



Die Untersuchung des immunoliposomalen Targetings von Endothelzellen als Grundlage für eine neuartige antiinflammatorische Therapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Apotheker Stephan Kessner
geb. am: 25.01.1976 in Staßfurt

Gutachter

1. Prof. Dr. G. Bendas
2. Prof. Dr. P. Nuhn
3. Prof. Dr. A. Fahr

Halle (Saale), 29. Oktober 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007444

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007444>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Theoretischer Teil	9
2.1. Das Endothel.....	9
2.1.1. Physiologische Barriere, Transportmöglichkeiten	9
2.1.2. Besonderheiten im Entzündungsprozess	12
2.2. Selektine als Targetstruktur	13
2.2.1. Adhäsionskaskade der Leukozyten	13
2.2.2. Expression der Selektine	16
2.3. Liposomales Targeting	19
2.3.1. Liposomen als Arzneistoffträger	19
2.3.2. Immunoliposomen / Stealth®-Modifikation / pH-Sensitivität.....	22
2.3.3. Zelluläre Aufnahmemechanismen für Liposomen	26
2.4. Ziele dieser Arbeit	29
3. Materialien und Methoden	30
3.1. Verwendete Substanzen.....	30
3.1.1. Chemikalien und Lipide	30
3.1.2. Präparative Darstellung der Lipidanker.....	31
3.1.2.1. N-Glut-PE (N-Glutaryl-DPPE)	31
3.1.2.2. Cyanur-PEG-PE (Cyanur-PEG-DPPE).....	31
3.1.3. Präparative Isolierung bakterieller Plasmid-DNA.....	32
3.2. Liposomen	34
3.2.1. Liposomenpräparationen	34
3.2.1.1. Hydratationsmethode.....	34
3.2.1.2. Phasenumkehrmethode.....	34
3.2.1.3. Detergenzmethode.....	35
3.2.2. Kopplung von Antikörpern an Liposomen.....	35
3.2.2.1. N-Glut-PE als Lipidanker.....	36
3.2.2.2. Cyanur-PEG-PE als Lipidanker	36
3.2.3. Charakterisierung.....	36
3.2.3.1. Partikelgrößenbestimmung.....	36
3.2.3.2. Proteinquantifizierung	37
3.2.3.3. Phosphatquantifizierung.....	38
3.2.3.4. Bestimmung der Einschussrate	38
3.2.4. Fluoreszenzmarkierung	39
3.2.4.1. Symmetrische Verteilung	39
3.2.4.2. Asymmetrische Verteilung.....	39
3.3. Zellkultivierung	40
3.3.1. Gewinnung humaner Nabelschnurendothelzellen.....	40
3.3.2. SRB-Assay zur Bestimmung der Wachstumsraten	41
3.4. Bindungsuntersuchungen.....	42
3.5. Internalisierungsuntersuchungen	43
3.5.1. Dithionit-Technik	43
3.5.2. Aufklärung der Internalisierungsmechanismen.....	44
3.5.2.1. Passive Aufnahmemechanismen	44
3.5.2.2. Aktive Aufnahmemechanismen	45

3.6. pH-sensitive Immunoliposomen.....	45
3.6.1. pH-abhängiges Freisetzungsverhalten.....	45
3.6.2. Serumstabilität.....	46
3.6.3. Fusionsnachweis mit endosomalen Vesikeln.....	46
3.6.4. In-vitro-Studien.....	47
3.6.4.1. Targetierung und fluoreszenzmikroskopische Auswertung.....	47
3.6.4.2. Auswirkung von Äquilibrationsreagenzien.....	48
3.6.4.3. Einschluss von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid.....	48
3.7. Gentransfer mit pH-sensitiven Immunoliposomen.....	48
3.7.1. Liposomenpräparationen.....	49
3.7.2. Liposomencharakterisierung.....	50
3.7.2.1. DNA-Quantifizierung.....	50
3.7.2.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	51
3.7.2.3. Serumstabilität.....	51
3.7.2.4. pH-abhängiges Freisetzungsverhalten.....	51
3.7.3. Transfektionsversuche an E. coli.....	52
3.7.4. Transfektionsversuche an HUVEC.....	52
4. Ergebnisse und Diskussion.....	54
4.1. Charakterisierung der Liposomen.....	55
4.2. In-vitro-Studien von Liposomen an Endothelzellen.....	58
4.2.1. Bindungsuntersuchungen.....	59
4.2.2. Internalisierungsuntersuchungen.....	64
4.2.2.1. Quantitative Studien.....	65
4.2.2.2. Qualitative Studien.....	69
4.2.3. pH-sensitive Immunoliposomen.....	75
4.2.3.1. Serumstabilität, pH-abhängige Freigabe, FRET.....	75
4.2.3.2. Einfluss von Äquilibrationsreagenzien.....	81
4.2.3.3. Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid.....	83
4.2.3.4. Mikroskopische Aufnahmen.....	84
4.3. Sterisch stabilisierte pH-sen. Immunoliposomen als Transfektionssystem.....	86
4.3.1. Herstellung und Charakterisierung plasmidhaltiger Liposomen.....	86
4.3.2. Transfektionsfähigkeit von E. coli.....	90
4.3.3. Transfektionsfähigkeit humaner Endothelzellen.....	92
5. Zusammenfassung.....	94
6. Literaturverzeichnis.....	96

Abkürzungen

BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovine Serum Albumine
CCL	Cationic Coated Liposomes
CHEMS	Cholesteryl Hemisuccinat Morpholino Salz
Chol	Cholesterol
Cyanur-PEG-PE	N-[3-Chlor-5-(ω -(3,5-dichloro-2,4,6-triazoxyl)-poly(ethylenglykol)- α -amino)-2,4,6-triazyl]-PE
DDS	Drug Delivery System
DiO	3,3'-Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat
DMPE	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPA	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-phosphatidsäure
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DOTAP	N-(1-[2,3-Dioleoyloxy]propyl)-N,N,N-trimethylammonium
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphocholin
DSPE	1,2-Distearoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EPS	Ei-phosphatidyl-serine
ESL-1	E-Selectin-Ligand-1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GFP	Green Fluorescent Proteine
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (Pyranin)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IgG	Immunglobulin G
IL	Immunoliposom
IL-1 β	Interleukin-1 β
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
LDL	Low Density Lipoproteine
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1
LSM	Laser Scanning Mikroskop
LPS	Lipopolysaccharid
LUV	Large Unilamellar Vesicle
LY	Lucifer Yellow
MAC-1	Membrane Attack Complex-1
MLV	Multilamellar Vesicle
MPB-PE	N-(4'-(4''-Maleimidophenyl)butyryl)-phosphatidylethanolamin
mPEG-PE	Methoxypolyethylenglykol- phosphatidylethanolamin
4-MU- β -D-Glykosid	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid
NBD-PE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)
NF κ B	Nuclear factor kappa B
N-Glut-PE	N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid

NSAP	Nichtsteroidale Antiphlogistika
OG	Oktylglykosid
PAF	Plättchenaggregierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatpuffer
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PE	Phosphatidylethanolamin
PDP-PE	N-(3'-(Pyridyldithio)-propionyl)-phosphatidylethanolamin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEG	Polyethylenglykol
PL	Phospholipid
POPC	1-Palmitoyl, 2-oleoyl- sn-glycero-phosphocholin
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RES	Retikuloendotheliales System
REV	reverse phase evaporation
RNA	Ribonucleinsäure
SCR	Short Consensus Repeats
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
SMPB	N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPLP	Stabilized Plasmid Lipid Particles
SRB	Sulphorhodamin B
SUV	Small unilamellar vesicle
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	2-Amino-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Ablauf der rezeptorgesteuerten Leukozytenadhäsion am Endothel und der Leukozytenemigration unter Entzündungsbedingungen
- Abb. 2:** HUVEC, 3 Tage nach Präparation
- Abb. 3:** Schematische Darstellung und Vergleich der Antikörper-Kopplung an Liposomen
- Abb. 4:** Abhängigkeit der Kopplungsausbeute in Anwesenheit von PEG-PE
- Abb. 5:** Abhängigkeit der Liposomengröße von der Herstellungsmethode
- Abb. 6:** Abhängigkeit der Bindungsereignisse zw. Liposomen und stimulierten HUVEC von der Art des eingesetzten Kopplungsankers und Antikörpers
- Abb. 7:** Abhängigkeit der Bindungsereignisse zw. Liposomen und unstimulierten HUVEC von der Art des eingesetzten Kopplungsankers und Antikörpers
- Abb. 8:** Abhängigkeit der Liposomenbindung von der Anwesenheit freier Antikörper
- Abb. 9:** Abhängigkeit der Bindung von der zugesetzten Liposomenmenge
- Abb. 10:** Abhängigkeit der Liposomenbindung vom FKS-Status der Endothelzellen
- Abb. 11:** Dithionit-vermittelte Reduktion des 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl zum 7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl
- Abb. 12:** Unterscheidung zwischen gebundenen und internalisierten Liposomen durch Dithionit-Technik
- Abb. 13:** Zeitabhängigkeit der NBD-Fluoreszenzlöschung durch Dithionit
- Abb. 14:** Abhängigkeit der Internalisierung von Kopplungsanker und Antikörper
- Abb. 15:** Fusionsnachweis zw. Immunoliposomen und stimulierten HUVEC nach 60 Minuten bei 4°C
- Abb. 16:** Fusionsnachweis zw. Immunoliposomen und stimulierten HUVEC nach 60 Minuten bei 4°C und weiteren 60 Minuten bei 37°C
- Abb. 17:** Hauptaufnahme-mechanismen der Zelle
- Abb. 18:** Abnahme der zellulären Internalisierung durch Inhibitoren
- Abb. 19:** Stabilität pH-sensitiver Liposomen (Typ1) in 40% Serum
- Abb. 20:** Freisetungsverhalten pH-sensitiver Immunoliposomen nach 15-minütiger Inkubation
- Abb. 21:** Veränderung des FRET während des Fusionsprozesses
- Abb. 22:** Fusion zwischen pH-sensitiven Immunoliposomen und endosomalen Vehikeln
- Abb. 23:** Veränderung der pH-sensitiven Freigabe in HUVEC durch NH₄CL
- Abb. 24:** Fluoreszenzentwicklung durch freies 4-Methylumbelliferon
- Abb. 25:** z-Scan durch eine Endothelzelle nach Internalisierung pH-insensitiver Immunoliposomen (NBD-PE)
- Abb. 26:** z-Scan durch eine Endothelzelle nach Internalisierung pH-sensitiver Immunoliposomen (Calcein)

Abb. 27: pH-abhängiges Freisetzungsverhalten von CCL und SPLP in Bezug auf Plasmidstatus

Abb. 28: cryo-TEM-Aufnahmen gefüllter bzw. ungefüllter SPLP

Abb. 29: Transfektion von E. coli durch CCL und SPLP

Abb. 30: GFP-Transfektion von HUVEC

1. Einleitung

Der Anteil chronisch verlaufender Entzündungsprozesse nimmt innerhalb medikamentös therapierbaren Erkrankungen immer mehr zu. Die gegenwärtige Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen ist zum Teil mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, da hochwirksame Arzneimittelgruppen wie z.B. Glucocorticoide in vielen Fällen die einzige Lösung zur Verbesserung des Krankheitsgeschehens darstellen, diese aber mit ihren bekannten Nebenwirkungsprofilen häufig an Grenzen der Einsetzbarkeit stoßen. So wurde in den letzten Jahren verstärkt nach neuartigen Wirkstoffen im Bereich der antiinflammatorischen Therapie gesucht. 1999 wurde Rofecoxib als erster Vertreter der selektiven COX-2-Inhibitoren für die Behandlung von Symptomen bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen (Arthrosen) zugelassen. Mit Leflunomid als Hemmer des Enzyms Dihydroorotatdehydrogenase wurde ein völlig neuer Wirkmechanismus in die Therapie der rheumatoiden Arthritis eingeführt. Die Blockade der Wirkung des Tumornekrosefaktors durch den chimären Antikörper Infliximab bzw. das Abfangen des frei zirkulierenden Trimers durch Etanercept vervollständigten die Ansatzmöglichkeiten für die Therapie der chronischen Verlaufsform der Entzündung erheblich. Die derzeitigen Erfolge bei Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale und Morbus Crohn zeigen aber, dass der Bedarf neuer Therapieansätze weiterhin vorhanden ist. So kann neben der Anwendung völlig neuer Arzneistoffe auch der Einsatz neuartiger Transportsysteme die Wirkung der entsprechenden Arzneimittel erhöhen. So genannte Drug Delivery Systeme (DDS) können die Wirkstoffe im Rahmen einer antiinflammatorischen Therapie direkt an den Ort des Krankheitsgeschehens heranbringen. Dadurch ist der erzielte Effekt deutlich verbessert und die Nebenwirkungen auf gesunde Zellen des Organismus werden dadurch verringert.

Als Wirkstoff-Transportvehikel dieser DDS haben sich die in den 60er Jahren von Bangham entwickelten Liposomen etabliert [Bangham et al. (1965)]. Da diese als Vehikel für sowohl hydrophile als auch lipophile Arzneistoffe dienen können, wurden große Hoffnungen auf die Liposomen gesetzt. Problematisch gestaltete sich jedoch das gezielte Heranbringen der Liposomen an den Wirkort. Durch die Bindung unterschiedlichster Liganden auf der Liposomenoberfläche konnte eine gewisse Zielspezifität erreicht werden. Als besonders geeignet erschienen deshalb die in den 80er Jahren entwickelten Immunoliposomen, die Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenstrukturen enthielten. Durch die hohe Spezifität sowie Affinität der Antikörper zu ihren jeweiligen Antigenen sollte ein ortsspezifischer Arzneistofftransport möglich werden.

In vielfältigen Untersuchungen der chronischen Entzündungsprozesse konnte durch Entdeckung und Charakterisierung verschiedener am Prozess beteiligter Entzündungsrezeptoren und –mediatoren die Aufklärung der molekularbiologischen Mechanismen erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Leukozyten rezeptorgesteuert am Endothel von entzündetem Gewebe binden und dort ins Gewebe emigrieren. Ein Meilenstein in dieser Entwicklung stellte die Identifizierung der Adhäsionsrezeptor-Familie der Selektine dar [Springer (1995)]. Sie vermitteln den initialen Kontakt zwischen Leukozyten und Gefäßendothel innerhalb des Entzündungsgebietes. Auf der Grundlage von Protein-Kohlenhydrat-Bindungen kommt es dadurch zur rollenden Verlangsamung der Leukozyten. Dies ist der Beginn der komplexen Adhäsionskaskade der Leukozyten am aktivierten Endothel.

