Die Viren haben sich evolutionär auf die spezifische Infektion eines Zelltyps spezialisiert und dabei den Weg in den Organismus bis hin zum Zellkern so optimiert, dass z. B. Lentiviren nahezu 100 % selbst nicht-proliferierender Zellen infizieren. Die Studien der Mechanismen, die Viren entwickelt haben, diese Hürden zu überwinden, können daher zur erfolgreichen Entwicklung effizienter nicht-viraler Alternativen beitragen.

#### 1.3.1 Eintritt in den Organismus bzw. die Zelle

Viren haben für die unterschiedlichen Herausforderungen spezifische Eigenschaften entwickelt. Der Tropismus der verschiedenen Viren wird durch die Interaktion von Liganden an der Virus-Oberfläche an die Zielzelle reguliert. Diese Liganden binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was zur Endozytose-vermittelten Internalisierung der Viren führt. Dabei nutzen die Viren die Clathrin-vermittelte Endozytose genau wie Clathrin-unabhängige Wege, wie z. B. die Caveolae-vermittelte Endozytose, um in die Zelle einzutreten. Zusätzlich haben Viren Endozytose-unabhängige Wege entwickelt. Behüllte Viren wie die Retroviren gelangen in der Regel über Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran in das Zytoplasma [62].

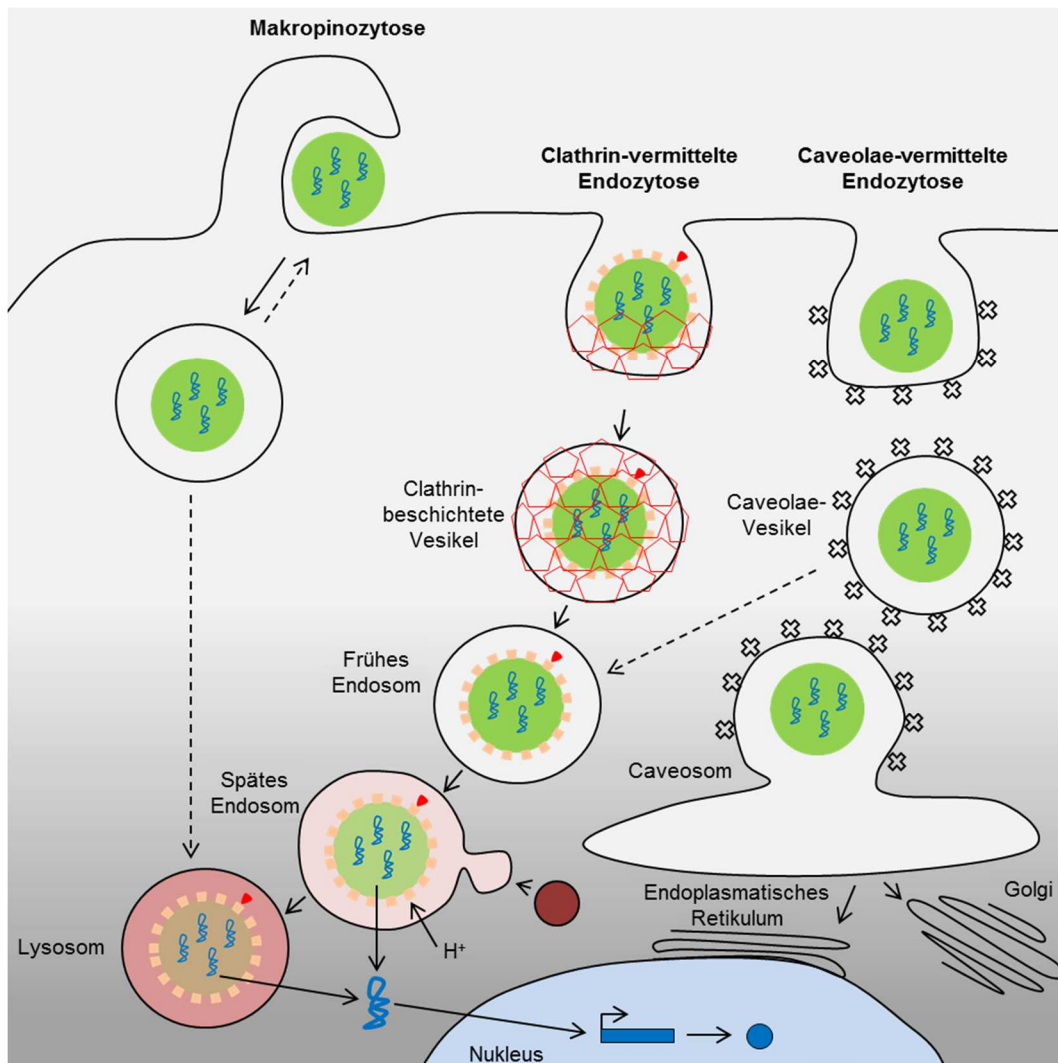
Unbehüllte Viren wie die Adenoviren dagegen penetrieren mit lytischen Peptiden die endosomale Membran (PMID: 21804909). Zur effizienten und gerichteten Internalisierung der NVA versucht man die Mechanismen der Viren zu adaptieren und modifiziert die NVA, z. B. mit Liganden für spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche oder mit lytischen Peptiden.

#### 1.3.1.1 Endozytosewege

Der am häufigsten ablaufende und am besten erforschte Endozytoseweg ist die Rezeptor- bzw. Clathrin-vermittelte Endozytose. Über diesen Endozytoseweg gelangen Nährstoffe, Pathogene, Antigene, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in die Zelle. Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist ein ständig ablaufender Prozess in nicht-proliferierenden Zellen, bei dem nach Bindung von Liganden an Rezeptoren Clathrin-Moleküle an der Innenseite der Plasmamembran angelagert werden und sich zu einem behüllten Vesikel ins Zytoplasma abschnüren (Abb. 5). Die Clathrinhülle wird abgestreift, wodurch die Vesikel mit frühen Endosomen fusionieren und sich der pH-Wert der Vesikel auf pH 5-6 erniedrigt. Durch anschließende Fusionierung mit Lysosomen erniedrigt sich der pH-Wert weiter auf pH 4-5 und die 40 unterschiedlichen lysosomalen sauren Hydrolasen, wie z. B. Nukleasen, Proteasen oder Lipasen degradieren die internalisierte Fracht, damit sie von der Zelle weiter verwertet werden kann. Da sich die Clathrin-beschichteten Vesikel auf einen maximalen Durchmesser von 200 nm ausdehnen können, kommen sie nicht für den Transport aller Makromoleküle in Frage [63]. Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) und der *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor sind zwei Beispiele für Rezeptoren, deren Liganden über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden [64, 65]. Die erfolgreiche Adaption des Mechanismus wurde z. B. mit *quantum dots* gezeigt, deren Modifizierung mit Liganden des EGFR modifiziert zur Clathrin-vermittelten Endozytose der *quantum dots* führte [66].

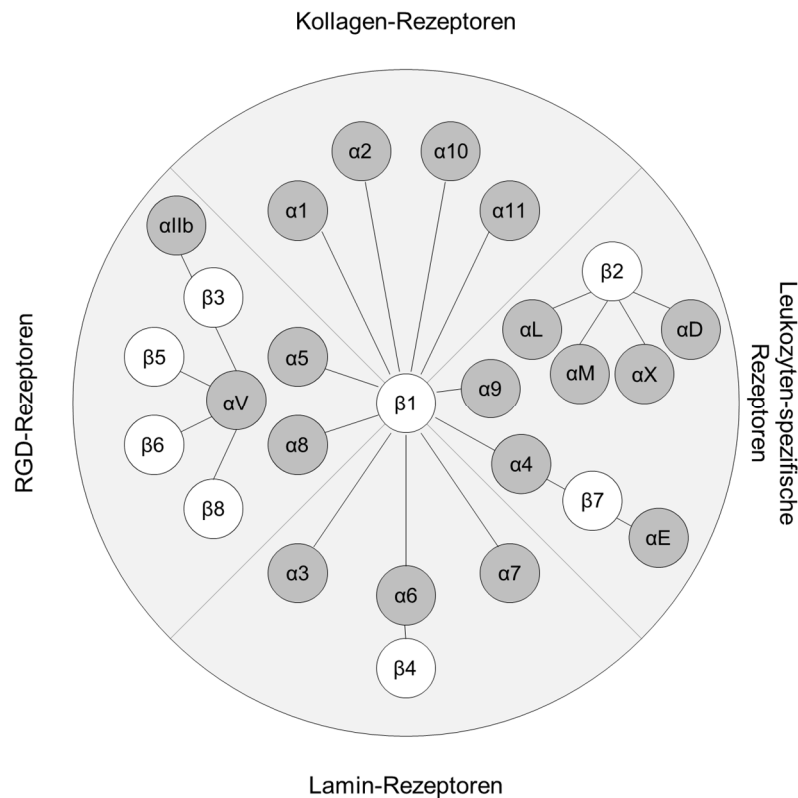
Der zweithäufigste ablaufende Endozytoseweg in Zellen ist die Caveolae-vermittelte Endozytose. Die 50-100 nm großen mit Caveolin ausgekleideten Vesikel schnüren sich im Bereich der *lipid rafts* der Zellmembran ab (Abb. 5). Die Vesikel fusionieren anschließend entweder mit Endosomvesikeln oder Caveosomen. Letztere haben im Gegensatz zu Endosomen einen neutralen pH-Wert, wodurch in diesen Vesikeln die Fracht nicht degradiert wird. Viele Viren und Bakterien nutzen diesen Endozytoseweg, um in die Zelle zu gelangen, ohne im Lysosom degradiert zu werden.

Ein weiterer Clathrin-unabhängiger Endozytoseweg ist die Makropinozytose (Abb. 5). Durch Aktin-vermitteltes Umstülpen der Zellmembran werden Vesikel mit einem Durchmesser zwischen 1-5  $\mu\text{m}$  generiert [67, 68]. Das Einstülpen scheint dabei unselektiv und unabhängig von Rezeptoren abzulaufen [69]. Auch ist der intrazelluläre Transport der Vesikel nur unzureichend analysiert und Zelltyp-abhängig. Dieser Weg wird als Eintrittsweg für viele NVA beschrieben, ist aber nicht gezielt anzusteuern [70].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Wege nach Makropinozytose, Clathrin- oder Caveolae-vermittelter Endozytose.** Die Internalisierung nicht-viraler Gentransfersysteme (grün) wird durch unterschiedliche Interaktion mit der Zelle bestimmt. Modifiziert nach Hillaireau *et al.* [70].

Die Schwierigkeit, NVA gezielt über spezifische Endozytosewege internalisieren zu lassen, wird am Beispiel der Integrine deutlich. Integrinrezeptoren sind Transmembranrezeptoren, die sich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Die zwei Hauptfunktionen der Integrine sind das Binden der Zelle an die extrazelluläre Matrix und die Signaltransduktion. Die unterschiedlichen Funktionen der Integrine werden durch die diversen Untereinheiten gesteuert. Sie unterscheiden sich in ihrer Liganden-Spezifität und werden aufgrund dessen in RGD-, Kollagen-, Leukozyten-spezifische- und Laminin-Rezeptoren eingeteilt (Abb. 6). RGD-Rezeptoren erkennen in ihren Liganden, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin oder Fibrinogen, eine minimale Sequenz aus drei Aminosäuren: Arg-Gly-Asp [71].



**Abbildung 6: Repräsentation der Integrin-Familie.** Die 24 Heterodimere der Integrin-Familie der Säugetiere setzen sich aus 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten zusammen. Aufgrund ihrer Ligandenspezifizität werden sie in unterschiedliche Gruppen zusammengefasst (modifiziert nach Barczyk *et al.* [72]).

Während die Expression der unterschiedlichen Integrinrezeptoren gut erforscht ist, ist ihr Endozytosemechanismus nicht genau geklärt. Bisher wurden neben der Clathrin-vermittelten Endozytose und Caveolae-vermittelten Endozytose auch Endozytose-unabhängige Wege beschrieben [73, 74]. Für diese unterschiedlichen Beobachtungen sind zum Teil die unterschiedlichen Rezeptorkombinationen verantwortlich. Integrine mit der  $\beta 1$ -Untereinheit führen zur Anreicherung der Integrine in *lipid rafts*, gefolgt von Caveolae-vermittelter Endozytose [75]. Lucie *et al.* zeigten dagegen, dass das Integrin  $\alpha V \beta 3$  mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert wird [76]. Entscheidend, von welchem Integrin-Rezeptor das RGD-Peptid internalisiert wird, sind die RGD-umgebenden Aminosäuren [77, 78]. Für zyklische RGD-Peptide konnte die spezifische Aufnahme über den Integrinrezeptor  $\alpha V \beta 3$  gezeigt werden.

Obwohl der Aufnahmemechanismus oft unklar ist, wurden bereits in vielen Studien RGD-modifizierte NVA erfolgreich in die Zelle transportiert. Pandita *et al.* verstärkten mit RGD-modifizierten Dendrimern den Transport von Plasmid-DNA in murine MSC [79]. Auch weitere, schwer zu transfizierende Zellen wie Endothelzellen, primäre Fibroblasten und Keratinozyten zeigten eine erhöhte Transfektionseffizienz, wenn die Gentransportsysteme mit RGD-Peptiden modifiziert wurden [80, 81].



### 1.3.1.2 Internalisierung über alternative Wege

Beobachtungen, dass die Aufnahme mancher Gentransfersysteme nicht durch Inhibitoren endozymatischer Wege gehemmt wird und Energie-unabhängig ist, bestätigte die Hypothese, dass es neben der Endozytose alternative Wege zur Internalisierung gibt [82]. Zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPP) waren die ersten Moleküle, für die alternative Wege in die Zelle gezeigt wurden. CPP ist eine Klasse, meist kurzer ( $\leq 20$  Aminosäuren) kationischer Peptide, die von einer Protein- oder Chimärsequenz hergeleitet wurden. Der Transaktivator der Transkription (Tat) des HI-Virus war das erste beschriebene CPP. Tat wurde bereits in sehr vielen Studien zum Transport sowohl kleiner als auch großer Moleküle in unterschiedliche Zelltypen genutzt [83-85]. Dabei bindet Tat unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen an anionische Lipide oder Glucosaminglukane an die Zellmembran, was die direkte Internalisierung ins Zytoplasma bewirkt [86]. Mehrere Hypothesen, wie der genaue Mechanismus der Internalisierung ist, wurden postuliert [70, 86]. Hence *et al.* zeigten anhand von Simulationen, dass es am wahrscheinlichsten ist, dass die Zellmembran aufgrund komplexer Wechselwirkungen einzelner Aminosäuren der Tat-Sequenz eine temporäre Pore bildet, durch die das Peptid ins Zytoplasma gelangen kann [87]. Neben Tat wurden weitere Sequenzen, wie z. B. Transportan, Polyarginin, Mercaptopropionylglycin (MPG) und Penetratin als CPP identifiziert und erfolgreich zum Transport von Molekülen in die Zelle genutzt [88-91]. Je nach Aminosäuresequenz und daraus resultierender Ladung der CPP können sie die Membran direkt penetrieren, die Oberflächenspannung der Membran reduzieren und zum langfristigen Einstrom in die Zelle führen. Neben der Porenbildung können sie zur Ausbildung von Mizellen oder Teppich-ähnlichen Strukturen führen [92]. Der genaue Mechanismus der unterschiedlichen Membranveränderungen ist größtenteils noch nicht erforscht. Neue Studien beschreiben demnach für das Tat-Peptid neben dem Eintritt über Poren auch die Internalisierung über Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose sowie Makropinozytose und zudem, dass Tat mehrere dieser Wege parallel nutzen kann [86].

Aufgrund der Vielzahl der Internalisierungswege ist die Modifikation der NVA sehr wichtig. Die oft kontroversen Beobachtungen der Aufnahmewege gleicher Liganden zeigen aber, dass neben den Liganden Faktoren wie Größe, Form oder Ladung der NVA den Aufnahmemechanismus beeinflussen können [93-95]. Zudem existieren Zelltyp-spezifische Aufnahmemechanismen. All dies erschwert die Vorhersage über die Effizienz der NVA und erfordert für jede neue Kombination an NVA und Zelltyp eine erneute Charakterisierung.

### 1.3.2 Intrazelluläre Verteilung

Damit die transportierten Gene exprimiert werden können, muss die Plasmid-DNA in den Zellkern gelangen. Daher müssen die Gentransportsysteme nach der Internalisierung auch

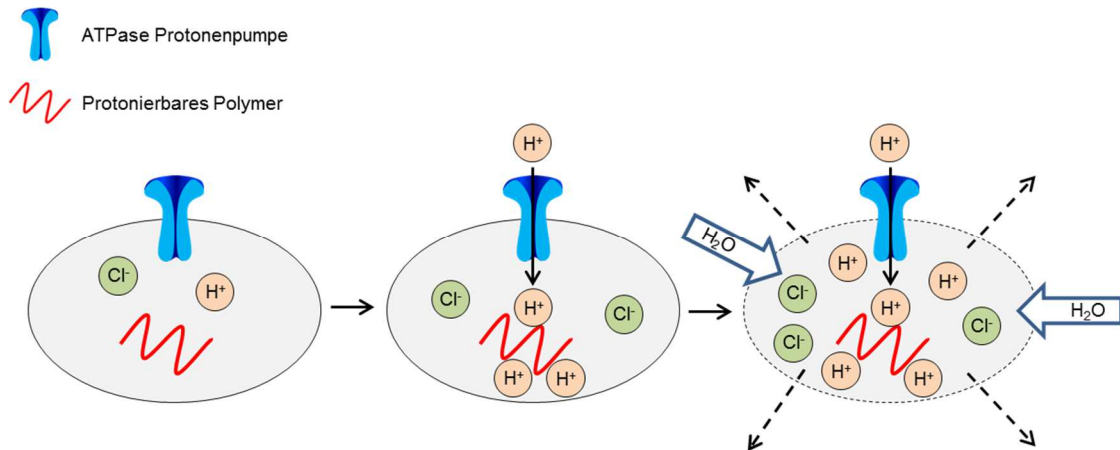
den Transport der Plasmid-DNA bis hin zum Zellkern sicherstellen. In den meisten Fällen werden die internalisierten Gentransportsysteme aber erstmal in Endozytose-Vesikel, wie z. B. die Endosomen eingeschlossen, bevor sie das Zytoplasma erreichen.

#### 1.3.2.1 Lysosomale Degradierung

Die Verwendung von Liganden, die eine Clathrin-vermittelte Endozytose bewirken, kann dazu führen, dass die Gentransportsysteme und auch die zu transportierende DNA im Lysosom degradiert werden. Viren, die über diesen Endozytoseweg in die Zelle gelangen, haben Strategien entwickelt, diesem Schicksal zu entgehen. Beispielsweise ändert das Membranprotein des Influenzavirus A, Hämagglutinin, pH-bedingt seine Konformation im Endosom, wodurch die hydrophoben Komplexe die Membranstruktur destabilisieren und das Innere des Virions durch die Endosomenmembran ins Zytosol geschleust wird.

Der Großteil der NVA dagegen, die über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden, wird im Lysosom degradiert [96]. Dies stellt damit ein Hauptproblem der NVA dar, was zum großen Effizienzunterschied gegenüber den viralen Vektoren bei der Transfektion beiträgt. Daher versucht man – angelehnt an Viren – mit Fusionspeptiden, die an die Oberfläche der NVA gebunden werden, die Freisetzung aus dem Endosom zu bewirken. E5, ein negativ geladenes, 20 Aminosäuren großes Peptidanalogen des Hämagglutinins, hat die Eigenschaft der Membranfusion bei niedrigem pH-Wert. Somit führte eine Kombination aus dem CPP Tat mit der E5-Sequenz bei Ko-Inkubation mit dem fluoreszierenden Protein mCherry zu einer gleichmäßigen zytoplasmatischen Verteilung [97]. GALA, ein Peptid mit der repetitiven Sequenz aus Glu-Ala-Leu-Ala, imitiert die Funktion viraler Fusionsproteine und ändert bei saurem pH-Wert die Konformation in eine helikale Struktur, welche die Endosomenmembran destabilisiert [98, 99]. Die Fusionierung von Lipoplexen mit GALA führte zur Erhöhung der Transfektionseffizienz [100].

Eine weitere Möglichkeit, die Degradierung im Lysosom zu umgehen, wird durch die Protonenschwamm-Hypothese beschrieben (Abb. 7). Hierzu fangen protonierbare Amine die Protonen ab, die zur pH-Erniedrigung in die frühen Endosomen gepumpt werden. Die Ansäuerung wird somit verhindert, worauf immer mehr Protonen – und mit ihnen auch Chloridionen – in die Vesikel gepumpt werden. Es kommt zum osmotisch bedingten Wassereinstrom, was das Platzen der Endosomvesikel und damit das Ausschütten des Vesikelinhaltes in das Zytoplasma mit sich führt. Synthetische kationische Polymere wie PEI oder PAMAM lösen einen Protonenschwamm-Effekt in Zellen aus, was sie zu effizienten Ausgangsmolekülen für NVA macht [101]. PEI-basierende Polyplexe wurden bereits erfolgreich für die Transfektion verschiedener Zelllinien *in vitro* und auch *in vivo* eingesetzt [52-54].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Protonenschwamm-Hypothese.** Protonierbare Amine wie z. B. Polymere fangen die Protonen ( $H^+$ ) ab, die zur pH-Erniedrigung in die frühen Endosomen gepumpt werden. Die Ansäuerung dieser wird somit verhindert, worauf verstärkt Protonen – und mit ihnen auch Chloridionen ( $Cl^-$ ) – in die Vesikel gepumpt werden. Dementsprechend kommt es zum osmotisch bedingten Wassereinstrom ( $H_2O$ ), was das Platzen der Endosomvesikel und damit das Ausschütten des Vesikelinhaltes in das Zytoplasma mit sich führt. Modifiziert nach Wanling *et al.* [102].

Lipoplexe bieten einen weiteren Weg einer lysosomalen Degradierung zu entgehen. Gelangen Lipoplexe in Endosomvesikel, können sie dort aufgrund ihrer Beschaffenheit eine Flip-Flop-Bewegung in der lipidreichen Membran auslösen, wodurch die Nukleinsäuren in das Zytoplasma freigesetzt werden [103].

NVA, die nicht eigenständig aus dem Endosom bzw. Lysosom gelangen, können mittels endo-/lysosomotropischen Reagenzien, wie z. B. Chloroquin oder Sucrose vor der lysosomalen Degradierung geschützt werden [104, 105]. Chloroquin ist eine schwache Base, welche die Plasmamembran penetrieren kann und in sauren Vesikeln akkumuliert [106]. Dadurch kommt es zur Erhöhung des pH-Werts, wodurch die lysosomalen Hydrolasen inhibiert werden [107]. Chloroquin kann zudem zum osmotischen Anschwellen und Platzen der Endosomen führen [108].

### 1.3.2.2 Intrazellulärer Transport zum Zellkern

Im Zytoplasma angekommen, nutzen Viren die zellulären Motorproteine, um zum Zielkompartiment zu gelangen. Ziel der DNA-Viren ist der Zellkern. Durch die Kernporen können Moleküle diffundieren, die kleiner als 9 nm bzw. 40 kDa sind. Moleküle mit einer maximalen Größe von 39 nm können aktiv über den Kernporenkomplex transportiert werden [109]. Damit ist sowohl für viele Viren als auch für die meisten NVAs der Transport in den Zellkern über Kernporen ausgeschlossen.

Lentiviren, wie das HI-Virus, die zu groß zum Transport durch die Kernporen sind, entpacken sich im Zytoplasma, wodurch ein Prä-Integrationskomplex freigesetzt wird, der über die Poren transportiert wird [110, 111]. Die Freisetzung der inkorporierten Plasmid-DNA im Zytoplasma stellt eine weitere Hürde vieler NVA dar, da diese oft zu langsam oder unzureichend geschieht

[44]. Obwohl bei Lipoplexen und Polyplexen die Plasmid-DNA nicht in die NP-Matrix inkorporiert ist, muss sie sich dennoch im Zytoplasma von den Lipiden- bzw. Polymer-Molekülen lösen. Dabei haben die pH-Änderungen bei der Endozytose einen Einfluss auf die Bindungsstärke und die Ansäuerung im Endosom führt zur stärkeren Wechselwirkung der DNA mit dem Polymer [112]. Doch selbst Plasmid-DNA, die bereits im Zytoplasma freigesetzt wurde, wird selten über Kernporen transportiert. Kernlokalisations-signale (*nuclear localization signal*, NLS) fördern den Transport zum Zellkern und durch die Kernporen. Neben der klassischen NLS-Sequenz wurden alternative NLS-Sequenzen, wie z. B. die Tat-Sequenz des HI-Virus identifiziert [113]. Lin *et al.* modifizierten Plasmid-DNA mit unterschiedlichen NLS-Sequenzen und zeigten, dass alle das mRNA-Level des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Vergleich zu unmodifizierten Lipoplexen erhöhten [114]. Die Transfektionseffizienz der NLS-modifizierten NVAs war allerdings immer noch unzureichend [115].

Viele Viren oder NVA, die theoretisch zu groß zur Überwindung der Kernporen sind, führen dennoch erfolgreich zur Expression der inkorporierten Plasmid-DNA. Für die murinen Leukämieviren wurde gezeigt, dass ihr Prä-Integrations-Komplex zu groß zum Transport durch Kernporen ist und sich diese Viren erst nach der Neuordnung des Zellkern nach einer Zellteilung ins Genom integrieren [116]. Damit gelangte die Plasmid-DNA nur bei der mitotischen Teilung der Zelle in den Kern. Ob diese Beobachtung Ursache dafür ist, dass manche Viren nur proliferierende und manche auch nicht-proliferierende Zellen infizieren können, würde bisher nicht eindeutig geklärt [117]. Die Tatsache, dass der Mechanismus des Eintritts in den Zellkern für große Moleküle bisher kaum verstanden ist, erschwert die Entwicklung der NVA. Auch der Anspruch, hohe Stabilität und Schutz beim Transport zum Zytoplasma, dort aber ein rasches und komplettes Entpacken der Nukleinsäuren zu gewährleisten, bedarf komplexer NVA für einen effizienten Gentransfer.

#### 1.4 Humanes Serumalbumin als Basis nicht-viraler Alternativen

Damit die viralen Vektoren für die Gen- und Zelltherapie abgelöst werden können, müssen neue, effiziente und biokompatible Gentransfersysteme entwickelt werden. Dabei zeigten Lipid- und Polymer-basierende NVA in aktuellen Studien vermehrt zytotoxische Effekte. Aber besonders die Primär- und Stammzellen, die zur Gen- und Zelltherapie eingesetzt werden sollen, reagieren sensitiv auf toxische Reagenzien. Unterschiedliche Stimuli können hMSC zur spontanen Differenzierung bringen [118, 119], wodurch sie ihre Potenz für die Zelltherapie verlieren. Generell sollten Zellen, die für eine Genthherapie weiter verwendet werden sollen, nicht zellulärem Stress oder toxischen Reagenzien ausgesetzt werden, da dies eine maligne Transformation auslösen könnte. Eine hohe Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit stellen damit essentielle Grundvoraussetzungen der NVA dar.

Besonders Protein-basierte Transportsysteme zeichnen sich durch ihre geringe Immunogenität und hohe Biokompatibilität aus [120]. Dabei ist vor allem Albumin ein interessantes Protein zum Wirkstofftransport. Doch während Albumin bereits in vielen Studien erfolgreich zum Transport verschiedener Wirkstoffe eingesetzt wurde, sind kaum Studien mit Albumin-basierten Gentransfersystemen bekannt.

Der erste Einsatz von Albumin-basierten Partikeln zum Transport von Wirkstoffen wurde bereits 1981 von Lee *et al.* beschrieben [121]. Dabei machen nicht nur die hohe Stabilität bei pH 4-9 und Hitze bis zu 60 °C, sondern auch die Biodegradierbarkeit, geringe Toxizität und Immunogenität Albumin zu einem idealen Material zum Wirkstofftransport [122]. Zusätzlich bietet Albumin eine Vielzahl von Bindestellen für unterschiedliche Wirkstoffe. Die hohe Biokompatibilität des Albumins ergibt sich aus den physiologischen Eigenschaften des Proteins: Serumalbumin ist mit 35-50 mg/ml das häufigste Protein im Blutplasma. Es reguliert den kolloidosmotischen Druck und trägt zur Pufferkapazität des Blutes bei [123]. Zusätzlich bindet und transportiert Serumalbumin hydrophobe Substanzen wie Fettsäuren, Bilirubin, zweiwertige Ionen (Kupfer, Cystein, Calcium), Hormone und Arzneistoffe im Blut, was es zum natürlichen Transporter macht.

Humanes Serumalbumin (HSA) besteht aus 585 Aminosäuren, wovon 35 Cysteine sind. Disulfidbrücken halten die  $\alpha$ -helikalen Strukturen zusammen, wodurch ein elliptisches Molekül mit einem Molekulargewicht von 65 kDa entsteht. Das *ALB*-Gen wird in Hepatozyten als Proalbumin exprimiert. Das N-terminale Peptid wird kotranslational entfernt, bevor es das raue endoplasmatische Retikulum als Proalbumin verlässt und im Golgi-Apparat weiter zu Albumin prozessiert. So werden täglich 150-250 mg HSA pro Kilogramm Körpergewicht produziert, welches in einem erwachsenen Menschen eine Halbwertszeit von 19 Tagen hat [124]. Damit baut ein 70 kg schwerer, gesunder Erwachsener jeden Tag 14 Gramm Albumin ab. Der Abbau geschieht in den Endothelzellen, in nahezu jedem Organ. Endothelzellen nehmen das HSA Rezeptor-vermittelt auf und degradieren es lysosomatisch [125, 126]. Die Internalisierung des Albumins über den neonatalen Fc-Rezeptors führt dagegen am Lysosom vorbei zur Exozytose und zur verlängerten Persistenz des HSA [127]. Zudem wird für Albumin die Caveolae-abhängige Aufnahme über Glykoprotein 60 (gp60)-Rezeptoren, die hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert werden, beschrieben [128]. Dabei wird das Albumin von den Endothelzellen transzytiert, d. h., dass es nach der Aufnahme direkt durch die Zelle transportiert und wieder ausgeschleust wird, um im Organismus weiter verteilt zu werden. Modifiziertes HSA, wie z. B. Formaldehyd-vernetztes Albumin, wird über die Scavenger-Rezeptoren gp30 und gp18 von Endothelzellen, Fibroblasten oder glatten Muskelzellen aufgenommen [125, 129].

### 1.4.1 HSA-basierende Nanopartikel

Nachdem bereits Wirkstoff-beladene HSA-Mikrosphären mit einer Größe von circa 1 µm in vielen Studien erforscht wurden, ermöglichte die Etablierung von HSA-basierenden Nanopartikeln (HSA-NP) darüber hinaus den Transport in die Zelle bzw. durch Körperbarrieren. Nanopartikel sind feste, kolloidale Teilchen mit einem Durchmesser von 10-1000 nm. HSA-NP haben wie die HSA-Mikrosphären den Vorteil, dass in sie sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe inkorporiert werden können [122, 130, 131].

Langer *et al.* etablierten und optimierten das Ethanol-basierte Desolvationsverfahren zur Herstellung 150-280 nm großer HSA-NP [132]. Der pH-Wert, die HSA-Konzentration der Ausgangslösung und die Geschwindigkeit der Ethanolzugabe konnten als entscheidende Parameter für die Größe der HSA-NP identifiziert werden. Weber *et al.* zeigten, dass die HSA-NP mittels unterschiedlicher Glutaraldehydmengen stabilisiert werden können [133]. Dabei konnten stabile HSA-NP mit einer 40-100 %igen Quervernetzung mit Glutaraldehyd erreicht werden. Je höher die HSA-NP mit Glutaraldehyd quervernetzt waren, desto niedriger war die Anzahl der Aminogruppen auf der Partikeloberfläche. Diese wiederum können zum kovalenten Binden von Wirkstoffen oder Liganden, wie z. B. Antikörpern, Zuckergruppen oder Peptiden, genutzt werden [134-136]. Da die chemische Stabilisierung mittels Glutaraldehyd allerdings zur Inaktivierung des inkorporierten Wirkstoffes führen kann und bifunktionale Aldehyde toxisch sind, ist die glutaraldehydfreie Herstellung der HSA-NP zu bevorzugen [137].

Weber *et al.* etablierten die Stabilisierung HSA-basierender Nanopartikel mittels Hitze, wobei eine Abhängigkeit der Stabilität von der Höhe der Temperatur und der Länge des Erhitzens beobachtet werden konnte [133]. Je höher und je länger die HSA-NP erhitzt wurden, desto stabiler wurden sie. Die Funktionalität inkorporierter Antisense-Oligonukleotide wurde durch die Erhitzung nicht beeinträchtigt [137]. Dennoch ist es vorstellbar, dass andere Wirkstoffe sensibel auf Temperaturen von über 100 °C reagieren, die teilweise zur Stabilisierung verwendet wurden [137]. Eine Stabilisierungsmethode der HSA-NP ohne toxisches Glutaraldehyd oder Erhitzung ist die Neuordnung intermolekularer Disulfidbrücken. Dabei werden die Disulfidbrücken der HSA-Moleküle reduziert und nach Präzipitation der NP wieder neu gebildet, wodurch die NP-Struktur stabilisiert wird. Wang *et al.* etablierten die Herstellung Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP mittels Glutathion [138]. Glutathion ist eines der größten Antioxidantien *in vivo*, weshalb durch dessen Verwendung die Biokompatibilität der HSA-NP nicht herabgesetzt wird [139].

Das Binden des Tumorthapeutikums Paclitaxel an 130 nm große Albumin-Nanopartikel (*nanoparticle albumin bound paclitaxel*, *nab*-Paclitaxel) verringerte die Hydrophobität des Wirkstoffes, was die direkte Injektion von *nab*-Paclitaxel ohne Lösemittel, und die damit verbundenen Nebenwirkungen, ermöglichte. Unter dem Handelsnamen Abraxan erhielt *nab*-Paclitaxel 2005 als erstes nanopartikuläres Medikament die Zulassung der FDA (*food and drug*

*administration*) in den USA zur Behandlung von Brustkrebs, seit 2008 ist es auch in der Europäischen Union zugelassen. 2012 erhielt Abraxan zudem die FDA-Zulassung zur Behandlung von fortgeschrittenem Lungenkrebs und seit 2013 zur Therapie von Pankreaskarzinomen.

Neben dem verbesserten Transport und Schutz des Wirkstoffs in der NP-Matrix tragen zusätzliche Liganden auf der NP-Oberfläche zur spezifischen Verteilung der HSA-NP bei. Neben einer nicht-kovalenten adsorptiven Bindung ist auch die kovalente Derivatisierung von Albumin-Nanopartikeln mit zielgerichteten Liganden möglich [137]. Dafür werden hydrophile Strukturen, wie z. B. Polyethylenglykol (PEG), an die NP-Oberfläche gebunden, was die Adsorption von Proteinen verhindert [140]. Zudem sind PEGylierte NP vor einem Abbau durch Makrophagen geschützt (*stealth effect*), da die Oposone nicht an PEG binden [141]. Funktionalisierte PEG-Moleküle können wiederum zur Kopplung von Liganden an die Nanopartikel und damit zum spezifischen *targeting* genutzt werden [142-144].

#### 1.4.2 HSA-Nanopartikel zum Transport von Nukleinsäuren

Neben den vielen Substanzen, die HSA im Blut bindet, hat es zudem die Fähigkeit, DNA zu binden. Malonga *et al.* zeigten, dass durch die HSA-DNA-Interaktion die Sekundärstruktur des Albumin stabilisiert wird [145]. Die Verwendung HSA-basierter Nanopartikel zum Transport von Nukleinsäuren könnte demnach eine biokompatible nicht-virale Alternative für die Gentherapie darstellen.

Grundsätzlich können die Nukleinsäuren adsorptiv oder kovalent an die Oberfläche von Nanopartikeln gebunden werden, wobei dies ihnen beim Transport keinen Schutz vor Nukleasen bietet [146]. Erst durch die Inkorporierung der Nukleinsäuren in die Nanopartikel-Matrix sind die Nukleinsäuren beim Transport geschützt, müssen im Zytoplasma aber wieder aus der Matrix freigesetzt werden. Dabei kann mit einer Beladungseffizienz von über 80 % die Plasmid-DNA effizient in HSA-NP inkorporiert werden [130].

Langiu *et al.* nutzen PEI-beschichtete HSA-NP zur Überwindung der Blut-Hirnschranke und zum gleichzeitigem Gentransfer [147]. Die Autoren konnten die Aufnahme der Nanopartikel in Kleinhirn-Granularzellen sowie eine Zeit-abhängige Transfektionseffizienz *in vitro* zeigen. HSA-PEI-DNA Nanopartikel zeigten in HEK293-Zellen vergleichbare Transfektions-effizienzen wie PEI-Polyplexe, mit einer dafür geringeren Zytotoxizität [148].

Ein weiteres Polymer, das zum Gentransport mit HSA kombiniert wurde, ist PAMAM. Liu *et al.* etablierten PAMAM/DNA/HSA-Komplexe zum Gentransport in Tumorzellen. HSA-Rezeptoren werden von Tumorzellen überexprimiert, weshalb die HSA-Beschichtung zur erhöhten Internalisierung der HSA-Dendriplexe führte [149]. Aufgrund ihrer Zytotoxizität sind Polymer-Modifikationen mit PEI oder PAMAM zum Einsatz in der Gentherapie aber kritisch zu sehen. Daher etablierten Mo *et al.* Plasmid-DNA beladene Nanopartikel, die nur aus unmodifiziertem HSA hergestellt wurden [130]. Sie konnten zeigen, dass die HSA-Matrix die Plasmid-DNA vor

dem enzymatischen DNase I-Abbau schützt und selbst 5 mg/ml der HSA-NP die Viabilität von ARPE-19-Zellen (humane retinale Pigmentepithel-Zelllinie) nicht beeinträchtigte. Die Plasmid-beladenen HSA-NP führten in ARPE-19-Zellen zudem zu einer hohen Transfektionseffizienz. Ein HSA-basierender Gentransfer in Primär- und Stammzellen wurde bisher nicht beschrieben, obwohl dies die Anwendungen der Gentherapie, die auf genetisch veränderten Primär- und Stammzellen basieren, voranbringen würde.

## 1.5 Zielsetzung

Die Gentherapie bietet hoffnungsvolle Ansätze, um monogenetische Krankheiten oder auch Tumorerkrankungen behandeln zu können. Die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen für die regenerative Medizin sowie die Tumorthherapie mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) sind nur zwei hoffnungsvolle Beispiele, wie in Zukunft Patienten mit genetisch veränderten Zellen therapiert werden könnten. Nach wie vor werden hauptsächlich virale Vektoren zum Transport therapeutischer Gene genutzt, da diese selbst schwer zu transfizierende Zellen wie Primär- und Stammzellen effizient genetisch verändern. Aufgrund der Sicherheitsrisiken, der hohen Herstellungskosten und der Einschränkung der Größe der inkorporierten Gene viraler Gentransfersysteme werden für die breite Anwendung der Gentherapie dringend effiziente, nicht-virale Alternativen gesucht.

Humanes Serumalbumin wurde bereits in diversen Studien als Basis biokompatibler und biodegradierbarer Nanopartikel zum Wirkstofftransport eingesetzt. Allerdings wurde deren Potential zum Einsatz in der Gen- und Zelltherapie bis dato nicht untersucht.

Ziel der Arbeit war es daher, ein effizientes nanopartikuläres Gentransfersystem basierend auf humanem Serumalbumin (HSA-NP) zu entwickeln und sein Potential zum nicht-viralen Gentransfer zu evaluieren. Der Fokus sollte dabei auf der Transfektionseffizienz und der Biokompatibilität liegen.

Dazu sollten Plasmid-beladene HSA-NP mit einem etablierten Desolvationsverfahren hergestellt werden und unterschiedliche Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrade zum Gentransport, selbst großer Plasmide bis zu 10 kb, vergleichend charakterisiert werden. Andererseits sollten alternative Quervernetzungsmethoden für Plasmid-beladene HSA-NP entwickelt werden, um die Funktionalität der inkorporierten Plasmid-DNA und Biokompatibilität des Gentransfersystems gewährleisten zu können. Zudem sollten Liganden identifiziert und getestet werden, mit deren Modifikation die Internalisierung und Transfektionseffizienz der HSA-NP gesteigert werden können. Dabei sollte die spezifische, zelluläre Bindung und Aufnahme sowie die subzelluläre Verteilung der modifizierten HSA-NP untersucht werden. Genexpressionsstudien in Zelllinien sollten der indirekten Analyse des Transports und der intrazellulären Freisetzung der inkorporierten Plasmid-DNA in biologisch aktiver Form dienen. Gleichzeitig sollten diese Studien zur Evaluierung der Transfektionseffizienz der HSA-



basierenden NP genutzt werden, welche einen wichtigen Parameter für Gentransfersysteme darstellt. Ein kritischer Faktor der Gentransportsysteme für die Gen- und Zelltherapie ist zudem ihre Biokompatibilität. Diese sollte anhand von vergleichenden Analysen mit Standardtransfektionsmethoden ermittelt werden. Abschließend sollten erste Transfektionsstudien der HSA-NP mit Primär- und Stammzellen zur prinzipiellen Anwendbarkeit von HSA als Basis nicht-viraler Gentransfersysteme dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die in den nachfolgend beschriebenen Arbeiten benutzten Chemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad. Die verwendeten Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien waren vom Hersteller steril verpackt oder für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### 2.1.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage CP225D	Sartorius, Göppingen
Autoklav 5050EL	Tuttnauer, Breda (Niederlande)
Begasungsbrutschrank BBD6220 (Heraeus)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Durchflussszytometer „BD FACSCalibur™“	BD Biosciences, Heidelberg
Gefrierbehälter „Mr. Frosty™“	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach an der Riss
Konfokales Laserraster-Mikroskop TCS SP8 (CLSM)	Leica, Wetzlar
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach an der Riss
Laminar-flow Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Lichtquelle für IX 71 „X-Cite® 120PC Q“	Excelitas technologies, Waltham (USA)
Magnetrührer „IKAMAG RET-GS“	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührer, beheizbar „MR HEI-Standard“	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührerplatte „CIMAREC Multipoint“	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Mehrkanalpipette „Research pro“	Eppendorf, Hamburg
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Kl. 2	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Mikrobiologischer Brutschrank , BK4029	Ehret, Emmendingen
Mikroskop IX71	Olympus, Hamburg
pH-Meter Portamess®	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Pipettierhilfe „Pipettboy acu“	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Pipetten „Research“	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage PCB	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttelinkubator C24	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
TECAN infinite® F200	Tecan Group Ltd., Maennedorf (Schweiz)
Thermomixer „Compact 5350“	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80 °C) „Glacier“	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Tischzentrifuge	neoLab, Heidelberg
Ultraschallbad „Elmasonic S15“	Elma Schmidbauer, Singen
Vakuumabsaugvorrichtung „Vacuboy“	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Vakuumpumpe „Vacusafe“	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Vortexer „Top-Mix 11118“	Bioblock Scientific, Illkirch Cedex (Frankreich)
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzahlbestimmungsgerät „CASY-TT“	Innovatis, Reutlingen
Zentrifuge „Biofuge Pico/primo R/R“	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge „Centrifuge 5424 R“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 3.0 R“	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Zetasizer Nano ZS	Malvern, Herrenberg

Computer-Software	Hersteller
AnalySIS Pro 5.1. und CellP	Olympus-SIS, Hamburg
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg
i-control™	Tecan Group Ltd., Maennedorf (Schweiz)
Leica Application Suite X (LAS AF)	Leica Microsystem, Heidelberg
Zeiss ZEN 2009	Zeiss, Jena

### 2.1.1.2 (Verbrauchs-) Materialien

Material	Hersteller
CELLSTAR® Multiwell-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR® Pipetten	Eppendorf, Hamburg
CELLSTAR® Plastikpetrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR® Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CultureSlides, 4er + 8er	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalpipetten, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Glaswaren	Schott, Mainz
Handschuhe, Latex	VWR international, Darmstadt
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryo-Röhrchen „Cryo.S™“	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kultivierungskavitäten „µ-Slide“	Ibidi, Martinsried
Küvetten „UVette“	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American National Can. Co., Chicago (USA)
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, 15 ml + 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen, verschiedene Größen	B. Braun, Melsungen
Spritzenfilter, 0,2 µm	VWR international, Darmstadt
Vorratsbehälter, 150 ml + 250 ml	Corning Life Science, Wiesbaden

### 2.1.2 Chemikalien und Kits

Chemikalie/Kit	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Alpha-MEM	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacillo®	Bode Chemie, Hamburg
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	PAA, Marburg
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
BrdU-Reagenz (Cell Proliferation ELISA)	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA-Standard, 2 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
CASYton, CASYclean	Innovatis, Reutlingen
CellTracker™blue CMAC	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytofix/Cytoperm™ Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (DMEM/F-12)	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Eindeckelmedium „VECTASHIELD® Hard Set™“	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
FACS-Flow, -Clean, -Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fibronektin	Biochrom AG, Berlin
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FuGene® HD	Promega, Madison (USA)
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt

Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Humanes Serumalbumin (HSA), $\geq 96\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
HyClone Wasser in Molekularbiologie-Qualität	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB-Broth (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe
Lipofectamine®2000	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Luciferase Assay Kit	Promega, Madison (USA)
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mykoplasmen-Detektions-Kit	Lonza, Basel (Schweiz)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Hydroxysuccinimid-PEG <sub>5000</sub> -Maleinimid	Rapp Polymere GmbH, Tübingen
OptiMEM®	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Paraformaldehyd, 37 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS, pH 7,2	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Penizillin/Streptomycin	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
ProFection® Mammalian Transfection System	Promega, Madison (USA)
PromoFluor-488 Premium Labeling Kit	PromoCell GmbH, Heidelberg
PromoFluor-633 Premium Labeling Kit	PromoCell GmbH, Heidelberg
Tat-Peptid (HIV Tat 48-60 Cys)	Innovagen AB, Lund (Schweden)
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	LifeTechnologies, Carlsbad (USA)
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser zur Injektion ( <i>aqua iniectionis</i> )	Berlin-Chemie, Berlin
WST-1-Reagenz (Cell Proliferation Reagent)	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.1.3 Antikörper

### 2.1.3.1 Primärantikörper

#### Primärantikörper zur quantitativen Durchflusszytometrie

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Hersteller	Bestellnummer
CD29 (Integrin $\beta 1$ )	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555443
CD34	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555822
CD44	IgG2b, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	550989
CD45	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555483
CD49e (Integrin $\alpha 5$ )	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555617
CD51 (Integrin $\alpha V$ )	IgG2a, Maus	Phycoerythrin	BioLegend	327910
CD73	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	550257
CD90	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555596
CD105	IgG1, Maus	Phycoerythrin	Acris	SM1177R
CD106	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555647
CD133	IgG1, Maus	Phycoerythrin	Miltenyi-Biotec	130-080-801
CD140a (PDGFR $\alpha$ )	IgG2a, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	556002
CD140b (PDGFR $\beta$ )	IgG2a, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	558821
EGFR1	IgG2b, Maus	Phycoerythrin	Abcam	ab130738
FGFR2	IgG1, Maus	keine	Abcam	ab89476
HLA-ABC	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555553
HLA-DR	IgG1, Maus	Phycoerythrin	Abcam	ab34930
Isotypenkontrolle	IgG1, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555749
Isotypenkontrolle	IgG2a, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555574
Isotypenkontrolle	IgG2b, Maus	Phycoerythrin	BD Biosciences	555743
Isotypenkontrolle	IgG1, Maus	Fluorescein	BD Biosciences	555909
Isotypenkontrolle	IgG1, Maus	keine	Abcam	ab81032

### Primärantikörper zur qualitativen Immunzytochemie

Antigen	Isotyp, Wirt	Klonalität	Hersteller	Bestellnummer
anti-HSA	Maus	monoklonal	Abcam	ab136896
anti-Lamp1	Maus	monoklonal	Abcam	ab25630
anti-Tat	Kaninchen	polyklonal	Innovagen	PA-2120-100

#### 2.1.3.2 Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma LifeTechnologies (Carlsbad, USA) bezogen.

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Exzitation/Emission	Bestellnummer
Anti-Maus	Ziege	Alexa Fluor 350	346/442 (nm)	A21049
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 488	488/519 (nm)	A11034
Anti-Maus	Ziege	Alexa Fluor 488	488/519 (nm)	A11029
Anti-Maus	Ziege	Alexa Fluor 555	555/580 (nm)	A31622

#### 2.1.4 Verwendete Medien/Lösungen/Puffer

##### 2.1.4.1 Zellkulturmedien

Kultivierungsmedium für	Basalmedium (Gibco® #)	FKS	Sonstige Zusätze
BJ-Fibroblasten	DMEM (#21855)	10 %	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/ml)
HEK293T	DMEM (#41966)	10 %	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/ml)
hMSC	Alpha-MEM (#32561)	15 %	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/ml)
MrC-5	DMEM/F-12 (#11039)	5 %	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/ml)

##### 2.1.4.2 Lösungen

<b>Block-Lösung</b>	BSA	1 %
	FKS	10 %
	Glycin	0,3 M
<b>Einfriermedium (Zellen)</b>	Basalmedium	90 %
	DMSO	10 %
<b>FACS-Fix</b>	Paraformaldehyd	1 %
	Natriumchlorid in PBS (pH 7,2)	0,85 %
<b>FACS-Stopp-Lösung</b>	FKS in PBS (pH 7,2)	10 %
<b>LB-Agarplatten</b>	LB-Broth	25 %
	Agar	1,5 %
	in dH <sub>2</sub> O (pH 7,4)	
<b>LB-Medium</b>	LB-Broth in dH <sub>2</sub> O (pH7,4)	2,5 %
<b>Perm-Block-Lösung</b>	BSA	1 %
	Tween20	0,02 %
	In PBS (pH 7,2)	

<b>Phosphatpuffer</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Dihydrat	1,28 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Dihydrat in dH <sub>2</sub> O (pH 8,0)	20 mM
<b>Trypanblau-Stocklösung</b>	Trypanblau in PBS (pH 7,2)	1 g/l

## 2.1.5 Plasmide

### 2.1.5.1 peGFP-N1

Das Plasmid peGFP-N1 (Clontech, nicht mehr erhältlich) ist 4,7 kb groß und codiert für das Reportergen *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), dessen Expression von einem CMV-Promotor reguliert wird. Zusätzlich codiert das Plasmid ein Gen zur Neomycin- bzw. Kanamycin-Resistenz, welches zur Selektionierung genutzt werden kann.

### 2.1.5.2 pCMV-Luc

Das Plasmid pCMV-Luc wurde zur Verfügung gestellt von Ralf Kuhn (Addgene-Plasmid # 45968). Es basiert auf dem Plasmid pGL3 basic (#E1751, Promega, Madison, USA), welches für die *firefly* (*Photinus pyralis*)-Luciferase codiert, jedoch zusätzlich mit einem CMV-Promotor in *cis*-Orientierung des Reportergens. Das Plasmid ist 5,6 kb groß und zur Selektionierung des Plasmides ist ein Ampicillin-Resistenzgen codiert.

## 2.1.6 Zelllinien und Bakterien

### 2.1.6.1 BJ-Fibroblasten

Die BJ-Fibroblasten (#08-0027, Stemgent, Cambridge, USA) wurden aus humaner normaler neonataler Vorhaut isoliert. Die Zellen zeigen im Vergleich zu anderen humanen Fibroblasten eine erhöhte Populationsverdopplungsrate (bis zu 72 Populationsverdopplungen). Sie waren eine der ersten Zelltypen, die erfolgreich in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) reprogrammiert wurden und werden daher oft als Kontrollzellen in Reprogrammierungs-Studien mitgeführt.

### 2.1.6.2 HEK293T-Zellen

Die Zelllinie HEK293 wurde mittels Transformation von humanen Nieren-Epithelzellen mit dem humanen Adenovirus Typ 5 generiert [150]. Die Variante HEK293T enthält zusätzlich das große T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40). Die Zellen haben eine Generationszeit von circa 20 Stunden und einen hypotriploiden Karyotyp. Die hier verwendeten HEK293T-Zellen wurden uns von Dr. Grez aus dem Georg-Speyer-Haus in Frankfurt zur Verfügung gestellt.

### 2.1.6.3 MrC-5-Zellen

MrC-5-Fibroblasten (#300395, cell lines service, Eppelheim) wurden aus humanen normalen Lungenfibroblasten eines 14-Wochen alten männlichen, kaukasischen Fötus isoliert [151]. Der

diploide Karyotyp der Zellen ist 46, XY. Die Zellen erreichen 42-46 Populationsverdopplungen, bevor sie seneszent werden.

#### 2.1.6.4 *E. coli*-Bakterien

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden die Bakterien „One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (#C4040-03, LifeTechnologies, Carlsbad, USA) mit dem Genotyp F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* verwendet.*

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen kultiviert, um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Viren zu vermeiden. In regelmäßigen Intervallen wurden alle Zellen bezüglich einer Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zell-basierten Experimente wurden mit der Zelllinie HEK293T, BJ-Fibroblasten, MrC-5-Fibroblasten oder humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Die HEK293T-Zellen wurden ab einer Konfluenz von circa 90 % passagiert, BJ-Fibroblasten, MrC-5-Zellen und hMSC ab einer Konfluenz von 70-80 %. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,05 %) für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes Abklopfen konnten die Zellen in frischem Kultivierungsmedium aufgenommen werden, welches die Trypsinaktivität inhibiert. Mittels Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) wurden die Zellen pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl und Viabilität der Zellen wurde mit dem CASY-TT bestimmt. Die Zellen wurden in entsprechender Zellzahl pro cm<sup>2</sup> Kultivierungsfläche ausgesät. Alle 2-3 Tage wurde das Kultivierungsmedium (siehe 2.1.4.1) gewechselt.

#### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden diese bei -170 °C in der flüssigen Phase des Stickstoffs in einem Kryotank gehalten. Dazu wurden die Zellen in kaltes Kryomedium (90 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in dem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter „Mr. Frosty™“ kontinuierlich um 1 °C pro Minute in einem -80 °C-Schrank abgekühlt und nach 24 h in die flüssige Phase des Stickstoffs überführt.

Zur Kultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese möglichst schnell aufgetaut. Dazu wurde das Kryoröhrchen mit den Zellen kurz in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen direkt in Kultivierungsmedium aufgenommen und

abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), um das DMSO-haltige Kryomedium zu entfernen. Die pelletierten Zellen wurden in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

#### 2.2.1.3 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von Oberschenkelköpfen isoliert. Die verwendeten Oberschenkelköpfe wurden Patienten bei einer Hüftoperation entfernt und uns von Dr. M. Maue und Dr. M. Hassinger des evangelischen Krankenhauses Zweibrücken zur Verfügung gestellt.

Aus den Oberschenkelhalsköpfen wurde das Knochenmark und trabekuläre Knochengewebe herausgeschabt, mit einer Schere zerkleinert und dreimal in Alpha-MEM gewaschen. Die isolierten Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mittels Zellsieb (70 µm) gefiltert und anschließend auf Ficoll-Paque PLUS pipettiert. Mittels Zentrifugation (350 g, 30 min, RT) reichern sich die mesenchymalen Stammzellen in der weißen Interphase des Ficoll-Gradienten an. Diese Phase wurde entnommen, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (450 g, 5 min, RT). Die pelletierten Zellen wurden in Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine Kultivierungsflasche überführt. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium gewechselt, wodurch nicht-adhärenente Zellen entfernt wurden. Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen passagiert und mit 1000-2000 Zellen/cm<sup>2</sup> weiter kultiviert. Das adipogene und osteogene Differenzierungspotential der isolierten mesenchymalen Stammzellen wurde mittels Oil-Red-O-Färbung bzw. von Kossa-Färbung untersucht (durchgeführt von Andrea Hecker). Zudem wurden die isolierten Zellen an Hand der Expression der Oberflächenrezeptoren CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 und HLA-ABC sowie dem Fehlen der Rezeptoren CD34, CD45, CD133 und HLA-DR immunzytochemisch im Durchflusszytometer charakterisiert. Die isolierten und charakterisierten hMSC wurden nach zwei bzw. drei Passagen eingefroren und bis zur Verwendung bei -170 °C in einem Kryotank gelagert.

#### 2.2.1.4 Analyse des Oberflächenexpressionsprofils der Zellen

Die Expression unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (Methode 2.2.3.1). Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert und 2,5-5,0 x10<sup>5</sup> Zellen pro Ansatz mit 0,5-1 µg Primärantikörper für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Der ungebundene Primärantikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 0,5 µg Fluoreszenz-gebundenem Sekundärantikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden erneut gewaschen und anschließend in 250 µl FACS-FIX für 30-60 Minuten bei 4 °C fixiert. In jeder Probe wurden 10.000 Zellen im Fluoreszenzkanal FL-1 (488/530/30 nm) bzw. FL-2 (488/585/42 nm) durchflusszytometrisch gemessen. Die Rohdaten wurden mit der Software CellQuest Pro ausgewertet. Dabei wurden Zellen, die mit der Isotypenkontrolle



gefärbt wurden, als Hintergrund gesetzt und nur Signale oberhalb dieser Population als positive Ereignisse gewertet (Abb. 9).

## 2.2.2 Molekularbiologische Techniken

### 2.2.2.1 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*) mit 0,1 µg Plasmid-DNA gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45-sekündigem Hitzeschock bei 42 °C wurde der Ansatz für 2 Minute auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf vorgewärmte Selektionsplatten (LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden zur Anzucht von Flüssigkulturen genutzt. Dazu wurde Selektionsmedium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) mit einer gewachsenen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Langzeitlagerung der generierten *E. coli*-Stämme wurden Kryostocks (80 % Flüssigkultur, 20 % Glycerin) angelegt, die bei -80 °C gelagert wurden.

### 2.2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA wurden 10 ml bzw. 50 ml Selektionsmedium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) mit dem *E. coli*-Stamm, der mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert wurde, angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden anschließend 500 ml bzw. 2,5 l Selektionsmedium angeimpft und über Nacht weiter inkubiert.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien der Übernachtskultur erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurde die Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse der Bakterien an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, von der sie anschließend mittels Hochsalzpuffer eluiert wurde. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Isopropanol-Präzipitation und Ethanol-fällung aufgereinigt und entsalzt.

Letztlich wurde sie in TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen und die Konzentration und Reinheit (Verhältnis der Absorption von 260/280 nm und 260/230 nm) mittels Photometer bestimmt. Eine qualitative Analyse der Plasmid-DNA wurde mittels Agaroseelektrophorese durchgeführt.

### 2.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Komplexbildung von Proteinen mit Brilliant Blue G, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von der Wellenlänge

465 nm auf 595 nm verschiebt. Die gemessene Absorption bei 595 nm ist proportional zu der Menge an Protein, welches sich in der Lösung befindet.

Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden unterschiedliche Verdünnungen angesetzt und in Dreifachbestimmung 5 µl in eine Kavität einer 96-Lochplatte vorgelegt. Zu der Probe wurden 250 µl des Bradford-Reagenz pipettiert und nach 15-minütiger Inkubationszeit die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichgerade ermittelt (BSA-Standard mit Konzentrationen: 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml und 1,4 mg/ml).

### 2.2.3 Herstellung und Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln

Die in dieser Arbeit beschriebenen Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten Nanopartikel wurden von Jennifer Look unter Betreuung von Prof. Dr. Langer am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Münster hergestellt, mit Liganden modifiziert und physikochemisch charakterisiert – mit Ausnahme der Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikel (GA-qv-NP), die zur Etablierung des Trypanblau-Quenchens verwendet wurden. Die Herstellung und Charakterisierung dieser GA-qv-NP sowie die Herstellung, Modifizierung und Charakterisierung der Disulfidbrücken-stabilisierten Nanopartikel wurde am IBMT durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Herstellung DNA-beladener HSA-Nanopartikel

##### Glutaraldehyd-quervernetzte Nanopartikel

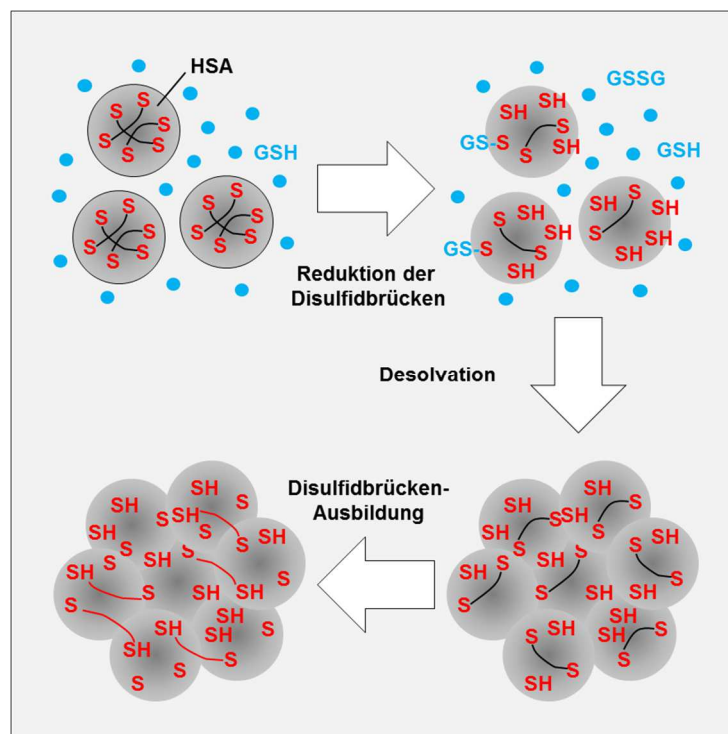
Die Synthese von unmodifizierten HSA-Nanopartikel erfolgte gemäß einer bekannten Desolvationstechnik [132, 133]. Hierzu wurde humanes Serumalbumin (HSA) in destilliertem Wasser zu 40 mg/ml gelöst und der pH-Wert auf 6 eingestellt. Die Lösung wurde mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) steril filtriert. In die HSA-Lösung wurde unter ständigem Rühren auf einer Magnetrührplatte 100-200 µg Plasmid-DNA pipettiert und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden der Lösung tropfenweise 2,7 ml Ethanol zugesetzt. Dies führte zur Entstehung von unstabilen Kolloiden. Durch Zugabe von Glutaraldehyd (8%) wurden die unstabilen Kolloide quervernetzt. Anhand unterschiedlicher Mengen an Glutaraldehyd wurden Quervernetzungsgrade von 20-100 % eingestellt. Dabei sind pro HSA-Molekül 59 Lysin-Moleküle und eine endständige Aminogruppe zu beachten. Zudem kann ein Glutaraldehydmolekül mit zwei Aminogruppen reagieren. Damit ergibt sich z. B. eine 100 % Quervernetzung aus 30 mol Glutaraldehyd/mol HSA. Die Suspension wurde über Nacht unter Rühren inkubiert. Zur Aufreinigung wurden die Nanopartikel zweimal bei 14.000 g für 8 min pelletiert und in destilliertem Wasser redispergiert.

### Hitze-quervernetzte Nanopartikel

Die Herstellung und Aufreinigung Hitze-quervernetzter Nanopartikel ist identisch mit Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikel. Anstatt der Zugabe von Glutaraldehyd, werden die H-qv-NP durch 10-minütige Erhitzung auf 70 °C stabilisiert. Die Temperatur wurde dabei mit einem Infrarot-Thermometer kontrolliert.

### Disulfidbrücken-stabilisierte Nanopartikel

Im Laufe der Arbeit wurden DNA-beladene Disulfidbrücken-stabilisierte Nanopartikel (D-qv-NP) als alternative Stabilisierungsmethode für HSA-NP etabliert und hergestellt. Das Prinzip beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die Disulfidbrücken der HSA-Moleküle mittels Glutathion (GSH) gespalten werden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Prinzip der Herstellung Disulfidbrücken-stablierter HSA-NP.** Zuerst werden die Disulfidbrücken der HSA-Moleküle mittels Glutathion (GSH) gespalten. Mit diesen werden Nanopartikel mittels Desolvationstechnik hergestellt. Die Nanopartikel werden durch die Ausbildung neuer Disulfidbrücken innerhalb der Nanopartikel stabilisiert. Modifiziert nach Wang *et al.* [138].

Erst nach der Nanopartikelpräzipitation wird das GSH wieder entzogen, wodurch Disulfidbrücken zwischen den HSA-Molekülen eines Nanopartikels ausgebildet werden.

Wang *et al.* etablierten die Herstellung von Curcumin-beladenen Disulfidbrücken-stabilisierten HSA-NP (D-qv-NP) mittels GSH [138]. Dieses Protokoll diente als Grundlage der Etablierung Plasmid-beladener D-qv-NP. Zur deren Herstellung wurden 40mg/ml HSA in *aqua inieci* gelöst und mit 100-200 µg Plasmid-DNA für 15 min unter Rühren inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit gleichem Volumen an 100 mM GSH für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die

Nanopartikel wurden durch Zugabe von 3 ml Ethanol präzipitiert. Das GSH wurde mittels 24-stündiger Dialyse entzogen. Die D-qv-NP wurden bei 4 °C gelagert.

#### PromoFluor633-markierte Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzte Nanopartikel

Glutaraldehyd- bzw. Hitze-quervernetzte Nanopartikel wurden mittels PromoFluor Labeling-Kit markiert. Dafür wurde das HSA markiert, aufgereinigt und anschließend zur Herstellung GA- oder H-qv-NP im Verhältnis 1:5 (PF633-markiertes HSA:unmarkiertes HSA) eingesetzt [152]. Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-NP (D-qv-NP) wurden nach deren Herstellung mit PromoFluor488 bzw. PromoFluor633 (PromoFluor-488 bzw. 633 Premium Labeling Kit) markiert. Dafür wurden die Nanopartikel nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die markierten D-qv-NP wurden bei 20.000 g für 20 min aufgereinigt und mit dH<sub>2</sub>O redispergiert.

#### 2.2.3.2 Peptid-Modifizierung der HSA-Nanopartikel

Die Peptid-Liganden wurden über heterobifunktionale PEG<sub>5000</sub>-Linker kovalent an die HSA-NP gebunden. Dazu wurden die HSA-NP in Phosphatpuffer (pH 8,0) aufgenommen und mit dem 11-fachen molaren Überschuss an N-Hydroxysuccimid-PEG<sub>5000</sub>-Maleinimid (0,88 mg/mg HSA) für 1 h bei 20 °C und 600 rpm mittels Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Nanopartikel zweimal bei 10.000 g für 8 min abzentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen und die pelletierten HSA-NP nach dem ersten Zentrifugationsschritt in destilliertem Wasser und nach dem zweiten in Phosphatpuffer (pH 8,0) redispergiert. Das Tat-Peptid (NH<sub>2</sub>-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-Cys-CONH<sub>2</sub>) mit endständigem Cystein konnte direkt zur Bindung an die Maleinimid-Gruppe des PEG<sub>5000</sub>-Linker genutzt werden. Dafür wurden 3,5 µg Tat-Peptid/mg HSA (Stock 0,8 mg/ml in destilliertem Wasser) zu der Nanopartikelsuspension gegeben und für 1 h bei 20 °C und 600 rpm mittels Thermomixer inkubiert. Die modifizierten HSA-NP wurden bei 10.000 g für 8 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten HSA-NP in destilliertem Wasser redispergiert.

Zur Kontrolle wurden PEGylierte (GA- und H-qv-) HSA-NP hergestellt. Hierzu wurden die HSA-NP mit einem 11-fachen molaren Überschuss an Methoxy-PEG<sub>5000</sub>-Succinimidyl-Hexanoat für 1 h bei 20 °C und 600 rpm mittels Thermomixer inkubiert und zweifach aufgereinigt.

Die Modifizierung der HSA-NP mit dem RGD-Peptid (cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Ac-SCH<sub>2</sub>CO)]) wurde nach dem obigen Protokoll durchgeführt. Als einzige Änderung mussten die RGD- bzw. RAD-Peptide vor der Verwendung für 10 s in einer Deacetylierungslösung (0,5 M Hydroxylamin-HCl, 25 mM EDTA in PBS, pH 7,2-7,5) inkubiert werden, da diese eine Schutzgruppe trugen. Die HSA-NP wurden anschließend mit einem äquimolaren Verhältnis deacetylierter RGD- bzw. RAD-Peptide über Nacht bei 20 °C und 600 rpm im Thermomixer inkubiert (11,08 µg RGD oder 11,29 µg RAD pro mg HSA-NP) und nach der Aufreinigung in destilliertem Wasser aufgenommen.

### 2.2.3.3 Beschichtung der HSA-NP mit Polyethylenamin

Zur Herstellung Polyethylenamin (PEI)-beschichteter HSA-NP wurden in einem ersten Schritt unmodifizierte bzw. Tat-modifizierte HSA-NP hergestellt. Die Beschichtung wurde nach dem Protokoll von Abbasi *et al.* durchgeführt [153]. Dazu wurden pro Ansatz (24-Lochplatten-Format) 100 µg HSA-NP (oder alternativ 0,5 µg Plasmid-DNA) in 500 µl Kultivierungsmedium verdünnt, mit 3 µg PEI (25 kDa, verzweigt; PEI-Stocklösung: 10 mg/ml in dH<sub>2</sub>O) gemischt und für 2-3 min gevortext. Die PEI-beschichteten HSA-NP wurden direkt zur Inkubation von Zellen eingesetzt.

### 2.2.3.4 Physikochemische Charakterisierung der HSA-Nanopartikel

#### Bestimmung des Durchmessers und Zetapotenzial von nanopartikulären Formulierungen

Alle hergestellten HSA-NP wurden physikochemisch charakterisiert bevor sie in den Zellbasierten Experimenten verwendet wurden. Die Messungen des Nanopartikel-Durchmessers und der Polydispersitätsindex (PDI) wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (Zetasizer Nano ZS) durchgeführt. Die Photonenkorrelationsspektroskopie, auch als dynamische Lichtstreuung bekannt, ist ein optisches Messverfahren zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers kolloidaler Partikel [154]. Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung, der Wärmebewegung der untersuchten Partikel in Flüssigkeiten (Tyndall-Effekt). Die Messungen wurden bei RT und einem Winkel von 173° durchgeführt. Die Nanopartikel wurden dafür in destilliertem Wasser verdünnt (1:400). Proben mit einem PDI  $\geq 0,1$  wurden nicht verwendet, da bei diesen nicht mehr von einer monomodalen Verteilung ausgegangen werden kann.

Die Messung der Oberflächenladung (Zetapotenzial) ist eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Stabilität einer Suspension, bestehend aus elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln. Dabei wird das elektrische Potenzial an der Grenzfläche einer festen und einer flüssigen Phase analysiert (in erster Näherung an eine Helmholtz-Doppelschicht). Zur Bestimmung des Zetapotenzials wurde die Probe in eine Kapillarküvette überführt und bei RT und 140 V mittels Laser-Doppler-Mikroelektrophorese (Zetasizer Nano ZS) gemessen.

#### Degradierung der Disulfidbrücken mittels Glutathion

Zur Analyse der Degradierung Disulfid-stabilsierter HSA-NP in Gegenwart von reduzierenden Reagenzien wurde die Trübung der Nanopartikelsuspension gemessen. Nach der DIN EN 27027 wird die Trübung einer Flüssigkeit als die Verringerung derer Durchsichtigkeit angesehen und durch die Gegenwart ungelöster Substanzen verursacht [155]. In der Nanopartikelsuspension führen die Partikel zur Trübung und dementsprechend zeigt sich eine Degradierung der Nanopartikel in einer reduzierten Trübung.

Die D-qv-NP (5 mg) wurden in Glutathionlösung (0,1 M in dH<sub>2</sub>O) aufgenommen und bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach 1 h, 2 h und 3 h wurden jeweils 100 µl Proben

entnommen und im Photometer bei der Wellenlänge 690 nm gemessen. Die Wellenlänge wurde so gewählt, dass sie außerhalb des Bereiches liegt, in der die HSA-NP Licht absorbieren können. Zur Kontrolle wurden D-qv-NP in Wasser inkubiert (Negativkontrolle) und parallel 100 % Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-Nanopartikel mitgeführt. Nach Abzug der Absorptionswerte des destillierten Wassers wurden die Messergebnisse für die jeweiligen Proben als statistische Mittelwerte bestimmt. Die Reduktion der Trübung der Proben wird als relativer Wert im Verhältnis zum Zeitpunkt 0 h (100 %) angegeben.

#### Isolierung inkorporierter Plasmid-DNA aus HSA-Nanopartikeln

Zur Überprüfung der Funktionalität der in HSA-NP inkorporierten Plasmid-DNA wurde diese mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit aus den Nanopartikeln isoliert. Dazu wurden 1 mg der Nanopartikel mit PBS auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht und für 5-15 min mit 20-60 µl Proteinase K inkubiert. Je höher der Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrad war, desto länger bzw. mit mehr Proteinase K mussten die Nanopartikel zur Degradierung inkubiert werden. Die Degradierung wurde anhand einer reduzierten Trübung der Nanopartikelsuspension sichtbar. Die aufgeklärte Lösung wurde nach Anleitung des Herstellers weiter behandelt und über Anionen-Austausch-Säulen aufgereinigt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in destilliertes Wasser aufgenommen und die Reinheit (260/280 nm; 260/230 nm) photo-metrisch bestimmt. Zur Analyse der Funktionalität, wurden HEK293T-Zellen mittels FuGene® HD (Methode 2.2.4.2) mit der isolierten Plasmid-DNA transfiziert.

#### 2.2.3.5 Zytotoxizitätsanalyse der HSA-Nanopartikel

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der HSA-NP sowie Standardtransfektionsmethoden (Calciumphosphat, FuGene® HD und Lipofectamine®2000) wurde die Stoffwechselaktivität mit dem Tetrazoliumsalz WST-1 bestimmt. Als Maß für die Zellproliferation wurde der Einbau des Basenanalogs 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) untersucht. Die Durchführung der Zytotoxizitäts-Analysen verlief nach DIN EN ISO 10993-5:2009 [156]. Dazu wurden 24 h vor der Behandlung MrC-5-Fibroblasten mit  $4,5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät. In den Negativkontrollen wurde das Kultivierungsmedium gewechselt. Die NP-Proben wurden mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  DS-NP, Tat-modifizierten H-qv-NP, Tat-modifizierten 20% GA-qv-NP oder RGD-modifizierten GA-qv-NP inkubiert. Alternativ wurden die Zellen mit den Standardtransfektionsmethoden behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit äquivalenten Mengen Plasmid-DNA oder Lösemittel (Wasser) inkubiert wurden. Nach 24-stündiger Behandlung wurden die Proben nach Protokoll des Herstellers mit WST-1- bzw. BrdU-Reagenz inkubiert. Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes (WST-1) wurde alle 30 min für maximal 4 h mittels eines Photometers (TECAN infinite® F200; Absorption bei 450 nm; Referenz: 690 nm) gemessen. Der Einbau des BrdU wurde ebenfalls im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) analysiert. Nach Abzug der

Leerwerte wurden die Messergebnisse für die jeweiligen Proben als statistische Mittelwerte bestimmt. Der Einfluss der Proben wird als relativer Wert im Verhältnis zur negativen Referenz (100 %) angegeben.

#### 2.2.4 Funktionale Analyse der HSA-Nanopartikel

Zur Analyse der Interaktion oder Genexpression mittels Durchflusszytometrie wurden  $7,5 \times 10^5$  HEK293T,  $1,5 \times 10^5$  BJ-Fibroblasten oder  $1,0 \times 10^5$  hMSC in 24-Lochplatten ausgesät. Für Analysen mittels konfokalen Laserraster-Mikroskops (CLSM) wurden die Zellen auf CultureSlides ausgesät. Diese wurden zuvor für eine Stunde mit Fibronektion ( $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichtet, um ein verbessertes Anwachsen der Zellen zu gewährleisten.

Nach 24 h wurde das Kultivierungsmedium der Zellen gewechselt. Die Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikel (GA-qv-NP) und Hitze-quervernetzten Nanopartikel (H-qv-NP) wurden nach der Herstellung lyophilisiert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Direkt vor der Inkubation wurden sie mit *aqua iniec.* zu  $10 \text{ mg}/\text{ml}$  redispergiert und stichprobenartig Größe und Zetapotenzial der Nanopartikel kontrolliert. Die Disulfidbrücken-stabilisierten Nanopartikel (D-qv-NP) wurden direkt nach der Herstellung eingesetzt.

##### 2.2.4.1 In-vitro-Charakterisierung der HSA-Nanopartikel

###### Durchflusszytometrische Analyse

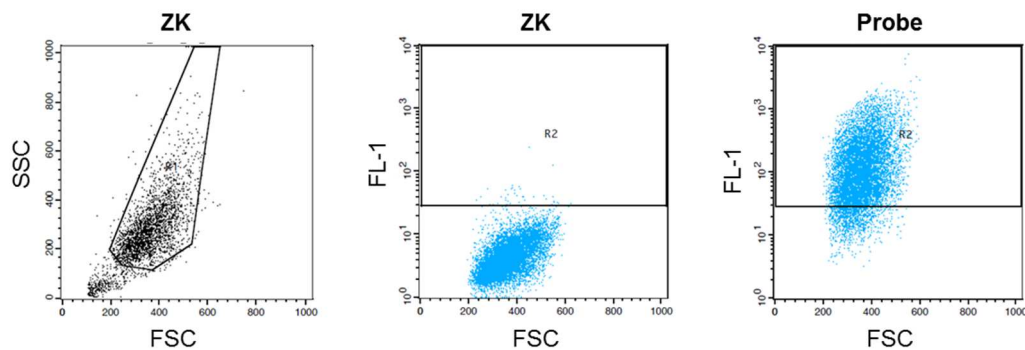
Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen bezüglich verschiedener Charakteristika oder gebundener Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren. Verschiedene Zellpopulationen können anhand ihrer Zellgröße und -granularität unterschieden werden. Fluoreszenzfarbstoffe werden mit einem Laser angeregt und das emittierte Licht auf Detektoren gelenkt. Die Detektion dieses Fluoreszenzlichts wird in Bezug auf die Kontrolle als ein quantitatives Signal gemessen.

Die Interaktion Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP (GA-qv-NP) mit Zellen wurde anhand der grünen Autofluoreszenz dieser Nanopartikel fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Filter Olympus FITC 467-498/513-556; IX71) und anschließend für die durchflusszytometrische Quantifizierung vorbereitet. Die H- und D-qv-NP wurden zur durchflusszytometrischen Analyse mit PromoFluor488 bzw. PromoFluor633 markiert (Methode 2.2.2.5).

Zur Analyse mittels Durchflusszytometer wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 3 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FACS-Stopp-Lösung aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.500 rpm und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in FACS-FIX resuspendiert und für mindestens 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert, bevor die Proben im Durchflusszytometer gemessen wurden. In jeder Probe wurden 10.000 Zellen im Fluoreszenzkanal FL-1 (488/530/30 nm) bzw. FL-4 (633/661/61 nm) analysiert. Die Rohdaten wurden mit der Software CellQuest Pro ausgewertet. Dabei wurden unbehandelte Zellen als

Hintergrund gesetzt und nur Signale oberhalb dieser Negativ-Population als positive Ereignisse gewertet (Abb. 9).

**A**



**B**

	Region	% Gated	MFI
<b>ZK</b>	R1	100,00	4,34
	R2	0,40	41,19
<b>Probe</b>	R1	100,00	100,57
	R2	88,46	126,48

**Abbildung 9: Darstellung einer beispielhaften Auswertung durchflusszytometrischer Messungen.** (A) Die Population (R1) wird durch die Messung der Größe (FSC) und Granularität (SSC) unbehandelter Zellen (ZK) bestimmt. Diese werden zudem als Hintergrund für Fluoreszenzsignale gesetzt (hier: Fluoreszenzkanal FL-1). Wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt, wird die äquivalente Isotypenkontrolle als Hintergrund gesetzt. Bei Messung behandelter Zellen (Probe) werden nur Ereignisse oberhalb des gesetzten Hintergrunds (R2) als positiv gewertet. (B) Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen unterteilt in die Regionen R1 und R2 sowie die prozentuale Anzahl gemessener Zellen in diesen Regionen (% Gated). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel bzw. Zelle. Die Zellen der hier gezeigten Probe waren zu 88,46 % positiv im Fluoreszenzkanal FL-1 und hatten eine MFI von 126,48.

### Konfokale Laserraster-Mikroskopie

Zur detaillierteren Analyse der Interaktion der HSA-NP mit Zellen wurden diese mittels konfokaler Laserraster-Mikroskopie (CLSM) analysiert. Die zu analysierende Probe wird dafür von einem Dauerstrichlaser punktwise abgerastert. Der Laser gleitet mittels beweglicher Spiegel über das Präparat und ist in der Fokusebene maximal fokussiert. Die im Fokus befindlichen Fluoreszenzmoleküle emittieren Photonen, die über dasselbe Objektiv eingefangen werden, bevor sie nach einem Strahlteiler und fokussierenden Linsen auf einen Detektor treffen. Um sicher zu stellen, dass nur Signale der Fokusebene detektiert werden, wird eine angepasste Lochblende dem Detektor vorausgesetzt. Das hier verwendete CLSM ist mit einer Laserdiode (405 nm) und einem Weißlichtlaser ausgestattet. Der Weißlichtlaser lässt sich auf die exakte Anregungswellenlänge der Fluorophore einstellen. Kam es zur Überlappung der Emissionsbereiche verschiedener Fluorophore, wurden diese sequentiell detektiert. Die verwendeten Parameter zum Detektieren der Fluorophore sind in Tabelle 3 dargestellt.



**Tabelle 3:** Verwendete Fluorophore und deren Anregungswellenlänge und Detektionsbereich zur konfokalen Laserraster-Mikroskopie.

Fluorophor	Anregung (nm)	Detektion (nm)
CellTracker™blue	405	412-459
Alexa Fluor 350	405	412-459
Alexa Fluor 488	490	497-549
Alexa Fluor 555	560	580-648
HSA-Autofluoreszenz	488/635	503-579/665-769

Zur Analyse der Zellen mittels CLSM wurde nach 48- bzw. 72-stündiger NP-Inkubation das Zytoplasma der Zellen nach Hersteller-Protokoll mit CellTracker™blue gefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit Paraformaldehyd (1 %; 3 min) fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, die Kammer der CultureSlides entfernt und der Objektträger unter der Sterilbank für maximal 1 h im Dunkeln trocknen gelassen. Die Proben wurden mit VECTASHIELD® HardSet™-Mounting-Medium ( $\pm$  DAPI) eingedeckelt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Nach 24 h wurden die Objektträger mit Nagellack versiegelt und mittels CLSM analysiert.

#### Immunzytochemische Färbung

Zur Ko-Lokalisierung der HSA-Nanopartikel mit den Lysosomen, wurden die Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Nanopartikel-Inkubation mit dem spezifisch gegen das Lysosomal Assoziierte Membranprotein-1 (LAMP-1) gerichteten monoklonalen Antikörper gefärbt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und für 1 h mit der Perm-/Blocklösung (1% BSA, 0,02% Tween20 in PBS) inkubiert. Der anti-LAMP-1-Antikörper (0,1 mg/ml) wurde 1:200 in Perm-/Blocklösung verdünnt und für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde der Sekundär-Antikörper Anti-Mouse Alexa Fluor 488 1:400 in Perm-/Blocklösung verdünnt und für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, die Kammer der CultureSlides entfernt und der Objektträger unter der Sterilbank für maximal 1 h im Dunkeln getrocknet. Die Proben wurden mit VECTASHIELD® HardSet™-Mounting-Medium ( $\pm$  DAPI) eingedeckelt und über Nacht bei 4 °C trocknen gelassen. Nach 24 h wurden die Objektträger mit Nagellack versiegelt und mittels CLSM analysiert.

#### 2.2.4.2 Analyse der Genexpression

Zur Analyse der Genexpressionsrate wurden die HSA-NP in unterschiedlichen Medien mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden entweder mit Kultivierungsmedium bzw. OptiMEM® mit oder ohne Chloroquin-Zusatz (0,1 mM für HEK293T-Zellen, 25  $\mu$ M für BJ-Fibroblasten und hMSC) inkubiert. Nach 24 h wurde das Inkubationsmedium durch Kultivierungsmedium ersetzt und die Zellen für 48 h weiter kultiviert. Die Transfektionseffizienz der HSA-NP, die das peGFP-N1-Plasmid inkorporiert hatten, wurde anhand der Expression des Reportergens

*enhanced* grün fluoreszierendes Protein (eGFP) fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Filter 488/520). Eine Differenzierung der eGFP-Expression von der Autofluoreszenz der Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP ist durch die zusätzliche Analyse des roten Fluoreszenzkanals möglich. Während die Emission des eGFP auf den grünen Fluoreszenzbereich beschränkt ist, hat die Autofluoreszenz der GA-qv-NP auch Emissionsmaxima im orangenen und roten Bereich. Zudem ist die eGFP-Expression gleichmäßig über alle Kompartimente der Zelle verteilt, während die HSA-NP stets vesikulär im Zytoplasma angeordnet waren.

Die prozentuale Anzahl der Zellen, die das Reporter-gen eGFP exprimieren, wurde mittels Durchflusszytometer quantifiziert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 3 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FACS-Stopp-Lösung aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in FACS-FIX resuspendiert und für mindestens 30 min bei 4 °C inkubiert, bevor die Proben im Durchflusszytometer analysiert wurden. In jeder Probe wurden 10.000 Zellen im Fluoreszenzkanal FL-1 (488/520 nm) vermessen. Die Rohdaten wurden mit der Software CellQuest Pro ausgewertet. Es wurde nur die Genexpressionsrate der Hitze- oder Disulfidbrücken-quervernetzten HSA-NP mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mittels Durchflusszytometrie war keine Differenzierung der eGFP-Expression von der Autofluoreszenz der Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP möglich.

Die Genexpressionsrate der Zellen, die mit dem Plasmid pCMV-Luc transfiziert wurden, wurde mittels Luciferase Assay quantifiziert. Das Plasmid pCMV-Luc codiert für die *firefly* Luciferase, welche mit Magnesium als Co-Substrat Luciferin zu dem biolumineszenten Oxyluciferin umsetzt. Zudem entsteht linear zur Oxidation des Luciferins ein Lichtblitz, welcher mittels Luminometer gemessen werden kann.

Zur Analyse der Luciferaseaktivität wurde das Kit Luciferase Assay von Promega nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen nach 72-stündiger Inkubationszeit mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Lysepuffer (1x) für 15 min inkubiert. Das Zelllysate wurde resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. In eine 96-Lochplatte wurden 10 µl Zelllysate vorgelegt (restliche Probe bei -20 °C gelagert). Nach Zugabe von 50 µl Luciferase Assay Reagenz wurde sofort die Lumineszenz der Proben im Luminometer (TECAN infinite® F200) gemessen. Nach Abzug der Negativkontrollen wurden die Messergebnisse für die jeweiligen Proben als statistische Mittelwerte bestimmt.

#### 2.2.4.3 Modulatoren der Genexpressionsrate

##### Testung verschiedener Inkubationsmedien zur Erhöhung der Genexpressionsrate

Der Einfluss verschiedener Modulatoren auf den HSA-NP-vermittelten Gentransport wurde mittels Transfektionsstudien ermittelt. Die Zellen wurden mit 50 µg/cm<sup>2</sup> der HSA-NP in 0,5 ml

des jeweiligen Transfektionsmedium (Tabellen 4 und 5) inkubiert. Nach 24 h wurde dieses durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt und die Zellen für 48 h weiter kultiviert. Die Genexpressionsrate wurde, wie unter 2.2.4.2 beschrieben, qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert bzw. mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

**Tabelle 4:** Medien zur Studie des Einflusses von fötalem Kälberserum auf die Transfektionseffizienz der HSA-NP

Medium	Zusatz	Sonstiges
OptiMEM®	FKS (10 %)	
OptiMEM®	BSA (5 mg/ml)	
OptiMEM®	HSA (5 mg/ml)	
DMEM	Keine	„Basalmedium“
DMEM	FKS (10 %)	„Kultivierungsmedium“

**Tabelle 5:** Medien zur Studie des Einflusses von verschiedenen Modulatoren auf die Genexpression

Medium	Zusatz	Durchführung
OptiMEM®	TNF $\alpha$ (15 ng/ml)	1-2 min vortexen 5 min inkubieren bei RT
OptiMEM®	IFN $\gamma$ (15 ng/ml)	1-2 min vortexen 5 min inkubieren bei RT
OptiMEM®	Ca $^{2+}$ (2.5 mM)	1-2 min vortexen 30 min inkubieren bei RT
OptiMEM®	MPG $\alpha$ (2 $\mu$ M)	Durch Pipettieren mischen 30 min inkubieren bei RT
OptiMEM®	E5-Tat (2 $\mu$ M)	Durch Pipettieren mischen 30 min inkubieren bei RT

## 2.2.5 Transiente Transfektion mittels Standardtransfektionsreagenzien

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % transfiziert. Die beschriebenen Ansätze beziehen sich auf eine Transfektion von Zellen im 24-Lochplatten-Format. Die Transfektionseffizienzen der verschiedenen Reagenzien wurden nach 24 h, 48 h und 72 h erst qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie und anschließend quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### 2.2.5.1 Calcium-Phosphat (ProFection® Mammalian Transfection System)

Grundlage der Calcium-Phosphat-Transfektion ist das Mischen der DNA mit CaCl $_2$ . Dadurch bildet sich ein Präzipitat, welches die Zellmembran bindet und mittels Endozytose internalisiert wird [157]. Die Methode der Calcium-Phosphat-Transfektion wurde erstmals von Graham [158] beschrieben und seitdem stetig weiter entwickelt [159].

Zur Transfektion wurde ProFection® verwendet, welches auf einer Calcium-Phosphat-vermittelten Transfektion basiert. Dazu wurden 2  $\mu$ g (hier 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) der Plasmid-DNA mit 17,6  $\mu$ l H $_2$ O und 2,4  $\mu$ l Calcium-Phosphatpuffer gemischt (Ansatz 1). In eine sterile Kavität einer 24-Lochplatte wurde 24  $\mu$ l HEPES-Puffer vorgelegt und mittels Pipettierhilfe und aufgesetzter Aspirationspipette gleichmäßig „blubbern“ gelassen. Während dessen wurde Ansatz 1 zu getropft, kurz weiter „geblubbert“ und anschließend für 30 min bei RT inkubiert.

Das Kultivierungsmedium der Zellen wurde gewechselt, bevor diese mit 48 µl des Calciumpräzipitats behandelt wurden.

#### 2.2.5.2 FuGene® HD (auch für Plasmid-Funktionalität genutzt)

FuGene® HD ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, dessen genaue Formulierung oder Wirkmechanismus unbekannt sind. Aufgrund der hohen Effizienz ist es dennoch ein weit verbreitetes Transfektionsreagenz, das standardmäßig für die In-vitro-Transfektion von Plasmid-DNA verwendet wird.

Zur Transfektion wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 4 µl FuGene® HD-Reagenz in 50 µl Basalmedium gemischt und 10 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Kultivierungsmedium der Zellen gewechselt und anschließend langsam die Transfektionslösung auf die Zellen tropfen gelassen.

#### 2.2.5.3 Lipofectamine®2000

Das Transfektionsreagenz Lipofectamine®2000 beruht auf dem Prinzip der Lipofektion: Kationische Lipidmoleküle, die sich in wässriger Lösung spontan zu vesikulären Strukturen (Liposomen) formieren, binden durch elektrostatische Wechselwirkung an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Dadurch werden Lipid-DNA-Komplexe (sog. Lipoplexe) gebildet, die von der Zelle internalisiert werden.