Aufgrund dieser initialen und zentralen Funktion innerhalb des Entzündungsgeschehens stellen die vaskulären Selektine hervorragende Zielstrukturen für Drug Delivery Systeme im entzündeten Gewebe dar. Ihre Exprimierung erfolgt ausschließlich unter Entzündungsbedingungen am Gefäßendothel. Aus diesen Gründen bieten sich als Vehikel für einen

selektionsgerichteten Arzneistofftransport Immunoliposomen mit funktionalisierten Anti-E-Selektin-Antikörpern an. Die therapeutische Wirkung setzt jedoch erst nach Freigabe des Arzneistoffes innerhalb der Zelle ein. Vorherige Bindungs- und Aufnahmeprozesse müssen deshalb quantitativ erfolgreich verlaufen. Die Stabilität der Transportvehikel muss bis dahin gewährleistet sein. Im Inneren der Zelle hingegen müssen die Immunoliposomen einem gewissen Zerfall unterliegen, da sonst ein intrazellulärer Abbau innerhalb der Lysosomen stattfindet. Dies würde einem Wirkverlust gleichkommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb in der Untersuchung der Wechselwirkungen von E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen mit aktivierten Endothelzellen unter in vitro-Bedingungen. Die aktivierten Endothelzellen repräsentieren hierbei den zellulär veränderten Zustand in einer Entzündungsphase. Die Bindungsfähigkeit als erster Schritt für ein erfolgreiches Drug Delivery System, sowie die Internalisierung der Immunoliposomen sollten quantitativ ermittelt werden. Eine sterische Stabilisierung der Liposomen durch Polyethylenglykoleinheiten sollte während dieser Arbeiten berücksichtigt werden. Durch sie können effizient die Halbwertszeiten der Liposomen und damit die von ihnen ausgehende Wirkung enorm gesteigert werden. Anschließend sollte durch die pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft der Freigabeprozess im Zellinneren deutlich erhöht werden. Dadurch würde der Liposomeninhalt dem Zellmetabolismus zur Verfügung stehen und somit seine Wirkung entfalten können. Stabile Vehikelsysteme würden an dieser Stelle einen Therapieverlust verursachen, da der Inhalt der internalisierten Liposomen einem Abbau durch lysosomale Enzyme unterliegen würde. Die im Zytosol freigesetzten Arzneistoffe dürfen bis zur intrazellulären Freigabe keinerlei Veränderung erfahren haben. Der Beweis dafür sollte abschließend mittels Gentransfektion der aktivierten Gefäßendothelzellen durch sterisch stabilisierte pH-sensitive Immunoliposomen erbracht werden.

Eine Umsetzung dieser Vorhaben würde die komplette Wirkung eines Drug Delivery Systems von der Anreicherung der Liposomen am Zielort bis hin zur intrazellulären Wirkung des Wirkstoffs simulieren und belegen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Das Endothel

2.1.1. Physiologische Barriere, Transportmöglichkeiten

Das Endothel stellt die Grenzschicht zwischen Gewebe und Gefäßen dar und bildet einen geschlossenen Zellverband. Es kleidet sowohl die Blutgefäße und die Gefäße des Lymphsystems als auch die Herzzinnenräume aus. Charakteristisch ist der Aufbau aus dem nur einschichtigen Oberflächenplattenepithel. Die Grenze zur Gewebeseite hin wird von einer Basalmembran gebildet. Die luminal Seite steht im ständigen Kontakt mit dem zirkulierenden Blut. Der Kontakt der Endothelzellen untereinander findet durch so genannte „junctional complexes“ statt. Hierbei unterscheidet man zwischen communicating (gap) junctions und dicht schließenden occluding (tight) junctions. Fast alle Gewebe sind von der Blutversorgung abhängig. Diese wiederum hängt von den Endothelzellen ab. Gäbe es nicht die Endothelzellen, die das Netz der Blutgefäße erweitern und aufbauen, wäre Wachstum und Reparatur von Geweben unmöglich. Neben der Funktion der Versorgung der darunterliegenden Gewebeschichten mit Nährstoffen, ist die Barrierefunktion eine weitere Hauptaufgabe des Endothels. Durch diese Zellschicht hindurch ist ein kontrollierter Transport von Stoffen aus dem Gefäß in Richtung Gewebe möglich. Der Endothelzelle stehen sowohl für Endozytoseprozesse in das Zellinnere als auch für Transzytosevorgänge durch die Zelle hindurch in tiefere Gewebeschichten verschiedenste Mechanismen und dafür notwendige Zellorganellen zur Verfügung: Caveolen (Plasmalemmvesikel), transendotheliale Kanäle, Fenestrationen, interzelluläre Verbindungskomplexe (junctions) und der Apparat für die rezeptorvermittelte Endozytose bestehend aus „clathrin-coated-pits“, „clathrin-coated-vesicles“, Endosomen, multivesikulären Körpern und Lysosomen [Simionescu et al. (1991)].

Das Gefäßendothel ist mit Kapazitäten ausgestattet, die es erlauben frei im Gefäß zirkulierende bioaktive Stoffe (Peptide, Amine, Hormone: LDL, Transferrin) in das umgebende Gewebe zu transportieren. Diese Plasmakomponenten können durch Endothelzellen über nichtspezifische und spezifische Prozesse aufgenommen werden. Hormone, Peptide und biogene Amine interagieren mit auf der Zellmembran verankerten Rezeptoren. Endotheliale Rezeptoren sind für viele vasoaktive Stoffe (Histamin, Serotonin, Bradykinin, Leukotriene), für Lipoproteine, Insulin und Metalloproteine (Transferrin) beschrieben. Das Andocken dieser Stoffe an ihre spezifischen Rezeptoren führt zur Auslösung unterschiedlich biologischer Effekte. Die Erhöhung der Endothelpermeabilität durch Histamin beruht z.B. auf den Bindungsvorgang zwischen Ligand und Rezeptor und der damit verbundenen Zytoskelettkontraktion und Öffnung interzellulärer junctions [Heltianu et al. (1982)].

Die Ausstattung der endothelialen Zellmembran mit Rezeptoren variiert stark nach Gefäßtyp. So sind Mannoserezeptoren und Scavenger-Rezeptoren zur Endozytose polyanionischer Makromoleküle (modifiziertes LDL, Albumin) vorrangig auf dem Endothel von Lebersinusoidalzellen zu finden [Kamps et al. (1997)]. Verschiedene Venendothelzellen (HUVEC) besitzen Fc-IgG-Rezeptoren [Pan et al. (1999)]. Der endotheliale Transport von Molekülen wird durch drei verschiedene Faktoren bestimmt. Dies ist zum einen die Plasmaantriebskraft, welche das Verhältnis zwischen hydrostatischen und onkotischen Druck (durch Makromoleküle verursachter Druck auf die Kapillarwand) widerspiegelt. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der permeierenden Moleküle wie z.B. Größe, Ladung, sterische Verhältnisse, chemische Struktur und Konzentration können ebenfalls den

Transport am Endothel beeinflussen. Auch zelluläre Faktoren spielen eine Rolle. So stellen der metabolische Zustand des Gefäßendothels und die Oberflächeneigenschaften der luminalen Zellmembran gleichsam wichtige Aspekte dar. Sie entscheiden mit darüber, auf welche Art und Weise und in welcher Menge der Stoff aufgenommen wird. Die Moleküle können dann entweder in die Zelle aufgenommen werden (Endozytose) bzw. durchqueren diese, um ins Interstitium zu gelangen (Transzytose). An der Transzytose beteiligte Strukturen sind Plasmalemmvesikel, die zwischen beiden Zellfronten hin und her pendeln. Weiterhin sind für Transzytoseprozesse auch Kanäle von Bedeutung, die nur kurze Lebenszeiten aufweisen und sich aus fusionierten Vehikeln gebildet haben. Innerhalb der Endozytose bestehen die am Prozess beteiligten Hauptstrukturen aus „clathrin-coated-pits“, „clathrin-coated-vesicles“, Endosomen (frühe, späte), multivesikulären Körpern und Lysosomen. Es kann zwischen mehreren Aufnahmemechanismen unterschieden werden. Dabei ist eine Einteilung in unspezifische und spezifische Prozesse sinnvoll. Zu den unspezifischen Mechanismen zählen Flüssigphasenendozytose, Flüssigphasentranszytose und die adsorptive Endozytose. Rezeptorvermittelte Endozytose und rezeptorvermittelte Transzytose stellen die spezifischen Internalisierungsmechanismen dar.

Die Flüssigphasenendozytose (Pinozytose) wird als Prozess beschrieben, durch den die Zelle flüssige und gelöste Stoffe aufnehmen kann. Daran sind hauptsächlich Plasmalemmvesikel beteiligt. Die so internalisierten Moleküle gelangen später zu Endosomen, multivesikulären Körpern und Lysosomen, wo sie dem weiteren Abbau unterliegen. Die Menge des aufgenommenen Stoffes hängt von der Plasmakonzentration ab. Die Beziehung zwischen Aufnahme und Plasmakonzentration beschrieb Williams an isolierten Kapillaren [Williams (1983)].

Die Flüssigphasentranszytose wird auch über Plasmalemmvesikel betrieben, wobei diese dann durch das Zytosol hindurch zur abluminalen Seite reichen und dort ihren Inhalt freigeben. Quantitativ betrachtet stellt dieser Prozess den Hauptmechanismus des trans-endothelialen Austausches dar.

Die adsorptive Endozytose als dritte Möglichkeit des unspezifischen Transports ist durch die Aufnahme von Feststoffen charakterisiert und wird häufig auch als Phagozytose bezeichnet. Die Aufnahmemenge ist auch hier von der Plasmakonzentration abhängig. Umfangreiche Partikel, z.B. Mikroorganismen und Zelltrümmer, werden durch große Endozytose-Vesikel aufgenommen, die man als Phagosomen bezeichnet. Der Durchmesser der Phagosomen wird von der Größe der aufgenommenen Partikel bestimmt. Die Phagosomen verschmelzen später mit den Lysosomen, in denen der Abbau stattfindet. Hierbei wurde auch erstmals das Auftreten früher und später Endosomen beobachtet, die auf dem Weg zum Lysosom Vorstufen darstellen [Park et al. (1988)]. Der Unterschied zur Pinozytose besteht auch in der vorherigen unspezifischen Adsorption an der Zelloberfläche, wodurch neben der Stoffkonzentration als limitierender Faktor noch die Anzahl der Bindungsstellen und die Höhe der Dissoziationskonstanten dazu kommen. Bei Protozoen dient dieser Mechanismus in erster Linie der Nahrungsaufnahme, während er in vielzelligen Organismen hauptsächlich durch spezialisierte Zellen wie z.B. Monozyten, Gewebemakrophagen oder polymorphkernige neutrophile Granulozyten (zusammengefasst: Phagozyten) erfolgt und vor allem der Infektabwehr und der Beseitigung alter Zellen bzw. ihrer Überreste dient. Die Haftung der Fremdpartikel am Phagozyten kann unspezifisch sein. Sie kann aber auch durch Rezeptoren zustande kommen. Solche Rezeptoren können z.B. den Fc-Teil von Immunglobulinen erkennen, die im Rahmen einer Immunantwort als Antikörper an der Oberfläche von Fremdpartikeln gebunden werden. Dieses Markieren der Fremdoberfläche für die Phagozytose wird als Opsonisierung bezeichnet. Auch für Endothelzellen wird gelegentlich die Phagozytose als potentieller Aufnahmeweg beschrieben [Simionescu et al. (1991)].

Als spezifischer Prozess ist die rezeptorvermittelte Endozytose bekannt. Dabei kommt es nur zur Aufnahme von Stoffen, die spezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche der

luminalen Seite besitzen. Diese Rezeptoren bzw. „specific binding sites“ (SBS) existieren für verschiedene Plasmabestandteile wie z.B. vasoaktive Stoffe, Hormone, Antikoagulantien, Prokoagulantien, fibrinolytische Faktoren und Lipoproteine (LDL). Die Plasmamembran-Rezeptoren sammeln sich in kleinen Einbuchtungen auf der Zelloberfläche. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte an diesen Stellen auf der zytoplasmatischen Seite ein Proteinsaum gezeigt werden. Der Stachelsaum besteht aus dem Protein Clathrin. In diesen spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, den Clathrin-coated Pits beginnt der endozytotische Zyklusteil. Die Hauptprotein­komponente eines Clathrin-coated Pits ist Clathrin selbst. Der Proteinkomplex besteht aus drei großen (schweren) und drei kleinen (leichten) Polypeptidketten, die zusammen eine dreibeinige Struktur aufweisen. Diese Form wird auch als ein Clathrin-Triskelion bezeichnet und besitzt die Gestalt eines Mercedes-Sternes. Clathrin-Triskelions lagern sich zu einem käfigähnlichen, konvexen Netz aus Fünf- und Sechsecken zusammen und bilden so auf den dem Zytoplasma zugewandten Membranoberflächen „coated pits“. Sie nehmen in der Regel 2% der Gesamtoberfläche der Plasmamembran ein. Die Clathrin-coated Pits besitzen nur eine kurze Lebensdauer. Vom Augenblick ihrer Entstehung bis zur typischen Einstülpung vergehen nur wenige Minuten. Auf der Außenseite der Membran befinden sich an den Einstülpungen die Rezeptoren für spezifische Makromoleküle in angereicherter Form. Die Moleküle binden an komplementären Zelloberflächenrezeptoren, sammeln sich in Coated Pits und gelangen als „Rezeptor-Makromolekül-Komplexe“ in den clathrinbedeckten Vehikeln in die Zelle.

Durch die rezeptorvermittelte Endozytose werden bestimmte Moleküle selektiv angereichert. Daher steigert sie auch den Wirkungsgrad, mit der einzelne Liganden aufgenommen werden können um das bis zu das 1000-fache. Die Hülle der Clathrin-coated Pits besteht neben Clathrin zusätzlich noch aus Adaptin. Dieses zweitwichtigste Hüllprotein setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen. Es liefert die mechanische Kraft, die die Membran in eine „Knospe“ zieht (Einstülpung) und ist hauptsächlich am Erkennungsvorgang spezifischer Transmembranproteine und der Verknüpfung dieser mit dem „Clathrin-Käfig“ beteiligt. Die Adaptine binden sozusagen von innen die „Clathrin-Triskelions“ und nach außen die Frachtrezeptoren mit ihren entsprechenden Liganden (Cholesterin, Transferrin etc.). Nach der Einstülpung (Knospung) der Coated pits kommt es zur Vesikelbildung und der Entstehung der Coated Vesicles. Diese Stachelsaumbläschen verlieren nach wenigen Sekunden ihre Beschichtung. Der Hüllenerfall bzw. Häutungsmechanismus ist noch nicht vollends aufgeklärt. Bewiesen ist bisher nur, dass die Auflösung der Clathrinschicht unter ATP-Verbrauch durch ein konstitutives Hitzeschockprotein geschieht. Dieses Protein arbeitet als eine „Belag-ablösende ATP-ase“. Die Vesikel fusionieren mit Endosomen und stellen die so genannten frühen Endosomen dar. Im sauren Milieu eines frühen Endosoms verändern viele der aufgenommenen Rezeptorproteine ihre Konformation und lassen dadurch ihre Liganden frei. Die meisten Rezeptoren dissoziieren danach ab und kehren zur selben Plasmamembran-Domäne zurück (z.B. LDL-Rezeptoren). Andere Rezeptortypen werden aber auch über späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert und dort mit dem Vesikelinhalt abgebaut. Dies ist z.B. beim Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) der Fall. Eine EGF-Bindung führt deshalb zur Abnahme der Anzahl der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diesen Vorgang bezeichnet man als Rezeptor-Herunterregulierung. Hier reguliert die Konzentration des signalauslösenden Liganden in der extrazellulären Flüssigkeit die Zahl der zugehörigen Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Zielzelle.

Die Beziehung zwischen frühen bzw. späten Endosomen und Lysosomen ist unsicher. Festgestellt werden konnten jedoch unterschiedliche pH-Werte innerhalb dieser Kompartimente. In frühen Endosomen, die knapp unter der Plasmamembran liegen, beträgt der pH-Wert ca. 6,0. In Markierungsexperimenten mit Meerrettich-Peroxidase [Machy et al. (1987), Derksen et al. (1987)] bzw. Ferritin [Trudel et al. (1985), Vargas et al. (1990)] konnte

ein Zeitabstand von knapp 5 Minuten bestimmt werden, der zwischen Inkubation und Auftreten der Indikatoren in frühen Endosomen lag.

Der Transport von den frühen zu den späten Endosomen wird von endosomalen Carriervehikeln vermittelt, die große Mengen eingestülpter Membran beinhalten. Man ist sich bisher nicht sicher, ob man diese multivesikulären Körper als mittelalte Endosomen, die während ihrer Reifung zum Zellinneren hin wandern, oder als getrennte Transport-Kompartimente betrachten soll. Als gesichert gilt, dass dieser Transport entlang der Mikrotubuli verläuft und einen Zeitraum von 10 bis 15 Minuten nach Adsorption in Anspruch nehmen kann. Die späten Endosomen fusionieren nach zusätzlicher Ansäuerung auf einen pH-Wert von 5,0 mit Hydrolase gefüllten Transportvehikeln des trans-Golgi-Netzes und stellen die Lysosomen dar. In ihnen findet die kontrollierte intrazelluläre Verdauung von Makromolekülen statt. Lysosomen enthalten ca. 40 verschiedene Arten hydrolysierender Enzyme, darunter Proteasen, Glykosidasen, Lipasen und Phosphatasen. Sie gehören alle zu der Gruppe der sauren Hydrolasen. Ihr Aktivitätsoptimum ist in saurer Umgebung erreicht. Membranständige ATP-betriebene Protonenpumpen sorgen für den entsprechenden Gradienten zwischen Endosom und Zytosol bzw. Lysosom und Zytosol.

Als rezeptorvermittelte Transzytose bezeichnet man den Prozess, in welchem spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Epithelzellen spezifische Makromoleküle von einem extrazellulären Raum zum anderen transportieren. Die Rezeptoren haben die Eigenschaft, dass der normale Endozytosezyklus auf der Ebene der frühen Endosomen abgebrochen wird. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe bleiben intakt und werden in Transportvehikeln verpackt, die sich von frühen Endosomen abschnüren. Diese bewegen sich dann in die Nähe der basolateralen Plasmamembran. Dort verschmelzen sie mit einer basolateralen Domäne der dortigen Plasmamembran und geben so den Inhalt auf der gegenüberliegenden Seite frei.

2.1.2. Besonderheiten im Entzündungsprozess

Im Rahmen einer Entzündung kommt es am Endothel zu verschiedensten morphologischen Veränderungen. Zellschädigungen finden immer im Gewebeverband statt und sind daher mit einer Vielzahl von Reaktionen verbunden. Diese Prozesse werden durch Mediatoren gesteuert, die entweder aus den Speichergranula bestimmter Zellen freigesetzt bzw. neu synthetisiert werden. Stoffe wie z.B. Stickstoffmonoxid und Bradykinin führen als vasoaktive Substanzen zur Relaxation glatter Muskelzellen in den Gefäßen. Es resultiert eine Vasodilatation der Gefäße. Die physiologische Autoregulation verursacht eine verstärkte Mikrozirkulation der Kapillaren. Auf Dauer führt die Vasodilatation aber zu einer Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (Stase).

Der Vasodilatation zeitlich nachgeordnet kommt es dann zum Austritt von Plasma und höhermolekularen Stoffen, wie Proteinen in das Interstitium, was sich in einer Schwellung der betroffenen Bereiche äußert. Ursache ist die Entstehung von Lücken (gaps) zwischen den Endothelzellen infolge Kontraktion dieser Zellen unter Mitwirkung von Aktin- und Myosinfilamenten. Diese sind mit den Zell-Zell-Verbindungen (junctions) eng assoziiert [Schmittler et al. (1990)]. Ort des ersten Plasmaaustritts sind Venolen. Mit steigender Reizintensität sind aber auch Kapillaren und Arteriolen betroffen. Ein typischer Mediator, der die Gefäßpermeabilität direkt steigert, ist Histamin. Dieses biogene Amin befindet sich in Speichergranula von Mastzellen, die im lockeren Bindegewebe um kleine Gefäße herum angeordnet sind und übt seine Wirkung über membranäre Rezeptoren aus [Heltianu et al. (1982)]. Leukotrien B₄ ist ein weiterer Mediatorstoff bei Entzündungsreaktionen, der die Permeabilität der Kapillaren steigern kann. Die Ödembildung wurde schon von Celsus als eines der fünf Kardinalsymptome der Entzündung beschrieben.

Der Exsudatphase in den kleinen Gefäßen mit Vasodilatation und Zunahme der Gefäßpermeabilität folgt die Infiltrationsphase mit der Einwanderung weißer Blutzellen. Infolge der Freisetzung chemotaktisch wirksamer Stoffe im entzündeten Gewebe akkumulieren dabei zunächst neutrophile Granulozyten und später Monozyten innerhalb der Kapillaren des geschädigten Gebietes und adhären an den Endothelzellen der Gefäßwand. Dieser Vorgang wird als Margination bezeichnet. Durch die Wirkung der freien Mediatoren kommt es zusätzlich zu einer Verlangsamung des Blutstromes durch Querschnittsvergrößerung der Gefäße nach Vasodilatation. Weiterhin wird die Fließgeschwindigkeit durch eine Viskositätszunahme des Blutes infolge des erhöhten Abstroms von intravasaler Flüssigkeit in den extravasalen Raum gesenkt. Durch die verlangsamte Fließbewegung gelangen vermehrt Granulozyten in den Bereich des Randstromes. Dieser Vorgang ist eine Sonderform und wird als hydrodynamische Margination bezeichnet. Die Granulozyten kommen dabei häufiger in Kontakt mit den Endothelzellen, die die Gefäße auskleiden.

Im Zuge einer Schädigung wird vom Endothel die Einwanderung von Granulozyten in den Entzündungsherd gefördert. Chemotaktische Stoffe sind in diesem Fall für das gezielte Heranführen von Entzündungszellen an den geschädigten Gewebebezirk verantwortlich. Hierzu zählen Faktoren des Komplementsystems (C3a, C5a) und Sekretionsprodukte normaler und geschädigter Zellen, sowie bakterielle Peptide. Weiterhin werden von den aktivierten Endothelzellen auch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren abgegeben, wodurch erneut Makrophagen stimuliert werden. Durch Chemotaxis in das entzündete Gebiet gelockte Granulozyten und Makrophagen nehmen vermehrt Zelltrümmer und Fremdpartikel durch Phagozytose in den Intrazellularraum auf und bauen sie durch lysosomale Enzyme ab. Durch vorherige Opsonisierung der Bakterien, Zelltrümmer und Fremdpartikel kann die Phagozytoseaktivität der Phagozyten gesteigert werden. Zu den so genannten Opsoninen zählen einige Faktoren des Komplementsystems (C3b), das C-reaktive Protein und an Zellen gebundenes IgG. Als Folge entzündlicher Prozesse werden auf der Endotheloberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert. Diese können mit Membranproteinen der Leukozyten reagieren und für diese als Leit- und Erkennungsstrukturen dienen. Man kennt drei große Familien von beteiligten Adhäsionsmolekülen. Diese sind Selektine, Integrine und Adhäsiene der Immunoglobulin-Superfamilie. Die Leukozyten wandern durch die Endothellücken unter partieller Auflösung der Basalmembran in das Interstitium. Der Prozess wird als Diapedese bezeichnet.

Die Selektine sind für den ersten Schritt der Wanderung von weißen Blutzellen, also das primäre Anhaften an der Gefäßwand verantwortlich. Nachfolgend bewirken Integrine eine stabile Adhäsion. Durch PECAM wird anschließend die eigentliche Transmigration durch kleine Lücken zwischen den Endothelzellen vermittelt. Der gesamte Prozess beginnend mit der verlangsamten Bewegung der Leukozyten, über die feste Anhaftung an der Gefäßwand bis hin zur Migration wird als Adhäsionskaskade der Leukozyten bezeichnet. Der Hintergrund dieser Prozesse, sowie die herausragende Stellung der Selektine als Targetstruktur im Rahmen einer antiinflammatorischen Therapie sollen im nächsten Kapitel beschrieben werden.

2.2. Selektine als Targetstruktur

2.2.1. Adhäsionskaskade der Leukozyten

Die zelluläre Immunabwehr während einer Entzündung geht immer mit einer Aktivierung und Mobilisierung phagozytosebefähigter Leukozyten (neutrophile Granulozyten und Monozyten), sowie deren Infiltration in das betroffene Gebiet einher. Die Extravasation

findet dabei hauptsächlich in kleinen venösen Gefäßen, den postkapillaren Venolen statt. Voraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist deren rezeptorvermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, die als Adhäsionskaskade bezeichnet wird [Springer (1995)]. Der Prozess wird von einer Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen (CAM's) vermittelt und setzt sich aus drei großen Teilabschnitten zusammen. Nach einer initialen Kontaktaufnahme zwischen fließenden Leukozyten und den Endothelzellen der Gefäßwand, dem sog. Tethering, findet ein Prozess des Zellrollens entlang des Endothels statt. Aus dieser Rollbewegung heraus entwickelt sich später eine feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel. Die Prozesse des Tetherings und der festen Adhäsion sind Voraussetzungen für das Stattfinden der abschließenden Emigration der Leukozyten in subendotheliales Gewebe. Die Rezeptoren der Zelladhäsionsmoleküle können im Rahmen der Kaskade entweder von den beteiligten Endothelzellen bzw. von den Entzündungszellen exprimiert werden. Sie gehören zu den Rezeptorfamilien der Selektine (E-, L-, P-Selektin), der Integrine (z.B. LFA-1, MAC-1) und der Immunglobulinsuperfamilie (z.B. ICAM-1 und PECAM-1).

In der Abbildung 1 sind die Teilschritte der Adhäsionskaskade dargestellt:

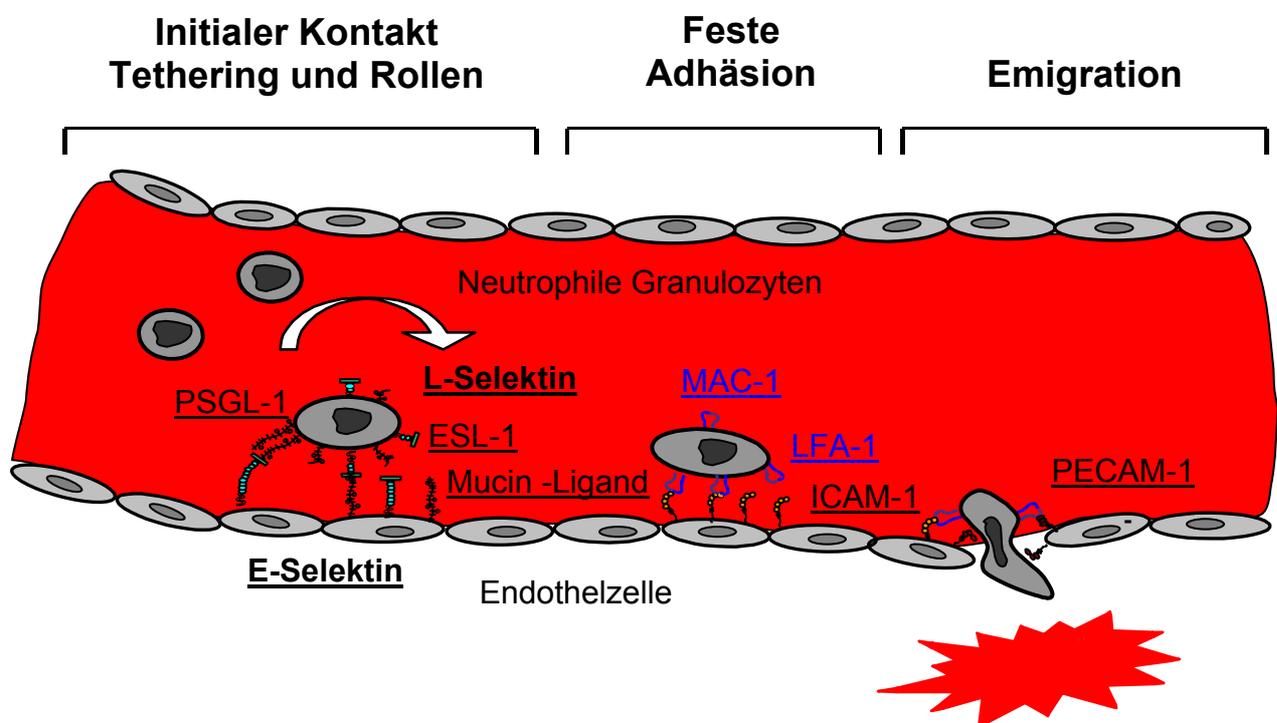


Abb. 1: Ablauf der rezeptorgesteuerten Leukozytenadhäsion am Endothel und der Leukozytenemigration unter Entzündungsbedingungen

Obwohl die Akkumulation der Leukozyten schon vor 100 Jahren mit Hilfe intravitalmikroskopischer Experimente betrachtet werden konnte [Cohnhein (1889)], kam es erst in den 90er Jahren durch Entdeckung der Rezeptoren der Selektinfamilie zur Aufklärung der molekularbiologischen Prozesse innerhalb der Adhäsionskaskade. In der Frühphase der Entzündungsreaktion kommt es zu der erwähnten Freisetzung von verschiedenen Entzündungsmediatoren. Diese können einerseits zur Gefäßdilatation führen (Histamin, Bradykinin, Stickstoffmonoxid) andererseits aber auch die Expression der Adhäsionsrezeptoren auf der Endotheloberfläche einleiten (Interleukin-1). Der initiale Kontakt der fließenden Leukozyten mit der Gefäßwand ist Voraussetzung für den ersten Teilprozess der Adhäsionskaskade, der auch als Tethering bezeichnet wird. Die Blutzellen besitzen zu diesem Zeitpunkt noch eine Fließgeschwindigkeit von 2 mm/sec. Anschließend kommt es durch die

Ausbildung schwach affiner Bindungen zu Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Rezeptoren der Endothelzellen der Gefäße. Dies führt zu einer verlangsamten Bewegung der Blutzellen am Endothel, wobei Geschwindigkeiten von 20µm/sec. auftreten. Das Tethering und der erwähnte Rollprozess werden von der Rezeptorfamilie der Selektine gesteuert. Die Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren sind hierbei so schwach, dass ein ständiges Abreißen und Neubilden von Bindungsprozessen zu beobachten ist. Ein festes Anhaften der Leukozyten am Endothel findet in dieser Phase noch nicht statt.

Die verlangsamten Leukozyten werden in einer zweiten Phase durch den Einfluss endothelialer Mediatoren (Chemokine, PAF) in einen aktivierten Zustand versetzt [Zimmermann et al. (1997)]. In Folge dessen kommt es zur verstärkten Aktivierung von Integrinen auf der Oberfläche der Leukozyten. Sie bewirken die feste Adhäsion und Extravasation der Leukozyten im Rahmen der Adhäsionskaskade. Zu den Integrinen gehören z.B. LFA-1 und MAC-1. Sie kommen auf den meisten Leukozyten-Subtypen vor und sind Dimere mit identischen β -Ketten und unterschiedlichen (aber Homologien aufweisenden) α -Ketten. Die wichtigsten Liganden der Integrine sind die Intercellular Adhesion Molecules (ICAM) auf den Endothelzellen. Sie können wie ICAM-2 und ICAM-3 konstitutiv vorhanden sein, bzw. wie ICAM-1 durch Zytokine (Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor) in ihrer Expression aktiviert werden [Arnaout et al. (1988)]. Durch die Bindung der aktivierten Integrine an ihre endothelialen Rezeptoren wird eine feste Adhäsion der zuvor abgebremsten, rollenden Leukozyten am Endothel vermittelt. Die Leukozyten flachen daraufhin ab, wodurch die resultierende Vergrößerung der Kontaktfläche eine weitere Bindungsverstärkung verursacht. Der nun folgende Prozess der Leukozytenextravasation ins subendotheliale Gewebe wird wiederum durch Integrin-Ligand-Wechselwirkungen gesteuert [Smith et al. (1989)]. Die Endothelzellen besitzen durch homogene Bindungen von „Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules“ (PECAM) interzelluläre Kontakte. Durch Bindung der leukozytären Integrine an diese Rezeptoren werden die homogenen PECAM-Bindungen gelöst, was sich im Auftreten interzellulärer Zwischenräume äußert. Durch diese Zwischenräume können anschließend die Leukozyten integrinvermittelt hindurchwandern.