Zur Transfektion wurden zwei Ansätze parallel vorbereitet. Für den ersten Ansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA in 50 µl Basalmedium verdünnt, für den zweiten 4 µl Lipofectamine®2000-Reagenz in 50 µl Basalmedium. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, 5 min inkubiert und tröpfchenweise auf Zellen, bei denen zuvor das Kultivierungsmedium gewechselt wurde, pipettiert.

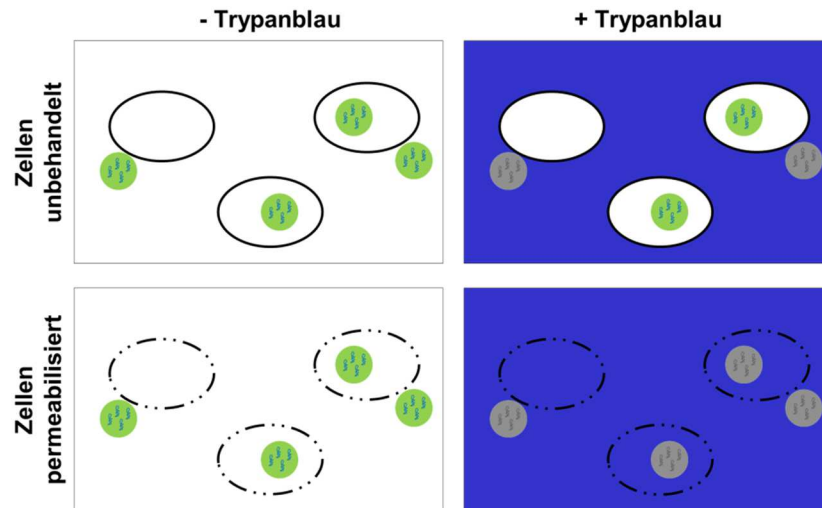
### 2.2.6 Quenchen extrazellulärer Fluoreszenzsignale mittels Trypanblau

Trypanblau ist ein polyanionischer Vitalitätsfarbstoff, der in tote Zellen eindringen, nicht aber die intakte Zellmembran überwinden kann. Dadurch färben sich tote Zellen dunkelblau und können von vitalen Zellen differenziert werden. Diese Eigenschaft des Trypanblau, zusammen mit der Tatsache, dass es die Fluoreszenz von FITC quenchen kann, hat man sich in Phagozytose-Assays zunutze gemacht. FITC-Moleküle, die bereits phagozytiert sind, können mittels Trypanblau nicht gequecht werden, im Gegensatz zu Fluorochromen, die sich außerhalb der Zelle befinden. Damit ist die Differenzierung zwischen Zellen, die FITC-Moleküle phagozytiert haben, von welchen, die die Moleküle nur gebunden haben, möglich. Da mit den gängigen Detektionsmethoden nicht eindeutig zwischen gebundenen und internalisierten Nanopartikeln differenziert werden kann, sollte das Trypanblau-Quenchen auf diese Anwendung übertragen werden. Konkret sollte untersucht werden, ob Trypanblau die Herstellungs-bedingte grüne Autofluoreszenz der Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP

(GA-qv-NP) quencht und zur eindeutigen zellulären Lokalisierung der GA-qv-NP einsetzbar ist.

#### 2.2.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse Trypanblau-behandelter Zellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden mit  $1,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> 24 h vor der Nanopartikelinkubation ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Kultivierungsmedium gewaschen und mit 50 µg/cm<sup>2</sup> bzw. 100 µg/cm<sup>2</sup> 100 % GA-qv-NP inkubiert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das Zytoplasma der Zellen mit CellTracker™blue nach Hersteller-Protokoll gefärbt und anschließend die Zellen mit Paraformaldehyd (1 %) für 3 min fixiert. Die Proben wurden zuerst in PBS mittels konfokalem CLSM analysiert (CellTracker™blue/HSA-Autofluoreszenz). Anschließend wurde das PBS abgenommen, durch Trypanblau (100 µM) ersetzt und erneut die grüne Autofluoreszenz der GA-qv-NP dokumentiert. Zur Verifizierung der Methode wurden Zellen wie bereits beschrieben ausgesät und mit GA-qv-NP inkubiert (Abb. 10). Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden sie für 3 min mit eiskaltem Methanol fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Die Proben wurden wieder zuerst in PBS und anschließend in Trypanblau mit einem CLSM dokumentiert.



**Abbildung 10: Etablierung von Trypanblau als Quencher Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP.** Zellen werden mit HSA-NP inkubiert, welche anhand ihrer Glutaraldehyd-vermittelten grünen Autofluoreszenz detektiert werden können. Durch die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie kann nicht zwischen Zellen differenziert werden, die die HSA-NP gebunden und/oder internalisiert haben (oben links). Trypanblau quencht die extrazellulären Fluoreszenzsignale, ohne die intrazellulären zu beeinträchtigen (oben rechts). Permeabilisierung der Zellen mit Methanol beeinträchtigt nicht die Autofluoreszenz der HSA-NP (unten links), aber macht die Zellmembran durchlässig für Trypanblau. Folglich werden sowohl extra- als auch intrazelluläre Fluoreszenzsignale gelöscht (unten rechts).

#### 2.2.6.2 Durchflusszytometrische Analyse Trypanblau-behandelter Zellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden mit  $1,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> 24 h vor der Nanopartikelinkubation ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Kultivierungsmedium gewaschen und mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw.  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  100 % GA-qv-NP inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 200  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert, bevor 10.000 Zellen pro Probe im Fluoreszenzkanal FL-1 (488/530/30 nm) durchflusszytometrisch bestimmt wurden. Anschließend wurde Trypanblaulösung (100  $\mu\text{M}$ ) in die Proben pipettiert, gevortext und erneut 10.000 Zellen analysiert. Zur Verifizierung des Quenchens wurden mit GA-qv-NP-inkubierte Zellen nach Anleitung des Herstellers mit dem Cytotfix/Cytoperm-Kit permeabilisiert. Dafür wurden die Zellen nach der Zentrifugation in 250  $\mu\text{l}$  Cytotfix/Cytoperm-Kit-Lösung resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurde 1 ml Perm/Wash-Puffer (1x, mit dH<sub>2</sub>O verdünnt) gegeben, die Zellen für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Die Rohdaten der Durchflusszytometer-Analyse wurden mit der Software CellQuest Pro ausgewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung HSA-basierender Gentransfersysteme

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung HSA-basierender Gentransfersysteme, als nicht-virale Alternative für die Gen- und Zelltherapie. HSA-basierende Nanopartikel (HSA-NP) wurden bereits mehrfach erfolgreich zum Wirkstofftransport eingesetzt [144, 160] und zeichnen sich besonders durch ihre Biokompatibilität aus [161]. Es ist bekannt, dass die Transfektion von Primär- und Stammzellen ineffizienter als die von Zelllinien ist. Daher sollten Glutaraldehyd, Hitze und Disulfidbrücken als unterschiedliche Quervernetzungs-methoden der HSA-NP sowie verschiedene Liganden-Modifikationen getestet und evaluiert werden. Die schrittweisen Änderungen der Nanopartikelformulierung wurden mittels Effizienz-Testungen in HEK293T-Zellen untersucht. Abschließend sollte der potentielle Einsatz der entwickelten HSA-NP in der Gen- und Zelltherapie mittels Transfektionsstudien in Primär- und Stammzellen evaluiert werden.

#### 3.1.1 Physikochemische Charakterisierung der HSA-Nanopartikel

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene HSA-basierende Gentransfersysteme entwickelt und getestet, um eine effiziente und biokompatible nicht-virale Alternative für die Gen- und Zelltherapie etablieren zu können. Neben unterschiedlichen Quervernetzungsmethoden, wurden auch verschiedene Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrade und Liganden-Modifikationen untersucht. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden die Größe und das Zetapotential der HSA-NP bestimmt.

Die Herstellung, Liganden-Modifizierung und physikochemische Charakterisierung der Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten HSA-NP (GA-qv-NP bzw. H-qv-NP) wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Münster von Jennifer Look durchgeführt.

Exemplarisch für die verwendeten HSA-NP die physikochemische Charakterisierung der RGD- und Tat-modifizierten 20 % bzw. 100 % GA-qv-NP gezeigt (Tab. 6). Zur Kontrolle des RGD-Liganden wurden HSA-NP mit RAD-Peptiden modifiziert und PEGylierte HSA-NP dienten der Kontrolle Tat-modifizierter HSA-NP. Durchschnittlich waren die Liganden-modifizierten GA-qv-NP zwischen 187,0 nm ( $\pm 14,2$ ) und 249,5 nm ( $\pm 27,2$ ) groß und hatten ein Zetapotential von -32,3 mV ( $\pm 7,1$ ) bis -45,6 mV ( $\pm 1,2$ ). Dabei waren 100 % GA-qv-NP circa 50 nm kleiner als 20 % GA-qv-NP.

**Tabelle 6:** Physikochemische Charakterisierung Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP. Die HSA-NP wurden bezüglich ihrer Größe und ihrem Zetapotential im Zetasizer vermessen. Die Herstellung und Charakterisierung der HSA-NP wurde von Jennifer Look am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Münster durchgeführt. (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n \geq 3$ )

NP-Formulierung Modifizierung	20 % GA-quervernetzt				100 % GA-quervernetzt			
	RAD	RGD	PEG	Tat	RAD	RGD	PEG	Tat
<b>Partikelgröße [nm]</b> (MW $\pm$ SD)	249,5 $\pm$ 27,2	247,2 $\pm$ 23,5	241,8 $\pm$ 11,4	222,9 $\pm$ 12,3	190,5 $\pm$ 14,0	187,0 $\pm$ 14,2	191,4 $\pm$ 22,0	196,7 $\pm$ 17,1
<b>Zetapotential [mV]</b> (MW $\pm$ SD)	-36,4 $\pm$ 8,2	-32,3 $\pm$ 7,1	-34,3 $\pm$ 6,0	-42,3 $\pm$ 2,2	-45,9 $\pm$ 6,2	-40,3 $\pm$ 8,0	-37,7 $\pm$ 6,3	-45,6 $\pm$ 1,2

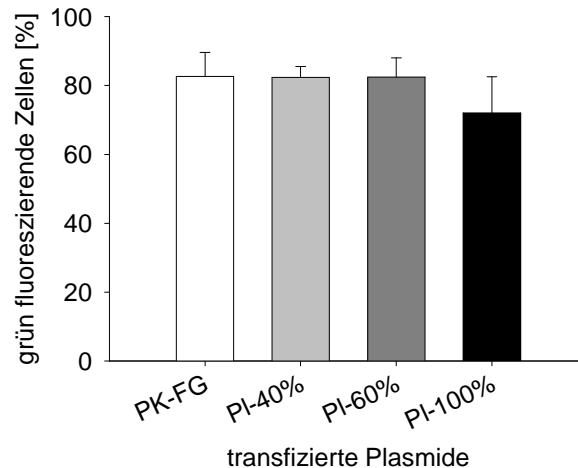
### 3.1.2 In-vitro-Charakterisierung Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-Nanopartikel

Die Plasmid-DNA wurde zum Schutz vor Nukleasen in die HSA-Nanopartikel-Matrix inkorporiert. Zur Stabilisierung dieser Plasmid-beladenen Nanopartikel mussten diese quervernetzt werden. Der gebräuchlichste Quervernetzer von HSA-NP ist Glutaraldehyd, wobei je nach Anwendung ein Quervernetzungsgrad zwischen 40 %-100 % eingestellt werden kann [133]. Der prozentuale Wert bezieht sich dabei auf die Absättigung der theoretisch vorhanden primären Aminogruppen des HSA mit Glutaraldehyd. Der optimale Quervernetzungsgrad von HSA-NP zum Gentransport war nicht bekannt, daher sollte dieser durch Testung unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzter Nanopartikel (GA-qv-NP) ermittelt werden.

Die Plasmid-DNA wurde erfolgreich in die unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP inkorporiert [152]. Vor der In-vitro-Charakterisierung der Plasmid-beladenen GA-qv-NP sollte die Funktionalität der inkorporierten Plasmid-DNA nach der Nanopartikel-Herstellung untersucht werden. Dazu wurde die inkorporierte Plasmid-DNA aus 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP isoliert und HEK293T-Zellen mittels FuGene® HD mit den isolierten Plasmiden transfiziert. Die Transfektionseffizienz war im Vergleich zur unbehandelten Plasmidkontrolle für die Plasmide, die aus 100 % GA-qv-NP isoliert wurden, um circa 10 % reduziert, aber nicht für Plasmide der 40 % und 60 % GA-qv-NP (Abb. 11). Damit wurde ein herstellungsbedingter Funktionsverlust der Plasmid-DNA ausgeschlossen.

Die GA-qv-NP wurden daher folgend bezüglich ihrer Bindung, Aufnahme und Transfektionseffizienz in den Zellen getestet. GA-qv-NP haben eine herstellungsbedingte Autofluoreszenz, was das direkte Detektieren von Zellen, die Nanopartikel gebunden oder internalisiert haben, mit Fluoreszenz-basierten Methoden ermöglicht. Die Transfektionseffizienz konnte durch das Inkorporieren des Plasmides peGFP-N1, welches für ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*) codiert, analysiert werden.



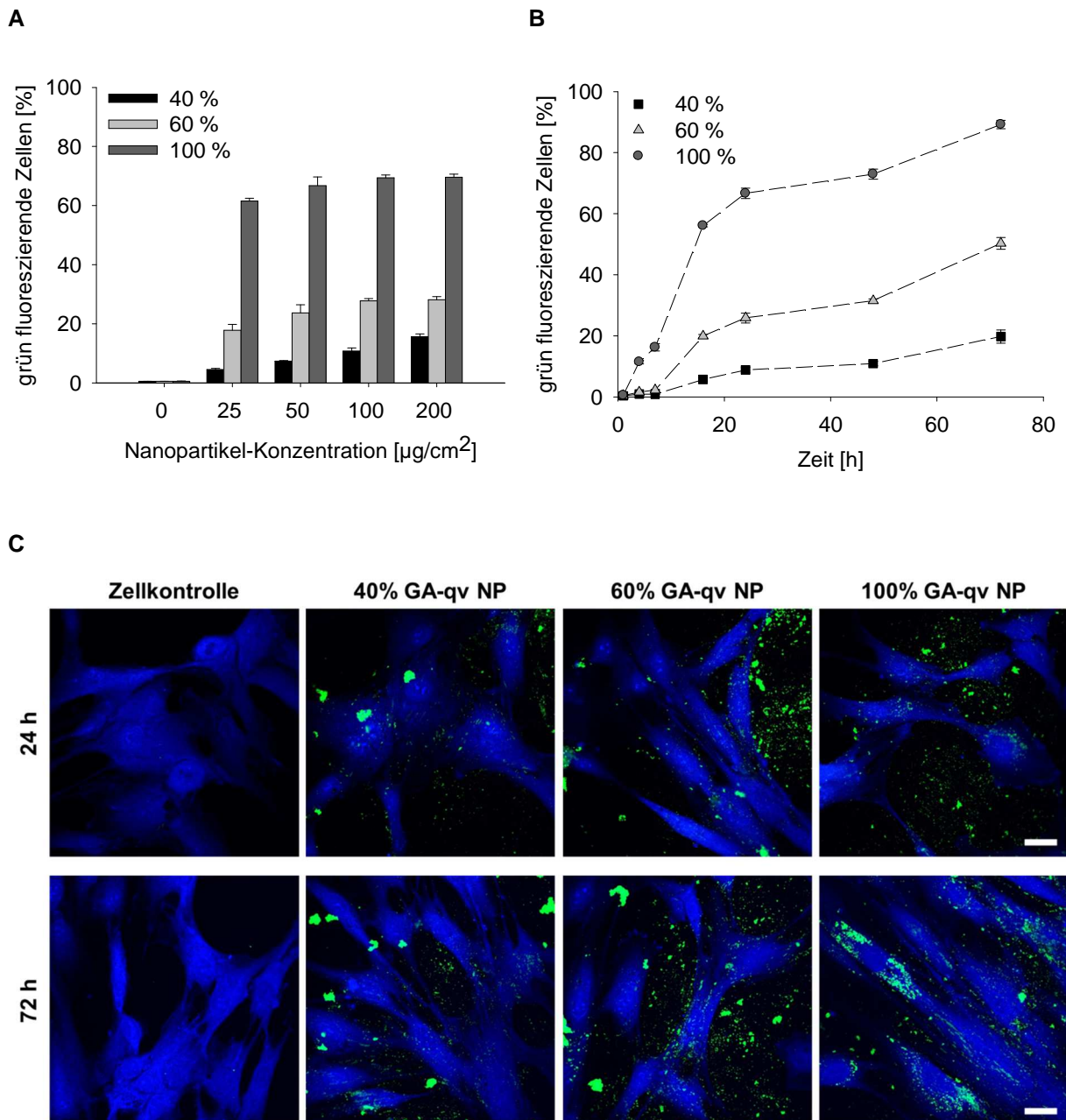


**Abbildung 11: Funktionalität der Plasmid-DNA nach Isolierung aus Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP.** Die Plasmide wurden mittels DNeasy Blood & Tissue Kit aus 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP isoliert. Mittels FuGene® HD-Transfektion wurden HEK-293T-Zellen mit den isolierten Plasmiden (PI-40%, PI-60%, PI-100%) sowie mit zuvor nicht inkorporierten Plasmiden (PK-FG) transfiziert. Die Genexpressionsrate der Zellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischer Mittelwert mit Standardabweichung (n = 3).

### 3.1.2.1 Unmodifizierte Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-Nanopartikel

#### Interaktion unmodifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit Zellen

Damit Nanopartikel internalisiert werden können und intrazellulär an ihren Wirkungsort gelangen, müssen sie zuerst mit der Zelle interagieren und an die Zellmembran binden. Die Interaktion der HSA-NP mit Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die ersten Nanopartikelformulierungen, die getestet wurden, bestanden aus einer mit Plasmid-DNA beladenen HSA-Matrix, die unterschiedlich stark (40 %, 60 %, 100 %) mit Glutaraldehyd quervernetzt wurde. Zur Analyse wurden hMSC mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dieser GA-qv-NP für 24 h inkubiert. Die 40 % GA-qv-NP zeigten eine geringe konzentrationsabhängige Interaktion mit hMSC, 60 % und 100 % GA-qv-NP dagegen kaum (Abb. 12 A). Einen größeren Einfluss hatte die Glutaraldehyd-Quervernetzung: 40 % GA-qv-NP interagierten mit maximal 15,7 % ( $\pm 0,9$ ) der Zellen und 100 % GA-qv-NP mit maximal 69,6 % ( $\pm 1,0$ ) der hMSC. Zur Untersuchung, inwiefern die niedrige Interaktion der 40 % GA-qv-NP mit der eventuell geringeren Autofluoreszenz niedrig Glutaraldehyd-quervernetzter Nanopartikel zusammenhängt, wurden 40 % und 100 % GA-qv-NP zusätzlich mit PromoFluor633 (PF633) markiert. Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen zeigten, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der Interaktion 40 % GA-qv-PF633-NP mit hMSC um circa ein Fünftel geringer im Vergleich zu 100 % GA-qv-PF633-NP (Abb. Anhang 1). Dies zeigt, dass der Grad der Glutaraldehyd-Quervernetzung Einfluss auf die Interaktion der HSA-NP mit Zellen hat.



**Abbildung 12: Einfluss der Konzentration und Inkubationszeit auf die Interaktion Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-Nanopartikel mit hMSC. (A)** Inkubation der hMSC mit unterschiedlichen Mengen an 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP. Die GA-qv-NP wurden anhand ihrer grünen Autofluoreszenz detektiert. Durchflusszytometrische Analyse der hMSC nach 24 h. **(B)** Inkubation der hMSC mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  an 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP. Durchflusszytometrische Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 1 h und 72 h. Die Werte sind dargestellt als statistischer Mittelwert mit Standardabweichung ( $n = 3$ ). **(C)** CLSM-Analyse von hMSC, die für 24 h oder 72 h mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  der 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP inkubiert wurden. Die Zellen wurden mit CellTracker™blue gefärbt (blau). Die Autofluoreszenz der HSA-NP ist grün dargestellt. Die Messbalken entsprechen  $25 \mu\text{m}$ .

Da die Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen zeitabhängig sein kann, wurden hMSC für 1 h, 4 h, 7 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  der unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP inkubiert. Wieder zeigte der Grad der Glutaraldehyd-Quervernetzung einen großen Einfluss auf die Interaktion der Nanopartikel mit hMSC (Abb. 12 B). Zudem

wurde für 40 %, 60 % und 100 % GA-qv-NP eine stetige Steigerung der Interaktion mit steigender Inkubationszeit festgestellt. Die größte Interaktion (89,2 % ( $\pm$  1,4) der Zellen) erreichten somit 100 % GA-qv-NP nach 72 h.

Mittels durchflusszytometrischen Messungen kann nicht differenziert werden, ob die Nanopartikel an die Zellmembran binden oder von den Zellen aufgenommen wurden. Zur detaillierteren Untersuchung der Nanopartikel-Zell-Interaktion wurden daher CLSM-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden hMSC für 24 h und 72 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  der unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP inkubiert. 40 % GA-qv-NP zeigten nach 24 h und 72 h große zellunabhängige Nanopartikel-Agglomerate und nur wenige Nanopartikel konnten zellassoziert lokalisiert werden (Abb. 12 C). Auch nach 72-stündiger Inkubation mit 60 % GA-qv-NP konnten nur wenig zellassozierte Nanopartikel detektiert werden. Dagegen zeigten einige der analysierten hMSC, die mit 100 % GA-qv-NP inkubiert wurden, perinukleär angeordnete Nanopartikelsignale. Dies deutet auf eine zytoplasmatische Verteilung und damit Internalisierung der Nanopartikel hin.

Die unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP zeigten auch nach einwöchiger Inkubation keine detektierbare Expression des Reportergens eGFP, welches auf dem inkorporierten Plasmid peGFP-N1 codiert ist. Neben hMSC wurden, bezüglich ihrer eGFP-Expression nach Behandlung mit HSA-NP, auch BJ-Fibroblasten analysiert, die mittels HSA-NP zu iPS reprogrammiert werden sollten, sowie HEK293T-Zellen, die als gut transfizierbare Zellen in der Literatur beschrieben sind und als Positivkontrolle in Transfektionsversuchen dienen.

#### Expressions-Analyse von Oberflächenrezeptoren

Die Transfektionsstudien der unmodifizierten GA-qv-NP zeigten, dass diese nicht zu einem erfolgreichen Gentransport führten. Potentielle Hürden im Gentransport der HSA-NP können geringe Internalisierungs- oder Plasmidfreisetzungsraten sein. Beide Engstellen sollten daher im Folgenden untersucht und Lösungsmöglichkeiten identifiziert werden.

Um die Internalisierung der HSA-NP zu erhöhen, können diese mit Liganden zur zielgerichteten Rezeptor-vermittelten Aufnahme modifiziert werden [162]. Entscheidend bei der Rezeptorauswahl zum Gentransfer war, dass der komplette Rezeptor-Ligand-Komplex von der Zelle internalisiert wird und keine Signalkaskaden aktiviert werden, die z. B. die Proliferation oder das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen. Als Kandidaten kamen daher verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren sowie Integrine in Frage, deren Expression auf den unterschiedlichen Zelltypen (hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen) durchflusszytometrisch untersucht wurde (Tab. 7). Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (EGFR1) wurde von 89,5 % ( $\pm$  8,7) bzw. 96,5 % ( $\pm$  1,8) der hMSC bzw. der BJ-Fibroblasten exprimiert, dagegen nur von 53,0 % ( $\pm$  19,7) der HEK293T-Zellen. Die Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptors 2 (FGFR2) konnte auf keinem Zelltyp

nachgewiesen werden, ebenso konnte auf HEK293T-Zellen keine Expression der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten des *platelet derived growth factor*-Rezeptor (PDGFR) detektiert werden. Integrinrezeptoren sind Heterodimere, die sich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Die Integrin-Untereinheit  $\alpha v$  wurde von 61,8 % ( $\pm$  9,6) der HEK293T-Zellen exprimiert, die Untereinheiten  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  von über 96,4 % der hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen. Die Integrine  $\alpha v\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  gehören zu den Fibronectin-Rezeptoren und binden, wie 20 weitere Integrine, eine spezifische Aminosäuresequenz ihrer Liganden: die RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenz.

**Tabelle 7:** Analyse der Oberflächenrezeptoren-Expression zum effizienten Transport der HSA-NP. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen wurden mit den verschiedenen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die prozentuale Anzahl an Zellen, die als positiv gemessen wurden, sind als statistische Mittelwerte ( $n = 3$ ) dargestellt: (-) unter 10 %, (+) 11-80 % und (++) über 80 %.

Rezeptor		hMSC	BJ-Fibroblasten	HEK293T
<b>EGFR</b>	EGFR1	++	++	+
<b>FGFR</b>	FGFR2	-	-	-
<b>PDGFR</b>	$\alpha$	+	+	-
	$\beta$	++	++	-
<b>Integrin</b>	$\alpha 5$	++	++	++
	$\alpha v$	++	++	+
	$\beta 1$	++	++	++

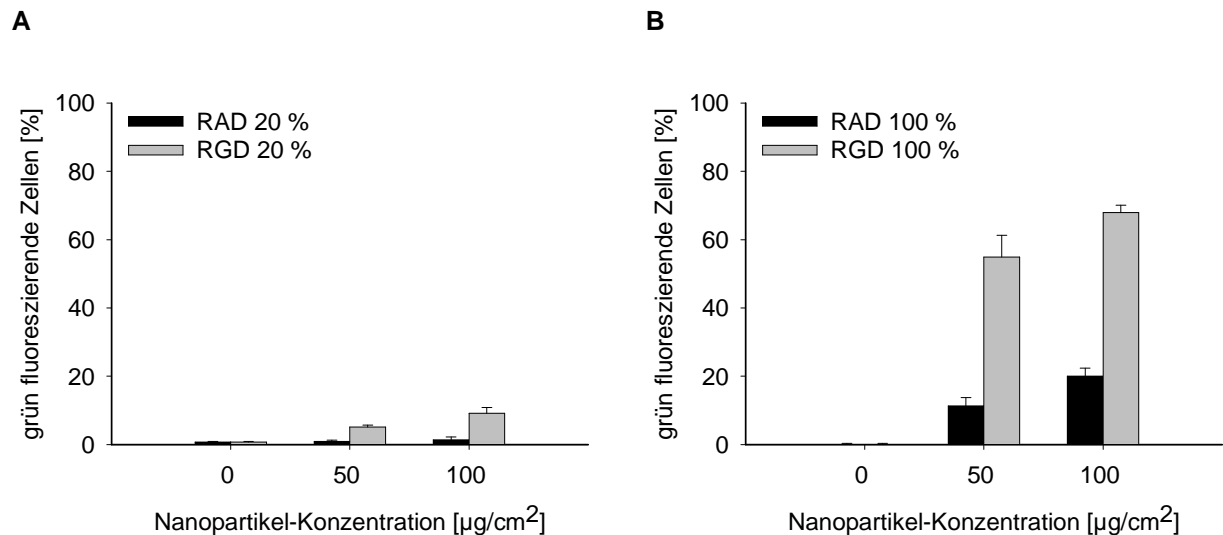
### 3.1.2.2 RGD-modifizierte Glutaraldehyd-qv HSA-Nanopartikel

Wie aus der Analyse der Oberflächenrezeptoren hervorging, exprimieren hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen verschiedene Integrine, welche die RGD-Sequenz binden. Daher wurden die GA-qv-NP zur Rezeptor-vermittelten Aufnahme mit RGD-Peptiden modifiziert. Analog wurden die GA-qv-NP mit RAD-Peptiden modifiziert. Durch die Änderung einer Aminosäure (Alanin statt Glycin) bindet das RAD-Peptid nicht die Integrin-Rezeptoren und dient damit als Kontrolle für die spezifische Bindung RGD-modifizierter Nanopartikel. Neben 100 % GA-qv-NP, die eine gute Interaktion mit den Zellen zeigten, wurden zusätzlich 20 % GA-qv-NP hergestellt und modifiziert. Die Reduzierung des Glutaraldehyds sollte die intrazellulären Plasmidfreisetzung fördern. Dabei war 20 % der geringste Vernetzungsgrad mit dem stabile HSA-NP hergestellt werden konnten.

#### In-vitro-Charakterisierung der RGD-modifizierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP

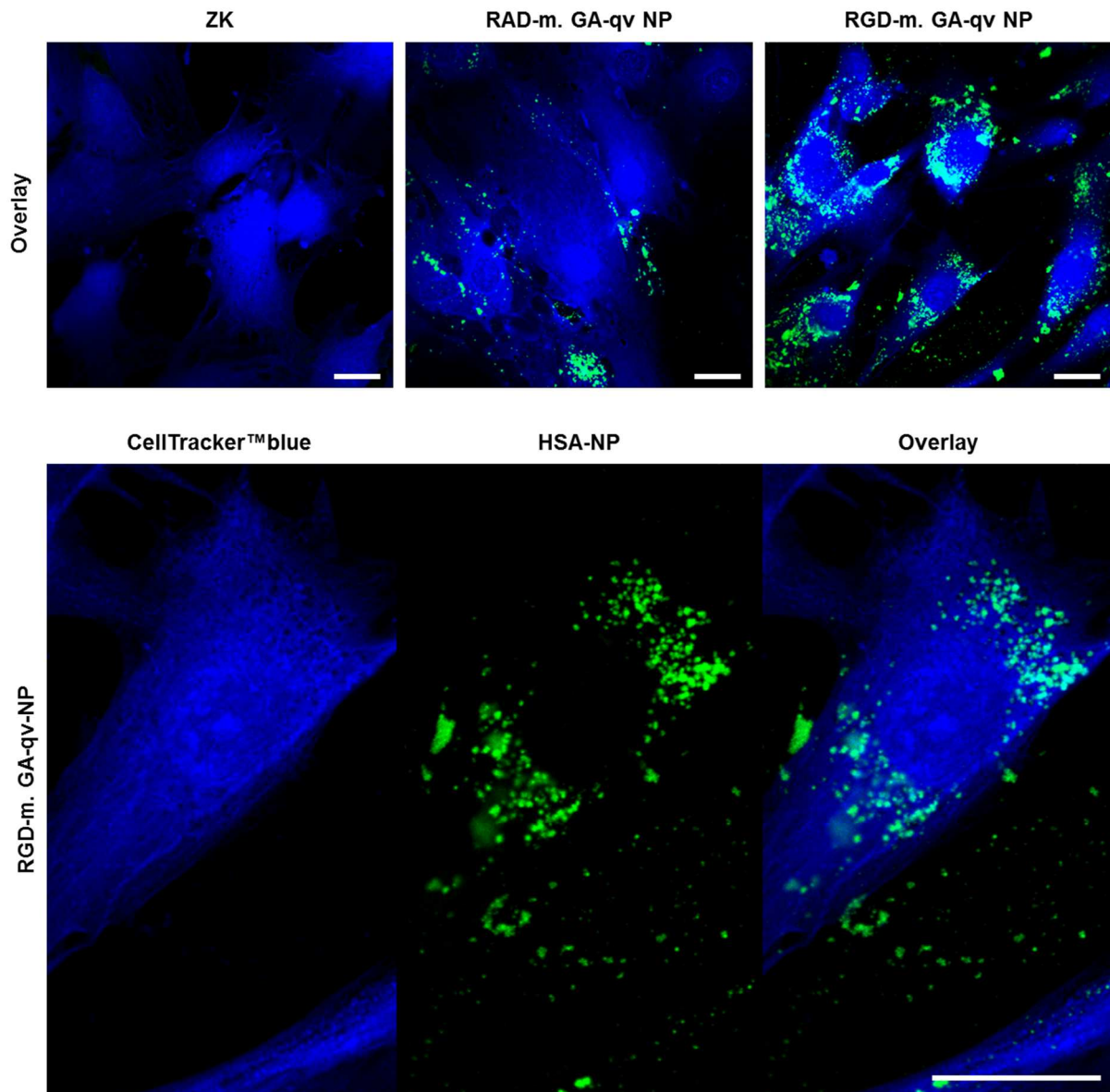
Der Einfluss der RGD-Modifizierung auf die Interaktion der HSA-NP mit Zellen wurde im Durchflusszytometer analysiert. Dazu wurden hMSC für 24 h mit RGD-modifizierten 20 % und 100 % GA-qv-NP inkubiert. RAD- und RGD-modifizierte 20 % GA-qv-NP zeigten kaum detektierbare Interaktion mit den Zellen (Abb. 13 A). RAD-modifizierte 100 % GA-qv-NP

zeigten eine geringe Interaktion mit maximal 16,6 % ( $\pm 3,0$ ) der hMSC (Abb. 13 B). Die Modifizierung der 100 % GA-qv-NP mit RGD führte dagegen zu einer Erhöhung der Interaktion auf maximal 73,5 % ( $\pm 5,2$ ).



**Abbildung 13: Interaktion RGD-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit hMSC.** (A) Inkubation der hMSC mit unterschiedlichen Konzentrationen RGD-modifizierter 20 % GA-qv-NP (RGD 20 %) bzw. (B) RGD-modifizierter 100 % GA-qv-NP (RGD 100 %). Zur Kontrolle wurden RAD-modifizierte GA-qv-NP (RAD 20 %, RAD 100 %) mitgeführt. Die Interaktion wurde nach 24 h durchflusszytometrisch untersucht. Die GA-qv-NP wurden anhand ihrer grünen Autofluoreszenz detektiert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).

Die Untersuchungen der Aufnahme der RGD-modifizierten GA-qv-NP erfolgte mittels CLSM-Analyse. Zellen, die mit RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP für 48 h inkubiert wurden, zeigten eine perinukleäre Akkumulation in fast allen analysierten Zellen (Abb. 14). Das Nanopartikelsignal war nicht gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, sondern vesikulär angereichert. Die RAD-modifizierten Kontroll-Nanopartikel zeigten im Gegensatz dazu kaum zellassoziertes Nanopartikelsignal. Daraus lässt sich schließen, dass die Modifizierung der GA-qv-NP mit dem RGD-Peptid in hMSC zu einer Integrin-vermittelten Aufnahme führt.

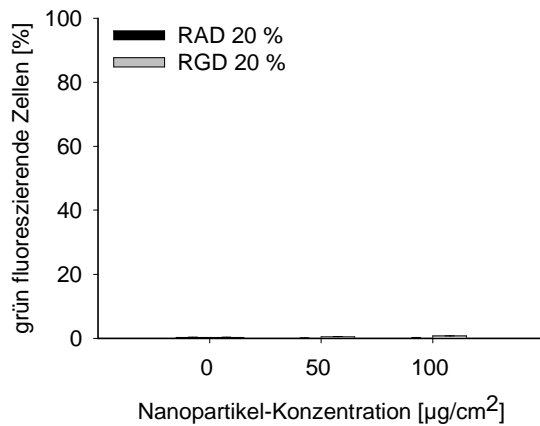


**Abbildung 14: Aufnahme RGD-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in hMSC.** CLSM-Analyse von hMSC die für 48 h mit RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP inkubiert wurden. Die Zellen wurden mit CellTracker™blue gefärbt (blau). Die Autofluoreszenz der HSA-NP ist grün dargestellt. **Obere Reihe:** Darstellung der Overlay der Zellkontrolle (ZK), RAD-modifizierten GA-qv-NP und RGD-modifizierter GA-qv-NP. **Untere Reihe:** Vergrößerung der mit RGD-modifizierten GA-qv-NP hMSC, aufgesplittet in die einzelnen Fluoreszenzen sowie als Overlay. Die Messbalken entsprechen 25 μm.

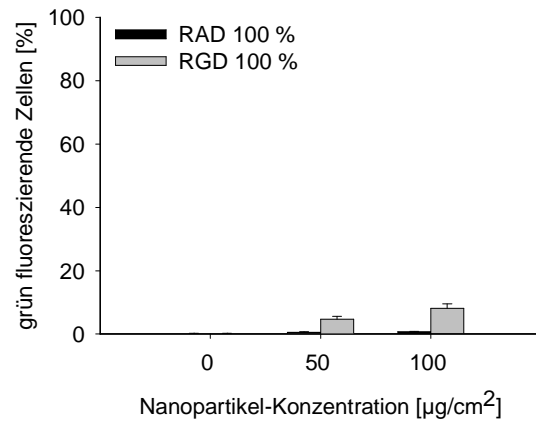
Der Einfluss der RGD-Modifizierung sollte auch für die weiteren Zelltypen, BJ-Fibroblasten und HEK293T analysiert werden. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit RGD-modifizierten 20 % und 100 % GA-qv-NP inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Bindung RGD-modifizierter 20 % wie auch 100 % Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP an BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen war gering (<15 %) (Abb. 15). CLSM-Analysen bestätigten die geringe Interaktion RGD-modifizierter GA-qv-NP mit BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies steht damit im Widerspruch zu den Ergebnissen der Rezeptorstudie,

welche eine sehr gute Expression der Integrin-Untereinheiten auf diesen beiden Zelltypen zeigte.

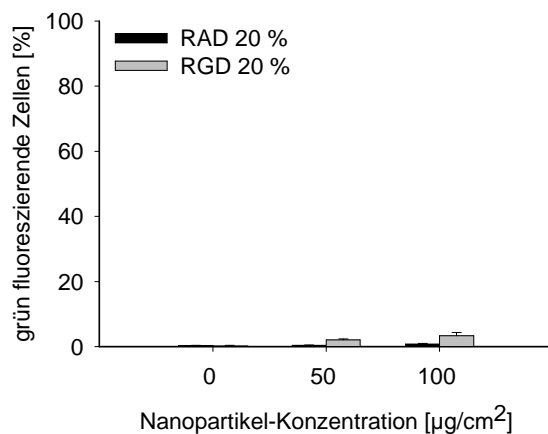
**A (BJ-Fibroblasten)**



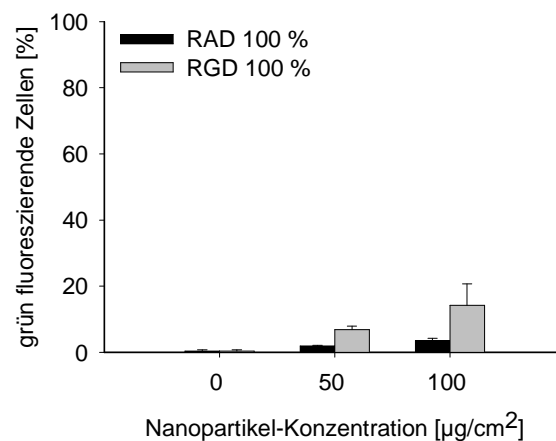
**B (BJ-Fibroblasten)**



**C (HEK293T-Zellen)**



**D (HEK293T-Zellen)**

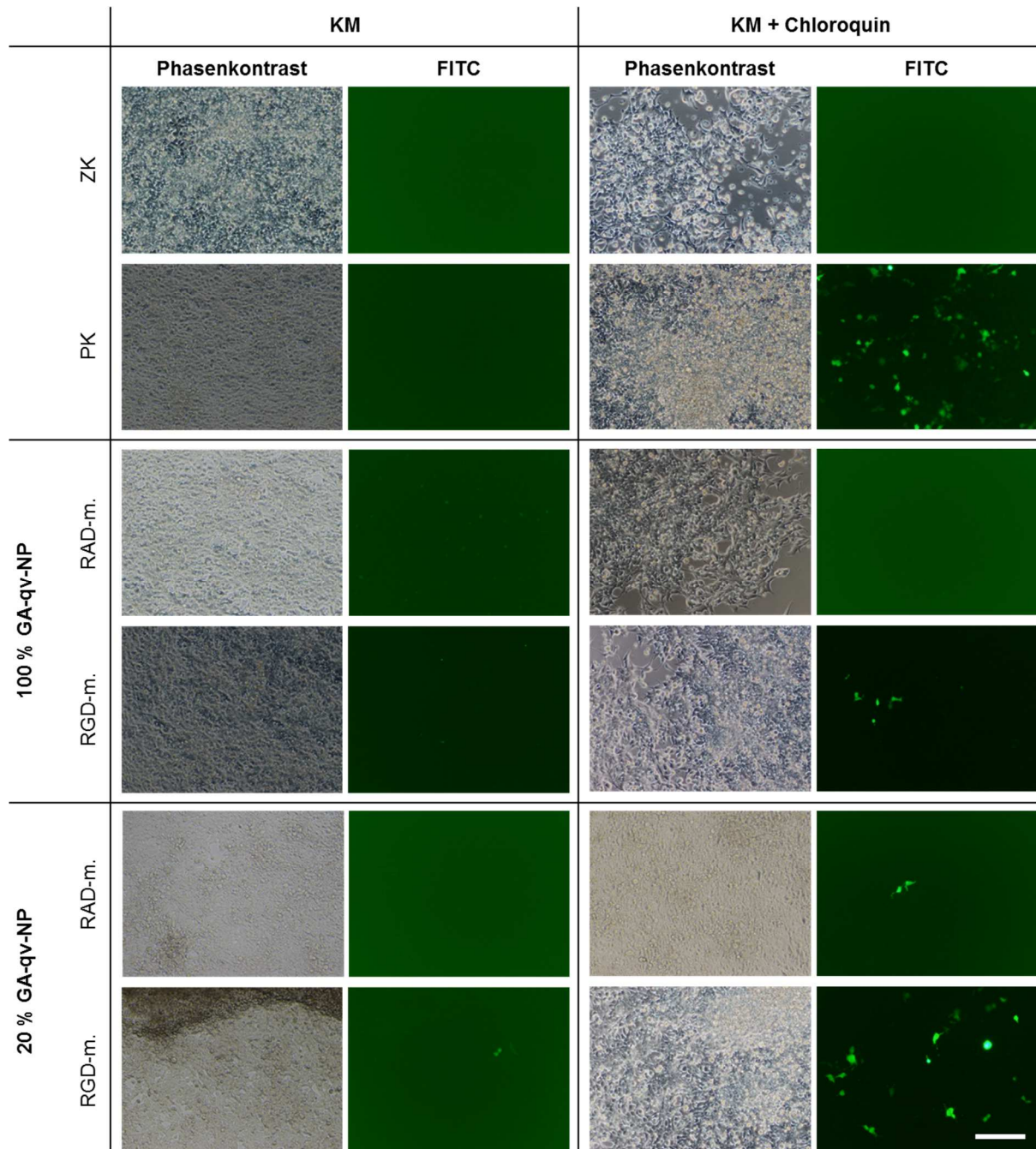


**Abbildung 15: Interaktion RGD-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen.** Inkubation der BJ-Fibroblasten mit **(A)** RGD-modifizierten 20 % GA-qv-NP (RGD 20 %) bzw. **(B)** RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP (RGD 100 %). Parallel wurden HEK293T-Zellen mit **(C)** RGD-modifizierten 20 % GA-qv-NP bzw. **(D)** RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP inkubiert. Zur Kontrolle wurden äquivalent RAD-modifizierte GA-qv-NP (RAD 20 %, RAD 100 %) mitgeführt. Die Interaktion wurde nach 24 h durchflusszytometrisch untersucht. Die GA-qv-NP wurden anhand ihrer grünen Autofluoreszenz detektiert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3).

### Funktionale Analysen der RGD-modifizierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP

Werden Nanopartikel erfolgreich von der Zelle internalisiert und ins Zytoplasma transportiert, kann die Plasmid-DNA aus der Nanopartikel-Matrix freigesetzt werden. Damit es zur Expression der auf dem Plasmid codierten Gene kommen kann, muss die Plasmid-DNA anschließend vom Zytoplasma in den Kern der Zelle gelangen. Anhand der Transfektionsrate kann demnach beurteilt werden, wie effizient die Freisetzung und der Transport der

inkorporierten Plasmid-DNA ist. Damit stellt die Transfektionseffizienz einen der wichtigsten Parameter eines Gentransportsystems dar. Die Genexpression der HSA-NP wurde mittels Expression des Reportergens eGFP nach 72 h analysiert.