Die Immunabwehr als Zeichen einer Entzündungsreaktion ist von den komplexen und ineinander greifenden Adhäsionsprozessen der Selektine und Integrine abhängig. Die universelle Bedeutung dieser Proteine für die Initiierung der Immunabwehr konnte in vielen in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen nachgewiesen werden [Lasky (1995)]. Dabei wird klar, dass ein funktioneller Ausfall einzelner Schritte der Adhäsionskaskade zu einer Störung der Leukozytenextravasation und damit zu einer verminderten Immunabwehr führt. Bei der Leukozyten-Adhäsions-Defizienz II (LAD II) handelt es sich um einen bis vor kurzem noch ungeklärten Gendefekt. Durch Mutationen im Kohlenhydrat-Stoffwechsel können keine funktionsfähigen Selektinliganden gebildet werden [Etzioni et al. (1997)]. Diese Krankheit prägt sich auf Grund des Fehlens von Selektinliganden als Immundefizienz aus. Die betroffenen Personen leiden trotz dramatischer Anstiege ihrer Leukozytenzahlen im Blut ständig an Infektionen und Fieberschüben. Außer bei diesem Defekt findet eine stark verminderte Chemotaxis auch bei einem erworbenen Mangel an sekundärer Granula innerhalb der Entzündungszellen statt (Verbrennungen). Während das Integrin LFA-1 offenbar nur in der Plasmamembran vorkommt, sind MAC-1 und p150,95 nämlich zusätzlich noch in weit höherer Dichte in den Membranen der intrazellulären sekundären Granula der Leukozyten lokalisiert. Bei großflächigen Verbrennungen können diese Speicherorte zerstört werden, was sich wiederum in einer fehlenden Emigration von Entzündungszellen innerhalb der notwendigen Immunabwehr äußert.

Da die Rezeptorfamilie der Selektine vorrangig am Prozess der entzündungsbedingten Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung beteiligt ist und im Rahmen einer Entzündungsreaktion zur Expression gebracht wird, stellt sie durch ihre initiale Rolle

innerhalb der Adhäsionskaskade einen Erfolg versprechenden Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie dar.

2.2.2. Expression der Selektine

Bei den Selektinen handelt es sich um lang gestreckte membrangebundene Glykoproteine. Entsprechend ihrer Ursprungszellen werden sie in E-Selektin (Endothelzellen), L-Selektin (Leukozyten) und P-Selektin (Plättchen und Endothelzellen) eingeteilt. Die Bezeichnung Selektin leitet sich von „Lektin“ ab. Lektin steht als eine Art Sammelbezeichnung für alle kohlenhydratbindenden Proteine. Die drei Selektine haben eine homologe Struktur und bestehen aus 5 Domänen. Einem kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Rest folgt eine transmembranäre Domäne. Die extrazelluläre Ausdehnung wird durch eine bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl von „short consensus repeats“ geprägt, die nachfolgend der transmembranären Domäne angeschlossen sind. Im Anschluss daran folgt eine dem „Epidermalen Wachstumsfaktor“ (EGF) ähnliche Domäne. Sie unterstützt durch Konformationsänderung des Rezeptors die Liganderkennung und Ligandbindung der nachfolgenden Lektin-Domäne. Diese befindet sich als abschließende Domäne am N-Terminus und stellt die eigentliche Kohlenhydrat-Bindungsstelle dar. Trotz ihrer strukturellen Homologien weisen die drei Selektine im Rahmen ihrer Aktivierung, Expression und Teilaufgaben im Bindungsvorgang große Differenzen auf.

L-Selektin kommt konstitutiv auf fast allen Leukozyten-Subtypen vor. Für eine bessere Zugänglichkeit befindet es sich auf den Mikrovilli der Entzündungszellen [Bruehl et al. (1996)]. Die exponierte Lage ermöglicht später trotz der relativ kleinen Molekülstruktur einen erleichterten Kontakt mit den verschiedenen Endothelliganden sog. Mucin-Liganden (GlyCAM-1= Glycosilation-dependent cell adhesion molecule-1 und MadCAM-1= Mucosal addressin cell adhesion molecule-1). Die L-Selektineinheiten werden wenige Minuten nach der Aktivierung der Leukozyten von der Zelloberfläche proteolytisch abgespalten. Der zugrunde liegende Mechanismus für diesen als „Shedding“ beschriebenen Prozess ist noch nicht aufgeklärt. Es wird aber von einer aktivierungs- und adhäsionsmodulierenden Funktion ausgegangen [Baca et al. (1997)]. Innerhalb der letzten beiden Jahre konnte jedoch die Abspaltung näher charakterisiert werden. Eine Metalloprotease ist für diesen Vorgang verantwortlich. Deren Aktivität wiederum wird durch intrazelluläre Signalwege reguliert, die Tyrosinkinaseabhängigkeiten aufweisen. Der gesamte Prozess findet außerdem nur an solchen L-Selektinen statt, die innerhalb der Membran als Cluster vorliegen [Phong et al. (2003)].

P-Selektin befindet sich in funktionsfähiger Form in speziellen Speichergranula der Zellen (Weibel-Palade-bodies der Endothelzellen und α -Granula der Thrombozyten) [Bonfanti et al. (1989)]. Nach anfänglicher Stimulation der Zellen mit Entzündungsmediatoren (Histamin, Thrombin) gelangt das P-Selektin innerhalb von 10 Minuten aus diesen Depots an die Zelloberfläche. Des Weiteren wird P-Selektin nach Zellaktivierung durch Zytokine oder Lipopolysaccharide (LPS) neu synthetisiert [McEver (1997)]. Als korrespondierender P-Selektin-Ligand auf den Leukozyten fungiert PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1). Nach Expressierung des P-Selektins auf der Zelloberfläche wird es durch Endozytose über Clathrin-coated Pits in die Speicher zurückgeführt bzw. lysosomal abgebaut. [Setiadi et al. 1995].

E-Selektin wird ausschließlich von den Endothelzellen nach Aktivierung mit Zytokinen, insbesondere Interleukin-1 β und TNF- α exprimiert. Da dieses Glykoprotein immer wieder neu hergestellt werden muss, erfolgt die Expressierung zur Präsentation des P-Selektins zeitlich versetzt. Die Konzentration des E-Selektins auf der Endothelzelloberfläche erreicht

deshalb erst nach vier bis acht Stunden ihr Maximum und geht innerhalb der nächsten 24 Stunden auf ihr Ausgangsniveau zurück [Bevilaqua et al. (1989)]. E-Selektin wird durch die Liganden ESL-1 (E-selectin ligand-1) und PSGL-1 auf den Leukozyten erkannt. Höchste Expressionslevel der Gene für E- und P-Selektin werden durch die Steuerung über den Transkriptionsfaktor NF- κ B erzielt [Collins et al. (1995)]. Dieser wird von reaktiven Sauerstoffspezies aktiviert, die in normalen Zellen durch eine Vielzahl von Radikalfängern unterdrückt werden [Rünegeler et al. (1999)]. Diese Abhängigkeit zeigt, dass oxidativer Stress innerhalb der Endothelzellen zu einer verstärkten Expression von Selektinen führt. Auch E-Selektin wird nach Aktivierung endozytotisch von der Zelloberfläche entfernt und im Lysosom abgebaut.

Die Abhängigkeit der Selektinexpression durch Entzündungsmediatoren steuert somit Dauer und Intensität des Leukozytenrollens. Gleichzeitig werden den Selektin-Subtypen dadurch unterschiedliche Funktionen zugeordnet. Das P-Selektin mit seiner lang gestreckten Struktur und das räumlich sehr exponierte L-Selektin auf den Mikrovilli der Leukozyten vermitteln in der Frühphase der Entzündung das Zellrollen. Durch die entsprechende de-novo-Synthese nach Aktivierung ist das E-Selektin für die Überleitung zur festen Adhäsion der Leukozyten an der Gefäßwand verantwortlich. Die Selektine sind demnach an einer sehr frühen Phase der Entzündung beteiligt. Ihr lokales und speziell beim E-Selektin temporäres Auftreten innerhalb der Adhäsionskaskade der Leukozyten macht sie zu interessanten Zielstrukturen in der antiinflammatorischen Therapie. Im Rahmen vielfältiger Untersuchungen konnten diese Aussagen erhärtet werden (selektindefiziente Mäuse, Bindungsexperimente mit Selektinen innerhalb künstlicher Membranen).

Für die Selektine sind bisher nur einzelne hoch affine Liganden bekannt. Es sind lang gestreckte Glykoproteine, an deren Proteingrundgerüst eine Vielzahl von Kohlenhydratseitenketten als Bindungsepitope glykosidisch verknüpft ist. Das so vermittelte Zellrollen entsteht durch Ausbildung und Dissoziation der Rezeptorbindungsstellen mit den hoch flexiblen Liganden. Bei den Kohlenhydrat-Bindungsepitopen handelt es sich um „N-Acetyl-laktosamin“-basierende Oligosaccharide. Sie sind in einer speziellen Art und Weise mit Fucose und einer Sialinsäure verknüpft. Eine große Bedeutung als Bindungsepitop besitzt das Tetrasaccharid Sialyl Lewis^X (sLe^X). Es besteht aus Sialinsäure, Galaktose, Fucose und Glucosamin, wobei die Lektin-Domäne des Selektins mit der Carboxylgruppe der Sialinsäure und über Ca²⁺ mit den OH-Gruppen der Fucose in Wechselwirkung tritt [Patel et al. (1994)]. Im Rahmen von Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von monoklonalen sLe^X-gerichteten Antikörpern, die adhäsionsvermittelte Bedeutung aller drei Selektine deutlich nachließ [Phillips et al. (1990)]. Trotz der relativ niedrigen Bindungsaffinität zwischen den Selektinen und sLe^X (1mM) konnten bisher keine besseren Bindungsepitope gefunden werden. Die ermittelte hohe Bindungsstärke zu den natürlichen Mucinliganden (100nM) kann bis heute strukturell nicht erklärt werden. Vor diesem Hintergrund wurde das sLe^X als Standardligand bei der Suche nach Selektininhibitoren herangezogen.

Eine lokal überschießende Leukozytenansammlung kann zur Pathogenese der Entzündung beitragen. Eine Dysregulation der Selektine wurde beispielsweise bei entzündlichen Erkrankungen wie der myokardialen Ischämie (verstärkte P-Selektin-Expression) oder der rheumatoiden Arthritis (verstärkte E-Selektin-Expression) beobachtet. Im Rahmen der Reperforationsmaßnahmen als Sofortmaßnahme bei der myokardialen Ischämie kommt es häufig zu akuten Entzündungen infolge einer Leukozytenanreicherung in den zuvor verschlossenen Gefäßen. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen Endothelzellen durch freie Sauerstoffradikale verstärkt P-Selektin exprimiert wird. Weiterhin werden diese Selektine durch Einwirkung der Radikale auch verzögert abgebaut [Weyrich et al. (1993)]. Des Weiteren besitzen die Selektine bei der Atherosklerose, die als entzündlich fibrotische

Antwort auf die Akkumulation von cholesterolhaltigen Lipoproteinen in der Gefäßwand anzusehen ist, eine wichtige Rolle [Vora et al. (1997)]. Bei Patienten mit tiefen Venenthrombosen werden erhöhte Spiegel an löslichem P-Selektin gefunden. Im Rahmen neuerer Untersuchungen am Rattenmodell konnte eine Abnahme der Häufigkeit dieser Gefäßverschlüsse nach vorheriger Inhibierung von P-Selektin gezeigt werden [Thanaporn et al. (2003)]. Bei Knieoperationen konnte P-Selektin als Marker für das Risiko von tiefen Venenthrombosen eingesetzt werden. Radiologisch detektierte Venenthrombosen gehen eng mit einer erhöhten Anzahl an aktivierten Plättchen einher. Diagnostische Untersuchungen an Patienten, die kurz zuvor ein künstliches Kniegelenk erhielten, konnten dies bestätigen [Yang et al. (2002)]. Selektine sind weiterhin auch an diabetischen Gefäßschäden (Angiopathie) beteiligt. Durch die dauerhaft erhöhten Glukosekonzentrationen kommt es innerhalb der Endothelzellen zu oxidativem Stress. Dieser führt zur verstärkten Expressierung von E-Selektin. Dadurch werden vermehrt Monozyten und andere Entzündungszellen in diese Regionen transportiert, die im Rahmen der Adhäsionskaskade dort binden und emigrieren. Im molekularen Mechanismus spielen hier vorrangig sog. „Advanced Glycation Endproducts“ (AGE) eine Rolle. Diese Moleküle entstehen bei der Reaktion zwischen Glukose und den Aminogruppen von Proteinen. Je höher die Konzentration an freier Glukose ist, desto stärker finden diese Nebenreaktionen statt. AGE's binden an spezielle Oberflächenrezeptoren und aktivieren dadurch den Transkriptionsfaktor κ B. Die vermehrte Bildung von Selektinen ist die Folge dieser Prozesse [Morigi et al. (1998)]. Des Weiteren vermitteln die Selektine auch die Bindung metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel mit anschließender Invasion in subendotheliale Bereiche [Biancone et al (1996)].

Die nachgewiesene Beteiligung der Selektine an der Entstehung verschiedener entzündlicher Prozesse lässt die gezielte Beeinflussung der Selektine als hoffnungsvollen Ansatzpunkt für eine neuartige antiinflammatorische Therapie erscheinen. Wegen ihrer zentralen Rolle im Entzündungsgeschehen stellen sie bei der Suche nach modernen Antiphlogistika attraktive Targetstrukturen dar. Im Gegensatz zur bisherigen symptomatischen Therapie könnte dadurch erstmals ein kausaler Angriff erfolgen. Prinzipiell ergeben sich mehrere Möglichkeiten für den antiinflammatorischen Ansatz auf Selektinbasis. Die direkte Inhibierung der Selektinfunktion ist durch den Einsatz von Anti-Selektin-Antikörpern möglich. So gelang es bisher mit Anti-P- und Anti-L-Selektin-Antikörpern im Tierversuch eine protektive Wirkung bezüglich Ischämie und Reperfusionsverletzung mit Neutrophilenakkumulation am Myokard nachzuweisen. Weiterhin konnte durch den Einsatz monoklonaler Antikörpern gegen E- und L-Selektin die bedrohliche Leukozyteninfiltration nach Herztransplantationen enorm reduziert werden [Carter et al. (2002)]. Die Inhibierung der Selektine mit spezifischen Antikörpern wurde u. a. auch von Elangham et al. untersucht, und dabei beobachtet, dass Anti-E-Selektin-Antikörper erfolgreich die Akkumulation von Neutrophilen in hypersensitiverter Primatenhaut inhibieren können [Elangham et al. (1997)].

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre der Einsatz von kompetitiv wirkenden löslichen Selektininhibitoren. Bei der Suche nach neuen Inhibitoren gilt sLe^X immer noch als Leitstruktur. Dabei werden durch Reduktion und Modifikation der räumlichen Molekülstruktur neue Formen erhalten, die vereinzelt bessere Bindungsaffinitäten aufweisen [Ohmoto et al (1996)]. Als Nachteil beim Vergleich vieler neuer Selektininhibitoren kommt hinzu, dass die unterschiedlichen Testsysteme einzelner Arbeitsgruppen nur geringfügig vergleichende Aussagen zulassen. Als aussichtsreiche Klasse konnte innerhalb der Arbeitsgruppe um Bendas sulfatierte heparinoide Verbindungen als Inhibitoren ermittelt werden [Höpfner et al. (2003)]. Bisher befindet sich aber lediglich eine einzige Struktur in der klinischen Testung. Die Substanz TBC 12-69 (Revotar AG) befindet sich in der klinischen Testung Phase II zur Therapie des Asthma Bronchiale bzw. der Psoriasis [Aydt et al. (2003)].