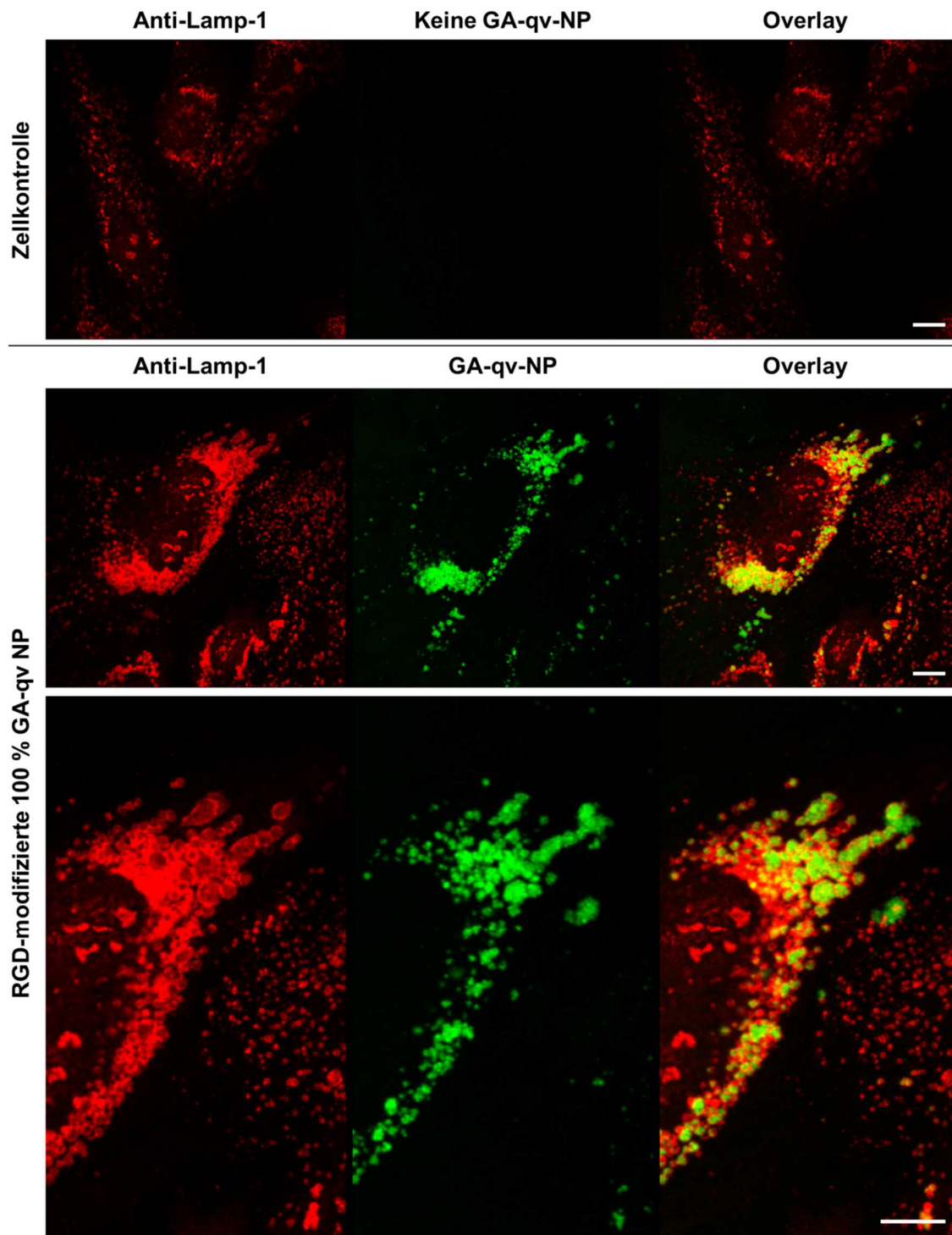
**Abbildung 16: Genexpressionsrate RGD-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in HEK293T-Zellen.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit RGD-modifizierten 20 % bzw. 100 % GA-qv-NP in Kultivierungsmedium (KM) mit und ohne 0,1 mM Chloroquin für 24 h. Zur Kontrolle wurden äquivalent RAD-modifizierte GA-qv-NP, eine Plasmidkontrolle (PK) und eine Zellkontrolle (ZK) mitgeführt. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



HEK293T-Zellen, die mit RGD- oder RAD-modifizierten 100 % GA-qv-NP in Kultivierungsmedium inkubiert wurden, zeigten keine Expression des Reportergens (Abb. 16, linke Spalte, Mitte). Dagegen konnte in Proben, die mit RGD-modifizierten 20 % GA-qv-NP behandelt wurden, vereinzelt eGFP exprimierende Zellen dokumentiert werden (Abb. 16, linke Spalte, unten).

Um den Einfluss der RGD-Modifizierung auf den Gentransport verifizieren zu können, sollte die Transfektionsrate mittels Chloroquin, einem lysosomotropischen Reagenz, erhöht werden (Abb. 16, rechte Spalte). Nach der Chloroquin-Behandlung stieg die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen in der Plasmidkontrolle. Zellen, die mit RAD-modifizierten (20 % und 100 %) GA-qv-NP in chloroquinhaltigem Medium inkubiert wurden, zeigten kaum Genexpression. Inkubation der RGD-modifizierten GA-qv-NP in chloroquinhaltigem Medium erhöhte dagegen deutlich die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen. Auffällig war zudem, dass die Genexpressionsrate nach Inkubation mit 20 % GA-qv-NP deutlich höher als mit 100 % GA-qv-NP war. Damit konnte die Kombination aus RGD-Modifizierung mit geringer Glutaraldehyd-Quervernetzung als bisher effektivste HSA-NP-Formulierung zum Gentransfer ermittelt werden. Da die Anzahl positiver Zellen in der Plasmidkontrolle höher als in den Nanopartikel-behandelten Proben war, wurde die Nanopartikelformulierung auf Basis dieser Ergebnisse weiterentwickelt.

Die erfolgreiche Steigerung der Transfektionsrate mittels Chloroquin deutete darauf hin, dass die Nanopartikel im Lysosom angereichert werden. Dies sollte mittels Ko-Lokalisations-Analyse in hMSC überprüft werden. Zur Markierung der Lysosomenmembran dienten spezifische Antikörper, die gegen das lysosomal assoziierte Membranprotein-1 (LAMP-1) gerichtet sind. Die CLSM-Analyse zeigte, dass sich nach 48-stündiger Inkubationszeit die Mehrheit der RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP in Lysosomen angereichert hatten, was diese Anschwellen ließ (Abb. 17). Damit konnten die zuvor beobachteten vesikulären Strukturen der Zellen, die mit RGD-modifizierten Nanopartikel inkubiert wurden, als Lysosome identifiziert werden, in denen sich GA-v-NP angereichert hatten.



**Abbildung 17: Ko-Lokalisationsanalyse RGD-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit Lysosomen.** Inkubation der hMSC mit RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP für 48 h. Anschließend immunzytochemische Färbung der Zellen mit anti-LAMP-1-Antikörper. Ko-Lokalisations-analyse von GA-qv-NP anhand ihrer Autofluoreszenz (grün; GA-qv-NP) und LAMP-1 (rot; Anti-Lamp-1) mittels CLSM. Darstellung der einzelnen Fluoreszenzen sowie deren Overlay. **Obere Reihe:** Zellkontrolle; **mittlere Reihe:** RGD-modifizierte 100 % GA-qv-NP; **untere Reihe:** vergrößerter Ausschnitt der RGD-modifizierte 100 % GA-qv-NP. Die Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

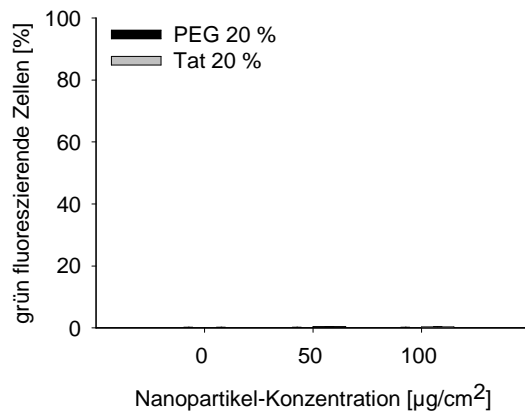
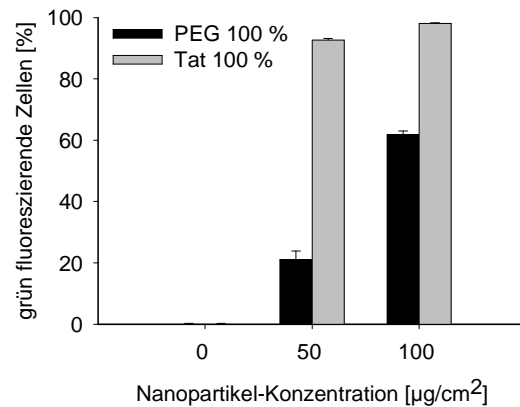
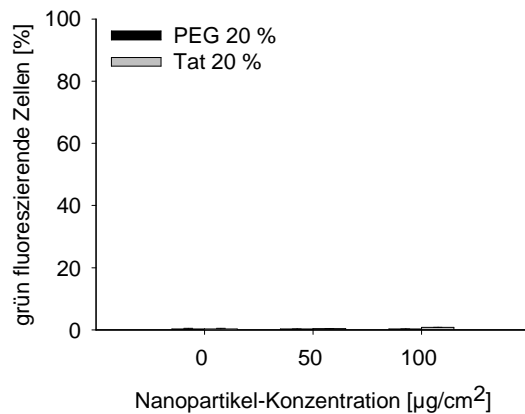
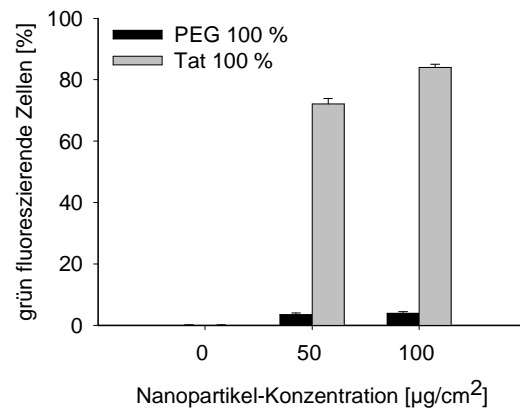
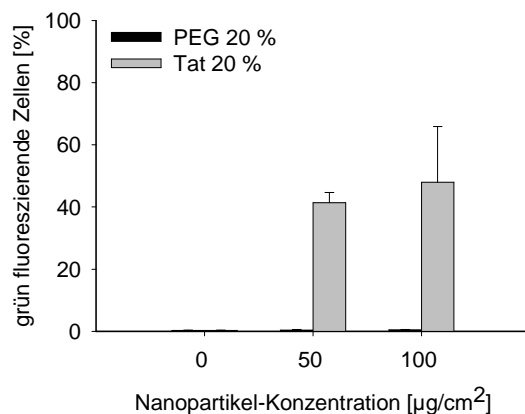
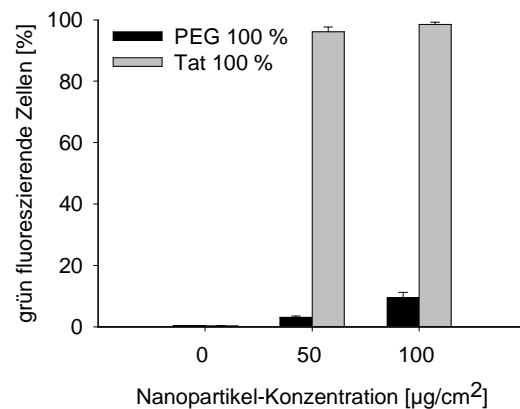
### 3.1.2.3 Tat-modifizierte Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-Nanopartikel

Die Anreicherung von Nanopartikeln im Lysosom sollte vermieden werden, da es dort zur Degradierung bzw. zum Funktionsverlust der inkorporierten Plasmid-DNA kommen kann. Eine Alternative zur Modifizierung mit Rezeptor-spezifischen Liganden bieten zellpenetrierende Peptide (CPP). Sie sind in der Lage durch Porenbildung oder Membraninsertion in die Zelle zu gelangen [87] und umgehen damit die Endosom-Lysosom-Route der Clathrin-vermittelten Endozytose. Daher sollten die GA-qv-NP mit dem CPP Tat (Transaktivator der Transkription) modifiziert werden. Die Bindung des Tat-Peptides an die HSA-NP erfolgte, wie bei den RGD-Peptiden auch, mittels bifunktionaler PEG-Linker. Als Kontrolle zur Tat-vermittelten Internalisierung dienten PEGylierte GA-qv-NP ohne Liganden, da kein äquivalentes Mock-Peptid für Tat bekannt ist. Die physikochemischen Eigenschaften der Tat-modifizierten GA-qv-NP änderten sich im Vergleich zu RGD-modifizierten GA-qv-NP nicht (Tab. 1).

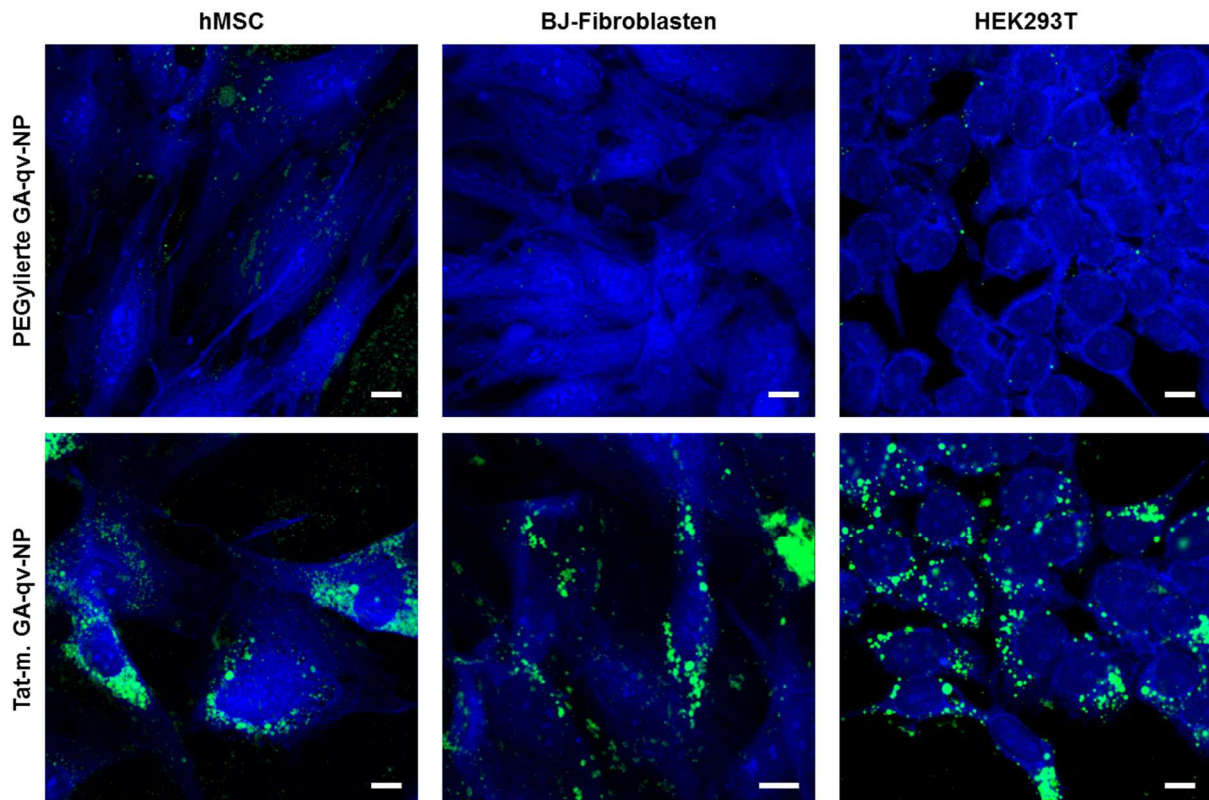
#### In-vitro-Charakterisierung der Tat-modifizierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP

Die Interaktion der Tat-modifizierten GA-qv-NP mit unterschiedlichen Zelltypen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen für 24 h mit Tat-modifizierten 20 % oder 100 % GA-qv-NP inkubiert (Abb. 18). Tat-modifizierte 20 % GA-qv-NP interagierten mit 47,9 % ( $\pm 17,91$ ) der HEK293T-Zellen, allerdings kaum mit hMSC oder BJ-Fibroblasten. Dagegen interagierten Tat-modifizierte 100 % GA-qv-NP mit mindestens 66,2 % ( $\pm 9,2$ ) bzw. 80,7 % ( $\pm 6,2$ ) der drei Zelltypen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Nanopartikel. Im Vergleich führte die Inkubation mit PEGylierten 100 % Glutaraldehyd quervernetzten Kontroll-Nanopartikel bei maximal 11,6 % ( $\pm 12,6$ ) der Zellen zu einer zellulären Interaktion.

Zur detaillierteren Analyse der Interaktion wurden hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 100 % GA-qv-NP inkubiert und mittels CLSM untersucht (Abb. 19). Nach 48 h waren in allen Zelltypen die Nanopartikel perinukleär detektierbar. Inkubation der Tat-modifizierten GA-qv-NP mit BJ-Fibroblasten führte zudem zu vielen Zell-unspezifischen Nanopartikelsignalen. Der Vergleich mit PEGylierten GA-qv-NP zeigte, dass die Modifizierung mit Tat erfolgreich die Interaktion und Internalisierung der HSA-NP mit bzw. in alle(n) drei Zelltypen erhöhte.

**A (hMSC)****B (hMSC)****C (BJ-Fibroblasten)****D (BJ-Fibroblasten)****E (HEK293T-Zellen)****F (HEK293T-Zellen)**

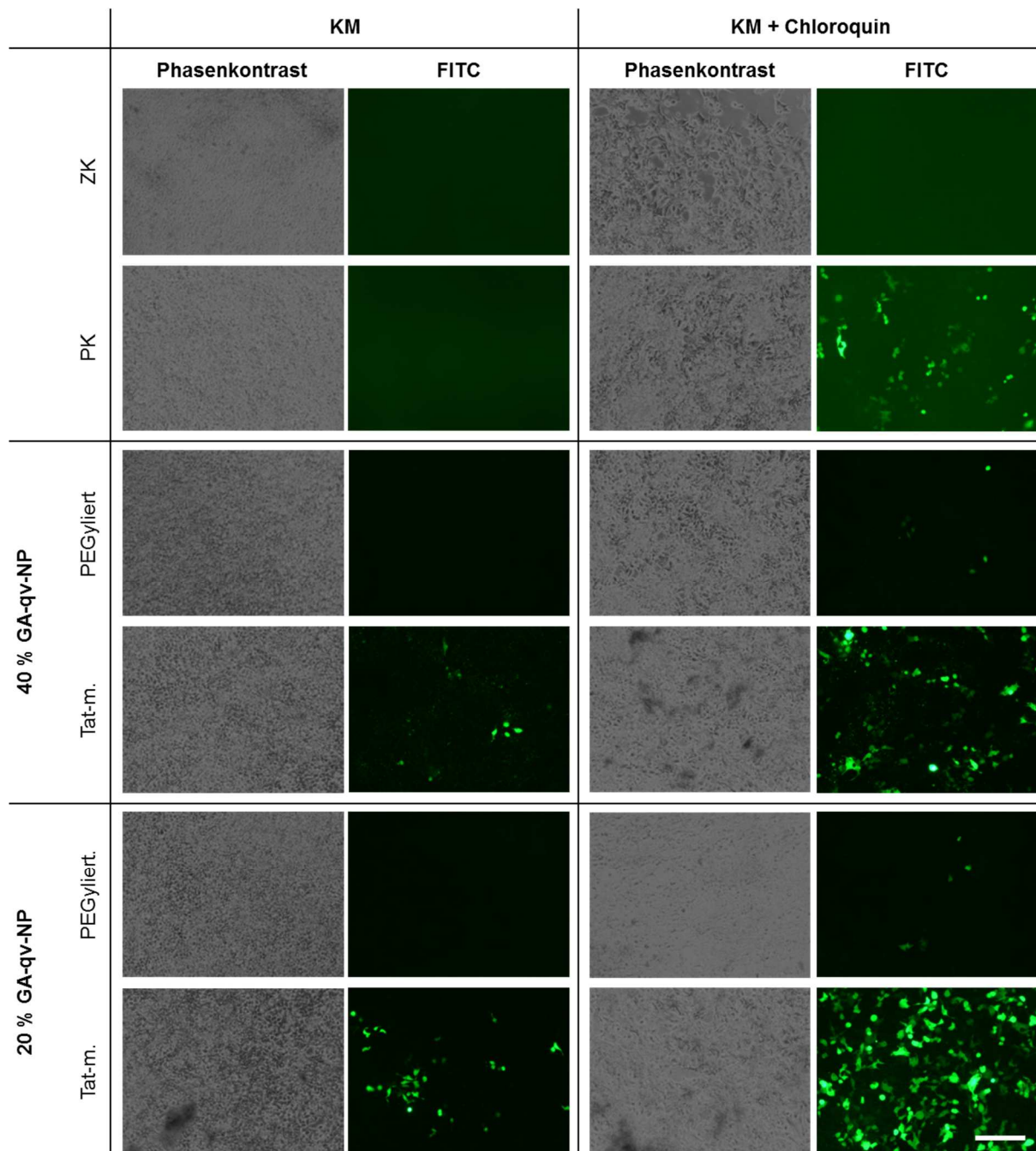
**Abbildung 18: Interaktion Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit Zellen.** Inkubation der hMSC mit Tat-modifizierten (A) 20 % GA-qv-NP (Tat 20 %) bzw. (B) 100 % GA-qv-NP (Tat 100 %). Parallel wurden BJ-Fibroblasten mit Tat-modifizierten (C) 20 % GA-qv-NP bzw. (D) 100 % GA-qv-NP und HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten (E) 20 % GA-qv-NP bzw. (F) 100 % GA-qv-NP inkubiert. Zur Kontrolle wurden äquivalent PEGylierte GA-qv-NP (PEG 20 %, PEG 100 %) mitgeführt. Die Interaktion wurde nach 24 h durchflusszytometrisch untersucht. Die GA-qv-NP wurden anhand ihrer grünen Autofluoreszenz detektiert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).



**Abbildung 19: Aufnahme Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in verschiedene Zelltypen.** CLSM-Analyse von hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit PEGylierten oder Tat-modifizierten 100 % GA-qv-NP inkubiert und anschließend mit CellTracker™blue gefärbt (blau). Die Autofluoreszenz der HSA-NP ist in grün dargestellt. Der Messbalken entspricht 10  $\mu$ m.

#### Funktionale Analysen der Tat-modifizierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP

Tat-modifizierte GA-qv-NP zeigten in Durchflusszytometrie- und CLSM-Analysen eine gute Interaktion und Aufnahme mit den bzw. in die verschiedenen Zelltypen. Ihre Funktionalität zum Gentransfer wurde über Transfektionsstudien untersucht. Da bereits für RGD-modifizierte GA-qv-NP gezeigt wurde, dass ein niedrigerer Quervernetzungsgrad den Gentransport fördert, wurden die HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % und 40 % GA-qv-NP in Kulturmedium mit und ohne Chloroquin inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen parallel mit PEGylierten GA-qv-NP oder freier Plasmid-DNA behandelt. Eine große Anzahl der Zellen, die mit Tat-modifizierten GA-qv-NP inkubiert wurden, zeigten nach 72 h Expression des Reportergens eGFP (Abb. 20). Dabei führt, wie bei RGD-modifizierten GA-qv-NP, die Inkubation mit geringer Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP zu mehr eGFP-exprimierenden Zellen als mit stärker quervernetzten. Zellen, die mit gering quervernetzten Tat-modifizierten GA-qv-NP inkubiert wurden, exprimierten dabei auch in Kultivierungsmedium ohne Chloroquin das Reportergen eGFP. Durch Zugabe von Chloroquin stieg wiederum erheblich die Genexpressionsrate der Zellen, die mit Tat-modifizierten Nanopartikeln inkubiert wurden. Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die mit PEGylierten GA-qv-NP inkubiert wurden, kaum Genexpression und auch die Plasmidkontrolle zeigte deutlich weniger eGFP-exprimierende Zellen.

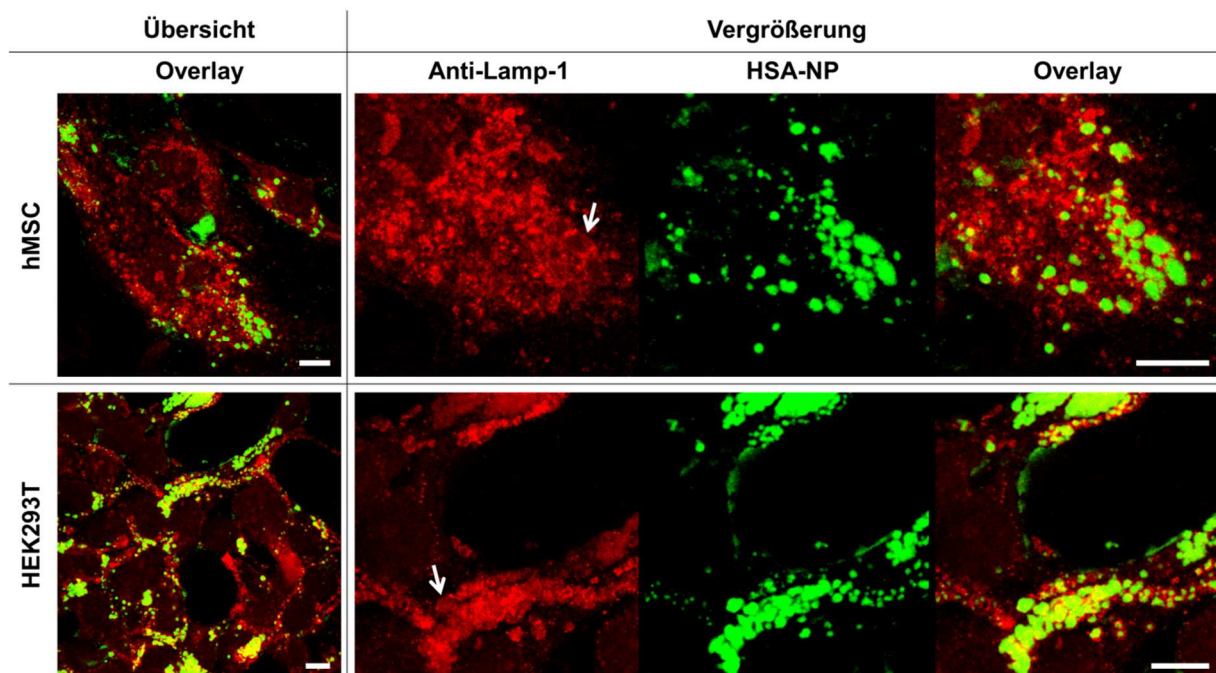


**Abbildung 20: Genexpressionsrate Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in HEK293T-Zellen.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % bzw. 40 % GA-qv-NP in Kultivierungsmedium (KM) mit und ohne 0,1 mM Chloroquin für 24 h. Zur Kontrolle wurden äquivalent PEGylierte GA-qv-NP, eine Plasmidkontrolle (PK) und eine Zellkontrolle (ZK) mitgeführt. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Dokumentation wurde die extrazelluläre HSA-Autofluoreszenz mittels Trypanblau gequenchet. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Inkubation Tat-modifizierter GA-qv-NP in chloroquinhaltigem Medium steigerte die Genexpressionsrate der Zellen. Daher wurde mittels Ko-Lokalisationsanalyse untersucht, ob auch Tat-modifizierte GA-qv-NP von der Zelle im Lysosom eingelagert werden. CLSM-Studien

zeigten, dass nach 48-stündiger Inkubation der hMSC und HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 100 % GA-qv-NP Fluoreszenzsignale der Nanopartikel mit dem der Lysosome ko-lokalisiert werden konnten (Abb. 21).

Die Tat-modifizierten GA-qv-NP waren verglichen mit RGD-modifizierten GA-qv-NP bezüglich der Interaktion mit Zellen und im Gentransfer effektiver. Wie RGD-modifizierte GA-qv-NP auch, akkumulierten die Tat-modifizierte GA-qv-NP im Lysosom, wodurch die Transfektionseffizienz durch den Einsatz von Chloroquin in HEK293T-Zellen erheblich gesteigert werden konnte.



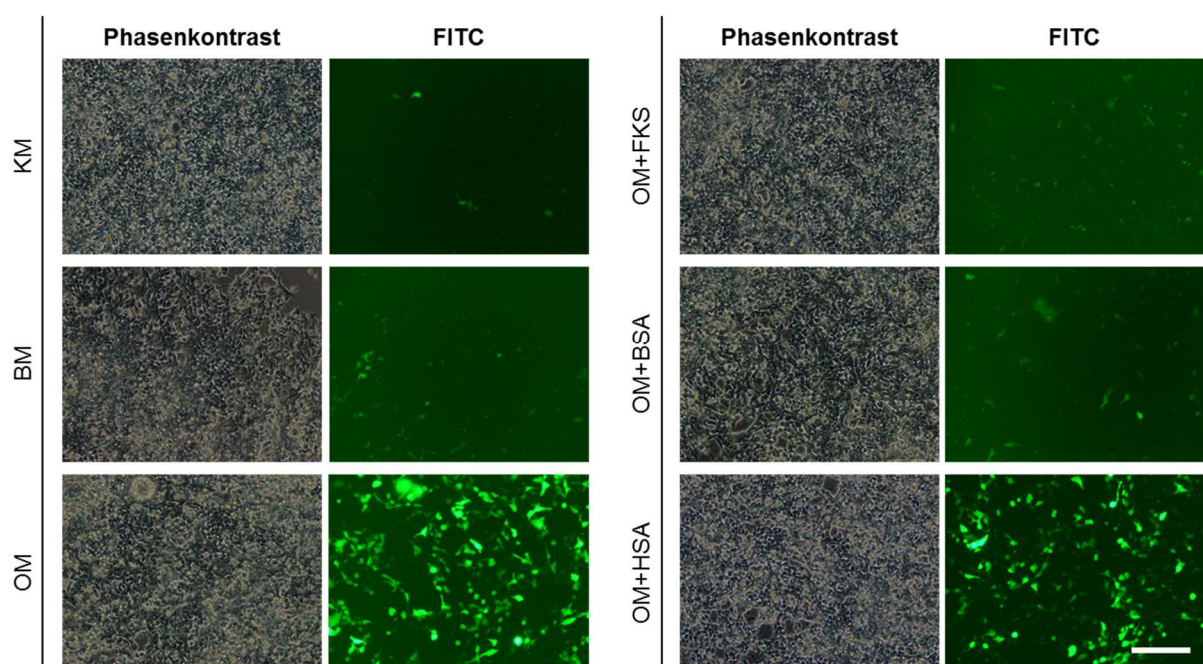
**Abbildung 21: Ko-Lokalisationsanalyse Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP.** Inkubation der hMSC und HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 100 % GA-qv-NP. Immunzytochemische Färbung der Zellen mit Anti-LAMP-1-Antikörper nach 48 h. Ko-Lokalisationsanalyse von GA-qv-NP (grün; Autofluoreszenz) und Anti-LAMP-1 (rot) mittels CLSM. Darstellung des Overlays zur Übersicht sowie eine vergrößerte Ansicht der einzelnen Fluoreszenzen und des Overlays. Die weißen Pfeile markieren Bereiche, in denen die GA-qv-NP angereichert sind. Die Messbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

#### Modulatoren der Genexpressionsrate Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP

Chloroquin übt sich nicht nur positiv auf die Transfektionseffizienz aus, sondern hat auch einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität [105]. Daher sollten weitere Modulatoren der Nanopartikel-vermittelten Transfektion identifiziert werden, um chloroquinfrei eine Erhöhung der Genexpressionsrate zu erreichen.

Es ist bekannt, dass fötales Kälberserum (FKS), welches dem Kultivierungsmedium von Zellen zugesetzt wird, einen negativen Einfluss auf die Transfektionseffizienz Lipid-ver-mittelter Transfektionsmethoden hat [163, 164]. Daher sollte der Einfluss von FKS auf die Transfektionsrate der HSA-NP mittels Genexpressionsanalyse ermittelt werden. Dafür wurden HEK293T-Zellen für 24 h mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in unterschiedlichen Medien

inkubiert: Kultivierungsmedium, Basalmedium (Kultivierungsmedium ohne FKS), OptiMEM®, OptiMEM® mit 10 % FKS, OptiMEM® mit 5 mg/ml BSA oder OptiMEM® mit 5 mg/ml HSA (Abb. 22). Zellen, die mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in Kultivierungs-medium und Basalmedium inkubiert wurden, zeigten kaum Genexpression. Die Nanopartikel-Inkubation in OptiMEM®, einem serumfreien Medium, führte dagegen zu einer großen Anzahl eGFP-exprimierender Zellen. Wurde dem OptiMEM® HSA zugesetzt, reduzierte dies die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen leicht, wurden FKS oder BSA zugesetzt, war keine Genexpression detektierbar. Damit konnte ein negativer Einfluss von FKS und BSA auf die HSA-NP-vermittelte Transfektion gezeigt werden.

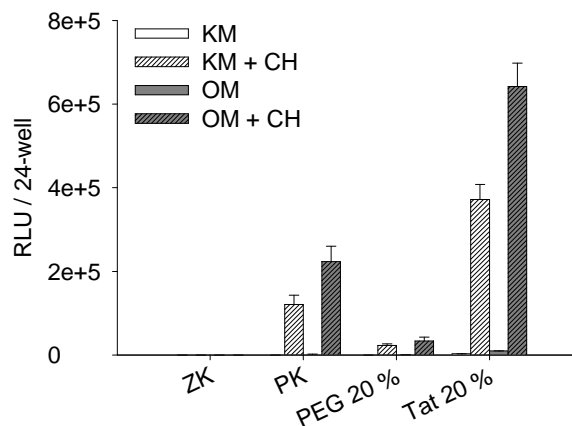


**Abbildung 22: Einfluss von Serum auf die Genexpression Tat-modifizierter Glutaraldehydquervernetzter HSA-NP.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in unterschiedlichen Inkubationsmedien: Kultivierungsmedium (KM), Basalmedium (BM) oder OptiMEM® (OM) bzw. OptiMEM® mit FKS, BSA oder HSA als Zusatz. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluorezenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Nachdem mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP eine effiziente Nanopartikelformulierung identifiziert wurde, sollte die Genexpressionsrate dieser in den optimierten Inkubations-medien mittels Luciferase-Assay quantifiziert werden. Dazu wurde das Plasmid pCMV-LUC in 20 % GA-qv-NP inkorporiert, welches für die Luciferase des *Photinus pyralis* codiert. HEK293T-Zellen wurden mit den Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in OptiMEM® oder Kultivierungsmedium mit und ohne Chloroquin für 72 h inkubiert. Die Analyse der Luciferaseaktivität zeigte, dass sowohl der Zusatz von Chloroquin die Genexpressionsrate der 20 % GA-qv-NP, als auch der freien Plasmid-DNA steigerte (Abb. 23). Die Inkubation der Zellen in

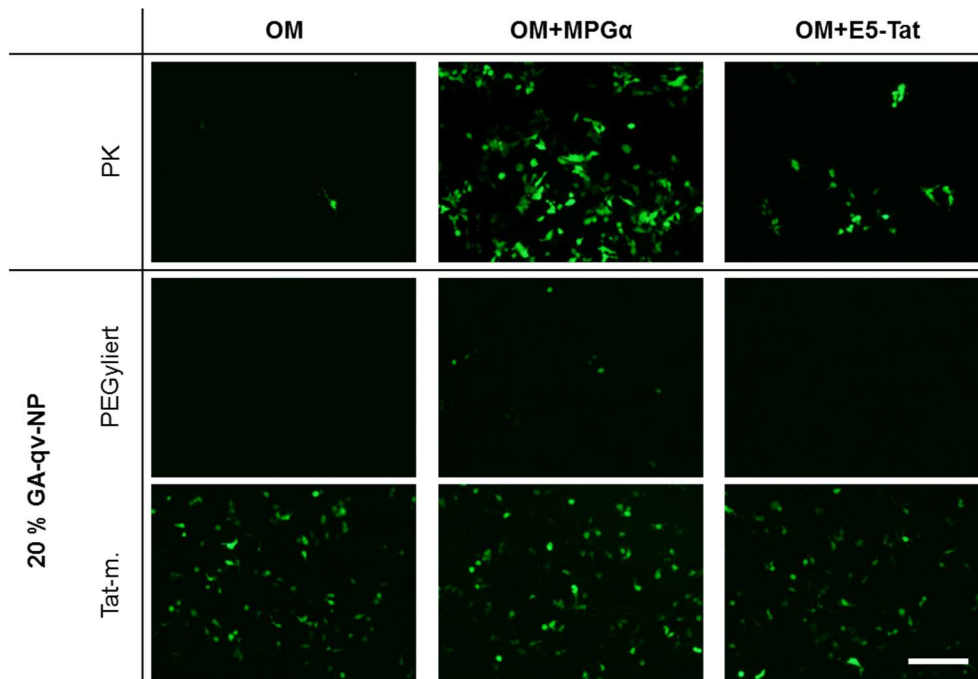


OptiMEM® führte zur spezifischen Erhöhung der Nanopartikel-vermittelten Transfektionsrate. Die Zugabe von Chloroquin in OptiMEM® steigerte die Luciferaseaktivität verglichen mit OptiMEM® ohne Zusatz um das 66-fache, reduzierte aber den spezifischen Einfluss auf die Nanopartikel-vermittelte Transfektion. Der Vorteil der Tat-Modifizierung auf die Genexpressionsrate zeigte sich in allen getesteten Konditionen.



**Abbildung 23: Genexpression Tat-modifizierter 20 % Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in unterschiedlichen Inkubationsmedien.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in Kultivierungsmedium (KM) oder OptiMEM® (OM) mit zusätzlich 0,1 mM Chloroquin (CH) oder ohne. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit Plasmid-DNA (PK) bzw. nur dem Inkubationsmedium (ZK) behandelt. Quantifizierung der Genexpressionsrate mittels Luciferase-Assay 72 h nach Nanopartikel-Inkubation. Die Werte stellen die relative Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) pro 24-Well als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3).

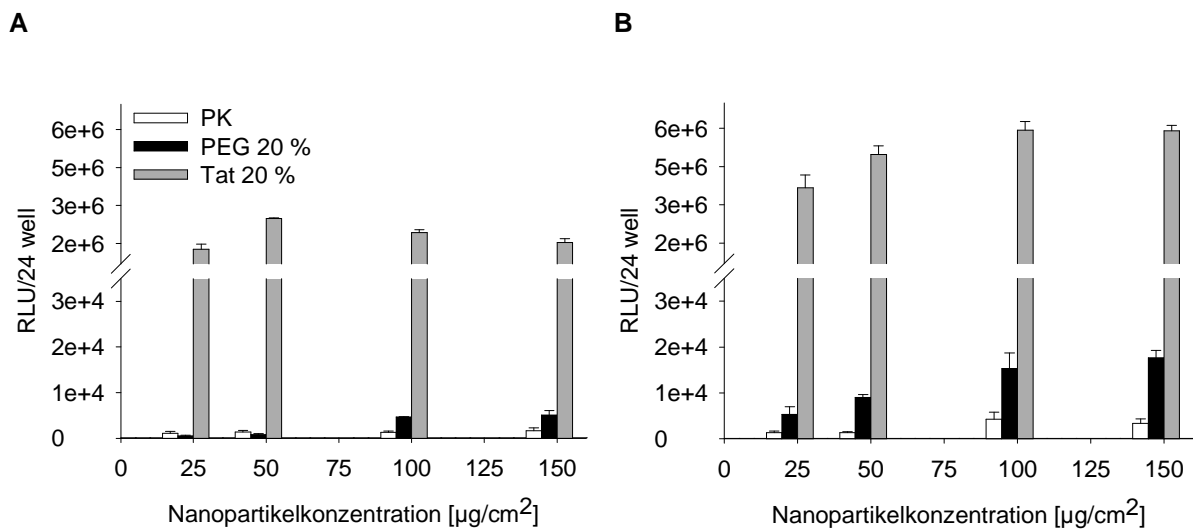
Die Beobachtung, dass die Inkubation in OptiMEM® spezifisch die Nanopartikel-vermittelte Transfektionsrate erhöht, macht es zu einem optimalen Inkubationsmedium für HSA-NP. Daher sollte versucht werden, chloroquinfrei die Genexpressionsrate in OptiMEM® zu steigern. Dazu wurden bekannte Modulatoren der Transfektionseffizienz als Zusatz in OptiMEM® getestet. Fluoreszenzmikroskopische Analysen nach Inkubation von HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in OptiMEM mit zusätzlich TNF $\alpha$  (15 ng/ml), IFN $\gamma$  (15 ng/ml) oder Ca<sup>2+</sup> (2.5 mM) zeigten allerdings keine Erhöhung der Gen-expressionsrate (Daten nicht gezeigt). Die Zell-penetrierenden Peptide MPG $\alpha$  (2  $\mu$ M) und E5-Tat (2  $\mu$ M), die mit Tat-modifizierten GA-qv-NP, PEGylierten GA-qv-NP und freier Plasmid-DNA in OptiMEM® ko-inkubiert wurden, steigerten zumindest die Transfektions-effizienz der freien Plasmid-DNA. Die Transfektionsrate der Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP blieb aber unverändert (Abb. 24). Die PEGylierten GA-qv-NP führten nur nach Inkubation in OptiMEM® mit zusätzlich MPG $\alpha$  vereinzelt zu eGFP-exprimierenden Zellen. Damit wurde durch Ko-Inkubation mit den getesteten Modulatoren bzw. Peptiden keine Steigerung der Genexpressionsrate Tat-modifizierter 20 % GA-qv-NP in OptiMEM® erreicht.



**Abbildung 24: Einfluss von MPG $\alpha$  und E5-Tat auf die Genexpression Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in OptiMEM® (OM) mit zusätzlich MPG $\alpha$  oder E5-Tat. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Plasmid-DNA (PK) in OptiMEM® mit zusätzlich MPG $\alpha$  oder E5-Tat inkubiert. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Da auf dem intrazellulären Weg zum Zellkern ein Großteil der Plasmid-DNA degradiert wird [165], kann neben der Zusammensetzung des Inkubationsmediums die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA erheblichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben. Daher sollte mit der zuvor etablierten Kombination aus Nanopartikelformulierung und Inkubationsmedium die kritische Plasmid-Menge für eine erfolgreiche HSA-NP-vermittelte Transfektion ermittelt werden. Im Fall der HSA-NP gibt es zwei Möglichkeiten die eingesetzte Plasmidmenge zu variieren. Zum einen wurden Nanopartikel hergestellt, in die unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA inkorporiert wurden, zum anderen wurden unterschiedliche Konzentrationen dieser Nanopartikel zur Transfektion eingesetzt. HEK293T-Zellen wurden in OptiMEM® mit den unterschiedlichen 20 % GA-qv-NP in verschiedenen Konzentrationen (25, 50, 100 bzw. 150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) inkubiert und die Genexpressionsrate nach 72 h mittels Luciferase-Assay quantifiziert. Zellen, die mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP mit der einfachen inkorporierten Plasmidmenge inkubiert wurden, zeigten eine Konzentrations-abhängige Genexpressionsrate, mit einem Maximum bei 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Nanopartikel (Abb. 25 A). Die Erhöhung der Nanopartikel-Konzentration führte zu einer Abnahme der Genexpressionsrate. Dagegen zeigte die Inkubation der Nanopartikel mit der doppelten inkorporierten Plasmid-menge eine 1,5-mal so hohe Luciferaseaktivität, die erst ab einer Nanopartikel-Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

stagnierte (Abb. 25 B). Daraus lässt sich schließen, dass das Inkorporieren von einer erhöhten Plasmidmenge sich positiv auf die Genexpressionsrate auswirkt.



**Abbildung 25: Einfluss der inkorporierten DNA-Menge auf die Genexpression Tat-modifizierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP.** HEK-293T-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50, 100, 150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Tat-modifizierter 20 % GA-qv-NP (Tat 20 %) in OptiMEM® inkubiert. **(A)** 100  $\mu\text{g}$  Plasmid (pCMV-Luc) pro mg HSA inkorporiert. **(B)** 200  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro mg HSA inkorporiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit Plasmid-DNA (PK) bzw. PEGylierten 20 % GA-qv-NP (PEG 20 %) behandelt. Die Genexpressionsrate wurde nach 72 h mittels Luciferase-Assay analysiert. Die Werte stellen die relative Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) pro 24-Well als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).

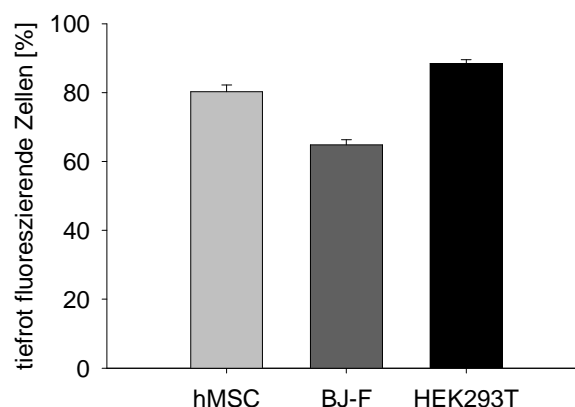
### 3.1.3 Hitze-quervernetzte HSA-Nanopartikel

Der Einfluss der Quervernetzung der HSA-NP auf die Transfektionseffizienz wurde anhand der unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP deutlich. Dabei erwies sich ein geringerer Glutaraldehyd-Vernetzungsgrad für den Gentransport in HEK293T-Zellen als förderlich. Da die Effizienz der GA-qv-NP, besonders unter chloroquinfreien Bedingungen, steigerbar ist, die Glutaraldehyd-Quervernetzung aber nicht mehr weiter reduziert werden konnte, sollte eine alternative Stabilisierungsmethode für HSA-NP etabliert und getestet werden. Die Stabilisierung der HSA-NP mittels Hitze stellt im Vergleich zu Glutaraldehyd zudem eine attraktive Alternative dar, da komplett auf toxische Reagenzien verzichtet werden kann. Die In-vitro-Charakterisierung der DNA-beladenen Hitze-quervernetzten HSA-NP (H-qv-NP) sollte dem Vergleich mit GA-quervernetzten HSA-NP dienen, um eine effiziente Nanopartikelformulierung zum Gentransfer zu ermitteln.

#### 3.1.3.1 Unmodifizierte Hitze-quervernetzte HSA-Nanopartikel

##### In-vitro-Charakterisierungen der Hitze-quervernetzten HSA-NP

H-qv-NP haben keine Glutaraldehyd-vermittelte Autofluoreszenz. Um die Interaktion mit Zellen analysieren zu können, wurden PF633-markierte H-qv-NP hergestellt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Interaktion der PF633-markierten H-qv-NP mit hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 26). Die PF633-markierten H-qv-NP zeigten eine Interaktion mit mindestens 64,9 % ( $\pm 1,5$ ) der Zellen und sind somit bezüglich ihrer Interaktion mit unmodifizierten 100 % Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikel vergleichbar (66,6 %  $\pm 2,9$ ; siehe Abschnitt 3.1.2.1).



**Abbildung 26: Interaktion PF633-markierter Hitze-quervernetzter HSA-NP mit Zellen.** Inkubation der hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PromoFluor633-markierter H-qv-NP. Nach 24 h durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl tiefrot fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).

### 3.1.3.2 Tat-modifizierte Hitze-quervernetzte HSA-Nanopartikel

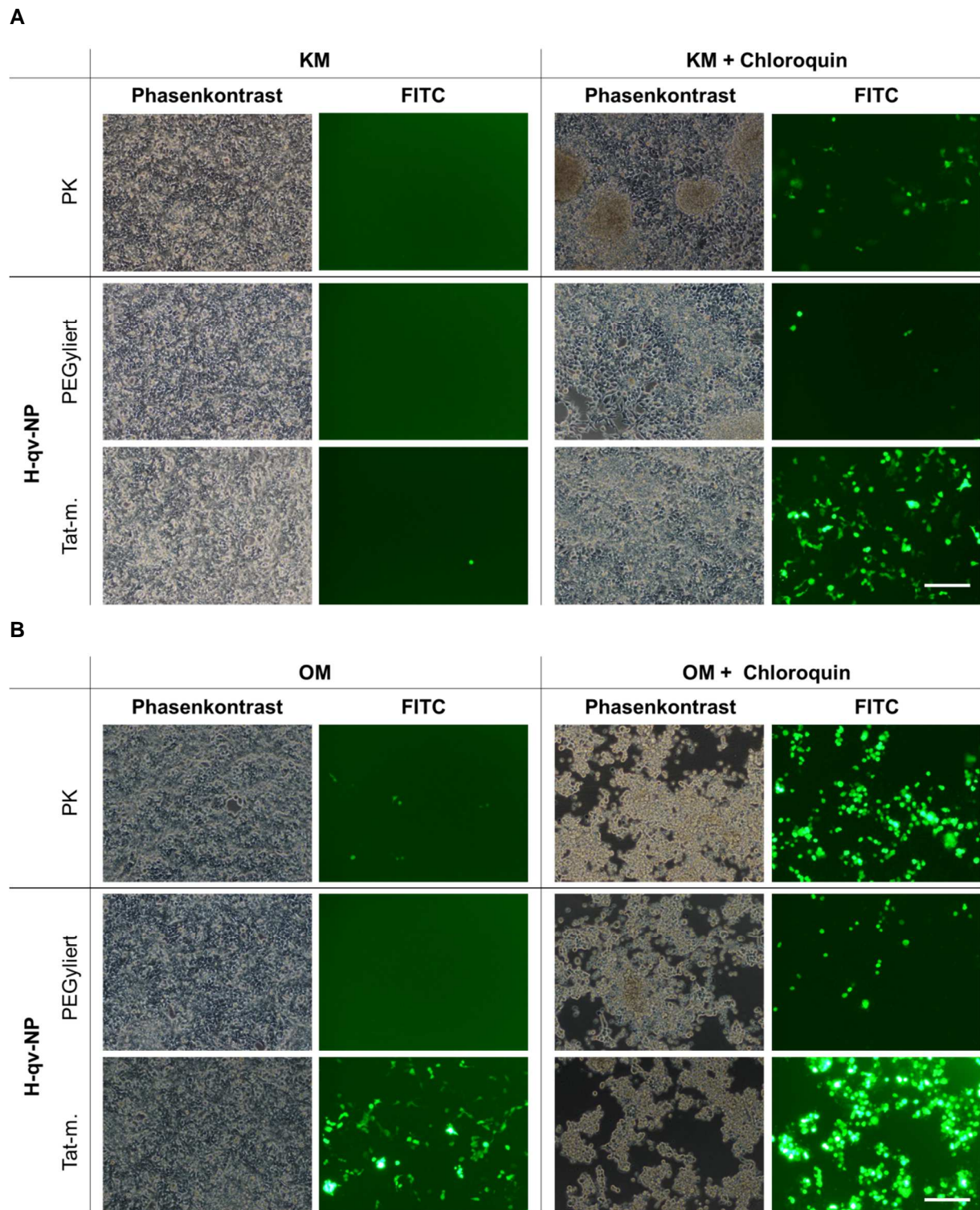
Ebenso wie die GA-qv-NP, wurden die H-qv-NP zur verbesserten Internalisierung mit Liganden modifiziert. Die H-qv-NP wurden mit Tat-Peptiden modifiziert, da diese im Vergleich zur Modifizierung mit RGD-Peptiden einen effizienteren Gentransfer bewirkten. Die Markierung der Tat-modifizierten H-qv-NP mit PF633 war nicht erfolgreich, weshalb die Analyse der Interaktion Tat-modifizierter H-qv-NP mit Zellen nicht möglich war. Da aber bereits unmodifizierte PF633-markierte H-qv-NP eine gute Interaktion mit den Zellen zeigten und sich die physikochemischen Eigenschaften der Tat-modifizierten H-qv-NP im Vergleich zu Tat-modifizierten GA-qv-NP nicht änderten, wurde direkt die Effizienz der Tat-modifizierten H-qv-NP zum Gentransfer analysiert.

#### Funktionale Analysen der Tat-modifizierten Hitze-quervernetzten HSA-NP

Das wichtigste Kriterium von Gentransfersystemen ist ihre Transfektionseffizienz. Zur Analyse der Effizienz der Tat-modifizierten H-qv-NP wurden diese mit HEK293T-Zellen in Kultivierungsmedium mit bzw. ohne Chloroquin inkubiert. Nach 72 h wurde die eGFP-Expression der behandelten Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die Inkubation Tat-modifizierter H-qv-NP in Kultivierungsmedium ohne Chloroquin führte in sehr wenigen Zellen zur Expression des eGFP (Abb. 27 A, links). Chloroquin-Zugabe hingegen erhöhte die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen der Tat-modifizierten H-qv-NP erheblich, auch der Plasmidkontrolle oder PEGylierter H-qv-NP (Abb. 27 A, rechts). Durch die Inkubation Tat-modifizierter H-qv-NP in OptiMEM® konnte auch ohne Chloroquin-Zusatz eine moderate Anzahl der Zellen zur eGFP-Expression gebracht werden (Abb. 27 B, links). Die Inkubation in OptiMEM® nach Chloroquin-Zugabe führte zur höchsten Anzahl eGFP exprimierender Zellen (Abb. 27 B, rechts).

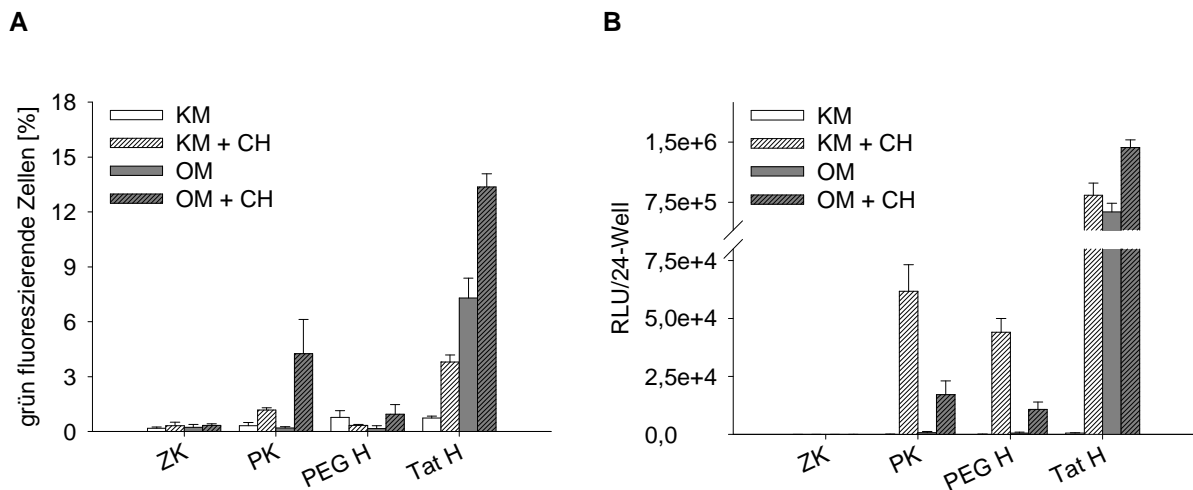
Die Quantifizierung der Transfektionseffizienz Tat-modifizierter H-qv-NP in unterschiedlichen Inkubationsmedien mittels Durchflusszytometrie bestätigte die Ergebnisse der qualitativen Analyse (Abb. 28 A). Die Modifizierung mit dem Peptid Tat erhöhte in Kultivierungsmedium mit Chloroquin, wie auch in OptiMEM® mit und ohne Chloroquin, die Genexpressionsrate der H-qv-NP. Dabei war die Inkubation der Tat-modifizierten H-qv-NP in OptiMEM® mit 7,3 % ( $\pm 1,09$ ) eGFP-exprimierenden Zellen höher als in chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium mit 3,8 % ( $\pm 0,38$ ). Inkubation in chloroquinhaltigem OptiMEM® führte mit 13,4 % ( $\pm 0,71$ ) zur höchsten Transfektionseffizienz. Dagegen exprimierten maximal 4,3 % ( $\pm 1,9$ ) der Zellen, die in chloroquinhaltigem OptiMEM® mit Plasmid-DNA behandelt wurden, das Reportergen eGFP.



**Abbildung 27: Genexpressionsrate Tat-modifizierter Hitze-quervernetzter HSA-NP in HEK293T-Zellen.** (A) Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten H-qv-NP in Kultivierungsmedium (KM) mit bzw. ohne 0,1 mM Chloroquin für 24 h. Zur Kontrolle wurden PEGylierte H-qv-NP sowie eine Plasmidkontrolle (PK) mitgeführt. (B) Parallel wurden HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten H-qv-NP in OptiMEM® (OM) inkubiert. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Die Messbalken entsprechen 200 µm.

Zum Vergleich der Transfektionseffizienz beider HSA-Formulierungen wurden Tat-modifizierte H-qv-NP mit inkorporiertem pCMV-Luc-Plasmid hergestellt. Die Quantifizierung der Transfektionseffizienz der Tat-modifizierten H-qv-NP mit inkorporiertem Luciferase-Reporter gen erfolgte nach 72 h mittels Luciferase-Assay (Abb. 28 B). Die Inkubation der HEK293T-Zellen mit H-qv-NP in Kultivierungsmedium ohne Zusätze zeigte kaum detektierbare Luciferaseaktivität. Die Tat-modifizierten H-qv-NP zeigten eine gute Transfektionseffizienz in chloroquinhaltigem Medium sowie in OptiMEM®. Die Luciferaseaktivität der Plasmidkontrolle war im Vergleich zu Tat-modifizierten H-qv-NP deutlich geringer. Auffällig war, dass die Inkubation in OptiMEM® nur die Genexpressionsrate der Tat-modifizierten H-qv-NP erhöhte.

Damit sind die H-qv-NP in ihrer Effizienz zum Gentransport mit 20 % GA-qv-NP vergleichbar.



**Abbildung 28: Genexpression Tat-modifizierter Hitze-quervernetzter HSA-NP.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten H-qv-NP (Tat H) in Kultivierungsmedium (KM) bzw. OptiMEM® (OM) mit oder ohne 0,1 mM Chloroquin (CH). Zur Kontrolle wurden äquivalent PEGylierte GA-qv-NP (PEG H), eine Plasmidkontrolle (PK) und eine Zellkontrolle (ZK) mitgeführt. **(A)** Tat-modifizierte H-qv-NP (Tat H) mit inkorporiertem peGFP-N1-Plasmid: Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP durchflusszytometrisch analysiert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ). **(B)** Tat-modifizierte H-qv-NP mit inkorporiertem pCMV-Luc-Plasmid: Quantifizierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay nach 72 h. Die Werte stellen die relative Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) pro 24-Well als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).

### 3.1.4 Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-Nanopartikel

Neben der Quervernetzung mittels Glutaraldehyd oder Hitze können HSA-NP über Disulfidbrücken stabilisiert werden [138]. Die Stabilisierung über Disulfidbrücken hat, wie die Quervernetzung mittels Hitze, den Vorteil, dass bei der Herstellung auf Glutaraldehyd verzichtet werden kann, wodurch die Biokompatibilität der Nanopartikel gesteigert wird. Zudem können Disulfidbrücken im Zytoplasma reduziert werden, was die Biodegradierbarkeit der HSA-NP erhöhen sollte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Herstellung Plasmid-beladener Disulfidbrücken-stabiler HSA-NP (D-qv-NP) etabliert und als alternative Quervernetzungs-Methode für HSA-NP zum Gentransfer evaluiert.

#### 3.1.4.1 Etablierung Disulfidbrücken-stabiler HSA-Nanopartikel

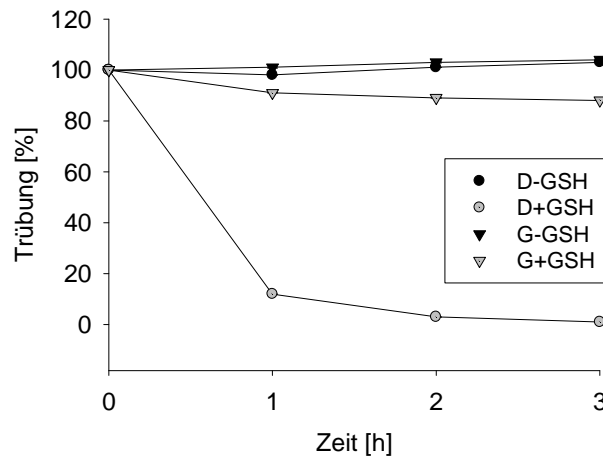
##### Physikochemische Charakterisierung der Disulfidbrücken-stabilisierten HSA-NP

Zur Herstellung der D-qv-NP wurden in einem ersten Schritt die Disulfidbrücken der HSA-Moleküle mittels Glutathion (GSH) reduziert. Nach der Nanopartikel-Präzipitation wurde das GSH wieder entzogen, wodurch sich die Disulfidbrücken zurückbilden konnten und die Nanopartikel-Struktur stabilisierte. Zur Kontrolle wurden D-qv-NP ohne GSH hergestellt. Unter diesen Bedingungen konnten keine stabilen HSA-NP ausgebildet werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Verifizierung, dass die D-qv-NP über Disulfidbrücken stabilisiert werden, wurde ihre Löslichkeit nach Zugabe reduzierender Reagenzien untersucht. Als solches wurde wieder GSH eingesetzt. HSA-NP führen in Suspension zu einer Trübung, die sich verringert, wenn die Nanopartikel degradiert werden. Photometrische Analysen der D-qv-NP-Suspension zeigten wenige Stunden nach GSH-Zugabe eine Reduzierung der Trübung. (Abb. 29). Bereits nach 30 min war die Trübung um die Hälfte reduziert und nach 3 h war keine Trübung mehr detektierbar, was auf eine GSH-vermittelte Degradierung der D-qv-NP schließen ließ.

Damit konnte die erfolgreiche Etablierung D-qv-NP gezeigt werden. Zudem lässt die erfolgreiche Reduzierung der Disulfidbrücken der DS-qv-NP auf eine gute Biodegradierbarkeit und eine damit einhergehende intrazelluläre Plasmidfreisetzung schließen, welche sich positiv auf die Genexpressionsrate auswirken sollte.





**Abbildung 29: Etablierung Disulfidbrücken-stabilsierter HSA-NP.** Mittels Trübungsmessung bei 690 nm im Photometer wurde die Stabilität bzw. die Degradierung der D-qv-NP nach Zugabe von 0,1 M GSH über 3 h verfolgt (D+GSH). Zur Kontrolle wurden D-qv-NP ohne GSH (Negativkontrolle; D-GSH) und parallel 100 % Glutaraldehyd-quervernetzte Nanopartikel inkubiert (G+GSH, G-GSH). Nach Abzug der Absorptionswerte von destilliertem Wasser wurden die Messergebnisse für die jeweiligen Proben als statistische Mittelwerte bestimmt. Die Reduktion der Trübung der Proben wird als relativer Wert im Verhältnis zur jeweiligen Negativkontrolle (100 %) angegeben.

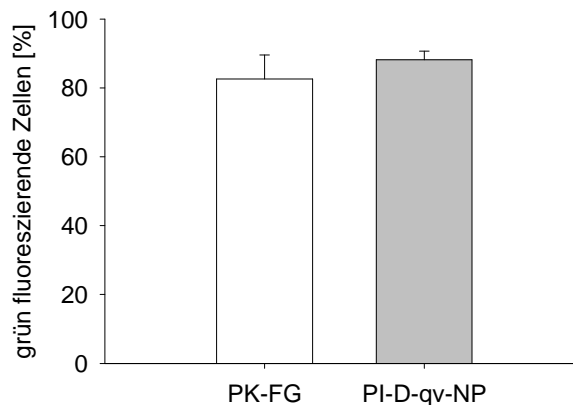
Ein wichtiges Kriterium zur Internalisierung von Nanopartikeln ist ihre Größe. Dabei werden kleinere Nanopartikel effizienter von Zellen aufgenommen als große [93]. Charakterisierungen von D-qv-NP mittels Zetasizer zeigten, dass die eingesetzte HSA-Konzentration erheblichen Einfluss auf die Partikelgröße der D-qv-NP hat (Tab. 8).

**Tabelle 8:** Physikochemische Charakterisierung Disulfidbrücken-stabilsierter HSA-NP. D-qv-NP mit einer HSA-Konzentration von 10 mg/ml, 20 mg/ml und 30 mg/ml wurden hergestellt. Größe und Zetapotential wurden im Zetasizer bestimmt, die Ausbeute mittels Bradford-Assay bestimmt. (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD); n = 3)

HSA-Konz. [mg/ml]	10	20	30
<b>Partikelgröße [nm]</b>	82,4	120,8	146,1
(MW $\pm$ SD)	$\pm 4,8$	$\pm 4,9$	$\pm 0,7$
<b>Ausbeute [%]</b>	88,5	75,44	65,6
(MW $\pm$ SD)	$\pm 3,5$	$\pm 3,9$	$\pm 10,6$
<b>Zetapotential [mV]</b>	13,2	12,5	15,6
(MW $\pm$ SD)	$\pm 2,0$	$\pm 2,3$	$\pm 1,2$

Mit steigender HSA-Konzentration wurden die D-qv-NP größer. Die kleinsten D-qv-NP (82,4 nm  $\pm$  4,8) wurden mit 10 mg/ml eingesetzter HSA-Konzentration erreicht. Dagegen sank mit ansteigender HSA-Konzentration von 10 mg/ml auf 30 mg/ml die Ausbeute von 88,5 % ( $\pm$  3,5 %) auf 65,6 % ( $\pm$  10,6 %) (Tab. 8). Das Zetapotenzial der D-qv-NP blieb unabhängig von der initialen HSA-Konzentration konstant bei durchschnittlich 13,8 mV ( $\pm$  1,6). Damit sind D-qv-NP etwa gleich groß wie GA- und H-qv-NP, weisen allerdings in dH<sub>2</sub>O ein positives Zetapotenzial auf.

Nach Etablierung des Herstellungsprotokolls für D-qv-NP wurden Plasmid-beladene D-qv-NP zum Gentransfer hergestellt. Bevor diese in Transfektionsstudien eingesetzt wurden, sollte die Funktionalität der inkorporierten Plasmide überprüft werden. Hierzu wurden die Plasmide aus den D-qv-NP isoliert und anschließend HEK293T-Zellen mit diesen transfiziert (Abb. 30). Mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung wurde im Vergleich zu Plasmiden, die nicht in Nanopartikel inkorporiert wurden, keine Reduktion der Genexpressionsrate der aus D-qv-NP isolierten Plasmide festgestellt.



**Abbildung 30: Funktionalität der Plasmid-DNA nach Inkorporierung in Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-NP.** Die Plasmide wurden mittels DNeasy Blood & Tissue Kit aus D-qv-NP isoliert. Mittels FuGene® HD-Transfektion wurden HEK-293T-Zellen mit den isolierten Plasmiden (PI-D-qv-NP) sowie zuvor nicht inkorporierten Plasmiden (PK-FG) transfiziert. Die Genexpressionsrate der Zellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischer Mittelwert mit Standardabweichung (n = 3).

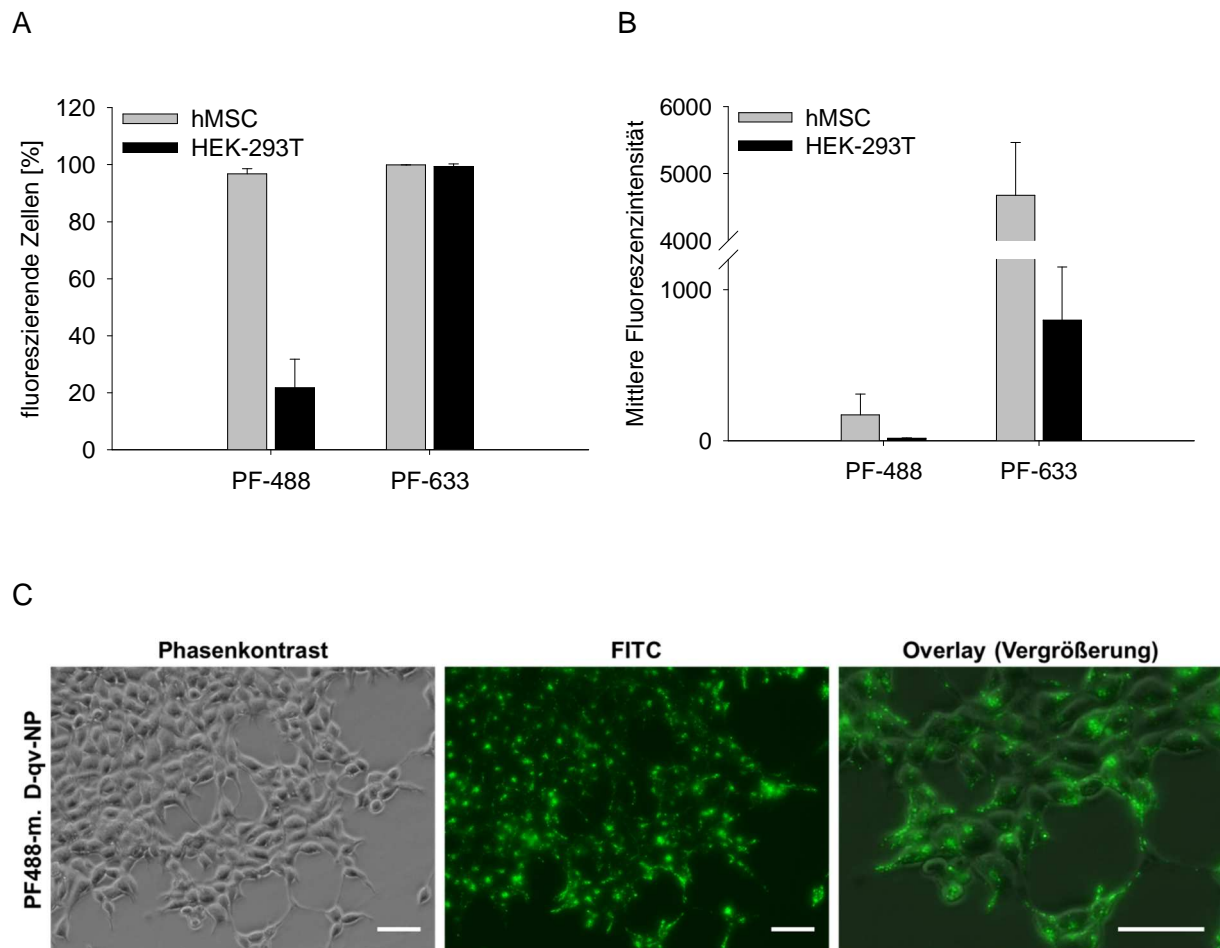
#### In-vitro-Charakterisierung Disulfidbrücken-stablisierter HSA-NP

Mittels durchflusszytometrischen Analysen sollte die Interaktion der unmodifizierten D-qv-NP mit Zellen analysiert werden. Da D-qv-NP keine Autofluoreszenz besitzen, wurden sie mit PF488 oder PF633 markiert.

Nach 24-stündiger Inkubation zeigten alle analysierten hMSC eine Interaktion mit den PF488- oder PF633-markierten D-qv-NP (Abb. 31 A). Dagegen zeigten nur 21,8 % ( $\pm 10,0$ ) der HEK293T-Zellen eine Interaktion mit PF488-markierten D-qv-NP, während 99,3 % ( $\pm 0,9$ ) der HEK293T-Zellen positiv für PF633-markierte D-qv-NP waren. Anhand der Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) konnte auch eine Differenz bezüglich der Interaktion unterschiedlich PF-markierter D-qv-NP mit hMSC festgestellt werden (Abb. 31 B). Die MFI der hMSC nach Inkubation mit PF633-markierten D-qv-NP war 27-mal höher als mit PF488-markierten D-qv-NP. Zudem konnte festgestellt werden, dass hMSC nach Inkubation mit PF633-markierten D-qv-NP im Vergleich zu HEK293T-Zellen eine im Mittel 6-mal so hohe Fluoreszenzintensität hatten.

Zur detaillierten Analyse wurden hMSC und HEK293T-Zellen mit PF488-markierten D-qv-NP inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 31 C). Nach Quenchen der

extrazellulären Fluoreszenz mittels Trypanblau konnten in jeder Zelle internalisierte PF488-markierte D-qv-NP detektiert werden. Demnach zeigten bereits unmodifizierte D-qv-NP eine sehr gute Interaktion mit den unterschiedlichen Zelltypen.



**Abbildung 31: Interaktion PromoFluor-markierter Disulfid-stabilisierter HSA-NP mit Zellen.** Inkubation der hMSC und HEK293T-Zellen mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  PromoFluor(PF)488 bzw. PF633-markierten D-qv-NP. Nach 24 h durchflusszytometrische bzw. fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen. **(A)** Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün bzw. tiefrot fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar ( $n = 3$ ). **(B)** Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung ( $n = 3$ ). **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der HEK293T nach Inkubation mit PF488-markierten D-qv-NP nach Trypanblau-Quenchen. Die Messbalken entsprechen  $100 \mu\text{m}$ .

### 3.1.4.2 Tat-modifizierte Disulfidbrücken-stabilisierte HSA-Nanopartikel

Die Plasmid-beladenen D-qv-NP wurden mit Tat-Liganden modifiziert, um ihre Effizienz zum Gentransport mit den Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten HSA-NP vergleichen zu können.

### Physikochemische Charakterisierungen Tat-modifizierter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP

Zur Modifizierung der D-qv-NP wird, wie bei GA- und H-quervernetzten HSA-NP, in einem ersten Schritt die Nanopartikeloberfläche mit bifunktionalen PEG-Linkern abgesättigt. Durch

Kopplung des Tat-Peptides an den PEG-Linker wird eine spezifische Interaktion des Nanopartikel über den Liganden an der Zelle erreicht. Aufgrund der Länge des PEG-Linkers und des Liganden waren Tat-modifizierte D-qv-NP durchschnittlich 40 nm größer als unmodifizierte D-qv-NP (Tab. 9). Zudem verschob sich das Zetapotential der D-qv-NP nach Modifizierung mit dem Tat-Peptid von 9,7 mV ( $\pm 3,1$ ) auf -7,6 mV ( $\pm 3,1$ ).

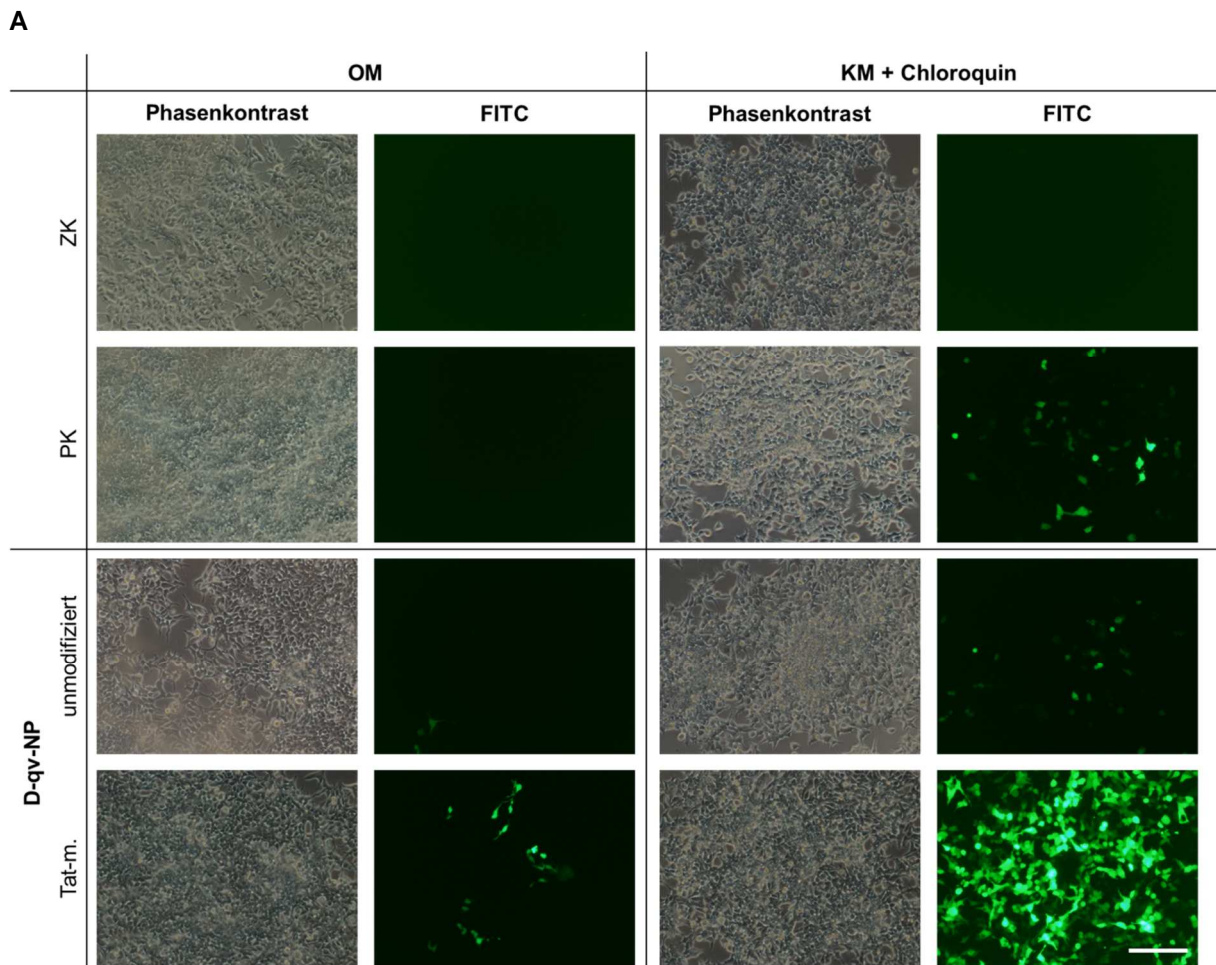
**Tabelle 9:** Physikochemische Charakterisierung Tat-modifizierter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP. Größe und Zetapotential der unmodifizierten und Tat-modifizierten D-qv-NP wurden im ZetaSizer ermittelt. (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD); n = 3)

HSA-Modifizierung	unmod.	Tat
<b>Partikelgröße [nm]</b> (MW $\pm$ SD)	167,0 $\pm 10,5$	207,0 $\pm 11,0$
<b>Zetapotential [mV]</b> (MW $\pm$ SD)	9,7 $\pm 3,1$	-7,6 $\pm 10,9$

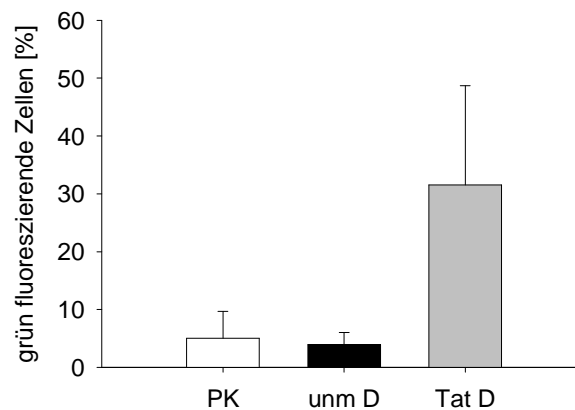
Das erfolgreiche Modifizieren der D-qv-NP mit Tat-Peptiden wurde mittels immunzytochemischer Färbung mit Antikörpern, die gegen Tat und HSA gerichtet sind, untersucht. CLSM-Analysen zeigten, dass in Zellen, die mit Tat-modifizierten D-qv-NP inkubiert wurden, die Fluoreszenzsignale der Tat-Peptide mit denen des HSA ko-lokalisiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

#### Funktionale Analysen der Tat-modifizierter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP

Im Folgenden sollte die Effizienz der Tat-modifizierten D-qv-NP zum Gentransfer ermittelt werden. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten D-qv-NP in chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium und in OptiMEM® inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch bezüglich ihrer eGFP-Expression untersucht (Abb. 32 A). Zellen, die mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Tat-modifizierter D-qv-NP inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu welchen, die mit der freien Plasmid-DNA oder unmodifizierten D-qv-NP behandelt wurden, verstärkt eine Expression des eGFP. Dabei war die Inkubation in chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium für die Transfektionseffizienz förderlicher als in OptiMEM®. Die Genexpressionsrate der Zellen, die in chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium inkubiert wurden, wurde im Durchflusszytometer quantifiziert (Abb. 32 B). Dabei führte die Inkubation von Tat-modifizierten D-qv-NP in 31,5 % ( $\pm 17,2$ ) der Zellen zur Expression des eGFP. Unmodifizierte D-qv-NP sowie freie Plasmid-DNA lagen mit weniger als 5 % deutlich darunter.



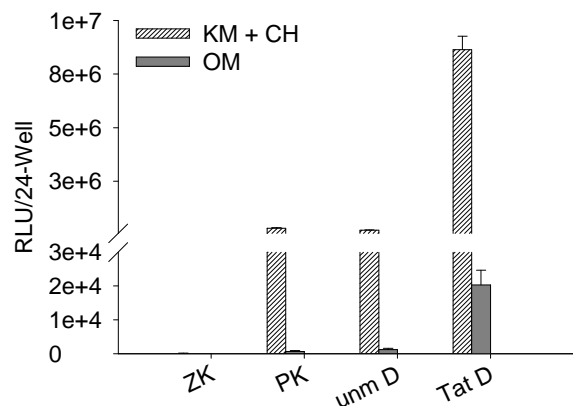
**B**



**Abbildung 32: Genexpression des eGFP Tat-modifizierter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten D-qv-NP (peGFP-N1-Plasmid inkorporiert) in OptiMEM® (OM) bzw. Kultivierungsmedium (KM) mit 0,1 mM Chloroquin für 24 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit unmodifizierten D-qv-NP, Plasmid-DNA (PK) oder nur dem jeweiligen Medium (ZK) inkubiert. **(A)** Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenz-mikroskopisch dokumentiert. Der Messbalken entspricht 200 µm. **(B)** Nach 72 h durchfluss-zytometrische Analyse der Zellen, die mit D-qv-NP in Kultivierungsmedium mit Chloroquin inkubiert wurden. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen nach Abzug der Zellkontrolle als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3). Unmodifizierte D-qv-NP (unm D), Tat-modifizierte D-qv-NP (Tat D).

Zur Vergleichbarkeit der Transfektionseffizienz aller HSA-Formulierungen wurden Tat-modifizierte D-qv-NP mit inkorporiertem pCMV-Luc-Plasmid hergestellt. HEK293T-Zellen wurden mit den Tat-modifizierten D-qv-NP in OptiMEM® und chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium inkubiert und nach 72 h die Luciferaseaktivität ermittelt (Abb. 33). Die Inkubation der Zellen mit D-qv-NP in OptiMEM® zeigte dabei eine kaum detektierbare Luciferaseaktivität. Dagegen führten Tat-modifizierte D-qv-NP in chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium zu einer sehr guten Transfektionseffizienz. Die Luciferaseaktivitäten der unmodifizierten D-qv-NP und der Plasmidkontrolle waren im Vergleich deutlich geringer.

Damit konnte der positive Einfluss der Tat-Modifizierung auf die Transfektionseffizienz auch für D-qv-NP gezeigt werden. Zum effizienten Gentransfer musste dem Medium, wie bei der Inkubation mit den anderen HSA-Formulierungen auch, Chloroquin zugesetzt werden. Die Inkubation in OptiMEM® erhöhte die Genexpressionsrate der D-qv-NP, allerdings nicht vergleichbar wie mit chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium.



**Abbildung 33: Luciferaseaktivität Tat-modifizierter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten H-qv-NP (Tat D) mit inkorporiertem pCMV-Luc-Plasmid in OptiMEM® bzw. in Kultivierungsmedium mit 0,1 mM Chloroquin für 24 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit unmodifizierten D-qv-NP (unmod D), Plasmid-DNA (PK) oder nur in Inkubationsmedium (ZK) inkubiert. Die Quantifizierung der Genexpressionsrate erfolgte 72 h nach Nanopartikel-Inkubation mittels Luciferase-Assay. Die Werte stellen die relative Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) pro 24-Well als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3).

## 3.2 Evaluierung der HSA-Nanopartikel für den virusfreien Gentransfer

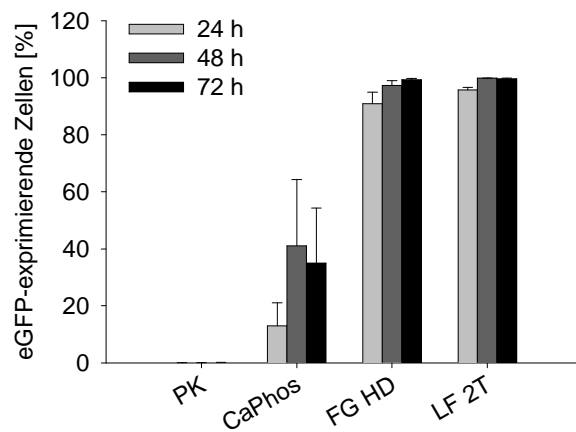
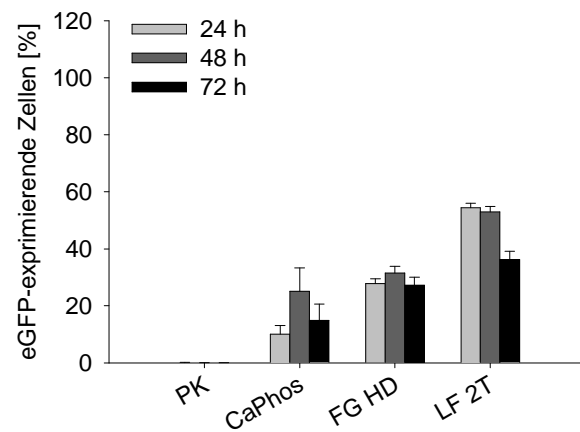
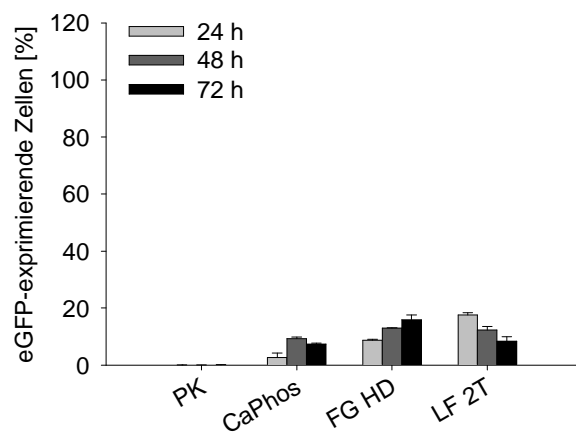
Die HSA-NP wurden anhand unterschiedlicher Quervernetzungsmethoden und Modifikationen für den Gentransfer optimiert. Der Vergleich mit Standard-Transfektionsmethoden (STM) bezüglich Transfektionseffizienz und Zytotoxizität sollte der Evaluierung der entwickelten HSA-NP dienen, wenngleich die STM nicht in der Gentherapie zum Einsatz kommen und nur der Einordnung der HSA-NP dienen.

### 3.2.1 Transfektionseffizienzen von Standard-Transfektionsmethoden

Gentransfersysteme werden stets bezüglich ihrer Transfektionseffizienz und Zytotoxizität beurteilt. Der verbreitete Einsatz der ausgewählten Standard-Reagenzien basiert auf ihrer Fähigkeit, *in vitro* unterschiedliche Zelllinien bzw. Zelltypen effizient transfizieren zu können. Zum Vergleich mit den entwickelten HSA-NP wurden hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen mittels Calcium-Phosphat, FuGene® HD und Lipofectamine®2000 mit dem peGFP-N1-Plasmid transfiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h der Transfektion wurde die Gen-expressionsrate in den Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Transfektion mit FuGene® HD und Lipofectamine®2000 zeigte für alle drei Zeitpunkte in über 90 % der HEK293T-Zellen eine Expression des eGFP (Abb. 34 A). Die Transfektion der HEK293T-Zellen mit Calcium-Phosphat führte zu einer maximalen Transfektionsrate von 41,1 % ( $\pm 23,2$ ) nach 48 h.

BJ-Fibroblasten zeigten die höchste Transfektionsrate (54,4 %  $\pm 1,5$ ) 24 h nach Inkubation mit Lipofectamine®2000 (Abb. 34 B). Dagegen wurden nach 72 h nur noch bei 36,2 % ( $\pm 2,9$ ) der BJ-Fibroblasten Expression des eGFP detektiert. Ähnlich war es in hMSC. 24 h nach Lipofectamine®2000-Inkubation mit 17,6 % ( $\pm 0,77$ ) war die maximale Transfektionsrate erreicht, welche nach 72 h auf 8,4 % ( $\pm 1,5$ ) sank (Abb. 34 C). Dagegen stieg die Anzahl eGFP-exprimierender hMSC nach FuGene® HD-Behandlung von 8,7 ( $\pm 0,34$ ) nach 24 h auf 15,9 % ( $\pm 1,5$ ) nach 72 h an.

Damit konnte deutlich die unterschiedliche Effizienz der STM in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden. Während die Zelllinie HEK293T effizient mit FuGene® HD und Lipofectamine®2000 transfiziert werden konnte, war deren Transfektionseffizienz in BJ-Fibroblasten und vor allem in hMSC stark reduziert.

**A (HEK293T-Zellen)****B (BJ-Fibroblasten)****C (hMSC)**

**Abbildung 34: Effizienz der Standard-Transfektionsmethoden.** (A) HEK293T, (B) BJ-Fibroblasten und (C) hMSC wurden mittels Calcium-Phosphat-Methode (CaPhos), FuGene® HD (FG HD) oder Lipofectamine®2000 LF 2T) mit dem Plasmid peGFP-N1 transfiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Plasmid-DNA (PK) inkubiert. 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion wurde die prozentuale Anzahl eGFP-exprimierender Zellen im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3).

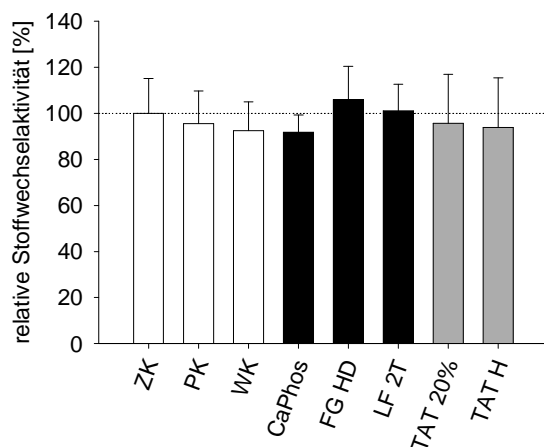


### 3.2.2 Zytotoxizität im Vergleich zu Standard-Transfektionsmethoden

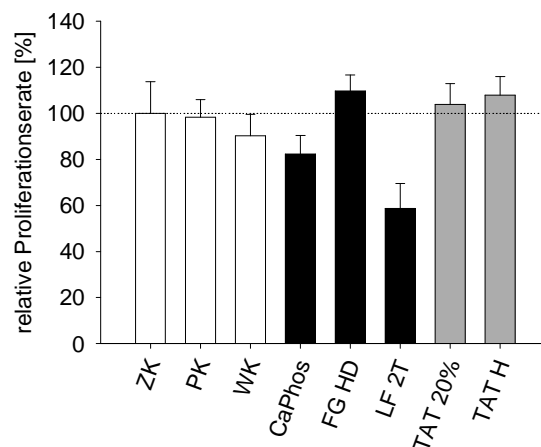
Die Genexpressionsrate der entwickelten HSA-NP lag unter der der getesteten STM (Calcium-Phosphat-Methode, FuGene® HD und Lipofectamine®2000). Doch sind die STM hauptsächlich bezüglich ihrer Transfektionseffizienz optimiert und weniger bezüglich ihrer Biokompatibilität. Da für einen effizienten Einsatz die Überlebensrate der Zellen eine essentielle Rolle spielt, sollte die Zytotoxizität der modifizierten HSA-NP als auch STM untersucht werden. Die Zytotoxizitäts-Assays wurden gemäß DIN EN ISO 10993-5:2009 mit humanen Fibroblasten (MrC-5) durchgeführt [156].

Nach 24-stündiger Behandlung mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP oder H-qv-NP bzw. den zuvor erwähnten STM wurden die relative Stoffwechselaktivität und Proliferationsrate der Zellen bestimmt. Weder eine der STM, noch die Tat-modifizierten HSA-NP beeinflussten die relative Stoffwechselaktivität der MrC-5-Zellen negativ (Abb. 35 A). Dagegen reduzierte die Inkubation der Zellen mit Calcium-Phosphat und Lipofectamine®2000 die relative Proliferationsrate auf 82,4 % ( $\pm 7,9$ ) bzw. 58,7 % ( $\pm 10,9$ ) (Abb. 35 B). Die Behandlung mit FuGene® HD oder Tat-modifizierten HSA-NP zeigte auch auf die Proliferationsrate keinen negativen Einfluss. Demnach sind die Tat-modifizierten HSA-NP biokompatibel, was ein wichtiges Kriterium für den nicht-viralen Gentransport darstellt.