Eine ganz neue Möglichkeit ergäbe sich, wenn Selektine als molekulare Ziele im Sinne eines ortsspezifischen Drug Delivery benutzt werden würden. Der große Vorteil der P- und E-

Selektine besteht in der direkten Bindung an den Entzündungsort. Im Gegensatz zu anderen Adhäsionsrezeptoren weisen sie unter physiologischen Bedingungen keinen Grundlevel im Expressionsverhalten auf. Sie besitzen somit ideale Voraussetzungen für die gezielte Beeinflussung des Entzündungsgeschehens mit hoher Spezifität. Vorteilhaft ist auch, dass die Vehikel für ein Erreichen des Zielortes das Gefäßsystem nicht verlassen müssen. Der Einsatz selektingerichteter Liposomen würde eine Kombination der positiven Transporteigenschaften der Liposomen mit den hervorragenden Targeteigenschaften der vaskulären Selektine bedeuten. Durch die längere Aktivität gegenüber P-Selektin erscheint das E-Selektin als die am besten geeignete Zielstruktur für ein antiinflammatorisches Drug Targeting. Durch die spezifisch zum Entzündungsort transportierten Liposomen könnten direkt im Entzündungsherd Arzneistoffe in hochkonzentrierter Form zur Verfügung stehen.

2.3. Liposomales Targeting

2.3.1. Liposomen als Arzneistoffträger

Neue Herausforderungen innerhalb der Therapie von bisher nur unzureichend bzw. nicht therapierbaren Krankheitsbildern treibt die Entwicklung neuer Arzneistoffe und neuer Arzneimittelträgersysteme ständig voran. Letzteres besitzt als Zielvorstellung, dass die Wirkstoffe direkt zu ihrem Wirkort transportiert werden. Sog. zielgerichtete Drug Delivery Systeme erfüllen diese Anforderungen [Forssen et al. (1998)]. Ortsspezifisches Targeting kann dabei als spezifisch entweder für ein Organ oder ein Gewebe, eine bestimmte Zelle oder auch ein intrazelluläres Kompartiment definiert werden. Damit kann die therapeutische Effizienz erhöht und die Beeinflussung gesunder Zellen und damit die Entstehung unerwünschter Nebenwirkungen reduziert werden. Schon Anfang unseres Jahrhunderts wurde die Idee des gezielten Arzneistofftransports als „Konzept der magischen Kugeln“ von Paul Ehrlich vorgestellt. Er erkannte schon 1906 das enorme Potential dieses Konzeptes [Ehrlich,P. (1906)]. Trotz der enormen Entwicklung in den Bereichen Molekulargenetik, Immunologie und Zellbiologie konnten bisher nur wenige Lösungsansätze für ein erfolgreiches Drug Targeting gezeigt werden.

Die Verwendung der von Bangham in den 60er Jahren entdeckten Liposomen als Transportsysteme im Rahmen eines Drug Delivery Systems wurde in den frühen 70er Jahren von Gregoriadis vorgeschlagen [Bangham et al. (1965), Gregoriadis,G. (1976)]. Liposomen, die aufgrund ihrer Phospholipidbilayerstruktur den natürlichen Zellmembranen sehr ähnlich sind, können als Modell für Zellmembranuntersuchungen genutzt werden. Die Vesikel aus konzentrisch angeordneten Lipiddoppelschichten besitzen jedoch eine weitaus bedeutendere Anwendungsmöglichkeit als Arzneistoffträger. In ihnen können sowohl hydrophile Arzneistoffe in der wässrigen Innenphase als auch lipophile Arzneistoffe innerhalb der Membran der Liposomen eingebaut werden. Liposomen sind durch die Art der am Aufbau beteiligten Lipide und der Anzahl ihrer Bilayerschichten charakterisiert. Entsprechend ihrer Morphologie kann man sie in kleine (SUV), große (LUV), einschichtige (unilamellar) und mehrschichtige (MLV) Vesikel einteilen. Sie entstehen durch Selbstassoziationsvorgänge von Amphiphilen (häufig Phospholipiden) innerhalb einer wässrigen Phase. Liposomen aus Phospholipiden weisen entsprechend ihres analogen Aufbaus zu Zellmembranen eine gute Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und eine relativ geringe Toxizität auf. Innerhalb ihrer physikalischen Eigenschaften besitzen sie eine enorme Vielfalt (Lipidzusammensetzung,

Membranfluidität, Größe, Ladung der Oberfläche etc.). Der liposomal applizierte Arzneistoff ist dabei von einer schützenden Lipidhülle umgeben. Die entsprechende Verteilung im Mehrkomponentensystem des Organismus ist damit unabhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des verkapselten Arzneistoffes. Aufgrund dieser Vorteile wurden große Hoffnungen in die Liposomen als Arzneistoffvehikel gesetzt, da man in ihnen eine gute Möglichkeit für die Realisierung eines Drug Delivery Konzeptes sah. Innerhalb der ersten systemischen Applikationen zeigte sich aber eine Reihe von Problemen. Liposomen treten nach ihrer systemischen Applikation sehr schnell mit Organen des Retikulo-Endothelialesystems (RES: Leber, Milz und Lunge) in Wechselwirkung [Kimmelberg (1976), Segal et al. (1976)]. Innerhalb dieser Organe werden körperfremde Stoffe als solche erkannt und ständig aus dem Blutkreislauf eliminiert. Durch den Entzug unbekannter Stoffe aus dem Körperkreislauf stellt das RES einen bedeutenden Grundpfeiler des körpereigenen Immunsystems dar. Die Liposomen werden innerhalb weniger Minuten phagozytiert, erreichen nur sehr geringe Zirkulationshalbwertszeiten und stehen als Vehikelsysteme so nicht mehr zur Verfügung. Eine Reduzierung dieses Abbaus erreichte man teilweise durch Modifizierung der Liposomen, indem man z.B. sehr kleine Vehikel einsetzte [Juliano et al. (1975)] und den Gehalt an Cholesterol innerhalb der Lipidzusammensetzung steigerte [Kirba et al. (1980)]. Eine weitere Blockade des RES wurde durch eine Prädosierung mit Dextransulfat und unfunktionalisierten Liposomen zur Sättigung der Makrophagen und damit der Erschöpfung ihrer Aufnahmekapazitäten erreicht [Aragnol et al. (1986), Patel et al. (1983)]. Da durch diese Maßnahmen die Verbesserungen nur geringfügig waren, stand die körpereigene Abwehrfunktion letztendlich einem erfolgreichen Drug-Targeting noch immer entgegen. Eine bedeutend effektivere Variante zur Verminderung der Aufnahme durch das RES und damit eine Möglichkeit zur Realisierung des Targeting stellten so genannte „Stealth[®]“-Liposomen dar. Diese Liposomen erhalten durch den Einbau von Lipiden mit voluminösen hydrophilen Kopfgruppen eine sterische Barriere, welche die Anheftung der Oponine und damit die darauf folgende Phagozytose vermindert [Blume et al. (1990)]. Der genaue Mechanismus dieses zirkulationsverlängernden Effekts wird im nächsten Kapitel ausführlicher beschrieben.

Ein weiteres Problem nach systemischer Applikation bestand in der geringen Serumstabilität der Vehikel. Es existiert eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten zwischen Liposomen und Blutkomponenten. Dabei besitzen neben Immunoglobulinen und Lipoproteinen auch Komplementfaktoren starken Einfluss auf die Stabilität der Liposomen [Bonte et al. (1987)]. Hierbei sind die stabilitätsverringernenden Merkmale der Serumlipoproteine am stärksten ausgeprägt. Man spricht sogar von einer durch Lipoproteine herbeigeführten „Serum-induzierten“ Lyse der Liposomen. Speziell das HDL führt auf der Liposomenoberfläche zu Adhäsions- und Anlagerungsprozessen, die z. T. von Penetrationsvorgängen in die Bilayermembran begleitet sind [Black et al. (1976)]. Lipidaustausch zwischen Bilayerkomponenten und HDL sind auch in Studien erwähnt worden [Bonte et al. (1986)]. Dies führt zum Ausfluss eingeschlossener Materialien durch die in ihrer Struktur gestörte Membran hindurch. Durch eine Erhöhung des Cholesterolanteils können Interaktionen mit Serumproteinen verringert werden. Das Cholesterol in der Liposomenmembran bedingt eine höhere Packungsdichte und erhöht somit die Serumstabilität [Kirby et al. (1980)]. Des Weiteren sollten zur Herstellung serumstabiler Liposomen nur hochgradig reine, rigide und gesättigte Lipide Verwendung finden [Huang et al. (1980)].

Bei den verschiedenen Versuchen, Liposomen als Arzneistoffvehikel gezielt am Wirkort anzureichern, kann man zwischen einem indirekten (passiven) und einem direkten (aktiven) Targeting unterscheiden. Ein indirektes Targeting ergibt sich aus der Natur der Liposomen als körperfremde Strukturen und der daraus resultierenden Anreicherung in Organen des RES. Ausgenutzt wird dies bei der Behandlung von besonders schwer-

wiegendem Befall von Leber und Milz mit Leishmaniose-Erregern [Gilbreath et al. (1985)]. Ein weiteres indirektes Targeting wurde durch die Ausnutzung der sich ständig veränderbaren Gefäßsysteme einiger solider Tumore möglich. Die neu gebildeten Gefäßabschnitte weisen zum Teil noch Lücken zwischen den Endothelzellen auf. Den Endothelzellen in diesen Gebieten fehlt zusätzlich dazu noch die Basalmembran. Dies erleichtert ein Eindringen der Liposomen [Roberts et al. (1997)] erheblich. Beim direkten Targeting erhalten die Liposomen durch Bindung an spezifische Oberflächenstrukturen des Zielgewebes ihre Spezifität. Dafür müssen die Liposomen mit spezifisch bindenden Strukturen an ihrer Oberfläche funktionalisiert werden. In den letzten Jahren wurden schon verschiedenste Liganden erprobt und an Liposomen gekoppelt. Dazu gehört z.B. Sialyl-Lewis^X, Transferrin und eine Vielzahl unterschiedlicher Immunglobuline. Eine äußerst viel versprechende Möglichkeit bot sich dabei in der Verwendung von Antikörpern als Oberflächenstruktur von Liposomen. Die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen zeichnet sich durch hohe Spezifität und starke Bindungsaffinität aus. Durch die Anwendung einheitlicher und einfacher Kopplungsmethoden konnte die Funktionalisierung der Liposomenoberfläche erheblich erleichtert werden. Der erste erfolgreich durchgeführte Versuch eines „Antikörper-vermittelten“ Targetings wurde 1975 von Gregoriadis vorgestellt [Gregoriadis et al. (1975)]. In heutiger Zeit existieren viele erfolgreiche Modelle der Anwendung von Immunoliposomen. Gerade im Bereich der Krebstherapie wird durch Einsatz tumorspezifischer monoklonaler Antikörper eine gezielte Behandlung erst möglich [Koning et al. (1999)]. Bei der Verwendung in-vivo stellt jedoch auch bei Immunoliposomen die Aufnahme durch das RES ein schwieriges Hindernis dar. Deshalb konnten viel versprechende Resultate von in-vitro-Versuchen mit Zellen in-vivo nicht reproduziert werden.

Ein weiteres Problem besteht in der gezielten Freigabe des liposomalen Inhaltes im Zellinneren. Stabile Liposomen würden im Inneren der Zelle nach einer erfolgreichen Internalisierung der lysosomalen Degradation zum Opfer fallen und damit wirkungslos sein. Durch die Ankopplung von Peptiden und Proteinen an die Liposomenoberfläche konnten targetspezifische Vehikel erreicht werden [Vidal et al. (1987)]. Die Freigabe der Inhaltsstoffe in das Zytosol erfolgte dadurch immer noch nicht. Eine gezielte Wirkstofffreisetzung musste geschaffen werden. Dabei sollte eine hinreichende Stabilität für das Targeting zum Wirkort mit einer gewissen Destabilität der Liposomen am Wirkort im Einklang stehen. Es kam zur Entwicklung so genannter targetsensitiver Immunoliposomen [Ho et al. (1986)]. Hierbei werden einem Phospholipid, welches allein nicht zur Bilayerausbildung befähigt ist, Stabilisatoren in Form lipidassoziierter Antikörper zugesetzt. Die nun gebildeten targetsensitiven Liposomen werden nach erfolgter Antikörperbindung am Wirkort instabil und geben dort ihren Inhalt frei [Pinnaduwage et al. (1992)]. Die Freigabe des Inhaltes erfolgte aber immer noch extrazellulär. Ein therapeutischer Effekt könnte demnach erst nach erfolgreicher Aufnahme der Stoffe durch die Zelle erzielt werden. Demgegenüber steht die zelluläre Aufnahme kompletter Liposomen. In diesem Fall würde der gesamte Liposomeninhalt das Zellinnere erreichen und seine Wirkung ausüben können.

Um eine intrazelluläre Freigabe des Liposomeninhaltes garantieren zu können, musste man sich den zytosolischen Gegebenheiten anpassen. Unterschiedliche Bedingungen innerhalb der Kompartimente galt es auszunutzen. Mit der Entwicklung pH-sensitiver Liposomen keimte neue Hoffnung auf [Ellens et al. (1984), Connor et al. (1984), Straubinger et al. (1985)]. Hierbei kommt es zu einer pH-abhängig gesteuerten Instabilität der Lipidbilayer. Das Prinzip der pH-abhängigen Freigabe wird in einem der nächsten Kapitel genauer vorgestellt.

2.3.2. Immunoliposomen/Stealth[®]-Modifikation/pH-Sensitivität

Um die Targetspezifität liposomaler Wirkstoffcarrier zu erhöhen, ist die Kopplung von Antikörpern an deren Oberfläche eine viel versprechende Möglichkeit. Die dabei entstehenden Immunoliposomen zeichnen sich durch ihre hervorragenden Zielspezifitäten aus. Dabei sind für den Erfolg des Targetings entsprechende zelluläre Oberflächenstrukturen essentiell. Auf den Zielzellen müssen sich diese Determinanten sowohl quantitativ als auch qualitativ von den umliegenden Geweben abheben. Ideal wäre eine Ausbildung dieser Strukturen nur unter pathologischen Bedingungen. Adhäsionsmoleküle zeigen eine solche temporäre Expressierung während des Verlaufs einer Entzündung. Die Bindungsstellen für Immunoliposomen wären demnach nur unter Entzündungsbedingungen im Entzündungsgebiet vorhanden. Innerhalb dieser Arbeit stehen die zeitlich und lokal limitiert exprimierten Adhäsionsmoleküle der Rezeptorfamilie der Selektine im Mittelpunkt.

Immunoliposomen wurden seit den achtziger Jahren beschrieben. Für die Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche von Liposomen wurden verschiedene Kopplungstechniken entwickelt. Idealerweise sollten sie einfach und schnell durchführbar sein und eine stabile Verbindung ergeben (kovalente Methoden). Die Kopplungsprozedur muss mit wenigen Reaktionsschritten sowie ohne großen präparativen Aufwand und Verlust an Antikörpern durchführbar sein. Während der Konjugation sollte der Antikörper die Fähigkeit zur Antigenerkennung behalten. Um die Bindung der Immunoliposomen an ihren Zielzellen zu optimieren, sollte ein möglichst großer Anteil der gebundenen Antikörper an der Liposomenoberfläche für die Zielzellen zugänglich sein. Die Liposomen dürfen weiterhin durch die Kopplungsmethode in ihrer strukturellen Integrität nicht beeinflusst werden.

Von den verschiedenen Methoden der kovalenten Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von Liposomen erscheint die Kopplungsprozedur unter Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung besonders erstrebenswert. Hierbei werden unter relativ milden Bedingungen im wässrigen Medium effektive Kopplungsraten erzielt. Durch den Wegfall einer vorherigen Antikörperderivatisierung weist diese Methode eine sehr elegante Verfahrensweise auf. Bei der Kopplungsmethode dient N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin als Lipidanker in den Liposomen. Durch Aktivierung der Carboxylgruppe mit einem Carbodiimid (EDC) bei pH 3,5 in wässrigem Milieu entsteht ein reaktives O-Acyl-Intermediat, welches bei pH 8 mit dem entsprechenden Aminogruppen-tragenden Antikörper unter Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung umgesetzt wird [Weissig (1991)]. Der Nachteil hierbei ist jedoch die anfängliche Kopplungsbedingung im Säuren. Die pH-sensitiven Liposomen würden bei dieser Prozedur zerstört werden. Eine gewisse Modifikation hat die Kopplungsvariante unter Verwendung von N-Glut-PE durch Ezpeleta erfahren [Ezpeleta et al. (1996)]. Hierbei wird die Antikörperanbindung zwar unter Verwendung analoger Reagenzien, jedoch bei neutralem pH-Wert und veränderter Reaktionszeit durchgeführt. Als Begründung für die Wahl des neutralen pH-Wertes wurde eine schnelle Abnahme der Aktivität des Carbodiimids im sauren Milieu angegeben.

Stark limitierend auf den systemischen Einsatz von Immunoliposomen wirkt sich die Tatsache aus, dass Liposomen nach ihrer Applikation schnell von Zellen des retikulo-endothelialen Systems (Makrophagen von Leber/Milz) als körperfremd erkannt und eliminiert werden. Die Funktionalisierung mittels Antikörper bewirkt offensichtlich eine zusätzliche Elimination. Dadurch werden nur kurze Zirkulationshalbwertszeiten erreicht. Therapeutisch notwendige Wirkstoffspiegel am Wirkort sind unter normalen Bedingungen mit konventionellen Immunoliposomen deshalb nicht zu erhalten. Richtungsweisende Strategien zur Zirkulationszeitverlängerung wurden zu Beginn der 90er Jahre entwickelt. 1987 entdeckten Allen et al. die zirkulationsverlängernde Wirkung des Gangliosids GM₁. Der Effekt wird durch die voluminösen und flexiblen Kopfgruppen des GM₁ hervorgerufen.

Blume nutzte 1990 diese Erkenntnis und versuchte sie auf Phospholipide zu übertragen [Blume et al. (1990)]. Dafür benutzten sie erstmals Phospholipide mit Polyethylenglykol-Kopfgruppen (PEG). Damit konnten erheblich längere Zirkulationshalbwertszeiten der Liposomen erreicht werden. Der protektive Effekt der PEG-Lipide (Stealth[®]-Effekt) zeigt eine Abhängigkeit von deren Kettenlänge und ihrer molaren Konzentration. Maximale Verlängerungen der Zirkulationszeiten konnten bei Molmassen, die zwischen 2000 und 5000 lagen und bei Konzentrationen von 5mol% / Gesamtlipid erhalten werden [Marruyama et al. (1991), Allen et al. (1991), Klibanov et al. (1991)]. Ab einer gewissen Konzentration an Polyethylenglykolketten findet eine parallele Ausrichtung der gestreckten PEG-Ketten statt. Durch diese als Bürstenmodell [Kenworthy et al. (1995)] bezeichnete Besonderheit bildet sich um das Liposom eine 5nm dicke sterische Schutzschicht [Woodle et al. (1994)] aus. Dadurch gelingt es den opsonisierenden Proteinen nicht mehr so leicht, sich auf der Liposomenoberfläche durch adsorptive Bindungsprozesse festzusetzen. Des Weiteren kommt es durch die sterische Stabilisierung der Liposomen auch zur Inhibierung der nicht opsoninvermittelten Aufnahme dieser durch Makrophagen der Leber (Kupferzellen) [Dijkstra et al. (1985)].

Immunoliposomen zeigen aufgrund ihres erhöhten Antigencharakters trotz sterischer Stabilisierung gegenüber ungekoppelten Liposomen prinzipiell verkürzte Zirkulationszeiten auf [Koning et al. (2001)]. Dabei besteht zwischen liposomal gebundener Antikörpermenge und erreichter Zirkulationshalbwertszeit eine umgekehrte Proportionalität. Bei einem Beispiel von Allen et al. sinkt der nachweisbare Liposomenanteil nach 24h bei sterisch stabilisierten Immunoliposomen mit steigender Anzahl gekoppelter Antikörper extrem ab. So sind von Vergleichsliposomen ohne Antikörper nach 24h noch 25% der applizierten Menge, von Immunoliposomen mit einer Antikörperdichte von 20µg/µmol noch 20%, bei 75µg/µmol nur noch 10% und bei 140µg/µmol keine Liposomen mehr nachweisbar [Allen et al. (1995)]. Dies lässt den Schluss zu, dass zu hohe Kopplungsraten mit über 80µg/µmol eine schnelle Eliminierung verursachen können. Einen relativ guten Kompromiss zeigen Immunoliposomen mit Kopplungsraten von 30 bis 50µg/µmol. Hier werden bei guter Targeterkennung gleichzeitig auch liposomale Zirkulationshalbwertszeiten von mehreren Stunden erreicht.

Innerhalb der sterisch stabilisierten Immunoliposomen können hinsichtlich der Anordnung der Antikörper zwei Typen unterschieden werden. Beim Typ I befinden sich die Antikörpermoleküle direkt auf der Liposomenoberfläche, wohingegen sie beim Typ II in exponierter Stelle am Ende der PEG-Ketten lokalisiert sind. Der Typ I ist vor allem durch eine starke Abnahme der Kopplungsmengen aufgrund der sterischen Wechselwirkungen durch die PEG-Ketten während der Kopplungsreaktion gekennzeichnet. Des Weiteren sind die gebundenen Antikörpermoleküle für spätere Targeterkennungprozesse regelrecht abgeschirmt. Dies äußert sich in relativ niedrigen Bindungsergebnissen sterisch stabilisierter Immunoliposomen vom Typ I [Slepshkin et al. (1997), Spragg et al. (1997)]. Dieses Problem konnte mit Hilfe des Typs II gelöst werden. Hierbei konnten erstmals die sterische Stabilisierung der Liposomen mit der guten Erkennbarkeit der Antikörper kombiniert werden. Zusätzlich zu den guten Antikörperbindungsraten konnten durch die Kopplung der Antikörper an den PEG-Terminus eine erhöhte Antikörpererkennbarkeit und -flexibilität und damit eine verbesserte Zellbindungsfähigkeit erreicht werden [Zalipsky (1993), Maruyama et al. (1995)].

Neben der Weiterentwicklung der Kopplungsanker existieren auch Fortschritte auf dem Gebiet der einzusetzenden Antikörpermoleküle. Hierbei steht die Betrachtung des liposomalen Antigenpotentials im Vordergrund der Forschungsarbeiten. Während früher noch mit Gemischen verschiedener Antikörper gearbeitet wurde, finden heute nur noch monoklonale Antikörper Anwendung. Obwohl sie eine hervorragende Spezifität besitzen, werden sie durch ihren Fc-Teil schnell von den Makrophagen als fremd erkannt und eliminiert. Eine Weiterentwicklung bestand in der Verwendung von Fab-Fragmenten. Die isolierten Antikörper-Erkennungsdomänen der IgG-Moleküle zeigen Targetspezifität gepaart mit vermindertem Antigenpotential. Probleme bestehen aber in der Kopplung solcher

Moleküle an Liposomen. Eine Verbesserung konnte durch den Einsatz chimärer Antikörper erreicht werden. Dabei handelt es sich um modifizierte monoklonale Antikörper, bei denen die Antigenerkennungs-Domäne (Fab-Teil) aus der Maus mit einer humanen Effektor-Domäne (Fc-Teil) vermischt ist. Diese Kombination stellt im Gegensatz zu Fab-Fragmenten noch intakte Antikörpermoleküle mit verträglicheren Eigenschaften dar. Durch einen weiteren Austausch speziessfremder Bestandteile innerhalb der Antikörper konnte eine weitere Verringerung der Antigenität durch Immunoliposomen erzielt werden. Seit einiger Zeit gibt es deshalb für eine Vielzahl von Oberflächenstrukturen sog. humanisierte Antikörper. Bei diesen monoklonalen Antikörpern ist nicht nur der Fc-Teil humanen Ursprungs, sondern zusätzlich ein gewisser Teil der Fab-Domäne. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Antigenität den Einsatz von Immunoliposomen ohne Zweifel limitiert, aber durch den Einsatz humanisierter Formen von Antikörpern scheint dieses Problem lösbar zu sein.

Die alleinige Anreicherung der Immunoliposomen an den Zellen des Zielgebietes durch Bindungsprozesse bewirkt jedoch noch keinen therapeutischen Nutzen des transportierten Wirkstoffs. Nach der Überwindung der Probleme der effizienten und gerichteten Antikörperkopplung an die Liposomenoberfläche zur Erhöhung der Targetspezifität und der sterischen Stabilisierung der Immunoliposomen zur Verlängerung ihrer Zirkulationshalbwertszeiten durch PEG-Ketten muss deshalb anschließend die erfolgreiche Freigabe des Liposomeninhaltes am Zielort erreicht werden. Eine gezielte intrazelluläre Wirkstofffreisetzung sollte geschaffen werden. Dabei muss eine hinreichende Stabilität für das Targeting zum Wirkort mit einer Destabilität der Liposomen am Wirkort im Einklang stehen. Die Entwicklung ging dabei von den targetsensitiven Immunoliposomen [Ho et al. (1986)] aus, die schon näher erläutert worden sind.

Eine intrazelluläre Freigabe kann durch pH-sensitive Liposomen erreicht werden. Das Ziel einer therapeutischen Anwendung ist es, mit Hilfe der spezifisch gerichteten Immunoliposomen Wirkstoffe in das Innere der Zielzelle zu transportieren. Die pH-sensitiven Immunoliposomen bestehen hauptsächlich aus einem Grundlipid. Dieses ist fast ausschließlich das zwitterionische Phosphatidylethanolamin (PE). Um im neutralen pH-Bereich eine Bildung von stabilen PE-reichen Liposomen zu fördern, setzte man schwach saure Amphiphile, wie z.B. Fettsäuren [Straubinger et al. (1985)], Acylaminosäuren [Connor et al. (1984)] und andere doppelkettige Lipide [Leventis et al. (1987)] zu, die im Neutralen durch ihre vorhandene Ladung einen Stabilisierungseffekt ausüben können. Bei niedrigeren pH-Bereichen verlieren sie diese Ladung und damit die Fähigkeit der Membranstabilisierung.

Nach erfolgreicher Bindung und Internalisierung der Immunoliposomen durch die Zelle sehen diese sich dem Schicksal des lysosomalen Abbaues konfrontiert. Bei einem erwarteten endozytotischen Aufnahmemechanismus kommt es dabei zu Kontakten im Bereich $4,5 < \text{pH} < 6,5$ [Ohkuma et al. (1978)]. Der Ölsäureanteil liegt dann undissoziiert vor und kann so seine stabilisierende Wirkung auf die Liposomenmembran nicht mehr aufrechterhalten [Connor et al. (1985)]. Nachteilig wirkt sich aber die Tatsache aus, dass diese Liposomen in biologischen Medien unzureichend stabil sind. In Gegenwart von Serum traten bei den ölsäurehaltigen Vesikeln nach 10 Minuten bis zu 80% des Liposomeninhaltes aus [Connor et al. (1986)]. Abhilfe wurde durch den Einsatz anderer Amphiphile erreicht. Mit Cholesterol-Hemisuccinat fand man ein Derivat, welches im physiologischen pH-Bereich von 7,4 negativ und im protonierten Zustand (unter pH 5,5) positiv geladen vorliegt. In dieser Form setzt sich die Lipidmembran aus PE und Cholesterol zusammen und wird instabil [Ellens et al. (1984)]. Die Nachteile der liposomalen Zerstörung im Serum bestehen bei dieser Zusammensetzung nicht und können deshalb für in-vitro-Versuche unter physiologischen Bedingungen genutzt werden. Die pH-sensitiven Immunoliposomen werden nach erfolgter Endozytose infolge des Kontaktes mit den Endosomen instabil. Sie destabilisieren und fusionieren zum Teil mit den endosomalen Membranen. Dabei kommt es zur Freigabe des Inhaltes ins Zytosol [Collins et

al. (1990)]. Die Ursache für den intrazellulären Destabilisierungsprozess der Lipidbilayer pH-sensitiver Immunoliposomen liegt in der Fusion von Liposomen und Endosomen/Lysosomen nach erfolgter Annäherung. Dieser Fusionsvorgang muss näher untersucht werden, wobei unterschiedliche Ergebnisse bei pH-sensitiven und pH-insensitiven Vesikeln zu erwarten sind.

Normale Fusionsassays konnten wegen der intrazellulären Komplexität und deren geringe Empfindlichkeit nicht genutzt werden. Resonanzexperimente auf Fluoreszenzbasis erfüllten diese Forderungen [Keller et al. (1977)]. Das Prinzip beruht auf der Interaktion zweier Fluorophore, wobei das Emissionsmaximum des Donors das Absorptionsmaximum des Akzeptors überlappt. Die Wechselwirkung kommt bei räumlicher Nähe beider Partner zustande. Sie ist abhängig von der Fluoreszenzintensität des Donors, der Breite des Überlappungsbereiches im Spektrum und vor allen Dingen der Entfernung der beiden Partner zueinander [Fung et al. (1978)].

Mit Hilfe der Kenntnis der Zusammensetzung endosomaler und lysosomaler Membranen [(Kobayashi et al. (1998))] wurde es möglich, die intrazellulären Fusionsprozesse in einem in-situ-Modell zu simulieren und quantitativ zu erfassen. Nach Herstellung der endosomalen Vesikel wurden diese mit Hilfe von FRET-Untersuchungen auf mögliche Wechselwirkungen mit sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen untersucht. Da die Fusion immer ein Wechselspiel zweier Partner darstellt, kann die Lokalisierung beider Partnerfluorophore unterschiedlich gestaltet sein. Im „Mixing-Assay“ [Hoekstra (1982)] beinhaltet jede Charge der Fusionspartner jeweils einen Fluoreszenzmarker innerhalb der Bilayer. Während der Messung kommt es bei Wechselwirkungen untereinander zum Quenchen der Fluoreszenz des Donors (NBD-PE) und zum Fluoreszenzanstieg auf der Seite des Akzeptors (Rhodamin-PE). Erklärbar ist dies durch einen Anstieg des Fluoreszenzenergie transfers, da bei Näherung der Liposomenarten zueinander auch die dort befindlichen Marker engeren Kontakt finden. Der gemessene FRET kann dabei durch Aggregations-, Adhäsions- und Fusionsprozesse begründet sein. Eine für diesen speziellen Fall notwendige separate Betrachtung von Fusionsprozessen war durch diesen Assay nicht möglich.

Im „Dilution-Assay“ [Struck et al. (1981), Rosenberg et al. (1983)] sind beide Fluorophore auf einer Population untergebracht, die als „labeled vesicles“ bezeichnet wird. Die zweite Vesikelart ist ungelabelt. Bei Wechselwirkungen untereinander wird die Verdünnung in ungelabelte Vesikel erfasst. Die Ursache dafür liegt in der Verringerung des FRET zwischen Donor und Akzeptor. Begründet wird dies durch Fusionsprozesse zwischen gelabelten und ungelabelten Liposomen, wodurch die räumliche Nähe beider Partner zueinander abnimmt. Auch spätere in-vitro-Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass sich der „Dilution-Assay“ für die genauere Betrachtung der Fusionsprozesse intrazellulär besser auswerten ließ [Kono et al. (1997)]. Diese Versuchsanordnung wurde auf endosomale Vesikel und sterisch stabilisierte pH-sensitive Immunoliposomen übertragen und wird in späteren Abschnitten vorgestellt.