**A (WST-1)**



**B (BrdU)**



**Abbildung 35: Zytotoxizität der Standard-Transfektionsmethoden im Vergleich zu HSA-NP.**

MrC-5-Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat-Methode (CaPhos), FuGene® HD (FG HD) oder Lipofectamine®2000 (LF 2T) bzw. Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP (Tat 20 %) sowie Tat-modifizierten H-qv-NP (Tat H) behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit äquivalenten Mengen an Plasmid-DNA (PK) oder Lösemittel (Wasser, WK) inkubiert wurden. Nach 24-stündiger Behandlung wurden die Proben mit WST-1- bzw. BrdU-Reagenz inkubiert. **(A)** Die Umsetzung des Tetrazoliumsalses (WST-1) bzw. **(B)** der Einbau des BrdU wurde mittels Photometer gemessen. Nach Abzug der Leerwerte wurden die Messergebnisse für die jeweiligen Proben als statistische Mittelwerte bestimmt. Der Einfluss der Proben wird als relativer Wert im Verhältnis zur negativen Referenz (100 %) angegeben.

### 3.3 Potentieller Einsatz HSA-basierender Gentransfersystemen zur virusfreien Gen- und Zelltherapie

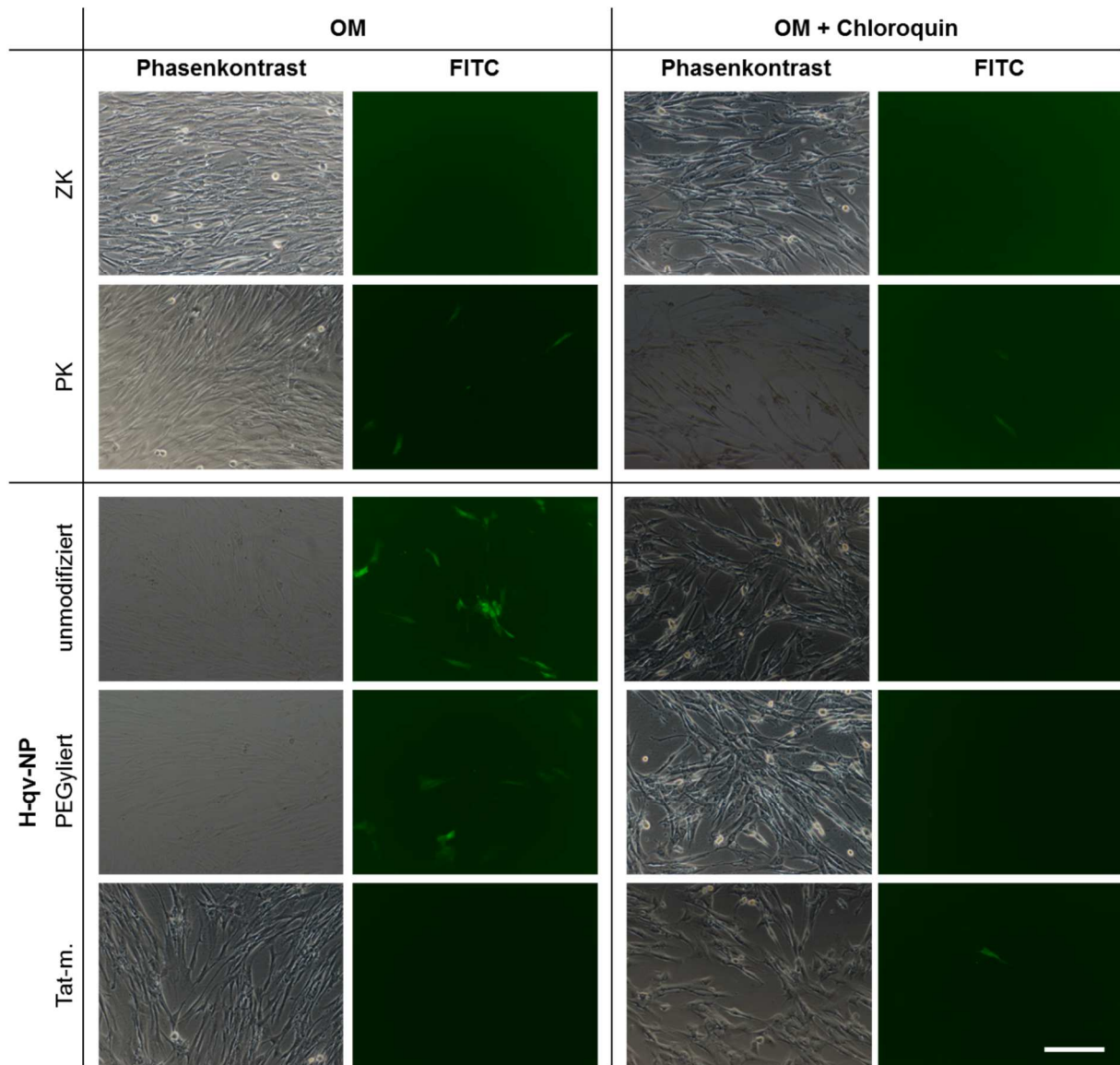
In dieser Arbeit sollten HSA-basierende Gentransfersysteme für die Gen- und Zelltherapie entwickelt werden. Die Analysen der Genexpressionsrate der unterschiedlichen Formulierungen wurden mit HEK293T-Zellen durchgeführt. Im Folgenden sollte daher der potentielle Einsatz des entwickelten HSA-basierenden nanopartikulären Systems zum Gentransfer in Primär- und Stammzellen ermittelt werden.

#### 3.3.1 Funktionale Analysen der HSA-Nanopartikel in Primär- und Stammzellen

Die Genexpressionsrate unmodifizierter GA-qv-NP wurde bereits, neben HEK293T-Zellen, in BJ-Fibroblasten und hMSC analysiert. Diese erste Nanopartikelformulierung zeigte allerdings in keinem der getesteten Zelltypen eine Expression des inkorporierten peGFP-N1-Plasmides. Daher wurden die HSA-NP zum effizienten Gentransfer modifiziert und weitere Quervernetzungsmethoden getestet. Im Laufe der Arbeit wurden mit Tat-modifizierten 20 % Glutaraldehyd-, Hitze- und Disulfidbrücken-quervernetzten HSA-NP erfolgreich Gentransfersysteme entwickelt, die eine gute Transfektionseffizienz in HEK293T-Zellen zeigten. Zur effizienten eGFP-Expression war die Inkubation in chloroquinhaltigem Medium nötig, wobei auch nach Inkubation in OptiMEM® chloroquinfrei eGFP-Expression gezeigt werden konnte.

BJ-Fibroblasten und hMSC wurden daher mit den unterschiedlichen Tat-modifizierten HSA-NP in OptiMEM® und chloroquinhaltigem Kultivierungsmedium inkubiert und nach 72 h die eGFP-Expression der Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Nach Inkubation Tat-modifizierter H-qv-NP in Kultivierungsmedium (mit und ohne Chloroquin) konnten keine eGFP-exprimierenden Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Anders zeigten BJ-Fibroblasten, die mit Tat-modifizierten H-qv-NP oder freier Plasmid-DNA in OptiMEM® inkubiert wurden, vereinzelt eGFP-Expression (Abb. 36, linke Spalte). Dabei führte die Inkubation der BJ-Fibroblasten mit unmodifizierten H-qv-NP in OptiMEM® zur höchsten Anzahl eGFP-exprimierender Zellen. Die Zugabe von Chloroquin in OptiMEM® reduzierte die Genexpressionsrate wieder (Abb. 36, rechte Spalte). Die Versuche mit GA-qv-NP und D-qv-NP verliefen identisch (Daten nicht gezeigt).

Da chloroquinhaltiges Inkubationsmedium keinen positiven Einfluss auf die Transfektionseffizienz der BJ-Fibroblasten hatte, war die Genexpressionsrate in BJ-Fibroblasten verglichen mit HEK293T-Zellen sehr viel geringer. Dennoch konnte erstmals ein HSA-NP-vermittelter Gentransfer in den schwer zu transfizierenden BJ-Fibroblasten nachgewiesen werden.



**Abbildung 36: Genexpression Tat-modifizierter Hitze-quervernetzter HSA-NP in BJ-Fibroblasten.** Inkubation der Zellen mit Tat-modifizierten H-qv-NP (peGFP-N1-Plasmid inkorporiert) für 24 h in OptiMEM® mit oder ohne 25  $\mu$ M Chloroquin. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit unmodifizierten H-qv-NP, PEGylierten H-qv-NP, Plasmid-DNA (PK) oder nur im jeweiligen Inkubationsmedium (ZK) inkubiert. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu$ m.

Nach Inkubation von hMSC mit Tat-modifizierten GA-qv, H-qv-NP und D-qv-NP in OptiMEM® konnten nur vereinzelt eGFP-exprimierende Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Wie bei BJ-Fibroblasten zeigte chloroquinhaltiges Inkubationsmedium keinen positiven Einfluss auf die Genexpressionsrate.

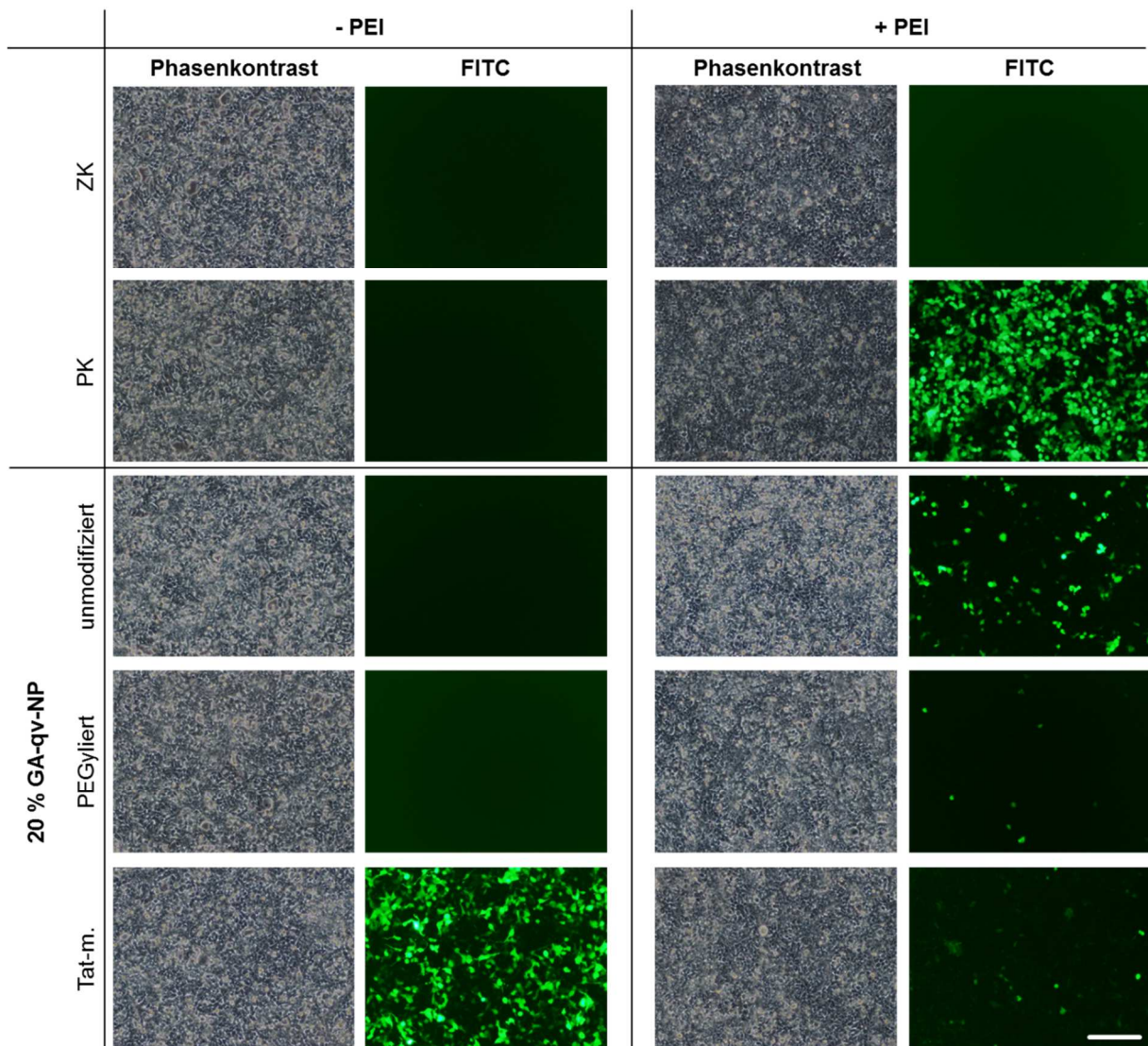
Damit war die Effizienz der optimierten HSA-NP in den schwer zu transfizierenden Primär- und Stammzellen sehr viel geringer als in HEK293T-Zellen. Chloroquin wirkte sich nicht positiv auf die Genexpressionsrate in hMSC und BJ-Fibroblasten aus. Im Gegensatz dazu förderte die Inkubation in OptiMEM® die Transfektionseffizienz.

### 3.3.2 Verstärkung des Gentransfers in Primär- und Stammzellen mittels Polyethylenimin

Chloroquin zeigte keinen positiven Effekt auf den Gentransport in Primär- und Stammzellen. Da die Liganden-modifizierten HSA-NP aber vorwiegend in Lysosomen eingelagert werden, sollte für deren Gentransport in Primär- und Stammzellen eine Alternative zu Chloroquin gefunden werden. Genau wie Chloroquin ist auch Polyethylenimin (PEI) in der Lage, Moleküle aus dem Endosom freizusetzen. Daher sollte untersucht werden, ob die Inkubation mit PEI einen positiven Effekt auf die Genexpressionsrate hat.

Dazu wurden Tat-modifizierte 20 % GA-qv-NP, unmodifizierte und PEGylierte GA-qv-NP sowie Plasmid-DNA mit PEI kombiniert und anschließend mit HEK293T-Zellen inkubiert (Abb. 37). Es konnte gezeigt werden, dass PEI, welches mit der freien Plasmid-DNA kombiniert wurde, zu einer sehr guten Transfektionseffizienz in HEK293T-Zellen führte. Beschichtung der PEGylierten und Tat-modifizierten HSA-NP mit PEI übte sich dagegen nicht positiv auf deren Genexpressionsrate aus. Nur die Effizienz der unmodifizierten 20 % Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikel konnte mittels PEI-Beschichtung erhöht werden.

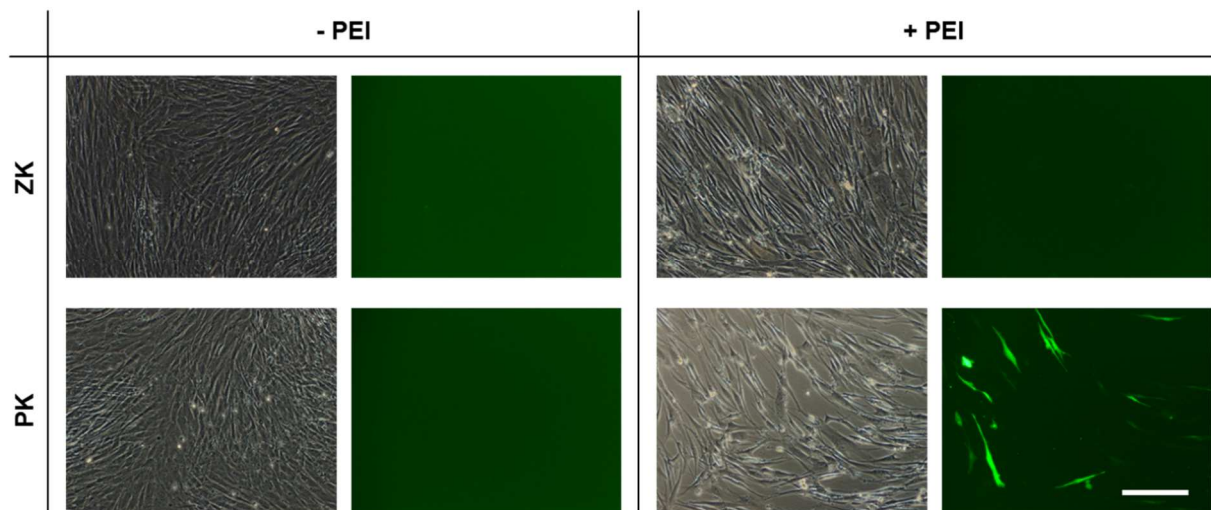
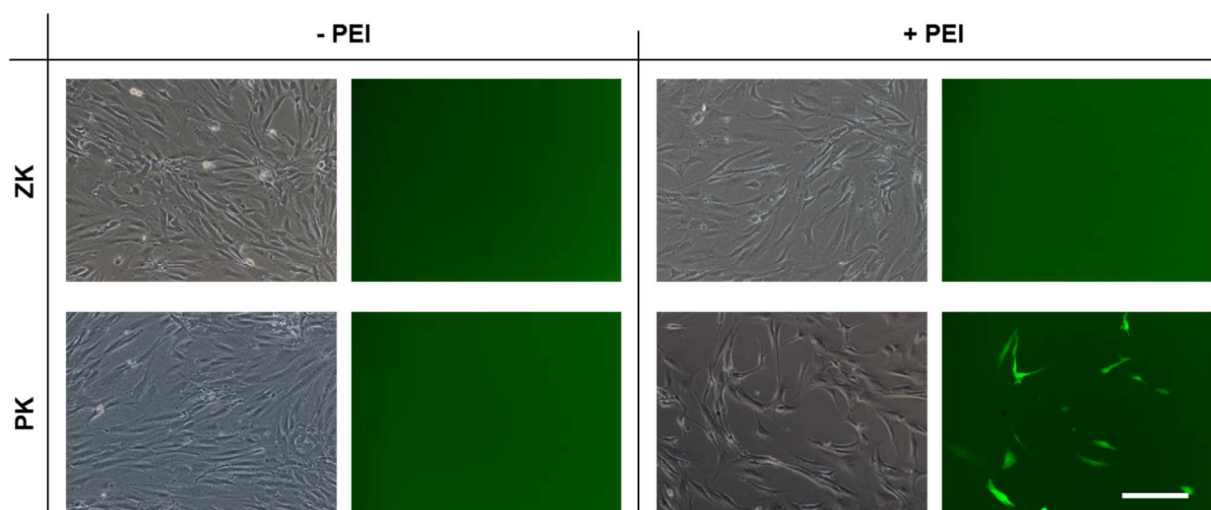
Das gleiche Experiment wurde mit Disulfid-quervernetzten Nanopartikel durchgeführt (Abb. Anhang 3). Zellen, die mit PEI-beschichteten Tat-modifizierten Nanopartikel inkubiert wurden, zeigten eine geringere eGFP-Expressionsrate als Tat-modifizierte Nanopartikel ohne PEI. Die Transfektionsrate unmodifizierter D-qv-NP wurde mittels PEI-Beschichtung leicht erhöht.



**Abbildung 37: Genexpression PEI-beschichteter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP in HEK293T-Zellen.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit PEI-beschichteten 20 % GA-qv-NP mit inkorporiertem peGFP-N1-Plasmid für 24 h in Kulturmedium. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit PEI-beschichteter Plasmid-DNA (PK) sowie mit GA-qv-NP ohne PEI-Beschichtung inkubiert. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Dies lässt den Schluss zu, dass sich die Kombination aus Tat-Modifizierung mit PEI-Beschichtung negativ auf die Transfektionseffizienz auswirkt. PEI alleine ist aber ein effizientes Polymer zur Steigerung des Gentransfers.

Daher sollte die Effizienz von PEI zum Gentransfer in Primär- und Stammzellen getestet werden. BJ-Fibroblasten und hMSC wurden mit PEI modifizierter Plasmid-DNA inkubiert und die eGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Nach 72-stündiger Behandlung zeigten nicht nur eine Vielzahl an BJ-Fibroblasten, sondern auch hMSC eine Expression des Reportergens eGFP (Abb. 38). PEI erhöhte erheblich den Gentransport der Plasmid-DNA und stellt damit für Primär- und Stammzellen eine endosomolytische Alternative zu Chloroquin dar.

**A (BJ-Fibroblasten)****B (hMSC)**

**Abbildung 38: Genexpression von PEI-Polyplexen in BJ-Fibroblasten und hMSC.** Inkubation der **(A)** BJ-Fibroblasten und **(B)** hMSC mit PEI-modifizierter Plasmid-DNA für 24 h in Kulturmedium. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent nur mit Medium (ZK) sowie der Plasmid-DNA ohne PEI inkubiert. Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200 µm.

### 3.4 Etablierung von Trypanblau zum Quenchen extrazellulärer Fluoreszenzsignale

Die Durchflusszytometrie- und CLSM-Analysen der HSA-NP ließen erkennen, dass eine eindeutige Lokalisierung der Nanopartikel anhand der etablierten Methoden nicht möglich ist. Dabei erleichterte die Autofluoreszenz der GA-qv-NP die direkte fluoreszenzmikroskopische sowie durchflusszytometrische Analyse. Mit diesen Methoden konnte jedoch nicht differenziert werden, ob die Nanopartikel an die Zellmembran gebunden oder internalisiert wurden. Während mittels Durchflusszytometrie diese Frage generell nicht geklärt werden kann, ist die Aussage mittels CLSM-Analyse Zell-abhängig. Aufgrund der Charakteristik der BJ-Fibroblasten und hMSC sich *in vitro* sehr flach auf der Kultivierungsfläche auszubreiten, war die Lokalisierung in diesen Zellen auch mittels CLSM-Analyse nicht möglich. Daher sollte eine alternative Methode entwickelt werden, mit der eine eindeutige Lokalisierung der HSA-NP in unterschiedlichen Zelltypen erreicht werden kann.

Die Fähigkeit von Trypanblau die Fluoreszenz von FITC-Fluorophoren zu quenchen machte man sich bereits für Phagozytose-Untersuchungen zunutze [166]. Da Trypanblau die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht überwinden kann, quencht es selektiv die extrazelluläre Fluoreszenz. Dies ermöglicht eine Differenzierung zwischen dem Zellinneren und -äußeren. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob Trypanblau die Autofluoreszenz Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP quencht und dadurch eine Differenzierung zwischen gebundenen und internalisierten HSA-Nanopartikeln möglich ist.

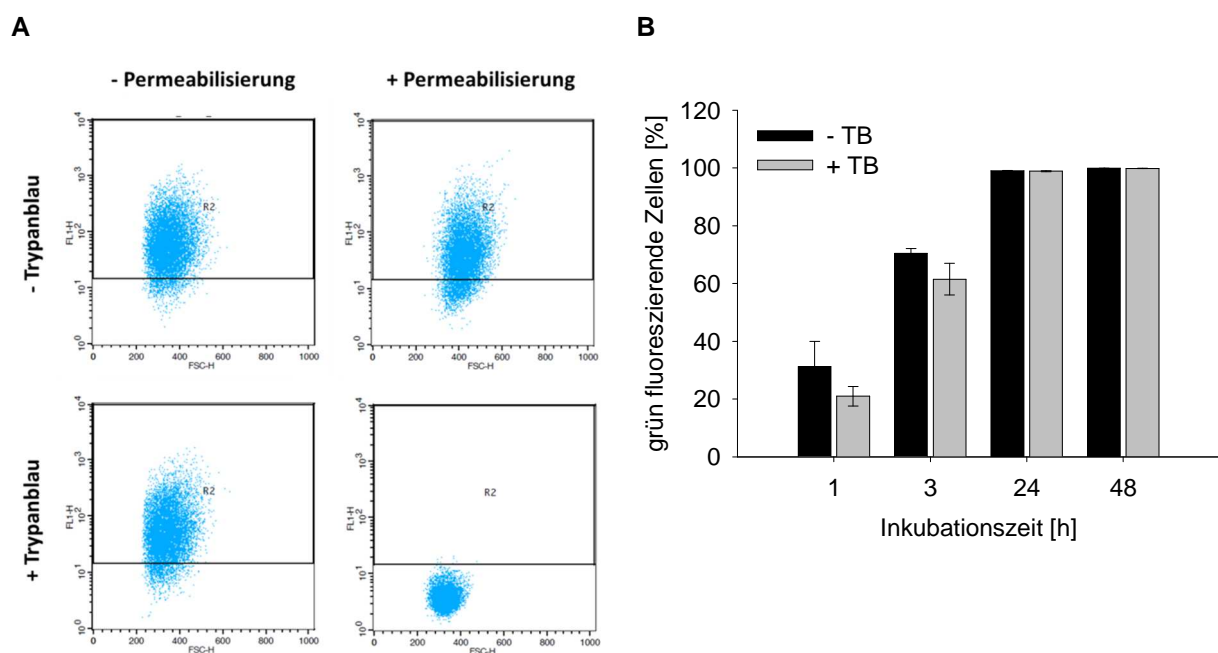
#### 3.4.1 Etablierung des Trypanblau-Quenchens für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie-Analysen können keinen Hinweis darauf geben, ob Nanopartikel an die Zellmembran gebunden haben oder bereits internalisiert wurden. Das Quenchen mittels Trypanblau könnte damit zur Erweiterung durchflusszytometrischer Ergebnisse beitragen. Die Anwendbarkeit des Trypanblau-Quenchens für die Autofluoreszenz Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP (GA-qv-NP) sollte daher mittels Durchflusszytometrie etabliert werden. Dafür wurden hMSC mit 100 % GA-qv-NP inkubiert und nach 24 h durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 39 A, oben links). Wurde den Zellen anschließend Trypanblau zugesetzt und diese erneut analysiert, änderte sich die Anzahl positiver Zellen nur gering (Abb. 39 A, unten links). hMSC, die nach der NP-Inkubation permeabilisiert wurden, zeigten im Durchflusszytometer noch 82,9 % ( $\pm 0,79$ ) grün fluoreszierende Zellen (Abb. 39 A, oben rechts). Nach Zugabe von Trypanblau konnten dagegen keine grün fluoreszierende Zellen mehr detektiert werden (0,13 %  $\pm 0,05$ ) (Abb. 39 A, unten rechts). Durch die Permeabilisierung gelangt das Trypanblau auch in das Zellinnere. Somit kann neben der extrazellulären Fluoreszenz auch die intrazellulär lokalisierte Fluoreszenz gequencht werden. Das komplette Erlöschen detektierbarer, grüner Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie lässt den Schluss

zu, dass Trypanblau zum Quenchen der grünen Autofluoreszenz der GA-qv-NP eingesetzt werden kann.

Zum weiteren Einblick in die Kinetik der Internalisierung wurden hMSC für 1 h, 3 h, 24 h und 48 h mit 100 % GA-qv-NP inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse mit und ohne Trypanblau zeigte, dass bereits nach einstündiger Inkubation kaum Signal gequencht wurde (10,2 % Differenz). Damit scheinen hMSC die 100 % GA-qv-NP bereits kurz nach dem Binden zu internalisieren. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation schienen die GA-qv-NP von allen untersuchten Zellen internalisiert, da Trypanblau-Quenchen keinen Einfluss auf die Anzahl grün fluoreszierender Zellen hatte. Damit konnte gezeigt werden, dass nahezu alle analysierten hMSC nach Inkubation mit 100 % GA-qv-NP diese internalisiert und nicht nur gebunden hatten.

Durch die Zugabe von Trypanblau konnte die Autofluoreszenz Glutaraldehyd-quervernetzter Nanopartikel erfolgreich gequencht werden. Somit konnte eine Methode etabliert werden, mit deren Hilfe die Internalisierung von Nanopartikel mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

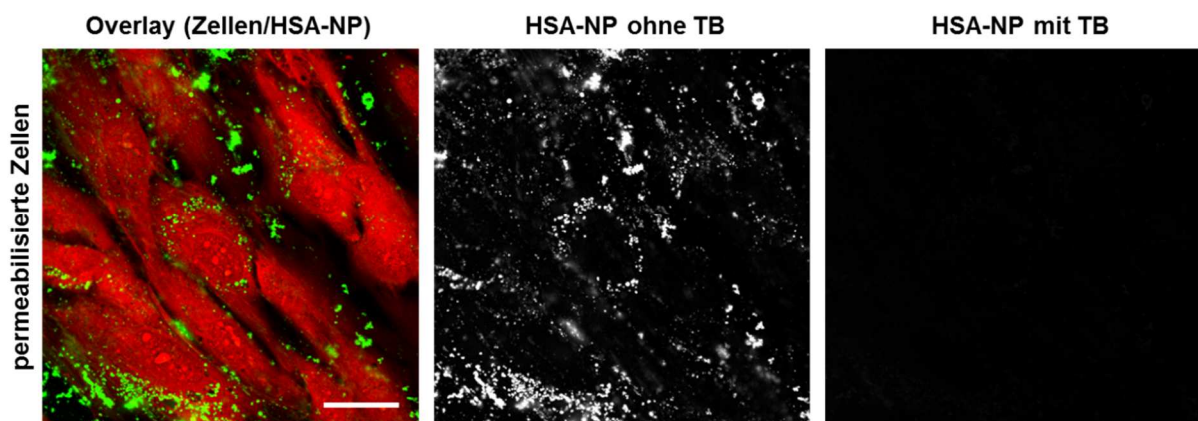


**Abbildung 39: Differenzierung von gebundenen und internalisierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP mittels Trypanblau im Durchflusszytometer. (A)** Nach 24-stündiger Inkubation der hMSC mit 100 % GA-qv-NP wurden die Zellen abgelöst, und ohne Permeabilisierung (- Permeabilisierung) oder permeabilisiert (+ Permeabilisierung) in PBS aufgenommen. Die Proben wurden durchflusszytometrisch vermessen (- Trypanblau), Trypanblau zugesetzt und erneut vermessen (+ Trypanblau). Darstellung der DotPlots (Kanal FL-1-H gegen Forwärts-Scatter (FSC-H)) repräsentativer Proben. **(B)** hMSC wurden für 1 h, 3 h, 24 h oder 48 h mit 100 % GA-qv-NP inkubiert. Die Zellen wurden abgelöst und in PBS im Durchflusszytometer vermessen (- Trypanblau). Den Proben wurde Trypanblau zugegeben und erneut vermessen (+ Trypanblau). Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen nach Abzug der Zellkontrolle als statistischen Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3).



### 3.4.2 Etablierung des Trypanblau-Quenchens für die Fluoreszenzmikroskopie

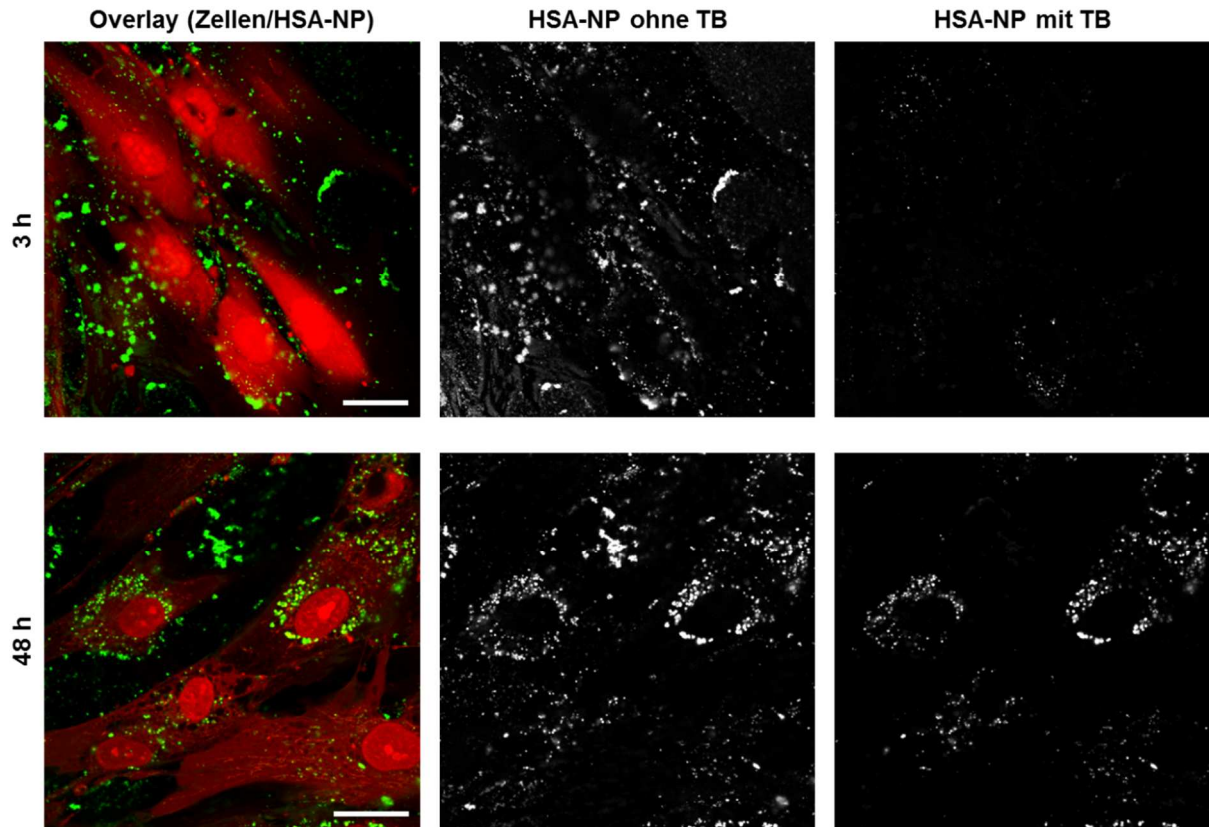
Mittels Durchflusszytometer-Analysen konnte gezeigt werden, dass Trypanblau die Autofluoreszenz der Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP quencht. Um die Lokalisierung der Nanopartikel detaillierter beschreiben zu können, müssen die Zellen mittels CLSM analysiert werden. Daher sollte die Trypanblau-Methode auch für Fluoreszenzmikroskopie-basierte Methoden etabliert werden. Hierzu wurden hMSC für 48 h mit 100 % GA-qv-NP inkubiert und mittels Methanol permeabilisiert. Die Methanol-Behandlung beeinträchtigte die Autofluoreszenz der GA-qv-NP nicht (Abb. 40, Overlay; HSA-NP ohne TB). Wurden die permeabilisierten Zellen mit Trypanblau inkubiert, erlosch dagegen die HSA-Autofluoreszenz komplett (Abb. 40, HSA-NP mit TB). Damit eignet sich Trypanblau auch als Quencher der HSA-Autofluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie.



**Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Differenzierung von gebundenen und internalisierten Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP mittels Trypanblau.** hMSC wurden für 48 h mit 100 % GA-qv-NP inkubiert. Die Zellen wurden mit CellTracker™blue (rot) markiert und mit Methanol permeabilisiert und fixiert. Die HSA-Autofluoreszenz (grün) nach Methanol-Behandlung wurde mittels CLSM analysiert (Overlay). Der gleiche Bildausschnitt ist einzeln für die Fluoreszenz der HSA-NP vor der Trypanblau-Inkubation (HSA-NP ohne TB) und danach (HSA-NP mit TB) als Graustufenbild dargestellt. Der Messbalken entspricht 25 µm.

Die CLSM-Analyse von hMSC, die für 3 h und 48 h mit 100 % GA-quervernetztes HSA-NP inkubiert wurden, machte mittels Trypanblau-Quenchens den Unterschied gebundener und internalisierter HSA-NP deutlich. Nach 3 h wurde das HSA-Signal hauptsächlich extrazellulär detektiert und mittels Trypanblau fast komplett gequencht (Abb. 41, obere Reihe, HSA-NP mit TB). Nach 48 h dagegen wurden von allen Zellen 100 % GA-quervernetztes HSA-NP internalisiert und perinukleär in Vesikeln eingelagert, und damit lediglich die wenigen nicht internalisierten Nanopartikel gequencht (Abb. 41, untere Reihe).

Trypanblau eignet sich somit zum Quenchen der HSA-Autofluoreszenz und ermöglicht die Unterscheidung zwischen Nanopartikel, die an die Zelle gebunden haben von welchen, die bereits internalisiert wurden.



**Abbildung 41: Zeitabhängige Internalisierung Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP in hMSC.** hMSC wurden für 3 h und 48 h mit 100 % GA-qv-NP inkubiert. Die Zellen wurden mit CellTracker™blue markiert, mittels Paraformaldehyd fixiert und im CLSM analysiert. Darstellung des Overlays der CellTracker™blue-Färbung (rot) und HSA-Autofluoreszenz (grün) ohne Trypanblau (Overlay) sowie der HSA-Autofluoreszenz einzeln als Graustufenbild ohne Trypanblau (HSA-NP ohne TB) bzw. mit Trypanblau (HSA-NP mit TB). Die Messbalken entsprechen 25  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

Bei der Gentherapie werden fehlerhafte Gene, die Ursache für die Entstehung einer Krankheit sind, durch ihre funktionale Kopie ersetzt. Dabei können neben genetischen Krankheiten, wie z. B. Mukoviszidose, auch Tumorerkrankungen behandelt werden. Die Anwendungen der Gentherapie sind aktuell auf sehr seltene Erkrankungen oder austherapierte Patienten beschränkt, da für den Transport der Gene nach wie vor virale Vektoren genutzt werden, die erhebliche Risiken mit sich bringen. Aus klinischer Sicht besteht großes Interesse an sichereren Gentransfersystemen, weshalb in den letzten Jahren intensiv an effizienten, nicht-viralen Alternativen (NVA) zum Gentransfer geforscht wurde. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass Nanopartikel, welche größtenteils zum Transport von Wirkstoffen genutzt werden, auch geeignete Plattformen für den Gentransfer bieten [167, 168]. Besonders humanes Serumalbumin (HSA) zeichnet sich aufgrund seiner Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit aus und erhielt bereits als Transportsystem für Paclitaxel als erstes nanopartikuläres Medikament die Zulassung zur Therapie von Mammakarzinomen und Pankreaskarzinomen [169]. Ein erfolgreicher Gentransfer mit HSA-basierenden Nanopartikeln (HSA-NP) in schwer zu transfizierenden Primär- und Stammzellen, deren genetische Veränderung im Fokus vieler Gentherapie-Ansätze steht, konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung und Evaluierung eines nicht-viralen Gentransfersystems basierend auf HSA für die Gen- und Zelltherapie. Bei der Entwicklung der Plasmid-beladenen HSA-NP stand vor allem deren Biokompatibilität im Vordergrund. Daher wurden neben Glutaraldehyd, biokompatible Quervernetzungsmethoden gesucht, die zu einer stabilen nanopartikulären Formulierung führen. Dabei wurden die HSA-NP während ihrer Entwicklung stetig bezüglich ihrer Effizienz zum Gentransfer analysiert. Im Fokus der In-vitro-Charakterisierung standen die Interaktion, Aufnahme und Genexpressionsrate der nanopartikulären Formulierungen in unterschiedlichen Zelltypen.

### Einfluss der Glutaraldehyd-Quervernetzung der HSA-basierenden Nanopartikel auf den Gentransfer

Glutaraldehyd ist der gebräuchlichste Quervernetzer HSA-basierender Nanopartikel mit dem Vorteil je nach Anwendung den Quervernetzungsgrad einstellen zu können [133]. Die unterschiedlichen Quervernetzungsgrade können zur Größenänderung und veränderten Stabilität der HSA-NP führen [133]. Da der Einfluss des Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrades auf den Gentransport nicht bekannt war, wurden 40 % bis 100 % Glutaraldehyd-

quervernetzte Plasmid-beladene HSA-NP (GA-qv-NP) hergestellt und bezüglich ihrer Bindungs- und Transfektionseffizienz in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) analysiert. Die HSA-NP zeigten mit allen getesteten Glutaraldehyd-Quervernetzungsgraden eine konzentrations- und zeitabhängige Interaktion mit hMSC, wobei niedrig (40 %) Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-NP geringer mit den Zellen interagierten als stark (100 %) quervernetzte. Dabei ist die grüne Autofluoreszenz der GA-qv-NP, mit der die Bindung detektiert wurde, abhängig von der Höhe der Glutaraldehyd-Quervernetzung und muss bei der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden. Die zusätzliche Markierung von 40 % und 100 % GA-qv-NP mit PromoFluor633 zeigte aber, dass die mittlere Fluoreszenz-intensität von Zellen, die mit 40 % GA-qv-NP inkubiert wurden, im Vergleich zu mit 100 % GA-qv-NP inkubierten Zellen deutlich geringer war und dass damit dieser Effekt nicht alleine auf der geringeren Autofluoreszenzintensität beruht. Es ist wahrscheinlicher, dass die niedrige Bindung der 40 % GA-qv-NP durch eine geringere Stabilität der Nanopartikel bedingt ist. Stabilitätsstudien der GA-qv-NP in Wasser zeigten, dass geringer Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-NP schneller degradieren als stärker Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-NP [152], was einerseits nachteilig für die Langzeitlagerung ist, sich andererseits aber für die intrazelluläre Plasmidfreisetzung als positiv erweisen könnte. Daher wurden in dieser Arbeit auch niedrig Glutaraldehyd-quervernetzte HSA-NP in den Transfektionsstudien untersucht. Zur Analyse der Transfektionsrate der unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP wurde in diese das Plasmid peGFP-N1 inkorporiert. Ein erfolgreicher Gentransfer sollte damit zur Expression des Reportergens eGFP führen. Analysen zeigten, dass die Plasmid-DNA erfolgreich in die HSA-NP inkorporiert werden konnte [170]. Jedoch konnte in keinem untersuchten Zelltyp (HEK293T-Zellen, hMSC oder BJ-Fibroblasten) nach Inkubation mit unmodifizierten unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP das Reportergen eGFP detektiert werden. Hopwood *et al.* [171] zeigten, dass bei hohen Temperaturen ab 75 °C Glutaraldehyd mit Nukleinsäuren wechselwirken kann. Es könnte somit sein, dass die fehlende Genexpression auf einer Beeinträchtigung der Plasmidfunktionalität während der NP-Herstellung beruht. Es wurde allerdings keine reduzierte Transfektionseffizienz der Plasmid-DNA, die aus den unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP isoliert wurde, ermittelt. Andererseits wurde bei der Isolierung der Plasmid-DNA aus den unterschiedlich Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP deutlich, dass zur Degradierung der 100 % GA-qv-NP im Vergleich zu 40 % GA-qv-NP die dreifache Menge an Proteinase K und eine deutlich längere Inkubationszeit benötigt wurde (Daten nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass auch intrazellulär die Plasmid-DNA kaum aus den stark Glutaraldehyd-quervernetzten Nanopartikeln freigesetzt werden kann, was die fehlende Genexpression erklären würde. Da aber auch 40 % GA-qv-NP nicht zur Genexpression führten, wird vermutet, dass selbst dieser Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrad noch zu hoch für eine intrazelluläre Plasmidfreisetzung

ist. Der geringste Glutaraldehyd-Quervernetzungsgrad, mit dem stabile HSA-NP hergestellt werden konnten, ist 20 %. Diese waren größer als 100 % GA-qv-NP und zeigten in Wasser eine verminderte Stabilität. Die Größenunterschiede sind mit einem charakteristischen Anschwellen der Protein-basierten HSA-NP in wässriger Lösung zu erklären. Dabei ist die Anschwellrate abhängig von dem Quervernetzungsgrad und eine höhere Quervernetzung führt zu einem geringeren Anschwellen. Die Inkubation der Zellen mit 20 % GA-qv-NP führte zu einer geringen Genexpressionsrate im Bereich einer spontanen Transfektion.

Damit wurde gezeigt, dass der Grad der Glutaraldehyd-Quervernetzung einen Einfluss auf die Stabilität sowie die Interaktion der HSA-NP mit Zellen hat. Durch die Verringerung der Glutaraldehyd-Quervernetzung konnte eine geringe Genexpression erreicht werden. Ein effizienter Gentransfer konnte dadurch allerdings nicht erreicht werden. Somit stellt der Grad der Quervernetzung nicht den alleinigen Grund für die Ineffizienz der GA-qv-NP beim Gentransport dar, sondern beruht möglicherweise auf einem unzureichenden intrazellulären Transport der HSA-NP.

### Einfluss unterschiedlicher Modifizierungen der HSA-basierenden Nanopartikel auf den Gentransfer

Der Aufnahmemechanismus der NVA hat einen entscheidenden Einfluss auf ihren anschließenden intrazellulären Transport. HSA wird von Endothelzellen mittels verschiedener Glykoprotein- oder Scavenger-Rezeptoren internalisiert [125, 128, 129]. Unklar dagegen ist, ob HSA auch von anderen Zelltypen internalisiert wird, bzw. über welchen Mechanismus dies vonstattengeht. Die In-vitro-Charakterisierung der unmodifizierten HSA-NP zeigte eine gute Bindung und Aufnahme mit bzw. in hMSC, eine etwas geringere mit BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen. Allerdings konnte in keinem getesteten Zellsystem eine effiziente Expression des Reportergens detektiert werden. Somit werden die unmodifizierten HSA-NP entweder von den untersuchten Zelltypen nicht ausreichend internalisiert oder die Translokation in den Zellkern ist unzureichend.