Die Funktionsfähigkeit der pH-abhängigen Instabilität der Liposomen im Zellinneren kann z.B. auch mit Hilfe von speziellen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden. Dazu werden Substanzen verwendet, die Substrate für lysosomale Enzyme darstellen. Mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid wurde ein im Grundzustand nichtfluoreszierendes Substrat der β -D-Glykosidase eingesetzt. Als Liposomeninhalt konnte dieser Stoff nach Bindungs- und Internalisierungsprozessen innerhalb der Zelle als Marker genutzt werden. Nur nach intrazellulärer Lokalisierung innerhalb lysosomaler Kompartimente kommt es zur Abspaltung des Glykosides und zur Entstehung der fluoreszierenden Form des 4-Methylumbelliferyls. Dieser Vorgang konnte durch Fluoreszenzmessungen zeitlich ausgewertet werden. Das unterschiedliche intrazelluläre Schicksal aufgenommener Liposomen konnte so den entsprechenden pH-sensitiven Eigenschaften fluoreszenztechnisch zugeordnet werden. PH-sensitive Immunoliposomen sollten im Vergleich zu pH-insensitiven Vesikeln keine starken Fluoreszenzsignale aufweisen, da ein lysosomaler Abbau nur geringfügig stattfindet.

Für die alleinige Bedeutung der anfänglichen Destabilisierung der pH-sensitiven Liposomenmembran in schwach saurer Umgebung und der sich daran anschließenden Fusion mit der endosomalen Membran sprechen nicht nur die ersten Studien zur pH-Sensitivität [Connor et al. (1985), Straubinger et al. (1985), Connor et al. (1986b)], sondern auch neuere Studien, in denen mit Hilfe schwacher Basen das zelluläre Aziditätsvermögen herabgesetzt wird. So konnte mit Chloroquin und Ammoniumchlorid der pH-Wert der Endosomen und Lysosomen deutlich erhöht werden. Eine erneute Betrachtung pH-sensitiver Liposomen an vorbehandelten Endothelzellen zeigte in dieser Arbeit eine deutlich schwächere pH-abhängige liposomale Freigabe, da so die Fusionsprozesse zwischen Liposomenbilayer und endosomaler/lysosomaler Membran gehemmt werden konnten [Maxfield et al (1982), Collins et al. (1987), Slepushkin et al. (1997)].

Die Anwendung von sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen erscheint lohnenswert, da die Vorteile der Liposomenanreicherung am Wirkort durch den Einsatz monoklonaler Antikörper mit den Vorteilen der gezielten Wirkstofffreigabe im Inneren der Zelle kombiniert werden können. Der Liposomeninhalt unterliegt nicht mehr dem Schicksal der lysosomalen Degradation, was einem Wirkverlust der inkorporierten Arzneistoffe bzw. einem Therapieversagen gleichkommen würde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Targetspezifität durch gekoppelte Antikörper, sterische Stabilisierung der Liposomen durch PEG-Ketten und pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft zwingende Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz von Liposomen als Drug Carrier Systeme darstellen.

2.3.3. Zelluläre Aufnahmemechanismen für Liposomen

Die verschiedenartigen Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Endothelzellen und Liposomen sollen im nächsten Kapitel vorgestellt werden. Dabei wird neben der Vorstellung der relevanten Aufnahmemechanismen durch die Zelle auch der Versuch unternommen, die Möglichkeiten ihrer Identifizierung und Differenzierung zu erläutern. Eine Übersicht zellulärer Transportprozesse gibt Kap. 2.1.1. wieder. An dieser Stelle sollen nur diejenigen Aufnahmemechanismen näher charakterisiert werden, die für ein zukünftiges liposomales Uptake in Frage kommen. Gerade im Hinblick auf eine therapeutische Relevanz der hier bereits vorgestellten sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen scheint es sinnvoll, deren zellulären Aufnahmemechanismus durch Endothelzellen zu kennen. Bei den einzelnen Interaktionsmöglichkeiten wird zwischen der Adsorption von Vesikeln auf der Zelloberfläche, der Fusion von Liposomen mit der Zellmembran sowie der endozytotischen Aufnahme von Vesikeln unterschieden [Forssen et al. (1998)]. Bereits in der Mitte der 70er Jahre wurden erste Aufnahmestudien von Liposomen an Zellen durchgeführt [Poste et al. (1976)]. Die zellulären Aufnahmemechanismen können grundsätzlich in zwei große Bereiche eingeteilt werden. Einerseits kann die Zelle durch passive Prozesse (Fusion) Stoffe von außen aufnehmen, andererseits ist es ihr über energieabhängige aktive Prozesse möglich, Stoffe gezielt in das Zellinnere zu internalisieren. Dazu zählen Prozesse wie Phagozytose, Pinozytose und „coated pit“-Endozytose. Die Aufnahme durch Pinozytose kann vernachlässigt werden, da hierbei nur Stoffe in gelöster Form (keine Vesikelgrößen im Mikro- bzw. Nanometerbereich) durch die Zelle aufgenommen werden. Dabei hängt das Ausmaß der Internalisierung von der Stoffkonzentration im Extrazellulärraum ab. Versuche mit den Farbstoffen Pyranin (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS)) und LY (Lucifer Yellow) bestätigten diese Konzentrationsabhängigkeit. Die Pinozytose zeigt hier sogar den großen Nachteil des relativ schnellen zellulären Effluxes, was die Bedeutung der Flüssig-Phasen-Pinozytose als Internalisierungsmechanismus für Liposomen noch mehr in den Hintergrund geraten lässt.

Das Ausmaß vorangegangener Fusionsprozesse als passiver Prozess spielt in der Aufnahme von Liposomen nur eine untergeordnete Rolle. Fusion kann dennoch durch den Einbau fusogen wirkender Stoffe innerhalb der Lipidbilayer gefördert werden. So steigert die Anwesenheit von Detergenzien die Fusion enorm. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, sich die Eigenschaften viraler Fusionsproteine zu Nutze zu machen (Sendai Virus Partikel) [Citovsky et al.(1985)]. Nachteilig ist allen fusogen wirkenden Stoffen jedoch, dass sie latent toxisch sind. Durch ihren mehr oder weniger festen Einbau kommt es zu unspezifischen Membranstörungen, die der Zelle schaden können. Unabhängig dieser Gefahr stellt die Fusion maximal die Bedeutung der Pinozytose als liposomalen Aufnahmemechanismus dar.

Eine getrennte Erfassung von Aufnahmeprozessen durch Fusion kann relativ einfach durch Ausnutzung der Energieunabhängigkeit erhalten werden. Dazu werden Aufnahmeversuche bei 4°C durchgeführt und mit Ergebnissen bei 37°C verglichen. Fusionsprozesse finden energieunabhängig sowohl bei 4°C als auch bei 37°C statt. Aktive Internalisierungsmechanismen wie unspezifische Phagozytose und rezeptorgesteuerte Endozytose sind eng an den zellulären Energiestatus gebunden und treten bei 4°C nur vereinzelt auf. Eine weitere Möglichkeit Fusionsprozesse von anderen Aufnahme-mechanismen zu differenzieren, liegt in der Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die in hohen Konzentrationen einen Self-Quench-Effekt aufweisen. Typische wässrige Indikatoren solcher Fusionsassay sind Calcein und 6-CF (Carboxyfluorescein) [Weinstein et al. (1980)]. Die Fluoreszenzauslöschung mittels Self-Quenching ist durch die verringerte Quantenausbeute des Anregungslichtes begründet. Oberflächlich adsorbierte bzw. komplett internalisierte Immunoliposomen fluoreszieren daher nicht. Erfolgt jedoch eine Fusion zwischen adsorbierten Vesikeln mit der Zellmembran, wird der eingeschlossene Farbstoff sehr stark im Zytosol verdünnt, so dass der gesamte Zellkörper eine diffuse Fluoreszenz zeigt.

Der zelluläre Hauptaufnahmemechanismus für Liposomen liegt aber im Bereich der aktiven und damit energieabhängigen Prozesse. Dazu zählen Phagozytose und Rezeptorvermittelte Endozytose. Im Rahmen der Phagozytose erfolgt die Aufnahme größerer Partikel. Sie ist Aufgabe spezialisierter, phagozytierender Zellen. Die Hauptfunktion solcher Zellen liegt im Infektionsschutz und in der Beseitigung geschädigter bzw. alter Zellen im Körper. Im Rahmen der Phagozytose kommt es durch den Aufnahmeprozess zur Bildung sog. Phagosomen, die im weiteren Verlauf mit Lysosomen fusionieren können. Dort findet der enzymatische Abbau des aufgenommenen Materials statt. Voraussetzung für eine phagozytotische Aufnahme ist stets die Adsorption der Partikel auf der Zelloberfläche. Durch Phagozytose gelangen relativ unspezifisch Stoffe in das Zellinnere. Dem gegenüber steht der hochspezifisch auf bestimmte Strukturen begrenzte Aufnahmemechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose. Die so internalisierten Partikel liegen in einem Größenbereich unter 150nm. Für diesen Mechanismus existiert auf der Zelloberfläche ein großes Spektrum spezialisierter Rezeptoren. Die entsprechend passende Molekülstruktur (z.B. in Form liposomal gekoppelter Antikörper) dockt an diese Rezeptoren an. Infolge der Bindung kommt es clathrinvermittelt zur Anreicherung der Moleküle in den Clathrin-coated Pits. Der genaue Mechanismus der Selektierung der gebundenen Stoffe und die Funktionsweise der Clathrinhülle als treibende Kraft dieses Vorgangs sind in Kap. 2.1.1. dargestellt. Zusammenfassend kann dieser spezifische Internalisierungsmechanismus durch Begriffe wie Bindung, Selektivierung, Einstülpung, Häutung und intrazelluläre Fusion in Kurzform anschaulich interpretiert werden.

Nach der kurzen Vorstellung der beiden Hauptaufnahmemechanismen sollen nun Methoden zur Differenzierung der Internalisierung speziell für sterisch stabilisierte „E-Selektin“-gerichtete Immunoliposomen vorgestellt werden. Die zelluläre Aufnahme als essentieller Bestandteil eines erfolgreichen liposomalen Drug Targetings muss näher untersucht werden. Mit der Kenntnis des Aufnahmemechanismus kann das liposomale Drug Carrier System weiterentwickelt und in seiner therapeutischen Effizienz gesteigert werden.

Die Phagozytose als unspezifischer Aufnahmemechanismus hängt direkt von der metabolischen Aktivität der Zelle ab. Befindet sich die Zelle im Ruhezustand bzw. in einem Stadium metabolischer Inaktivität, wird die Aufnahme extrazellulärer Stoffe nur vermindert stattfinden. Als metabolische Inhibitoren finden dazu häufig Formaldehyd, Antimycin A und Natriumazid Anwendung [Dijkstra et al. (1984), Blumenthal et al. (1987)]. Dabei wirken sie gleichsam auf alle Internalisierungsprozesse [Lee et al. (1993), Slepishkin et al. (1997), Simoes et al. (1999)] und blockieren demnach rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Prozesse gleichzeitig. Innerhalb dieser Arbeit sollte mit diesen Inhibitoren die Aufnahme der Liposomen durch die Endothelzellen fast vollständig unterdrückt werden können. Eine quantitative Unterscheidung der Internalisierungsmechanismen sollte durch den Einsatz von Cytochalasin als Inhibitor möglich sein. Cytochalasin ist ein Mykotoxin, das Aktinfilamente auflöst. Dabei hemmt es als Inhibitor aktinabhängiger Polymerisationsprozesse spezifisch die Phagozytose [Zelphati et al. (1996), Matsui et al. (1997)]. Cytochalasin wird z.B. auch verwendet, um zelluläre Fortbewegungsvorgänge zu studieren [Takigawa et al. (1987), Finbloom et al. (1987)]. Rezeptorgesteuerte Aufnahmevorgänge werden durch den Einsatz von Cytochalasin nicht beeinflusst [Ishiwata et al. (1998), Simoes et al. (1999)].

Eine differenzierte Betrachtung rezeptorvermittelter Internalisierungsvorgänge erhält man durch intrazellulären Kaliumentzug [Heuser et al. (1989), Colin et al. (2000)]. Dadurch werden Clathrinstruktureinheiten auf der Innenseite der Zellmembran abgelöst. Diese sind jedoch als Grundbaustein für die Bildung der Clathrin-coated Pits essentiell. Es kommt dadurch nicht zur Abschnürung der rezeptorgebundenen Immunliposomen in sog. "Clathrin-coated-pits-vesicles". Der gesamte rezeptorvermittelte Internalisierungsmechanismus ist damit blockiert. Clathrinunabhängige Aufnahmevorgänge werden nicht beeinflusst. Interessant erscheint der Vergleich der Aufnahmemechanismen bei gleichen Liposomenarten mit unterschiedlichem Antikörperstatus (ungekoppelte bzw. mit spezifischen Antikörper gekoppelte Liposomen) zu sein.

Um die internalisierten von den adsorbierten Liposomen zu unterscheiden, kann die Dithionit-Technik angewendet werden. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Natriumdithionit stark fluoreszierendes NBD (7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) zu nichtfluoreszierendem ABD (7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) reduzieren kann [McIntyre et al. (1991)]. Verwendet man Liposomen, die ausschließlich in ihrer äußeren Monolayer Farbstoffmoleküle tragen (Ethanolinjektionsmethode Kap. 3.2.4.2.), so wird die Fluoreszenz oberflächlich gebundener Liposomen nach Dithionitbehandlung gelöscht, wohingegen die Farbstoffmoleküle internalisierter Liposomen aufgrund der Unfähigkeit des geladenen Dithionions zur Permeation durch Membranbilayer einer Reduktion entgehen. Mit dieser Methode lassen sich adsorbierte von aufgenommenen Liposomen quantitativ trennen. Mit einem Vergleich von ungekoppelten Liposomen gegenüber spezifischen Immunliposomen kann die Bedeutung des E-Selektins auf Bindungs- und Internalisierungsvorgänge untersucht werden. Mit diesem Wissen kann das liposomale Carriersystem bestehend aus sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunliposomen in seiner Wirksamkeit zusätzlich gesteigert werden.

Eine „E-Selektin“-vermittelte Bindung und Internalisierung der Immunliposomen durch aktivierte im Entzündungsstadium befindliche Endothelzellen würde einen Einsatz als Drug Delivery System begünstigen. Die Targetspezifität der Vehikel wäre enorm, was Nebenwirkungen in anderen gesunden Gefäßabschnitten deutlich verringern würde. Des Weiteren kann eine erfolgreiche intrazelluläre Freigabe liposomal verkapselter Stoffe durch den Einsatz pH-sensitiver Lipidformulierungen gefördert werden.

2.4. Ziele dieser Arbeit

Selektine stellen aufgrund ihrer initialen und zentralen Rolle in der Adhäsionskaskade der Leukozyten ideale Targetmoleküle für eine gezielte Akkumulation antiinflammatorischer Wirkstoffe dar. Als Zielstruktur scheint E-Selektin besonders geeignet zu sein, da es im Gegensatz zu L-Selektin nicht konstitutiv vorliegt, und im Gegensatz zu P-Selektin eine längere Expressionszeit innerhalb einer Entzündungsreaktion aufweist. Als Wirkstoff-Transport-Systeme haben sich Liposomen bewährt. Mit dem Einsatz von E-Selektin-Antikörpern als spezifische Ligandstruktur auf der Oberfläche der Liposomen können Drug-Carrier-Systeme mit höchster Zielspezifität erhalten werden. Die Immunoliposomen müssen dabei zum Erreichen ihrer Zielobjekte nicht das Gefäßsystem verlassen, so dass das Problem der geringen Extravasation und des sich daraus ergebenden Zutritts der Immunoliposomen an die Liganden der Endothelzellen entfallen würde. Das Gesamtziel dieser Arbeit bestand einerseits in der Erfassung der Liposomen-Zell-Wechselwirkungen (Bindungs- und Internalisierungsprozesse) zwischen sterisch stabilisierten selektingerichteten Immunoliposomen und aktivierten Endothelzellen unter in-vitro-Bedingungen und andererseits der Beweis der intrazellulären Wirkung der darin verkapselten Stoffe nach zellulärer Aufnahme durch die Endothelzellen.