Aus diesem Grund sollte die Aufnahme der HSA-NP durch die Modifizierung ihrer Oberfläche mit spezifischen Liganden zur Rezeptor-vermittelten Endozytose forciert werden. Dafür wurden Oberflächenrezeptoren identifiziert, die von den verschiedenen Zelltypen gleichermaßen exprimiert werden und deren Aktivierung das Schicksal der Zelle nicht grundsätzlich ändert [144, 162]. Besonders hMSC können durch unterschiedliche Stimuli zur spontanen Differenzierung gebracht werden [118, 119], wodurch ihre Proliferationskapazität reduziert werden würde und sie ihre Potenz für die Zelltherapie verlieren würden. Neben unterschiedlichen Wachstumsfaktorrezeptoren (*growth factor receptor*, GFR), wie den epidermalen, Fibroblasten- oder *platelet-derived* GFR, wurden die Integrine als potentielle Rezeptoren identifiziert. Analysen zeigten, dass der epidermale GFR sowie die unterschiedlichen Integrinuntereinheiten von allen getesteten Zelltypen gleichermaßen

exprimiert werden. Die exprimierten Integrine gehören zur Gruppe der RGD-Integrine, welche die spezifische Aminosäureabfolge RGD ihrer Liganden bindet [71]. Studien zeigten, dass Bindung von RGD-Peptiden an Makromoleküle oder Nanopartikel die Internalisierung dieser deutlich erhöhen kann [79-81]. Es existieren allerdings widersprüchliche Studien darüber, über welchen Aufnahmemechanismus die RGD-modifizierten Moleküle in die Zelle gelangen. Aber auch bei hMSC konnte eine gesteigerte Interaktion von Goldnanopartikeln, welche mit RGD-Liganden modifiziert waren, detektiert werden [172]. Daher wurden 20 % und 100 % GA-qv-NP HSA-NP mit RGD-Liganden modifiziert.

Bindungsstudien zeigten, dass RGD-modifizierte 100 % GA-qv-NP effizienter mit hMSC interagierten als RGD-modifizierte 20% GA-qv-NP. Die Etablierung des Quenchens der extrazellulären Autofluoreszenz der GA-qv-NP mittels Trypanblau ermöglichte zudem eine Aussage der genauen Lokalisierung dieser Nanopartikel mittels Fluoreszenz-basierter Analysemethoden. So konnte anhand von CLSM-Analysen eine vesikuläre, perinukleäre Verteilung der RGD-modifizierten 100% GA-qv-NP detektiert werden. In weiterführenden Ko-Lokalisationsstudien wurden diese Vesikel als Lysosome identifiziert. Damit führte die Modifizierung der GA-qv-NP mit RGD-Peptiden zum Transport ins Lysosom, dessen Aufgabe die Degradierung endozytierter Moleküle ist.

Alleinig durch die Ko-Lokalisierung mit lysosomalen Vesikeln kann der Endozytoseweg der RGD-modifizierten GA-qv-NP nicht eindeutig bestimmt werden. Während die Clathrin-vermittelte Endozytose vermehrt den lysosomalen Weg verfolgt, werden die Moleküle nach Caveolae-vermittelter Endozytose und Makropinozytose vermehrt am Lysosom vorbei geführt, aber auch in seltenen Fällen zum Lysosom transportiert [70]. Für die Integrin-rezeptor-vermittelte Aufnahme sind sowohl Clathrin- als auch Caveolae-vermittelte Endozytose beschrieben [73, 74], wobei die Internalisierung über RGD-Integrine mit  $\beta 1$ -Untereinheit verstärkt Caveolae-vermittelt abläuft [75]. Alle getesteten Zelltypen exprimierten die  $\beta 1$ -Untereinheit auf über 90 % der Zellen, wodurch dieser Aufnahmeweg wahrscheinlich wäre. Doch auch die RGD-Sequenz umgebenden Aminosäuren sind mitentscheidend dafür über welchen Integrin-Rezeptor RGD-modifizierte Makromoleküle internalisiert werden [173]. Dadurch wäre es auch möglich, dass die RGD-modifizierten GA-qv-NP über den Integrin-rezeptor  $\alpha v \beta 3$  internalisiert werden, welcher zur Clathrin-vermittelten Endozytose und damit zum Transport zu Lysosomvesikeln führt [76].

Demnach ist auch eine Internalisierung der RGD-modifizierten GA-qv-NP über weitere RGD-Integrinrezeptoren denkbar, die in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert wurden. Dies würde erklären, weshalb die RGD-modifizierten GA-qv-NP kaum mit BJ-Fibroblasten und HEK293T-Zellen interagierten, dagegen gut mit hMSC, während auf allen Zelltypen gleiche Expressionsmuster für die getesteten Integrinuntereinheiten gemessen wurden. Des Weiteren wurde nur die Anwesenheit der Integrinuntereinheiten analysiert und nicht, wie stark die

Integrinrezeptoren pro Zelle exprimiert wurden, wodurch auch möglich ist, dass die Expression einer als positiv gemessene Zelle nicht äquivalent zu einer effizienten Internalisierung ist. Zudem ist bekannt, dass Integrine in einer aktiven Form vorliegen müssen, um ihre Liganden binden zu können [174]. Wurden die Zellen vor der Inkubation mit RGD-modifizierten GA-qv-NP mit Manganchlorid vorinkubiert, welches die Integrine aktiviert [174], führte dies dennoch nicht zu einer gesteigerten Interaktion der RGD-modifizierten GA-qv-NP mit HEK293T-Zellen. Ungeachtet der geringen Interaktion mit HEK293T-Zellen konnte in dieser Arbeit erstmals ein HSA-NP-vermittelter Gentransport mit RGD-modifizierten 20 % GA-qv-NP detektiert werden. Die RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP zeigten dagegen keine Genexpression, genauso wie die RAD-modifizierten Kontrollnanopartikel oder Zellen, die nur mit der Plasmid-DNA inkubiert wurden. Die Beobachtung, dass nur mit niedrig Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP eine Genexpression erreicht wurde, bestätigte die Hypothese, dass ein geringerer Quervernetzungsgrad die Plasmidfreisetzung begünstigt und damit auch die Genexpressionsrate fördert.

Aufgrund der Tatsache, dass diese niedrig Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP allerdings nur eine geringe Bindung mit den untersuchten Zellen zeigten, muss diskutiert werden, wie die Bindung bzw. Internalisierung von Nanopartikeln in Bezug auf die Genexpression generell zu bewerten ist. Während weitläufig eine Aufnahme von Nanopartikeln und damit ihre intrazelluläre Detektion als erstrebenswert gilt, muss beachtet werden, dass die HSA-NP nicht einzeln mittels CLSM detektiert werden können, sondern lediglich Nanopartikel-Akkumulationen. Intrazelluläre Akkumulationen sind aber oftmals ein Zeichen dafür, dass die Nanopartikel vesikulär – z. B. in Endosomen oder Lysosomen – eingeschlossen sind. Dies kann zu einer geringen zytoplasmatischen Verteilung und damit verbundenen geringeren intrazellulären Wirkstofffreisetzung führen. Dass die gering quervernetzten GA-qv-NP keine intrazelluläre Akkumulation zeigten, kann demnach auch bedeuten, dass diese nicht so stark bzw. gar nicht im Lysosom akkumulieren, weil sie entweder dort direkt degradiert werden oder erst gar nicht dorthin gelangen. Die Degradierung der Nanopartikel noch bevor sie die Zelle erreichen ist auszuschließen, da dies sowohl unmodifizierte, RAD- und RGD-modifizierte HSA-NP gleichermaßen betreffen müsste und demnach alle die gleiche Bindungs- und Genexpressions-Charakteristik aufweisen müssten. Es wurden aber stets höhere Genexpressionsraten in Proben der RGD-modifizierten HSA-NP gemessen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass diese spezifisch internalisiert wurden, ohne im Lysosom angereichert zu werden. Da allerdings bereits zuvor gezeigt wurde, dass die RGD-modifizierten 100 % GA-qv-NP im Lysosom eingelagert werden, wurden die Zellen zusätzlich zur Behandlung mit GA-qv-NP mit Chloroquin, einem lysosomotropischen Wirkstoff, inkubiert. Zellen, die dagegen mit den Nanopartikeln ohne Chloroquin inkubiert wurden, zeigten keine eGFP-Expression.

Damit konnte mit RGD-modifizierten GA-qv-NP zwar einerseits erstmals ein erfolgreicher Gentransfer gezeigt werden, dieser war aber gering und abhängig von Chloroquin. Dies lässt den Schluss zu, dass die RGD-Modifizierung der HSA-NP die Aufnahme der Nanopartikel in den untersuchten Zelltypen begünstigt, aber die Genexpression nur unzureichend fördert.

Vor diesem Hintergrund wurden alternative Liganden zum Gentransport der HSA-NP identifiziert und getestet. Zellpenetrierende Peptide (CPP) wie das Tat, der *trans-activator of transcription* des HIV, können über verschiedene Wege in die Zelle gelangen. Neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose, können CPP alternativ z. B. zur Ausbildung von Poren in der Zellmembran führen [86, 87]. Durch diese können die CPP ins Zytoplasma transportiert werden, ohne das Endosom/Lysosom durchqueren zu müssen. Im Gegensatz zu der Modifizierung mit RGD-Peptiden zeigten die Tat-modifizierten HSA-NP eine sehr gute Interaktion mit allen getesteten Zelltypen. Selbst niedrig (20 %) Glutaraldehyd-quervernetzte Tat-modifizierte HSA-NP führten zu einer detektierbaren Interaktion mit HEK293T-Zellen. Die CLSM-Analyse nach 48-stündiger Inkubation der HEK293T-Zellen mit Tat-modifizierten GA-qv-NP zeigte eine intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel in nahezu allen dokumentierten Zellen, wobei auch diese in vesikulären Strukturen angeordnet waren. Funktionale Analysen der Tat-modifizierten Nanopartikel zeigten erstmals eine Gen-expression ohne Chloroquin, die über die Häufigkeit einer spontanen Transfektion hinausging. Die Zugabe von Chloroquin ins Inkubationsmedium steigerte die Genexpression der Tat-modifizierten Nanopartikel erheblich, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass ein Großteil der Tat-modifizierten GA-qv-NP im Lysosom eingelagert wurde. Ko-Lokalisations-Experimente bestätigten den Verdacht einer lysosomalen Einlagerung der Tat-modifizierten GA-qv-NP. Damit wird entweder nur ein geringer Teil der Tat-modifizierten GA-qv-NP über alternative Wege internalisiert oder auch diese führen letztlich zur lysosomalen Einlagerung.

Bereits mehrere Studien berichteten, dass auch Tat-modifizierte Moleküle zu lysosomalen Vesikeln transportiert werden können [175, 176]. Dabei ist nicht nur der Ligand entscheidend dafür, welcher Aufnahmeweg genutzt wird, sondern auch die zu transportierenden Moleküle selbst. Generell hat die Größe der Nanopartikel einen entscheidenden Einfluss auf den Aufnahmemechanismus [93]. Tünnemann *et al.* demonstrierten, dass die Größe der Proteine oder Moleküle, den Aufnahmeweg des daran gebundenen Tat-Peptides beeinflussen [85]. Ungebundene Tat-Peptide wurden sehr schnell internalisiert und zeigten anschließend eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung. Je größer die Moleküle waren, an die die Tat-Peptide kovalent gebunden wurden, desto langsamer wurden sie internalisiert und umso stärker reichert sich in Vesikeln an. Damit würde sich eine Reduzierung des Durchmessers der HSA-NP positiv auf deren Internalisierung auswirken. Lin *et al.* beschrieben, dass durch die Verwendung alternativer Desolvationsreagenzien, wie z. B. Methanol oder Aceton die Herstellung von HSA-NP mit einer Größe von unter 100 nm möglich



ist [177]. Die in der Studie von Tünnemann *et al.* als groß bezeichneten *quantum dots* waren mit 20 nm allerdings zehnmal kleiner, als die in dieser Arbeit analysierten circa 200 nm großen HSA-NP. Damit ist es unwahrscheinlich, dass eine Optimierung der HSA-NP bezüglich ihrer Größe auf beispielsweise <100 nm ausreichen würde, um deren Transport zu lysosomalen Vesikeln zu verhindern. Daher war das Ziel durch die Identifizierung der optimalen Inkubationsbedingungen für Tat-modifizierte GA-qv-NP einen chloroquinfreien effizienten Gentransport zu erreichen.

Es ist bekannt, dass sich neben einer Einlagerung im Lysosom weitere Faktoren negativ auf die Genexpressionsrate von NVA auswirken können. Besonders für Lipofektionen wurde die Reduktion der Transfektionsrate aufgrund des Zusatzes an fötalem Kälberserum (FKS) im Medium beschrieben [163, 164]. Der direkte Einfluss des FKS auf die HSA-NP wurde in einer Studie zur Lagerungsstabilität analysiert [170]. Dabei wurde gezeigt, dass die Lagerung in serumhaltigem Medium negativen Einfluss auf die Stabilität der HSA-NP hat. Für serumsensitive Transfektionsmethoden wird OptiMEM® als Inkubationsmedium empfohlen. In der Tat erhöhte die Inkubation der Tat-modifizierten HSA-NP in OptiMEM® die Anzahl an eGFP-exprimierenden Zellen deutlich im Vergleich zum Kultivierungsmedium, welches FKS enthielt. Wurde dagegen dem OptiMEM® FKS oder bovines Serumalbumin (BSA) zugegeben, reduzierte sich die Genexpressionsrate wieder auf das Ausgangsniveau. Interessanterweise reduzierte die Zugabe von HSA in OptiMEM® die Genexpression geringer im Vergleich zu BSA. Damit scheint besonders das BSA des FKS einen negativen Einfluss auf den nanopartikulären Gentransport zu haben. Es stellt sich hierbei die Frage, ob die Stabilität der HSA-NP durch ein Binden des freien Albumins reduziert wird oder die Aufnahme der HSA-NP in Konkurrenz zu dem freien Albumin steht. In beiden Fällen müsste eine reduzierte Interaktion der HSA-NP im serumhaltigen Medium im Vergleich zur Inkubation in OptiMEM® detektiert werden. Die Interaktion der HSA-NP mit den Zellen war jedoch in OptiMEM® nicht höher als im Kultivierungsmedium (Abb. Anhang 2), wodurch keine der Hypothesen bestätigt werden konnte. Zudem ist fraglich, warum sich besonders das BSA negativ auf die Genexpressionsrate auswirkt. Weiterführende Studien dieses Phänomens könnten zum Verständnis der Internalisierung von HSA-NP und damit zur weiteren Entwicklung effizienter HSA-basierter Gentransportsysteme beitragen.

Neben dem reduzierenden Effekt des FKS müssen zudem für die Genexpression fördernde Zusätze im OptiMEM® enthalten sein, denn die Inkubation der Tat-modifizierten HSA-NP in Basalmedium (Kultivierungsmedium ohne FKS) führte lediglich zu einer geringen Expression des Reportergens eGFP. Die komplette Formulierung des OptiMEM® ist nicht veröffentlicht. Allerdings ist bekannt, dass diesem Transferrin, Insulin sowie verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, um die Vitalität der Zellen im serumreduzierten Milieu zu steigern. Eine Erhöhung der Nanopartikel-vermittelten Genexpressionsrate durch zusätzliches

Transferrin oder Insulin im Basalmedium konnte nicht detektiert werden, obwohl beide in der Literatur als positive Modulatoren der Transfektion beschrieben sind [178-180]. Da es keine detaillierten Angaben zur Formulierung gibt, konnte der positive Einfluss des OptiMEM® nicht näher eingegrenzt werden. Dennoch stellte OptiMEM® die optimale Basis des Inkubationsmediums für die HSA-NP dar.

Die Zugabe von Chloroquin in OptiMEM® förderte die Genexpressionsrate der HSA-NP zusätzlich, womit gezeigt werden konnte, dass OptiMEM® Chloroquin nicht ersetzt, sondern ergänzt. Mikroskopische Analysen zeigten allerdings morphologische Veränderungen der Zellen, welche mit OptiMEM® in Anwesenheit von Chloroquin behandelt wurden, was auf eine erhöhte Zytotoxizität dieser Kombination hindeutet. Da mit diesem Ansatz eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden könnte, wurde versucht, mittels endosomolytischen Peptiden in OptiMEM® die Wirkung des Chloroquin zu ersetzen.

In der Regel werden die NVA kovalent mit endosomolytischen Peptiden modifiziert. Einige Studien zeigten aber, dass die direkte Zugabe von endosomolytischen Peptiden in das Inkubationsmedium zu einer gesteigerten endosomal Freisetzung ko-inkubierter NVA führen kann. Das erste zellpenetrierende Peptid, deren Ko-Inkubation zum effizienten Transport von Oligonukleotiden genutzt wurde, war MPG $\alpha$ . MPG $\alpha$  ist ein synthetisches Peptid, welches eine Fusionierung aus der hydrophoben Sequenz des HIV gp41 mit der NLS der SV40 T-Antigen-Sequenz darstellt [90]. Die Ko-Inkubation Tat-modifizierter GA-qv-NP mit MPG $\alpha$  in OptiMEM® steigerte die Genexpressionsrate der Nanopartikel allerdings nicht. Genauso wurde durch Ko-Inkubation mit dem Peptid E5-Tat (Fusionspeptide der modifizierten HA2-Sequenz des Influenzavirus mit Tat) die Genexpressionsrate der Tat-modifizierten GA-qv-NP nicht erhöht. Dabei zeigten Lee *et al.*, dass Tat-Fusionsproteine (Tat-mCherry) von der Ko-Inkubation mit E5-Tat profitierten [97]. Während die Inkubation von Tat-mCherry im Lysosom lokalisiert wurde, führte die Ko-Inkubation mit E5-Tat zu einer gleichmäßigen zytoplasmatischen Verteilung der mCherry-Fluoreszenz. Es ist allerdings zu beachten, dass Tat-modifizierte HSA-NP größer als Proteine sind und eventuell daher keine Steigerung der Genexpressionsrate mittels Ko-Inkubation mit endosomolytischen Peptiden erzielt werden konnte. Interessant wäre demnach die kovalente Bindung von GALA oder E5-Tat an HSA-NP. Dies könnte zur Erkenntnis führen, ob die Ko-Inkubation der Tat-modifizierten HSA-NP mit E5-Tat-Peptiden aufgrund eines Ungleichgewichtes nicht zur Freisetzung aus dem Endosom gebracht werden konnten, HSA den endosomolytischen Effekt von Peptiden reduziert oder aber die Ko-Inkubation nicht so effizient wie ein kovalentes Binden der Peptide ist.

Das Modifizieren der HSA-NP konnte als wichtiger Modulator der Internalisierungs- und Genexpressionsrate identifiziert werden, wobei die effizienteste chloroquinfreie Transfektion mit Tat-modifizierten 20 % GA-qv-NP in OptiMEM® ohne weitere Zusätze erreicht wurde.

## Alternative Quervernetzungsmethoden zur Herstellung HSA-basierender Gentransfersysteme

Neben der Stabilisierung mit Glutaraldehyd können HSA-Nanopartikel mittels Hitze oder Disulfidbrücken stabilisiert werden. Diese alternativen Quervernetzungsmethoden haben den Vorteil, dass komplett auf chemische Reagenzien verzichtet werden kann. Denn obwohl bereits in vielen Studien die Biokompatibilität Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP gezeigt wurde [148, 162, 181], gibt es auch einige Kritiker dieser Stabilisierungsmethode [137, 182, 183]. Zudem wurde ein Einfluss der alternativen Quervernetzungsmethoden auf die intrazelluläre Plasmidfreisetzung und damit auch Genexpressionsrate erwartet, da dies bereits mit unterschiedlichen Glutaraldehyd-Quervernetzungsgraden gezeigt wurde.

Die Quervernetzung von HSA-NP mittels Hitze wurde bereits von Weber *et. al.* [133] beschrieben und zudem der erfolgreiche Transport von Antisense-Oligonukleotiden mit diesen Nanopartikeln gezeigt [137]. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten unmodifizierten und Tat-modifizierten Plasmid-beladenen H-qv-NP unterscheiden sich nur gering in Größe, Zetapotential sowie Konzentration der inkorporierten Plasmid-DNA von den äquivalenten GA-qv-NP [152]. Die Modifizierung mit Tat-Peptiden führte genau wie bei GA-qv-NP zu einer erhöhten Transfektionseffizienz der H-qv-NP in HEK293T-Zellen. Auffällig war, dass H-qv-NP, in welche das Luciferaseplasmid pCMV-Luc inkorporiert wurde, im Vergleich zu H-qv-NP mit inkorporiertem peGFP-N1-Plasmid eine geringere Stabilität hatten. Dies zeigte sich darin, dass die Ergebnisse von Nanopartikeln innerhalb einer Charge nicht reproduzierbar waren. Die Ergebnisse der H-qv-NP mit inkorporiertem peGFP-N1-Plasmid dagegen konnten reproduziert werden, wenn auch die Transfektionseffizienz verschiedener Chargen zueinander schwankte: Während einige Chargen Tat-modifizierter H-qv-NP eine Transfektionseffizienz von circa 30 % in OptiMEM® erreichten, waren es bei anderen Chargen maximal 3 % oder 8 %. Die Instabilität der H-qv-NP ist vor allem in Hinblick auf deren Einsatz in der Gentherapie bedenklich. Dabei zeigten die Tat-modifizierten H-qv-NP hohe Genexpressionsraten in OptiMEM® ohne Chloroquin-Zusatz, was genau wie auch die Glutaraldehyd-freie Herstellung vorteilhaft für die Biokompatibilität des Gentransfersystems ist. Demnach würde die Quervernetzung mittels Hitze für HSA-basierende Gentransfer-systeme eine interessante Alternative darstellen, wenn die Stabilität der H-qv-NP erhöht werden könnte.

Die hier getesteten H-qv-NP wurden für 10 min bei 70 °C inkubiert. Diese Parameter wurden gewählt, um die Funktionalität der inkorporierten Plasmid-DNA gewährleisten zu können. In der Literatur wurden dagegen entweder höhere Temperaturen oder längere Inkubationszeiten zur Stabilisierung der H-qv-NP verwendet [133, 137]. Weber *et al.* testeten Hitzestabilisierungen zwischen 2-48 h bei 50-70 °C und gaben an, dass erst ab 70 °C die Inkubationszeit auf unter 24 h reduziert werden konnte um stabile Nanopartikel herstellen zu können. Demnach müsste in weitergehenden Studien ermittelt werden, wie sich eine

verlängerte Inkubationszeit oder erhöhte Temperatur auf die Funktionalität der inkorporierten Plasmid-DNA sowie die Stabilität und die Transfektionseffizienz der H-qv-NP auswirken würden. Erst dann kann das Potential der H-qv-NP für die Gen- und Zelltherapie sicher ermittelt werden.

Eine weitere Möglichkeit HSA-NP zu stabilisieren, ist die Ausbildung von Disulfidbrücken. Gong *et al.* verwendeten das zytotoxische  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Reduzierung von Disulfidbrücken, um Albumin-basierte Nanopartikel herzustellen [131, 184]. In einer kürzlich erschienen Publikation etablierten Wang *et al.* die Stabilisierung von Curcumin-beladenen HSA-Nanopartikeln mittels Glutathion (GSH), welches biokompatibel ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzung des GSH für die Herstellung DNA-beladener Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP (D-qv-NP) erweitert. Die Größe der D-qv-NP war vergleichbar mit der Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzter HSA-NP. Dies war zu erwarten, da die Quervernetzung einen geringeren Einfluss auf die Größe der HSA-NP hat als z. B. das Desolvationsreagenz, welches bei allen Stabilisierungsmethoden Ethanol war [132, 177]. Langer *et al.* beschrieben, dass zudem der pH-Wert sowie die Konzentration der initialen HSA-Lösung entscheidend die Größe der GA-qv-NP beeinflussen [132]. Auch für die D-qv-NP konnte eine Abhängigkeit der Größe von der ausgehenden HSA-Konzentration festgestellt werden. Ein wesentlicher Unterschied der Disulfidbrücken-stabilisierten HSA-NP zu den Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten HSA-NP ist, dass diese ein positives Zetapotential in Wasser haben (circa 10 mV). Für viele Nanopartikelformulierungen wurde bereits gezeigt, dass sich ein positives Zetapotential förderlich auf die Bindung der Nanopartikel an die negativ geladene Zellmembran auswirkt [185]. Es ist aber möglich, dass über eine stark positive Ladung (>30 mV) diese so intensiv mit der Membran der Zellen interagiert, dass irreparable Löcher entstehen, wodurch sich die Zytotoxizität dieser Nanopartikel erhöhen würde [59, 185]. In dieser Arbeit konnte mit D-qv-NP behandelten Zellen keine erhöhte Zytotoxizität oder morphologische Veränderungen festgestellt werden.

Neben einer erhöhten Bindung könnten die D-qv-NP zudem einen Vorteil bei der intrazellulären Plasmidfreisetzung haben, da die Spaltung von Disulfidbrücken ein ständig ablaufender Prozess in Zellen ist. Die Plasmidbeladung der D-qv-NP wurde indirekt über die DNA-Konzentration im Überstand ermittelt. In keinem der analysierten Überstände konnte Plasmid-DNA analysiert werden, was auf eine komplette Inkorporierung der Plasmid-DNA in die D-qv-NP schließen lässt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der nicht vorhandenen Autofluoreszenz mussten die D-qv-NP zur direkten In-vitro-Charakterisierung mit PromoFluor markiert werden. An hMSC und HEK293T-Zellen zeigten die markierten D-qv-NP eine sehr gute Bindung. Aber obwohl die Funktionalität der Plasmid-DNA nach Einbindung in die Nanopartikel nicht beeinträchtigt wurde, konnte nur eine sehr geringe Genexpressionsrate in

HEK293T-Zellen detektiert werden. Somit ist anzunehmen, dass die positive Ladung der D-qv-NP nicht allein zum effizienten Gentransfer ausreicht.

Zur Evaluierung der Transfektionseffizienz der D-qv-NP mit den anderen HSA-Formulierungen, wurden auch diese mit Tat-Peptiden modifiziert. Funktionale Analysen zeigten erneut, dass die Tat-Modifizierung die Genexpressionsrate im Vergleich zu unmodifizierten HSA-NP erheblich steigerte. Aber wie auch bei den Tat-modifizierten Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten HSA-NP musste für eine effiziente Genexpression des Reportergens eGFP dem Medium Chloroquin zugesetzt werden.

Alternative Quervernetzungsmethoden ändern damit nichts an der Tatsache, dass Tat-modifizierte HSA-NP im Lysosom eingelagert werden. Hierfür sind entweder der Ligand Tat, das HSA selbst oder die physikochemischen Eigenschaften der HSA-NP ausschlaggebend. Denn während unmodifizierte D-qv-NP ein positives Zetapotential aufweisen, erhalten sie durch PEGylierung und Tat-Modifizierung ein negatives Zetapotential. Die Aufnahme der Tat-modifizierten D-qv-NP sollte damit theoretisch vergleichbar mit der der Tat-modifizierten Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten HSA-NP sein. Ein Vorteil dieser Formulierung könnte somit nur aus einer verbesserten Plasmidfreisetzung resultieren.

Die intrazelluläre Freisetzung der Plasmid-DNA wurde indirekt anhand der Transfektionseffizienz analysiert. Qualitative Analysen der Genexpressionsrate Tat-modifizierter peGFP-N1-beladener D-qv-NP in der Fluoreszenzmikroskopie ließen im Vergleich zu GA-qv-NP und H-qv-NP keinen sichtbaren Vorteil dieser Formulierung erkennen. Zur Quantifizierung wurden pCMV-Luc-beladene D-qv-NP hergestellt. Der Vergleich der Luciferaseaktivität von Zellen, die mit Tat-modifizierten GA-, H- oder D-qv-NP inkubiert wurden, zeigte die höchste Genexpressionsrate nach Behandlung mit Tat-modifizierten D-qv-NP. Die Unterschiede sind für einen Luciferase-Assay allerdings zu gering, um eindeutig die Stabilisierung über Disulfidbrücken als effizienteste Quervernetzungsmethode DNA-beladener HSA-NP bestimmen zu können. Dies bedeutet wiederum, dass entweder die Formulierung für die Effizienz des Gentransports eine untergeordnete Rolle spielt oder aber der Einfluss aufgrund der lysosomalen Einlagerung der HSA-NP nicht detektiert werden kann. Für die D-qv-NP wurde ein deutlicher Vorteil bei der intrazellulären Plasmidfreisetzung erwartet, da diese Partikelformulierung komplett mittels endogener Enzyme degradiert werden kann. Allerdings wurden diese, wie auch schon die Glutaraldehyd- und Hitze-quervernetzten Nanopartikel, größtenteils im Lysosom eingelagert. Durch den lysosomotropischen Wirkstoff Chloroquin konnten die Nanopartikel aus dem Lysosom freigesetzt werden, wurden aber eventuell auch in ihrer Struktur verändert bzw. bereits durch die Lagerung in den Lysosomen degradiert, was Einfluss auf die Formulierungen sowie Plasmidfreisetzung haben könnte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die D-qv-NP im Vergleich zu den anderen HSA-Formulierungen intrazellulär schneller degradiert werden würden, wenn die HSA-NP mit einem

Aufnahmemechanismus in die Zelle gelangen würden, der nicht zur Einlagerung der Nanopartikel im Lysosom führt.

Die D-qv-NP sind in ihrer Transfektionseffizienz vergleichbar mit 20 % Glutaraldehyd-quervernetzten HSA-NP, aber Verwendung toxischer Reagenzien bei deren Herstellung. Sie stellen damit für die Entwicklung von HSA-basierenden Gentransportsystemen eine Alternative zu GA-qv-NP dar. Demnach wäre von Interesse, in weiteren Studien Möglichkeiten zu identifizieren, wie der Endosom-Lysosom-Weg umgangen werden kann, um einerseits langfristig eine chloroquinfreie HSA-basierte Transfektionsmethode zu etablieren und andererseits das volle Potential der D-qv-NP ermitteln zu können.

## Evaluierung der HSA-basierenden Gentransfersysteme in Bezug auf ihre Transfektionseffizienz und Biokompatibilität

Die vielen in der Literatur beschriebenen nicht-viralen Alternativen (NVA) werden aufgrund der geringen Effizienz und/oder Zytotoxizität bis dato nicht zum Gentransfer in der Zell- und Gentherapie eingesetzt. Daher sollten die entwickelten Plasmid-beladenen HSA-NP bezüglich ihrer Transfektionseffizienz und Zytotoxizität evaluiert werden. Die Evaluierung wurde anhand vergleichender Studien mit den Standard-Transfektionsmethoden (STM) Calcium-Phosphat, FuGene® HD und Lipofectamine®2000 durchgeführt.

Zur Einordnung der Transfektionseffizienz der optimierten HSA-Formulierungen wurden hMSC, BJ-Fibroblasten und HEK293T mit dem peGFP-N1-Plasmid transfiziert und die Genexpressionsrate des eGFP durchflusszytometrisch quantifiziert. Wie erwartet, zeigte sich eine größere Differenz der Transfektionseffizienz zwischen den unterschiedlichen Zelltypen, als zwischen den verschiedenen getesteten Transfektionsmethoden. Während HEK293T-Zellen leicht zu transfizieren sind, sind Primär- und Stammzellen als schwer zu transfizieren beschrieben [186]. Dies bestätigte sich für alle hier getesteten Transfektionsmethoden. Tatsächlich wurde für die Kombination der HEK293T-Zellen mit FuGene® HD oder Lipofectamine®2000 eine Transfektionseffizienz von fast 100 % erreicht. BJ-Fibroblasten ließen sich dagegen sehr ineffizient transfizieren (maximal 36 % nach 72 h mit Lipofectamine®2000), während hMSC kaum detektierbare eGFP-Expression zeigten.

Im Vergleich zu den STM wurde mit den Tat-modifizierten HSA-NP eine geringere Genexpressionsrate in HEK293T-Zellen erreicht. Die Inkubation mit Tat-modifizierten D-qv-NP führte in circa 30 % der HEK293T-Zellen zur eGFP-Expression, was der Transfektionseffizienz von Calcium-Phosphat entspricht. Verglichen mit den anderen STM war die Calcium-Phosphat-Methode bei allen getesteten Zelltypen am ineffizientesten. Damit konnten in der vorliegenden Arbeit zwar bereits große Fortschritte in der Genexpressionsrate der HSA-NP gemacht werden, an die Effizienz der kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien reichen sie dennoch noch nicht heran.

Dieses Ergebnis steht mehrfach im Widerspruch zu der einzigen in der Literatur beschriebenen Studie, in der zuvor DNA-beladene HSA-NP zum Gentransfer eingesetzt wurden. Mo *et al.* [130] detektierten nach Inkubation mit Plasmid-beladenen, unmodifizierten 200 % GA-qv-NP eine sechsmal höhere Transfektionseffizienz als mit Lipofectamine® (Anmerkung: Lipofectamine® ist das Vorläufer-Reagenz von Lipofectamine®2000 und wird von LifeTechnologies nicht mehr vertrieben). Dabei wurde die Transfektionseffizienz anhand der Expression des Reportergens *yellow fluorescent protein* (YFP) in ARPE-19-Zellen (humane retinale Pigmentepithel-Zelllinie) ermittelt und erreichte bereits nach 48 h 86 %. Es ist allerdings fraglich, wie zwischen der Autofluoreszenz der GA-qv-NP und dem Reporter gen YFP differenziert wurde, da beide im gleichen Fluoreszenzkanal ihre Absorptionsmaxima haben. Die Autoren zeigten, dass unbeladene 200 % GA-qv-NP zu einem Hintergrund von nur 2 % führten und damit die GA-qv-NP entweder kaum mit den Zellen interagierten oder nach 48 h fast komplett degradiert wurden. Im Vergleich dazu zeigten in der vorliegenden Arbeit 100 % GA-qv-NP eine sehr gute Interaktion mit unterschiedlichen Zelltypen. Diese stark quervernetzten GA-qv-NP wurden allerdings kaum mehr intrazellulär degradiert und es konnte keine Genexpression detektiert werden. Diese kontroversen Ergebnisse müssen daher mit dem unterschiedlichen verwendeten Zelltypen erklärt werden. So könnten die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der GA-qv-NP in ARPE-19-Zellen aufgrund zellspezifischer Mechanismen im Vergleich zu den in dieser Arbeit getesteten Zelltypen effizienter erfolgen. Demnach ist auch möglich, dass HSA-NP von diesen Zellen mittels alternativer Wege internalisiert werden, die nicht zur Einlagerung im Lysosom führen.

Im Fokus der Etablierung von HSA-basierenden Gentransfersystemen für die Gen- und Zelltherapie sollte neben der Transfektionseffizienz auch die Biokompatibilität stehen. Die Analyse der humanen Fibroblasten (MrC-5) nach 24-stündiger Inkubation mit Tat-modifizierten HSA-NP und STM zur Bestimmung der Zytotoxizität zeigte, dass keines der getesteten Transfektionsreagenzien die relative Stoffwechselaktivität reduzierte. Im Gegensatz dazu war eine leichte Reduzierung der relativen Proliferationsrate nach Calcium-Phosphat-Behandlung messbar. Die Inkubation mit Lipofectamine®2000 reduzierte die relative Proliferationsrate der MrC-5-Zellen um mehr als 40 %. Dies zeigte sich bereits in einer Reduzierung der prozentualen Anzahl transfizierter Zellen über den analysierten Zeitraum. Damit wies das einzige STM, das zu einer detektierbaren Genexpressionsrate in schwer zu transfizierenden Zellen wie den BJ-Fibroblasten und hMSC führte, eine erhöhte Zytotoxizität auf und spiegelt damit die aktuelle Problematik der meisten Transfektionsmethoden für Primär- und Stammzellen wider: Entweder sind sie nicht effizient oder zytotoxisch.

Gesucht war ein Gentransfersystem speziell zur biokompatiblen nicht-viralen Modifizierung von Primär- und Stammzellen. Denn besonders die Primär- und Stammzellen reagieren sensibel auf Stressfaktoren, was zu einer Beeinflussung der Proliferation führen kann [187].

Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer geeigneten Transfektionsmethode mit hoher Effizienz und geringer Toxizität. Die Tat-modifizierten HSA-NP zeigten in den Zytotoxizitätstests keine negativen Effekte. Die Unbedenklichkeit des HSA wurde bereits durch die FDA-Zulassung des Abraxane®, ein HSA-basiertes Tumorthapeutikum, bekräftigt [169]. In dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Modifizierung der HSA-NP mit Tat-Peptiden die Biokompatibilität der HSA-NP nicht beeinträchtigt. Damit sind diese bezüglich ihrer Biokompatibilität grundsätzlich unbedenklich und zum nicht-viralen Gentransfer geeignet.

### Einschätzung des Potentials HSA-basierender Nanopartikel für einen nicht-viralen Einsatz in der Gen- und Zelltherapie

Die Untersuchungen zur Etablierung und Optimierung der HSA-NP zum Gentransfer erfolgte mit HEK293T-Zellen. Diese sind leicht zu transfizieren und Änderungen der Gentransfersysteme bezüglich ihrer Effizienz können direkt analysiert werden. Da aber in der Gen- und Zelltherapie die HSA-NP zur genetischen Modifizierung von Primär- und Stammzellen eingesetzt werden sollen, wurden diese zusätzlich in BJ-Fibroblasten und hMSC getestet.

Während die RGD- und Tat-modifizierten 100 % GA-qv-NP von hMSC sehr gut internalisiert wurden, führte weder die Inkubation mit modifizierten GA-qv-NP, H-qv-NP oder D-qv-NP zu einer detektierbaren Genexpression des Reportergens eGFP. Humane mesenchymale Stammzellen werden, genau wie BJ-Fibroblasten, als schwer zu transfizieren klassifiziert. Dabei stellt die genetische Modifizierung von hMSC eine besondere Hürde dar. Im Gegensatz zu anderen schwer zu transfizierenden Zellen gibt es für hMSC nur sehr wenige erfolgreiche, nicht-virale Transfektionsmethoden [188]. Eine der effizientesten davon ist die Nukleofektion, mit der bis zu 45 % einer hMSC-Population transfiziert werden können [46]. Nach der Elektroporation ist allerdings das Proliferationsverhalten der hMSC stark reduziert, sodass die Anwendung dieser Methode einschränkt ist. Damit gibt es z. B. für die Ex-vivo-Tumorthherapie mit hMSC bis dato keine Alternative zu viralen Vektoren. DNA-beladene HSA-NP wären bezüglich ihrer Biokompatibilität eine gute Alternative, zur genetischen Veränderung von hMSC muss aber deren Transfektionseffizienz deutlich gesteigert werden.

Anders zeigten einige BJ-Fibroblasten nach Inkubation mit HSA-NP (20 % GA-qv-NP, H-qv-NP und D-qv-NP) eine Expression des Reportergens eGFP, womit erstmals ein HSA-vermittelter Gentransfer in Primärzellen gezeigt wurde. In diesen Zellen wurde allerdings mit unmodifizierten HSA-NP eine höhere Transfektionseffizienz als mit Tat-modifizierten HSA-NP erreicht. Dies widerspricht den Ergebnissen der Interaktionsstudien, welche zeigten, dass die Tat-modifizierten GA-qv-NP sehr gut mit BJ-Fibroblasten interagierten und auch internalisiert wurden, während die unmodifizierten HSA-NP kaum mit den BJ-Fibroblasten interagierten. Diese Widersprüche unterstreichen die zuvor aufgestellten Zweifel, dass Interaktionsstudien



zur Identifizierung von effizienten Gentransfersystemen geeignet sind. Demnach müssen bereits in der Etablierungsphase der Gentransfersysteme diese in Transfektionsstudien mit den Zielzellen eingesetzt werden.

Auffällig war zudem, dass sich die Inkubation in chloroquinhaltigem Medium weder auf die Transfektionseffizienz in hMSC noch in BJ-Fibroblasten positiv auswirkte. Die höchste Genexpressionsrate zeigten die Primär- und Stammzellen, wenn sie mit den HSA-NP in OptiMEM® inkubiert wurden. Dabei wurden in Vorversuchen die optimalen Chloroquin-Konzentrationen für die verschiedenen Zelltypen ermittelt, um zytotoxische Effekte zu vermeiden. Zeilhofer *et al.* zeigten, dass Chloroquin in einigen Zelltypen zum Proliferationsstopp führen kann, was wiederum im Zusammenhang mit einer niedrigen Genexpressionsrate stehen könnte [189]. Für viele NVA wird davon ausgegangen, dass ihre inkorporierte DNA nur während der Mitose in den Zellkern gelangen kann. Die Behandlung mit Chloroquin zeigte sich in den getesteten Primär- und Stammzellen als ungeeignet und führte demnach nicht zu einer gesteigerten Freisetzung der im Lysosom lokalisierten HSA-NP. Somit muss zum effizienten, HSA-vermittelten Gentransfer in Primär- und Stammzellen eine Chloroquin-unabhängige, endo- bzw. lysosomale Freisetzung der Plasmid-DNA erreicht werden.

Das Polymer Polyethylenimin (PEI) wurde bereits mehrfach als endosomolytisches Reagenz zum nicht-viralen Gentransfer eingesetzt und auch HSA-Nanopartikel, in welche PEI inkorporiert oder mit PEI beschichtet wurden, sind in der Literatur beschrieben [147, 148] – jedoch wurden diese bisher nicht zur Transfektion von Primär- und Stammzellen eingesetzt. Aus Vorversuchen ging hervor, dass die Beschichtung Tat-modifizierter 20 % GA-qv-NP mit PEI die Transfektionseffizienz dieser reduzierte. Die Genexpressionsrate unmodifizierter 20 % GA-qv-NP wurde dagegen durch die PEI-Beschichtung gesteigert. Die höchste Transfektionseffizienz wurde allerdings in Zellen erreicht, welche nur mit den Polyplexen aus PEI und Plasmid-DNA (PEI-Polyplexen) inkubiert wurden. Dies deutete darauf hin, dass HSA den positiven Effekt des PEI in HEK293T-Zellen vermindert und durch die Modifikation mit Tat-Peptiden dieser nochmals reduziert wird. Möglich ist demnach auch, dass aus unmodifizierten 20 % GA-qv-NP Plasmid-DNA freigesetzt wurde, die zusammen mit PEI zu einer moderaten Genexpressionsrate führte. Gleiche Ergebnisse wurden mit PEI-beschichteten D-qv-NP erreicht, sodass sich ausschließen lässt, dass dieser Effekt auf einer negativen Wechselwirkung des PEI mit Glutaraldehyd beruht.

Interessanterweise führte eine Inkubation der PEI-Polyplexe auch zu einem erfolgreichen Gentransfer in den Primär- und Stammzellen. Nicht nur BJ-Fibroblasten zeigten nach Inkubation mit PEI-Polyplexen eine moderate Anzahl eGFP-exprimierender Zellen – auch die hMSC. Damit konnte gezeigt werden, dass PEI, im Gegensatz zu Chloroquin, als endosomolytisches Reagenz in Primär- und Stammzellen geeignet ist. Da aber PEI-beschichtete HSA-NP in HEK293T-Zellen eine niedrigere Transfektionseffizienz im Vergleich

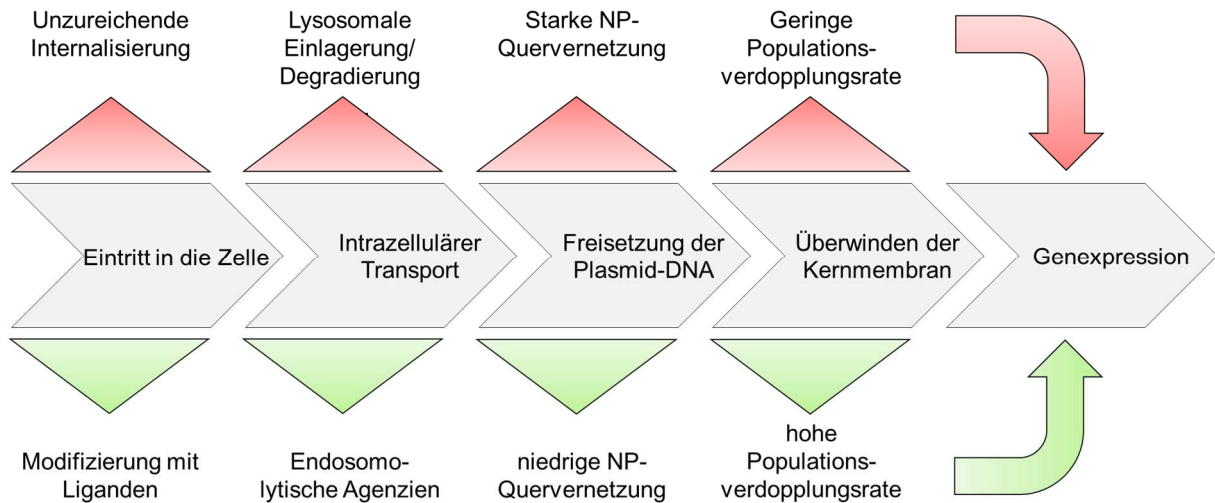
zu PEI-Polyplexen hatten, muss getestet werden, wie sich eine Inkorporierung des PEI in die HSA-NP auf die Genexpressionsrate auswirken würde. Die Inkorporierung des PEI könnte seine zytotoxische Wirkung reduzieren, da diese hauptsächlich durch die unspezifische Bindung des kationischen Polymers an die negativ geladene Zellmembran ausgelöst wird [86]. Andererseits könnte intrazellulär die endosomolytische Aktivität des PEI zum Tragen kommen, wenn die Degradierung der HSA-NP vorgeht. Auch ist es möglich, dass die Ladung des HSA und Tat-Peptides die Pufferkapazität des PEI und damit auch sein endosomolytisches Potential beeinflusst. Zu einem erfolgreichen Gentransfer müsste somit das optimale Verhältnis der Reagenzien zueinander analysiert werden.

Neben dem Potential von PEI als endosomolytisches Reagenz konnte weiterführend gezeigt werden, dass PEI und Chloroquin nicht identisch wirken bzw. sich ergänzen können, was wiederum der Studie von Akinc *et al.* widerspricht. In deren Studie führte die Chloroquin-Zugabe nicht zu einer Steigerung der Genexpressionsrate von PEI-Polyplexen [190], da theoretisch beide Reagenzien den gleichen endosomolytischen Effekt auslösen sollten. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Nanopartikel-vermittelte Genexpression von D-qv-NP dagegen ein Anstieg von 7,7 % nach Chloroquin-Zugabe bzw. 1,0 % nach PEI-zugabe auf 50,3 % in HEK293T-Zellen gemessen, wenn diese mit einer Kombination aus Chloroquin und PEI inkubiert wurden (Abb. Anhang 4). Der gleiche Effekt konnte für die freie Plasmid-DNA beobachtet werden. Durch die alleinige Zugabe von PEI wurde aber die Transfektions-effizienz der freien Plasmid-DNA stärker erhöht als nur mit Chloroquin als Zusatz, da PEI auch die Aufnahme der sonst kaum internalisierten Plasmid-DNA fördern kann.

Die Kombination von Chloroquin mit PEI scheint hingegen eine Engstelle des Gentransportes bzw. der Plasmidfreisetzung durchbrochen zu haben. Demnach wäre interessant, ob auch die Ko-Inkubation oder Modifizierung von HSA-PEI-NP mit endosomolytischen Peptiden, wie z. B. GALA oder E5-Tat, eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreichen würde - vor allem vor dem Hintergrund, dass Chloroquin in den Primär- und Stammzellen keinen positiven Effekt auf die Genexpressionsrate hatte, und gerade in diesen Zellen aber eine deutliche Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden muss, um Einsatz in der Gen- und Zelltherapie zu finden.

Mit der unzureichenden Internalisierung, lysosomalen Einlagerung oder geringen Plasmidfreisetzung im Zytosol konnten wichtige Hürden des HSA-basierenden Gentransfers identifiziert und Ansätze zur Überwindung dieser formuliert werden, damit in Zukunft effiziente und biokompatible Gentransfersysteme für die Gen- und Zelltherapie entwickelt werden können (Abb. 42). Neben den bereits diskutierten Hürden des Gentransports ist besonders die Überwindung der Kernmembran in Primär- und Stammzellen problematisch. Diese Zellen proliferieren in der Regel sehr viel langsamer als entartete Tumorzellen, wodurch die Plasmid-DNA seltener in den Zellkern gelangen kann. Die Proliferationsrate von Primär- und

Stammzellen kann nicht erhöht werden. Somit müssen die vorigen Hürden entsprechend effizient überwunden werden, um auch in diesen Zellen hohe Genexpressionsraten erreichen zu können.



**Abbildung 42: Hürden des Gentransport-Prozess und Möglichkeiten diese zu überwinden.** Verschiedene Hürden des Gentransportes (rote Dreiecke) wirken sich negativ auf die Genexpressionsrate aus (roter Pfeil). Entsprechende Lösungsansätze (grüne Dreiecke) können zur Überwindung der Hürden und damit zur Erhöhung der Genexpressionsrate beitragen (grüner Pfeil).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erfolgreich HSA-basierende Gentransfersysteme entwickelt und evaluiert werden. Die Transfektionseffizienz der HSA-NP wurde durch die Modifizierung mit dem zellpenetrierenden Peptid Tat sowie durch die Inkubation in serumfreien Medien, wie OptiMEM®, gesteigert. Durch die Etablierung des Trypanblau als Quencher der HSA-Autofluoreszenz, waren eindeutige Unterscheidungen der intra- oder extrazellulären Lokalisation der HSA-NP möglich. Aufgrund der Lokalisierung der HSA-NP im Lysosom war die Inkubation mit Chloroquin für die Genexpressionsrate in HEK293T-Zellen förderlich, allerdings nicht in Primär- und Stammzellen. Eine geringe Glutaraldehyd-Quervernetzungsrage stellte sich als positiv für den Gentransport dar, wobei mit Hitze- und Disulfidbrücken weitere Glutaraldehyd-freie Quervernetzungsmethoden identifiziert werden konnten. Die HSA-NP stellen damit ein geeignetes biokompatibles Gentransfersystem dar. Um aber in Zukunft die HSA-NP als nicht-virale Alternative in der Gen- und Zelltherapie einsetzen zu können, muss die Transfektionseffizienz in den schwer zu transfizierenden Primär- und Stammzellen weiter gesteigert werden.

## Ausblick

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass es zur Etablierung nicht-viraler Gentransfersysteme für die Gen- und Zelltherapie zahlreiche Hürden gibt, die überwunden werden müssen, um eine Alternative zu den unsicheren, aber effizienten viralen Vektoren

darstellen zu können. Verschiedene Lösungsansätze wurden identifiziert, um diese Hürden zu umgehen, doch waren die Ergebnisse der zur Etablierung genutzten Zelllinien nur bedingt auf die Primär- und Stammzellen übertragbar. Die Entwicklung und Analyse der NVA sollte daher künftig direkt in den Zielzellen erfolgen. Dadurch ist zu erwarten, dass vermehrt Zelltyp-spezifische Gentransfersysteme entwickelt werden und weniger welche, die gleichermaßen effizient in Zelllinien, Primär- oder Stammzellen sind.

Die in dieser Arbeit etablierten und optimierten HSA-NP zeigten die Tendenz in lysosomalen Vesikeln eingelagert zu werden. Für einen effizienten Gentransport müssen die HSA-NP somit in der Lage sein dieser Einlagerung zu entkommen. Die Zugabe des lysosomotropischen Reagens Chloroquin förderte die Transfektionseffizienz der HSA-NP in HEK293T-Zellen, nicht aber in den Primär- und Stammzellen. Mit Polyethylenimin (PEI) konnte bereits ein Reagenz identifiziert werden, welches auch in diesen Zellen eine endosomolytische Aktivität besitzt. Weitere Polymere, wie z. B. PAMAM, sind bereits als endosomolytisch bekannt und könnten bezüglich ihrer Effizienz und Zytotoxizität in Primär- und Stammzellen getestet werden. Kombinierte Nanopartikel aus HSA und endosomolytischen Polymeren (HSA-Polymer-NP) könnten demnach eine hoffnungsvolle Basis für Gentransfersysteme für schwer zu transfizierende Zellen sein. Zudem ist die Auswahl der Liganden, mit denen die HSA-NP modifiziert werden können, nicht ausgeschöpft und stellt nach wie vor ein interessantes Instrument dar, um einerseits um beispielsweise die Spezifität und Effizienz des Gentransfersystems zu modulieren und um andererseits eine Einlagerung im Endosom bzw. Lysosom zu umgehen. Spezielle synthetische endosomolytische Liganden könnten dabei nicht nur zur Modifizierung von HSA-NP, sondern auch von HSA-Polymer-NP verwendet werden, um einen effizienten Gentransport der Nukleinsäuren zu erreichen.

Um langfristig die viralen Vektoren ersetzen zu können, bietet aber nicht nur die Formulierung des nanopartikulären Transportsystems Optimierungsansätze, sondern auch das genetische Material selbst. Die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) mittels *messenger* RNA (mRNA) ist die derzeit effizienteste Reprogrammierungs-Methode und hat gegenüber DNA-Vektoren zusätzlich den Vorteil, dass das Sicherheitsrisiko geringer ist. Die Inkorporierung von mRNA statt Plasmid-DNA in HSA-NP wurde bisher nicht gezeigt, könnte aber ein interessanter Ansatz für die effiziente virusfreie Generierung von iPS-Zellen sein [30, 191], da dies die Internalisierungsrate der mRNA und damit die Reprogrammierungsrate steigern könnte.

Letztlich muss die Transfektionseffizienz der nicht-viralen Alternativen in Primär- und Stammzellen erhöht werden, ohne dass gleichzeitig die Zytotoxizität gesteigert wird. Dafür grundlegend ist die weitere Erforschung der zellulären Mechanismen, die den effizienten Gentransport bedingen. Denn obwohl bereits für viele nicht-viralen Alternativen versucht

wurde das Design der Viren zu adaptieren, sind Viren nach wie vor erfolgreicher darin ihre Nukleinsäuren bis zum Zellkern der Wirtszelle zu transportieren.

## Literaturverzeichnis

1. Rubanyi, G.M., *The future of human gene therapy*. Mol Aspects Med, 2001. **22**(3): p. 113-42.
2. Ram, Z., Culver, K.W., Walbridge, S., Blaese, R.M., and Oldfield, E.H., *In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats*. Cancer Res, 1993. **53**(1): p. 83-8.
3. Walther, W. and Schlag, P.M., *Current status of gene therapy for cancer*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(6): p. 659-64.
4. ESchG (idF v. 13.12.1990) § 5 *Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen*.
5. Edelstein, M.L. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. Journal of Gene Medicine 2015; Available from: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>.
6. Hodgkinson, C.P., Gomez, J.A., Mirotsov, M., and Dzau, V.J., *Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(11): p. 1513-26.
7. Kidd, S., Spaeth, E., Klopp, A., Andreeff, M., Hall, B., and Marini, F.C., *The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe*. Cytotherapy, 2008. **10**(7): p. 657-67.
8. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
9. Knoop, K., Kolokythas, M., Klutz, K., Willhauck, M.J., Wunderlich, N., Draganovici, D., et al. Spitzweg, C., *Image-guided, tumor stroma-targeted 131I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery*. Mol Ther, 2011. **19**(9): p. 1704-13.
10. McCormick, F., *Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 130-41.
11. Sandmair, A.M., Turunen, M., Tynnela, K., Loimas, S., Vainio, P., Vanninen, R., et al. Yla-Herttuala, S., *Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions*. Cancer Gene Ther, 2000. **7**(3): p. 413-21.
12. Yang, K., Xu, W.G., Liu, Y.Z., Meng, X.R., Chen, P., and Wu, L.C., *Study on the effect of BMSCs-EGFP-tk as mediator of HSV1-tk/GCV suicide gene therapy directed against A549 in vitro*. Int J Clin Exp Med, 2014. **7**(9): p. 3080-6.
13. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K., *Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy*. J Gene Med, 2009. **11**(5): p. 373-81.
14. Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
15. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
16. Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., et al. Abe, M., *Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells*. Nature, 2013. **494**(7435): p. 100-4.
17. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., et al. Yamanaka, S., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
18. Zhao, H.X., Li, Y., Jin, H.F., Xie, L., Liu, C., Jiang, F., et al. Wang, X.H., *Rapid and efficient reprogramming of human amnion-derived cells into pluripotency by three factors OCT4/SOX2/NANOG*. Differentiation, 2010. **80**(2-3): p. 123-9.
19. Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 649-3.
20. Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G., *Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 543-9.
21. Fujie, Y., Fusaki, N., Katayama, T., Hamasaki, M., Soejima, Y., Soga, M., et al. Era, T., *New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113052.

22. Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., et al. Kim, K.S., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-6.
23. Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., et al. Daley, G.Q., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
24. Zeuner, A. and De Maria, R., *Reprogramming: so simple, so complex*. Cell Death Differ, 2012. **19**(8): p. 1253-4.
25. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A., *Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 795-7.
26. Li, Z. and Rana, T.M., *Using microRNAs to enhance the generation of induced pluripotent stem cells*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2012. **Chapter 4**: p. Unit 4A 4.
27. Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., et al. Pei, D., *The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(6): p. 575-87.
28. Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., et al. Daley, G.Q., *Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 598-602.
29. Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., et al. Deng, H., *Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds*. Science, 2013. **341**(6146): p. 651-4.
30. Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., et al. Rossi, D.J., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
31. Plews, J.R., Li, J., Jones, M., Moore, H.D., Mason, C., Andrews, P.W., and Na, J., *Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14397.
32. Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., et al. Anderson, W.F., *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
33. Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., and Edelstein, R.M., *Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview*. J Gene Med, 2004. **6**(6): p. 597-602.
34. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., et al. Fischer, A., *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 255-6.
35. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., et al. Cavazzana-Calvo, M., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
36. Agency, E.M., *European Medicines Agency recommends first gene therapy approval*, in EMA/CHMP/474664/2012. 2012. p. 2.
37. Grimm, D. and Kay, M.A., *From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy*. Curr Gene Ther, 2003. **3**(4): p. 281-304.
38. Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J., *Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 791-801.
39. Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M., *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11854-9.
40. McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J., *Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis*. Gene Ther, 2001. **8**(16): p. 1248-54.
41. Ibraheem, D., Elaissari, A., and Fessi, H., *Gene therapy and DNA delivery systems*. Int J Pharm, 2014. **459**(1-2): p. 70-83.
42. Dingermann, T., *Gentherapie - Aktuelle Methoden und Forschungsergebnisse*. Vortrag, 2011.
43. Yoshinaga, T., Yasuda, K., Ogawa, Y., and Takakura, Y., *Efficient uptake and rapid degradation of plasmid DNA by murine dendritic cells via a specific mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **299**(3): p. 389-94.
44. Wang, D., Robinson, D.R., Kwon, G.S., and Samuel, J., *Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery*. J Control Release, 1999. **57**(1): p. 9-18.

45. Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., et al. Lemoli, R.M., *Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(2): p. 454-61.
46. Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., and Bosserhoff, A.K., *Efficient transfection method for primary cells*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(2): p. 235-45.
47. Ramamoorth, M. and Narvekar, A., *Non viral vectors in gene therapy- an overview*. *J Clin Diagn Res*, 2015. **9**(1): p. GE01-6.
48. Khosravi-Darani, K., Mozafari, M.R., Rashidi, L., and Mohammadi, M., *Calcium based non-viral gene delivery: an overview of methodology and applications*. *Acta Med Iran*, 2010. **48**(3): p. 133-41.
49. Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G., *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery*. *J Control Release*, 1999. **60**(2-3): p. 149-60.
50. Lleres, D., Weibel, J.M., Heissler, D., Zuber, G., Duportail, G., and Mely, Y., *Dependence of the cellular internalization and transfection efficiency on the structure and physicochemical properties of cationic detergent/DNA/liposomes*. *J Gene Med*, 2004. **6**(4): p. 415-28.
51. Betker, J.L., Gomez, J., and Anchordoquy, T.J., *The effects of lipoplex formulation variables on the protein corona and comparisons with in vitro transfection efficiency*. *J Control Release*, 2013. **171**(3): p. 261-8.
52. Diebold, S.S., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M., and Zenke, M., *Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(27): p. 19087-94.
53. Zanta, M.A., Boussif, O., Adib, A., and Behr, J.P., *In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine*. *Bioconjug Chem*, 1997. **8**(6): p. 839-44.
54. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
55. Nguyen, H.K., Lemieux, P., Vinogradov, S.V., Gebhart, C.L., Guerin, N., Paradis, G., et al. Kabanov, A.V., *Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents*. *Gene Ther*, 2000. **7**(2): p. 126-38.
56. Ward, C.M., Read, M.L., and Seymour, L.W., *Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2221-9.
57. Mahato, R.I., Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M., *In vivo disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes*. *J Drug Target*, 1995. **3**(2): p. 149-57.
58. Merdan, T., Kunath, K., Petersen, H., Bakowsky, U., Voigt, K.H., Kopecek, J., and Kissel, T., *PEGylation of poly(ethylene imine) affects stability of complexes with plasmid DNA under in vivo conditions in a dose-dependent manner after intravenous injection into mice*. *Bioconjug Chem*, 2005. **16**(4): p. 785-92.
59. Frohlich, E., *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. *Int J Nanomedicine*, 2012. **7**: p. 5577-91.
60. Nouri, F.S., Wang, X., Chen, X., and Hatefi, A., *Reducing the Visibility of the Vector/DNA Nanocomplexes to the Immune System by Elastin-Like Peptides*. *Pharm Res*, 2015.
61. Nguyen, J. and Szoka, F.C., *Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle?* *Acc Chem Res*, 2012. **45**(7): p. 1153-62.
62. Smith, A.E. and Helenius, A., *How viruses enter animal cells*. *Science*, 2004. **304**(5668): p. 237-42.
63. Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P., *Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(4): p. e1000394.
64. Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L., *Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis*. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2086-9.
65. Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M.L., and Kirchhausen, T., *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 591-605.
66. Zhang, M.Z., Li, C., Fang, B.Y., Yao, M.H., Ren, Q.Q., Zhang, L., and Zhao, Y.D., *High transfection efficiency of quantum dot-antisense oligonucleotide nanoparticles in cancer cells through dual-receptor synergistic targeting*. *Nanotechnology*, 2014. **25**(25): p. 255102.
67. Conner, S.D. and Schmid, S.L., *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature*, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
68. Mukherjee, S., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R., *Endocytosis*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(3): p. 759-803.



69. Racoosin, E.L. and Swanson, J.A., *M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages*. J Cell Sci, 1992. **102 ( Pt 4)**: p. 867-80.
70. Hillaireau, H. and Couvreur, P., *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66(17)**: p. 2873-96.
71. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D., *Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal*. Cell, 1986. **44(4)**: p. 517-8.
72. Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D., *Integrins*. Cell Tissue Res, 2010. **339(1)**: p. 269-80.
73. Nemerow, G.R. and Stewart, P.L., *Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63(3)**: p. 725-34.
74. Ning, Y., Buranda, T., and Hudson, L.G., *Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway*. J Biol Chem, 2007. **282(9)**: p. 6380-7.
75. del Pozo, M.A., Balasubramanian, N., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Grande-Garcia, A., Anderson, R.G., and Schwartz, M.A., *Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization*. Nat Cell Biol, 2005. **7(9)**: p. 901-8.
76. Sancey, L., Garanger, E., Foillard, S., Schoehn, G., Hurbin, A., Albiges-Rizo, C., et al. Coll, J.L., *Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide*. Mol Ther, 2009. **17(5)**: p. 837-43.
77. Koivunen, E., Wang, B., and Ruoslahti, E., *Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins*. Biotechnology (N Y), 1995. **13(3)**: p. 265-70.
78. Koivunen, E., Gay, D.A., and Ruoslahti, E., *Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library*. J Biol Chem, 1993. **268(27)**: p. 20205-10.
79. Pandita, D., Santos, J.L., Rodrigues, J., Pego, A.P., Granja, P.L., and Tomas, H., *Gene delivery into mesenchymal stem cells: a biomimetic approach using RGD nanoclusters based on poly(amidoamine) dendrimers*. Biomacromolecules, 2011. **12(2)**: p. 472-81.
80. Ishikawa, A., Zhou, Y.M., Kambe, N., and Nakayama, Y., *Enhancement of star vector-based gene delivery to endothelial cells by addition of RGD-peptide*. Bioconjug Chem, 2008. **19(2)**: p. 558-61.
81. Stoff, A., Rivera, A.A., Banerjee, N.S., Mathis, J.M., Espinosa-de-los-Monteros, A., Le, L.P., et al. Curiel, D.T., *Strategies to enhance transductional efficiency of adenoviral-based gene transfer to primary human fibroblasts and keratinocytes as a platform in dermal wounds*. Wound Repair Regen, 2006. **14(5)**: p. 608-17.
82. Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., et al. Bienert, M., *Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1414(1-2)**: p. 127-39.
83. Nitin, N., LaConte, L., Rhee, W.J., and Bao, G., *Tat peptide is capable of importing large nanoparticles across nuclear membrane in digitonin permeabilized cells*. Ann Biomed Eng, 2009. **37(10)**: p. 2018-27.
84. Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., et al. Nakanishi, M., *Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells*. J Biol Chem, 2001. **276(28)**: p. 26204-10.
85. Tunnemann, G., Martin, R.M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F., and Cardoso, M.C., *Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells*. FASEB J, 2006. **20(11)**: p. 1775-84.
86. Zhang, X., Zhang, X., and Wang, F., *Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs: from basic drug delivery mechanism to application*. Expert Opin Drug Deliv, 2012. **9(4)**: p. 457-72.
87. Herce, H.D. and Garcia, A.E., *Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104(52)**: p. 20805-10.
88. Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Langel, U., *Cell penetration by transportan*. FASEB J, 1998. **12(1)**: p. 67-77.
89. Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B., *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97(24)**: p. 13003-8.
90. Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G., *A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 1997. **25(14)**: p. 2730-6.

91. Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10444-50.
92. Ziegler, A., *Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(4-5): p. 580-97.
93. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
94. Chithrani, B.D. and Chan, W.C., *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1542-50.
95. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3657-66.
96. Lechardeur, D. and Lukacs, G.L., *Intracellular barriers to non-viral gene transfer*. Curr Gene Ther, 2002. **2**(2): p. 183-94.
97. Lee, Y.J., Erazo-Oliveras, A., and Pellois, J.P., *Delivery of macromolecules into live cells by simple co-incubation with a peptide*. Chembiochem, 2010. **11**(3): p. 325-30.
98. Nakase, I., Kogure, K., Harashima, H., and Futaki, S., *Application of a fusigenic peptide GALA for intracellular delivery*. Methods Mol Biol, 2011. **683**: p. 525-33.
99. Simoes, S., Slepushkin, V., Gaspar, R., de Lima, M.C., and Duzgunes, N., *Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides*. Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 955-64.
100. Simoes, S., Slepushkin, V., Pretzer, E., Dazin, P., Gaspar, R., Pedroso de Lima, M.C., and Duzgunes, N., *Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(2): p. 270-9.
101. Sonawane, N.D., Szoka, F.C., Jr., and Verkman, A.S., *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44826-31.
102. Lam, W.L.a.J.K.W., *Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems*. Molecular Regulation of Endocytosis, 2012.
103. Zuhorn, I.S., Bakowsky, U., Polushkin, E., Visser, W.H., Stuart, M.C., Engberts, J.B., and Hoekstra, D., *Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency*. Mol Ther, 2005. **11**(5): p. 801-10.
104. Erbacher, P., Roche, A.C., Monsigny, M., and Midoux, P., *Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes*. Exp Cell Res, 1996. **225**(1): p. 186-94.
105. Ciftci, K. and Levy, R.J., *Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts*. Int J Pharm, 2001. **218**(1-2): p. 81-92.
106. Maxfield, F.R., *Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts*. J Cell Biol, 1982. **95**(2 Pt 1): p. 676-81.
107. Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., et al. Birnstiel, M.L., *Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4033-7.
108. Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H., *Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(1): p. 32-45.
109. Pante, N. and Kann, M., *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 425-34.
110. Dismuke, D.J. and Aiken, C., *Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3712-20.
111. Suzuki, Y. and Craigie, R., *The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(3): p. 187-96.
112. Kang, H.C., Samsonova, O., Kang, S.W., and Bae, Y.H., *The effect of environmental pH on polymeric transfection efficiency*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1651-62.
113. Efthymiadis, A., Briggs, L.J., and Jans, D.A., *The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1623-8.
114. Lin, J., Qin, T., Zhu, L.Q., Zhang, Q., Yu, Q.H., and Yang, Q., *Enhancement of transfection efficiency with NLS and SPB-NLS*. Mol Med Rep, 2014. **9**(6): p. 2559-67.
115. Hebert, E., *Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy?* Biol Cell, 2003. **95**(2): p. 59-68.

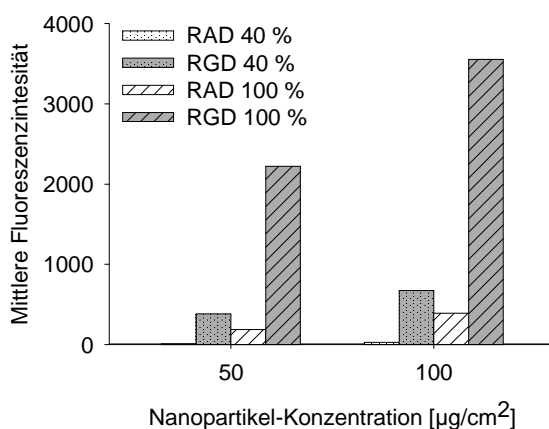
116. Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G., and Brown, P.O., *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 2099-108.
117. Zou, S., Scarfo, K., Nantz, M.H., and Hecker, J.G., *Lipid-mediated delivery of RNA is more efficient than delivery of DNA in non-dividing cells*. Int J Pharm, 2010. **389**(1-2): p. 232-43.
118. Oskowitz, A., McFerrin, H., Gutschow, M., Carter, M.L., and Pochampally, R., *Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic*. Stem Cell Res, 2011. **6**(3): p. 215-25.
119. Ward, D.F., Jr., Salaszyk, R.M., Klees, R.F., Backiel, J., Agius, P., Bennett, K., et al. Plopper, G.E., *Mechanical strain enhances extracellular matrix-induced gene focusing and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through an extracellular-related kinase-dependent pathway*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(3): p. 467-80.
120. Nitta, S.K. and Numata, K., *Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(1): p. 1629-54.
121. Lee, T.K., Sokoloski, T.D., and Royer, G.P., *Serum albumin beads: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs*. Science, 1981. **213**(4504): p. 233-5.
122. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. J Control Release, 2008. **132**(3): p. 171-83.
123. Vallner, J.J., *Binding of drugs by albumin and plasma protein*. J Pharm Sci, 1977. **66**(4): p. 447-65.
124. Busher, J.T., *Serum Albumin and Globulin*, in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, H.K. Walker, W.D. Hall, and J.W. Hurst, Editors. 1990: Boston.
125. Schnitzer, J.E. and Bravo, J., *High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7562-70.
126. Brunskill, N.J., *Albumin and proximal tubular cells--beyond endocytosis*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(11): p. 1732-4.
127. Giragossian, C., Clark, T., Piche-Nicholas, N., and Bowman, C.J., *Neonatal Fc receptor and its role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of immunoglobulin G-based biotherapeutics*. Curr Drug Metab, 2013. **14**(7): p. 764-90.
128. Tirupathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P., and Malik, A.B., *Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25968-75.
129. Schnitzer, J.E., Sung, A., Horvat, R., and Bravo, J., *Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24544-53.
130. Mo, Y., Barnett, M.E., Takemoto, D., Davidson, H., and Kompella, U.B., *Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 746-57.
131. Gong, G., Pan, Q., Wang, K., Wu, R., Sun, Y., and Lu, Y., *Curcumin-incorporated albumin nanoparticles and its tumor image*. Nanotechnology, 2015. **26**(4): p. 045603.
132. Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., and Schubert, D., *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int J Pharm, 2003. **257**(1-2): p. 169-80.
133. Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., and Langer, K., *Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles*. Int J Pharm, 2000. **194**(1): p. 91-102.
134. Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., and Langer, K., *Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells*. J Drug Target, 2004. **12**(7): p. 461-71.
135. Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., et al. Wagner, E., *Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery*. Gene Ther, 1997. **4**(5): p. 409-18.
136. Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, D.T., and Birnstiel, M.L., *Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6099-103.
137. Steinhäuser, I.M., Langer, K., Strebhardt, K.M., and Spankuch, B., *Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation*. Biomaterials, 2008. **29**(29): p. 4022-8.
138. Wang, W., Huang, Y., Zhao, S., Shao, T., and Cheng, Y., *Human serum albumin (HSA) nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds*. Chem Commun (Camb), 2013. **49**(22): p. 2234-6.

139. van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Cross, C.E., Koostra, J.M., Volz, W.G., Halliwell, B., and Louie, S., *Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. L289-96.
140. Moghimi, S.M., Hunter, A.C., and Murray, J.C., *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
141. Leroux, J.C., De Jaeghere, F., Anner, B., Doelker, E., and Gurny, R., *An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes*. Life Sci, 1995. **57**(7): p. 695-703.
142. Wagner, S., Zensi, A., Wien, S.L., Tschickardt, S.E., Maier, W., Vogel, T., et al. von Briesen, H., *Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32568.
143. Michaelis, K., Hoffmann, M.M., Dreis, S., Herbert, E., Alyautdin, R.N., Michaelis, M., et al. Langer, K., *Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(3): p. 1246-53.
144. Anhorn, M.G., Wagner, S., Kreuter, J., Langer, K., and von Briesen, H., *Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(12): p. 2321-31.
145. Malonga, H., Neault, J.F., Arakawa, H., and Tajmir-Riahi, H.A., *DNA interaction with human serum albumin studied by affinity capillary electrophoresis and FTIR spectroscopy*. DNA Cell Biol, 2006. **25**(1): p. 63-8.
146. Kneuer, C., Sameti, M., Bakowsky, U., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H., and Lehr, C.M., *A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(6): p. 926-32.
147. Langiu, M., Dadparvar, M., Kreuter, J., and Ruonala, M.O., *Human serum albumin-based nanoparticle-mediated in vitro gene delivery*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107603.
148. Rhaese, S., von Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H., Kreuter, J., and Langer, K., *Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery*. J Control Release, 2003. **92**(1-2): p. 199-208.
149. Hawkins, M.J., Soon-Shiong, P., and Desai, N., *Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(8): p. 876-85.
150. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
151. Jacobs, J.P., Jones, C.M., and Baille, J.P., *Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5*. Nature, 1970. **227**(5254): p. 168-70.
152. Look, J., *Neuartige Liganden-modifizierte Nanopartikel als Trägersystem für Nukleinsäuren*. Dissertation (Westfälische Wilhelms-Universität Münster), 2014.
153. Abbasi, S., Paul, A., Shao, W., and Prakash, S., *Cationic albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: preparation and in vitro assessment*. J Drug Deliv, 2012. **2012**: p. 686108.
154. Baumann, F.E., Schübel, K.D., Häger, H., Hessling, B., Kreutz, J., Kahraman, E., and Mörth, S., *Verfahren zur Herstellung von Polymer-Nanopartikel-Compounds mittels einer Nanopartikel-Dispersion*. 2013, Google Patents.
155. DIN EN 27027:1994-03, *Wasserbeschaffenheit; Bestimmung der Trübung (ISO 7027:1990)*; Deutsche Fassung EN 27027:1994. 1994.
156. DIN EN ISO10993-5:2009-10, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfung auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10933-5:2009)*; Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009. 2009.
157. Loyter, A., Scangos, G.A., and Ruddle, F.H., *Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 422-6.
158. Graham, F.L. and van der Eb, A.J., *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.
159. Kingston, R.E., Chen, C.A., and Okayama, H., *Calcium phosphate transfection*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 13.
160. Elsadek, B. and Kratz, F., *Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon*. J Control Release, 2012. **157**(1): p. 4-28.
161. Watcharin, W., Schmithals, C., Pleli, T., Koberle, V., Korkusuz, H., Huebner, F., et al. Kreuter, J., *Biodegradable human serum albumin nanoparticles as contrast agents for the detection of hepatocellular carcinoma by magnetic resonance imaging*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **87**(1): p. 132-41.
162. Low, K., Wacker, M., Wagner, S., Langer, K., and von Briesen, H., *Targeted human serum albumin nanoparticles for specific uptake in EGFR-Expressing colon carcinoma cells*. Nanomedicine, 2011. **7**(4): p. 454-63.

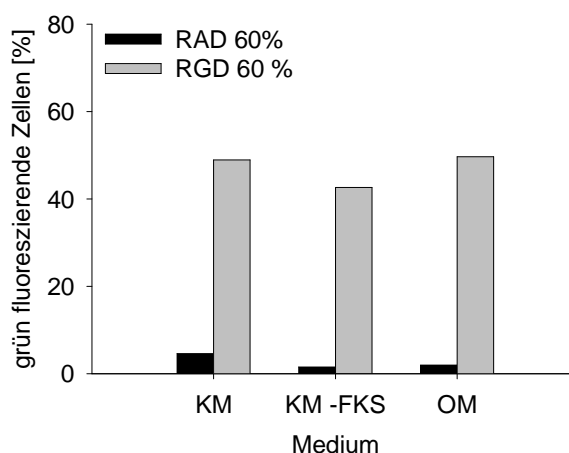
163. Golan, S., Aytar, B.S., Muller, J.P., Kondo, Y., Lynn, D.M., Abbott, N.L., and Talmon, Y., *Influence of biological media on the structure and behavior of ferrocene-containing cationic lipid/DNA complexes used for DNA delivery*. Langmuir, 2011. **27**(11): p. 6615-21.
164. Simoes, S., Slepishkin, V., Pires, P., Gaspar, R., Pedroso de Lima, M.C., and Duzgunes, N., *Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1463**(2): p. 459-69.
165. Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., et al. Lukacs, G.L., *Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer*. Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 482-97.
166. Sahlin, S., Hed, J., and Rundquist, I., *Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay*. J Immunol Methods, 1983. **60**(1-2): p. 115-24.
167. Vijayanathan, V., Thomas, T., and Thomas, T.J., *DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy*. Biochemistry, 2002. **41**(48): p. 14085-94.
168. Panyam, J. and Labhasetwar, V., *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(3): p. 329-47.
169. Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., et al. O'Shaughnessy, J., *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 7794-803.
170. Look, J., Wilhelm, N., von Briesen, H., Noske, N., Gunther, C., Langer, K., and Gorjup, E., *Ligand-Modified Human Serum Albumin Nanoparticles for Enhanced Gene Delivery*. Mol Pharm, 2015.
171. Hopwood, D., *The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids*. Histochem J, 1975. **7**(3): p. 267-76.
172. Medda, R., Helth, A., Herre, P., Pohl, D., Rellinghaus, B., Perschmann, N., et al. Cavalcanti-Adam, E.A., *Investigation of early cell-surface interactions of human mesenchymal stem cells on nanopatterned beta-type titanium-niobium alloy surfaces*. Interface Focus, 2014. **4**(1): p. 20130046.
173. Takagi, J., *Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 403-6.
174. Bazzoni, G., Shih, D.T., Buck, C.A., and Hemler, M.E., *Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25570-7.
175. Wei, Y., Jana, N.R., Tan, S.J., and Ying, J.Y., *Surface coating directed cellular delivery of TAT-functionalized quantum dots*. Bioconjug Chem, 2009. **20**(9): p. 1752-8.
176. Raagel, H., Saalik, P., Hansen, M., Langel, U., and Pooga, M., *CPP-protein constructs induce a population of non-acidic vesicles during trafficking through endo-lysosomal pathway*. J Control Release, 2009. **139**(2): p. 108-17.
177. Lin, W., Coombes, A.G., Davies, M.C., Davis, S.S., and Illum, L., *Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method*. J Drug Target, 1993. **1**(3): p. 237-43.
178. Li, Y., Ogris, M., Wagner, E., Pelisek, J., and Ruffer, M., *Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation*. Int J Pharm, 2003. **259**(1-2): p. 93-101.
179. Elfinger, M., Pfeifer, C., Uezguen, S., Golas, M.M., Sander, B., Maucksch, C., et al. Rudolph, C., *Self-assembly of ternary insulin-polyethylenimine (PEI)-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery and expression in alveolar epithelial cells*. Biomacromolecules, 2009. **10**(10): p. 2912-20.
180. Truong-Le, V.L., Walsh, S.M., Schweibert, E., Mao, H.Q., Guggino, W.B., August, J.T., and Leong, K.W., *Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres*. Arch Biochem Biophys, 1999. **361**(1): p. 47-56.
181. Storp, B., Engel, A., Boeker, A., Ploeger, M., and Langer, K., *Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure*. J Microencapsul, 2012. **29**(2): p. 138-46.
182. Furst, W. and Banerjee, A., *Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(5): p. 1522-8; discussion 1529.
183. Niknejad, H. and Mahmoudzadeh, R., *Comparison of Different Crosslinking Methods for Preparation of Docetaxel-loaded Albumin Nanoparticles*. Iran J Pharm Res, 2015. **14**(2): p. 385-94.

184. Gong, G., Zhi, F., Wang, K., Tang, X., Yuan, A., Zhao, L., et al. Hu, Y., *Fabrication of a nanocarrier system through self-assembly of plasma protein and its tumor targeting*. *Nanotechnology*, 2011. **22**(29): p. 295603.
185. Huhn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S.J., et al. Parak, W.J., *Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge*. *ACS Nano*, 2013. **7**(4): p. 3253-63.
186. Helledie, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M., *A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2008. **17**(4): p. 837-48.
187. Brandl, A., Meyer, M., Bechmann, V., Nerlich, M., and Angele, P., *Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(11): p. 1541-7.
188. Santos, J.L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pego, A.P., Granja, P.L., and Tomas, H., *Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration*. *Curr Gene Ther*, 2011. **11**(1): p. 46-57.
189. Zeilhofer, H.U., Mollenhauer, J., and Brune, K., *Selective growth inhibition of ductal pancreatic adenocarcinoma cells by the lysosomotropic agent chloroquine*. *Cancer Lett*, 1989. **44**(1): p. 61-6.
190. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A.M., and Langer, R., *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*. *J Gene Med*, 2005. **7**(5): p. 657-63.
191. Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., and Givol, D., *Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(1): p. 189-93.

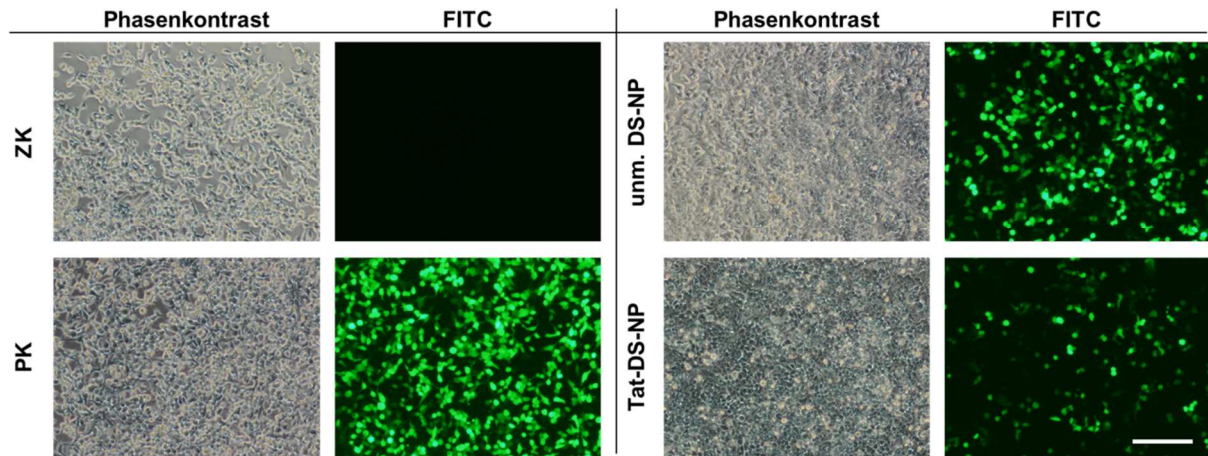
## Anhang



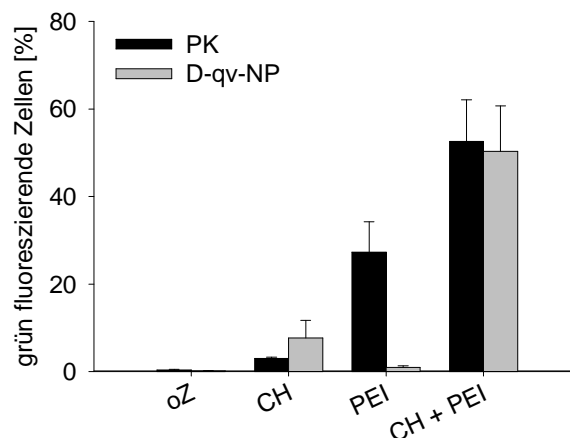
**Abbildung Anhang 1: Interaktion PF633-markierter Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit hMSC.** Inkubation der hMSC mit unterschiedlichen Konzentrationen RGD-modifizierter PromoFluor633-markierter 40 % bzw. 100 % GA-qv-NP. Parallel wurden Zellen mit RAD-modifizierten PromoFluor-markierten GA-qv-NP behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Werte stellen die mittlere Fluoreszenzintensität tiefrot fluoreszierender Zellen dar.



**Abbildung Anhang 2: Interaktion Glutaraldehyd-quervernetzter HSA-NP mit hMSC in unterschiedlichen Inkubationsmedien.** Inkubation der hMSC mit 50 µg/cm<sup>2</sup> RAD- bzw. RGD-modifizierter 60 % GA-qv-NP in Kultivierungsmedium (KM), KM ohne FKS (KM-FKS) oder OptiMEM® (OM). Die GA-qv-NP wurden ohne weitere Markierung anhand ihrer grünen Autofluoreszenz detektiert. Die Werte stellen die prozentuale Anzahl grün fluoreszierender Zellen nach 24 h dar.



**Abbildung Anhang 3: Genexpression PEI-beschichteter Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP in HEK293T-Zellen.** Inkubation der HEK293T-Zellen mit PEI-beschichteten D-qv-NP mit inkorporiertem peGFP-N1-Plasmid (unmodifiziert oder Tat-modifiziert) für 24 h in Kultivierungsmedium mit 0,1 mM Chloroquin. Zur Kontrolle wurden die Zellen äquivalent mit PEI-beschichteter Plasmid-DNA (PK) oder nur dem Medium inkubiert (ZK). Nach 72 h wurde die Expression des Reportergens eGFP fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Dokumentation mittels Phasenkontrast und FITC-Filter. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung Anhang 4: Genexpression Disulfidbrücken-stabilisierter HSA-NP nach Chloroquin- und PEI-Zugabe.** HEK293T wurden mit D-qv-NP (Plasmid peGFP-N1 inkorporiert) für 24 h in verschiedenen Inkubationsmedien inkubiert: Kultivierungsmedium mit Chloroquin (CH), mit PEI (PEI) oder mit Chloroquin und PEI (CH + PEI). Parallel wurden Zellen mit Plasmid-DNA behandelt (PK). 72 h nach der Behandlung wurde der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen im Durchflusssytometer quantifiziert. Die Werte stellen die statistischen Mittelwerte mit Standardabweichung dar (n = 3).



## Publikationen

### Publikationen in *peer-reviewed* Journals

Look J\*, **Wilhelm N\***, von Briesen H, Noske N, Günther C, Langer K, Gorjup E: „Ligand-modified human serum albumin nanoparticles for targeted gene delivery“. *Mol. Pharmaceutics*; doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00153. Epub 2015 Aug 14

\*gleichberechtigte Erstautoren

**Wilhelm N**, Stracke F und Gorjup E: „Trypan blue as a quencher for aldehyde based autofluorescence“. *Manuskript in Vorbereitung*

Schwind L\*, **Wilhelm N\***, Kartarius S, Montenarh M, Gorjup E, Götz C: „Protein kinase CK2 is necessary for the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.“ *Biochim Biophys Acta*. 2015 May 26. pii: S0167-4889(15)00177-9. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.023.

\*gleichberechtigte Erstautoren

Klein T, Lange S, **Wilhelm N**, Bureik M, Yang TH, Heinzle E, Schneider K: „Overcoming the metabolic burden of protein secretion in *Schizosaccharomyces pombe*--a quantitative approach using 13C-based metabolic flux analysis.“ *Metab Eng*. 2014 Jan;21:34-45. doi: 10.1016/j.ymben.2013.11.001. Epub 2013 Nov 19.

**Wilhelm N\***, Kostelnik K\*, Götz C, Montenarh M: „Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes.“ *Mol Cell Biochem*. 2012 Jun;365(1-2):37-45. doi: 10.1007/s11010-012-1241-y. Epub 2012 Jan 24.

\*gleichberechtigte Erstautoren

### Präsentationen auf internationalen Kongressen

**Wilhelm N**, Look J, Noske N, Günther C, Rodriguez J. R., Serra M., Carrondo, Alves P, Prosper F, Langer K, von Briesen H, Gorjup E: “A serum albumin-based gene delivery system for the safe virus-free application in gene and cell therapy“. Kongress *BioNanoMed* (Graz, Österreich; 2015) – *Vortrag*

**Wilhelm N**, Oppenberg J, Langer K, Rodriguez JR, Prosper F, Serra M, Alves P, Noske N, Günther C, von Briesen H, Gorjup E: “A nanoparticle-based gene delivery system for the safe virus-free application in gene and cell therapy“. *2<sup>nd</sup> International Annual Conference of the GSCN* (Heidelberg; 2014) – *Posterbeitrag*

Oppenberg J\*, **Wilhelm N\***, Noske N, von Briesen H, Gorjup E, Langer K: "Nanogene - A nanoparticle-based gene delivery system for the safe virus-free application in gene and cell therapy". *2<sup>nd</sup> EuroNanoMed Review seminar for funded projects and Training workshop on regulatory affairs for funded partners* (Düsseldorf; 2014) – *Posterbeitrag*

\*gleichberechtigte Erstautoren

**N. Wilhelm**, J. Oppenberg, K. Langer, J. R. Rodriguez, F. Prosper, M. Serra, M. Carrondo, P. Alves, N. Noske, S. Kern, R. Huss, C. Günther, H. von Briesen, E. Gorjup: "Generation and manipulation of stem cells by a nanoparticle-mediated gene delivery system". Kongress *CLINAM* (Basel, Schweiz; 2013) - *Posterbeitrag*

**Wilhelm N**, Look J, Langer K, Noske N, Günther C, von Briesen H, Gorjup E "NanoGene - A nanoparticle-based gene delivery system for the safe virus-free application in gene and cell therapy". *3<sup>rd</sup> EuroNanoMed* (Stockholm, Schweden; 2014) – *Posterbeitrag*

**N. Wilhelm**, J. Oppenberg, K. Langer, J. R. Rodriguez, F. Prosper, M. Serra, M. Carrondo, P. Alves, N. Noske, S. Kern, R. Huss, C. Günther, H. von Briesen, E. Gorjup: "Generation and manipulation of stem cells by a nanoparticle-mediated gene delivery system". Kongress *Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine* (Heidelberg; 2012) – *Posterbeitrag*

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. Fuhr und Herrn Prof. Dr. Zimmermann für die Möglichkeit, die Arbeit am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu dürfen sowie für Ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Meese für die Übernahme des Koreferats meiner Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. von Briesen für die Betreuung der Promotion und seine fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen.
- ganz besonders Herrn Dr. Gorjup für seine wissenschaftliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft.
- allen Partnern des NanoGene-Projektes für die gute Kooperation und die wissenschaftlichen Diskussionen. Besonders möchte ich Frau Dr. Look für den engen Austausch sowie die Bereitstellung Plasmid-beladener HSA-Nanopartikel danken.
- Herrn Dr. Maue und Herrn Dr. Hassinger für das zur Verfügung stellen der Oberschenkelköpfe.
- Frau Hecker für die Isolierung und Charakterisierung der humanen mesenchymalen Stammzellen.
- Frau Marx, Frau Siebert und Herrn Hohlreiter für ihre Unterstützung im Rahmen studentischer Arbeiten.
- allen Mitgliedern der Abteilung Zellbiologie & angewandte Virologie für das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.
- meinem Bruder, Herrn Wilhelm, für das Korrekturlesen der Arbeit.
- meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung während dieser Arbeit.
- schließlich Herrn Dr. Ampofo für seine wissenschaftliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft. Seine unermüdliche Leidenschaft am Forschen waren Inspiration und Motivation für diesen Weg.