In einem ersten Schritt sollten dafür Immunoliposomen hergestellt werden, die einer späteren Anwendung Rechnung tragend eine sterische Stabilisierung aufweisen. Der Erhalt der Targetspezifität solcher Vehikel trotz Modifikation mit PEG-Ketten stand dabei im Vordergrund. Durch den Einsatz unterschiedlicher Typen von Kopplungsankern konnten Erkenntnisse für spätere in-vivo-Einsätze gewonnen werden. In-vitro-Studien zur quantitativen Ermittlung höchster Bindungsanteile sollten sich anschließen. Dabei wurden sowohl der Antikörperstatus, der Kopplungsanker und die sterische Stabilisierung der Liposomen variiert und deren mögliche Abhängigkeit auf Bindungsereignisse untersucht.

Die alleinige Akkumulation von Immunoliposomen am entzündeten Endothel stellt noch keinen Garant für das Einsetzen eines therapeutischen Effekts des transportierten Wirkstoffes dar. Deshalb musste in einem zweiten Schritt das Internalisierungsverhalten der gebundenen Immunoliposomen untersucht werden. Die Aufklärung des zellulären Aufnahme-mechanismus für selektingerichtete Immunoliposomen wurde als Teilziel formuliert. Während dieser Arbeiten wurden neue Probleme in Form intrazellulärer Abbaumechanismen für internalisierte Liposomen sichtbar. Eine spezielle Lipidzusammensetzung sollte die aufgenommenen Immunoliposomen vor dem Schicksal einer späteren lysosomalen Degradation bewahren. Die Funktions- und Einsatzfähigkeit der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen musste in weiteren Untersuchungen erbracht werden.

Die Anwendbarkeit dieses Carrier-Systems auf aktuelle antiinflammatorische Forschungsansätze zeigte, dass ein Einsatz im Rahmen der Gentherapie nicht ohne weitere Modifizierungen übertragbar ist. Einen Einsatz der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen als System für erfolgreichen Gentransfer an humanen Endothelzellen sollte deshalb als Endziel dieser Arbeit formuliert werden. Für die Umsetzung mussten neue Herstellungstechniken auf bereits gesicherte Ergebnisse der Bindungs- und Internalisierungsstudien der Immunoliposomen übertragen und mit diesen verknüpft werden. Transfektionsversuche sollte abschließend die Wirksamkeit des liposomalen Systems bewiesen können.

3. Materialien und Methoden

3.1. Verwendete Substanzen

3.1.1. Chemikalien und Lipide

Als Ausgangssubstanzen für die Liposomenpräparationen kamen folgende Substanzen zur Anwendung:

SPC	Lucas-Meyer, Hamburg
Lipoid-EPS, Lipoid-SPC,	Lipoid KG, Ludwigshafen
DOPE, DPPC, DMPE, POPC, Alexis Corporation,	Läufelfingen, Schweiz
Chol	Serva, Heidelberg
DOTAP, CHEMS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DPPE-PEG-2000	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren:

HPTS, DiO, NBD-DPPE	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
6-CF	Acros Organics, Geel, Belgium
Calcein	Serva, Heidelberg
Lissamine [®] Rhodamine-B-DPPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

Die Salze für die hergestellten Puffergemische (PBS, TRIS, HEPES, Borat-Puffer, TE-Puffer) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Des Weiteren stammten auch das Aktivierungsreagenz EDC, das unspezifische humane IgG, das Standard-Protein BSA, die DNA aus Fischsperma, das Substrat 4-MU- β -D-Glykosid, die Farbstoffe Hoechst 33258 zur DNA-Quantifizierung und Sulforhodamin B zur Proteinfärbung und die beiden Detergenzien Triton-X-100 und Natriumcholat von Sigma-Aldrich. Der spezifische monoklonale Antikörper Anti-Human-E-Selektin (mAB-BBA 26) wurde von der Firma R&D-Systems (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) bezogen. Die Inhibitoren Formaldehyd, Cytochalasin D, Antimycin A und Natriumazid wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich geliefert.

Ammoniumchlorid als verwendetes Äquilibrierungsreagenz, der Gerbstoff n-Propylgallat zum Schutz der Zellpräparate vor dem Ausbleichen, sowie Sephadex[®] zum Befreien der Liposomen von nicht eingeschlossenen Fluoreszenzmarkern und Sepharose[®] zur Abtrennung der freien ungekoppelten Antikörper stammten auch von Sigma. Das Detergenz OG wurde von Alexis bezogen. Die für die Transfektionsversuche eingesetzte Plasmid-DNA pMCV1.4-EGFP wurde von Mologen (Mologen GmbH, Berlin) geliefert.

Die Pufferlösungen PBS, TRIS, HEPES und Boratpuffer wurden nach Standardprotokollen hergestellt und waren wie alle verwendeten Lösungsmittel von analytischer Reinheit. Mowiol 488 stammte von Kremer-Pigmente (Aichstetten, Deutschland).

3.1.2. Präparative Darstellung der Lipidanker

3.1.2.1. N-Glut-PE (N-Glutaryl-DPPE)

Analog der Arbeit von Weissig [Weissig (1999)] erfolgte die Herstellung des Kopplungsankers N-Glut-PE (N-Glutaryl-DPPE) aus DPPE und Glutarsäureanhydrid. Dazu wurden 250mg DPPE (0,36mmol) in wasserfreiem Chloroform gelöst und in Gegenwart von 60µl trockenem Pyridin mit 410mg Glutarsäureanhydrid (3,6mmol) versetzt. Die Reaktion verlief 2 Tage unter Rühren bei Raumtemperatur. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie wurde das Entstehen des gewünschten Reaktionsproduktes kontrolliert. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak im Volumenverhältnis 65/35/3. Nach kontrollierter Umsetzung erfolgte eine säulenchromatografische (Kieselgel 16, Merck) Abtrennung des N-Glut-PE vom übrigen Reaktionsansatz. Das Elutionsmittel bestand aus dem Gemisch der dünnenschichtchromatografischen Abtrennung. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Danach erfolgte eine Trocknung des Produktes über P₂O₅ im Vakuum. Eine Stammlösung des fertigen Lipidankers in einer Konzentration von 5µmol/ml in Chloroform wurde hergestellt und bei einer Temperatur vom -20°C aufbewahrt.

Die erhaltenen Chromatogramme wurden gemäß nachfolgender Sprühreihenfolge detektiert. Um Substanzen mit lipophilen Gruppen nachzuweisen, wurde zuerst mit Bromthymolblau reagenz besprüht. Ein Trocknungsvorgang folgte. Zum spezifischen Nachweis der Phospholipide, sowie aller Phosphorsäurediester und Phosphorsäuretriestere diente Molybdänspray. Nach diesem Sprühvorgang wurden die Verbindungen als dunkelblaue Flecke sichtbar.

Bromthymolblau-Sprühreagenz:

200mg Bromthymolblau wurde in wenigen ml Ethanol gelöst. Dazu gab man 400mg KOH und löste alles in 1l destilliertem Wasser auf.

Molybdänspray-Sprühreagenz:

Lösung 1: 312g konzentrierte Schwefelsäure wurden mit Wasser auf 250ml verdünnt. Anschließend wurden 10g Molybdäntrioxid (MoO₃) zugegeben und das Gemisch bis zum vollständigen Auflösen der Substanz gekocht.

Lösung 2: 125ml der Lösung 1 wurden mit 450mg Molybdänpulver versetzt und 15 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde vom Bodensatz dekantiert und filtriert.

Je 5ml Lösung 1 und Lösung 2 wurden gemischt und die Mischung mit 10ml destilliertem Wasser verdünnt. Nach dem Abkühlen war dieses Gemisch als fertiges Spray einsetzbar.

3.1.2.2. Cyanur-PEG-PE (Cyanur-PEG-DPPE)

Entsprechend der beschriebenen Herstellungstechnik von Bendas [Bendas et al. (1999)] wurde der Kopplungsanker Cyanur-PEG-PE (Cyanur-PEG-DPPE) über 3 Zwischenschritte synthetisiert. Im ersten Schritt bildete sich Cyanurchlorid-DPPE. Anschließend kam es zur Bindung der Aminogruppe eines heterobifunktionellen PEG über die Cyanurchloridbrücke. Daraus resultierte die Verbindung PEG-Cyanurchlorid-DPPE. Im letzten Schritt wurde terminal der PEG-Spacer mit einem weiteren Cyanurchlorid umgesetzt. Über diesen

Cyanurchloridrest konnten in einer späteren Kopplungsreaktion Proteine durch eine nukleophile Substitutionsreaktion gebunden werden. Die Integrität des Ankers innerhalb der späteren Liposomenbilayer war durch das Vorhandensein des DPPE-Restes gewährleistet.

Zur synthetischen Darstellung dieses endgruppenfunktionalisierten Lipidankers wurden 200mg DPPE (0,29mmol) in trockenem Chloroform gelöst und mit 160mg Cyanurchlorid (0,87mmol) und 37mg N,N-Diisopropylethylamin (0,29mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz blieb für 72h unter Rühren bei Raumtemperatur. Eine Kontrolle der stattgefundenen Umsetzung erfolgte dünnschichtchromatografisch im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser im Volumenverhältnis 65/35/0,5 mit anschließender bekannter Detektion in Form der Sprühreihenfolge von Bromthymolblau und Molybdänspray. Die funktionalisierte Verbindung Cyanurchlorid-DPPE (Rf 0,7) wurde nun mittels präparativer DC (Kieselgel, 2mm Schichtdicke, Merck) isoliert. Die zweite Umsetzungsreaktion bestand in der Anknüpfung der PEG-Kette. Dazu wurde das Cyanurchlorid-DPPE in trockenem Chloroform aufgenommen und mit einer 0,9fachen molaren Menge des heterobifunktionellen α -Amino- ω -Hydroxy-PEG (3000) versetzt. Dies wurde in Anwesenheit eines äquimolaren Gehaltes an N,N-Diisopropylamin unter Rühren für 72h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach Beendigung der Reaktionszeit erfolgte die Überprüfung der Umsetzung mittels Dünnschichtchromatografie. Das erhaltene Zwischenprodukt PEG-Cyanurchlorid-DPPE (Rf 0,65) wurde durch präparative DC abgetrennt.

Die Anknüpfung des terminalen Cyanurchlorids an die funktionalisierte PEG-Kette des Lipidankers stellte den letzten Schritt der Synthese dar. Das entstandene Zwischenprodukt wurde dazu mit der dreifach molaren Menge an Cyanurchlorid und einer äquimolaren Menge an N,N-Diisopropylamin versetzt. Nach weiteren 72h unter Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Überprüfung des Reaktionsumsatzes mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie (Rf 0,6). Die abschließende Isolierung des Cyanur-PEG-DPPE aus dem Reaktionsansatz erfolgte mit Hilfe der Säulenchromatografie (Kieselgel 60, Merck). Als Elutionsmittel kam das Gemisch Chloroform/Methanol im Volumenverhältnis 90/10 bzw. später 70/30 zum Einsatz. Das fertige Cyanur-PEG-DPPE wurde in einer Stammlösung der Konzentration von 1 μ mol/ml in Chloroform aufgenommen und bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

3.1.3. Präparative Isolierung bakterieller Plasmid-DNA

Das verwendete bakterielle Plasmid stammt aus transfizierten *Escherichia coli* und codiert eine Antibiotikaresistenz. Die Trägerorganismen weisen beim Vorhandensein eine Resistenz gegenüber dem β -Lactamantibiotikums Ampicillin auf. Die Isolierung erfolgte am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg. Die Kultivierung und Transformation kompetenter *Escherichia coli* wurde freundlicherweise von Dr. D. Glanz vom gleichen Institut durchgeführt, dem an dieser Stelle nochmals mein persönlicher Dank gilt.

Die Plasmidisolierung aus *Escherichia coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse [Birnboim et al. (1979)] in leicht modifizierter Form. Die plasmidhaltigen Zellen (100 ml) wurden dafür durch Zentrifugation (6000 RPM, 15 min, 20°C) vom Medium abgetrennt. Das resultierende Zellpellet wurde vorsichtig mit 10ml der Lösung 1 in 50ml Röhrchen aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 50 μ l Lysozym (10mg/ml). Eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis schloss sich an. Durch Zugabe von 20ml der Lösung 2 und vorsichtigen, langsamen Mischvorgängen kam es zur vollständigen Zerstörung der Zellen, woran sich eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis anschloss. Nun wurden 15ml der Lösung 3 hinzupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten

auf Eis. Dadurch kam es zur Denaturierung aller Eiweißbestandteile. Eine Zentrifugation (5000 RPM, 15 min, 4°C) mit anschließender Filtration in ein neues Röhrchen brachte die entsprechende Abtrennung. Im Überstand befand sich das Gemisch aus DNA und RNA. In diese Lösung gab man 20ml Isopropanol und ließ dieses Gemisch für 15 Minuten bei 20°C inkubieren. Durch diesen Vorgang kam es zur Fällung der DNA und RNA. Bei einer erneuten Zentrifugation (5000 RPM, 10 min, 4°C) erhielt man ein Pellet bestehend aus beiden Nukleinsäuren. Nach Resuspendierung mit 4ml Wasser, Zugabe von 4ml 5M Lithiumchlorid und einem Mischvorgang schloss sich eine Inkubation von 20 Minuten auf Eis an. Hierbei konnte die Ausfällung restlicher Eiweißspuren beobachtet werden. Durch Zentrifugation (4000 RPM, 5 min, 4°C) trennte man diese Reste ab. Der Überstand wurde mit 18ml reinem Ethanol in ein neues Röhrchen gegeben. Nach Mischen dieses Inhaltes folgte eine Inkubation bei -20°C für 1h. Dabei fiel das reine Gemisch aus DNA und RNA aus. Eine Zentrifugation (9000 RPM, 10 min, 4°C) schloss sich an, wobei das Pellet mit 0,5ml TE-Puffer in ein Eppendorfgefäß aufgenommen wurde. Durch Zugabe von 10µl RNA-ase (10mg/ml) und einer anschließenden Inkubation von 1h bei 60°C kam es zur Zerstörung der vorhandenen RNA-Anteile. Eine nun zugegebene Menge von 10µl Proteinase K (10mg/ml) baute die RNA-ase ab. Die Inkubation hierfür betrug 1h bei 37°C. Nun gab man 0,5ml Roti[®]-Phenol/Chloroform (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol) hinzu. Nach Schütteln und Zentrifugieren (14000 RPM, 1 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und 0,5ml eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Wieder folgte eine Zentrifugation (14000 RPM, 1 min, 4°C) und ein Entfernen des Überstandes. Daran schloss sich ein Resuspendieren mit 50µl 3M Natriumacetat und 1ml reinem Ethanol zum Fällen der reinen, sauberen DNA an. Die weitere Inkubation für 1h bei -20°C war aus quantitativer Sicht von Bedeutung. Ein Letztes Abzentrifugieren mit 14000 RPM bei 4°C für 10 Minuten folgte. Das Waschen der Pellets mit 70% Ethanol und das Aufnehmen in einem definierten Volumen TE-Puffer beendete die Prozedur.

Eine Quantifizierung folgte im Anschluss. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde spektralphotometrisch (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) durch Messung der Absorption bei 260nm durch eine Quarzküvette bestimmt. Die Reinheit der DNA-Proben wurde über den Quotienten E_{260} / E_{280} bestimmt.

Die DNA wird als rein bezeichnet, wenn der Wert zwischen 1,8 und 2,0 lag. Niedrige Werte zeigen Verunreinigungen durch Proteine (Absorptionsmaximum bei 280nm) an. Die Quotienten der isolierten Plasmide lagen bei 1,9.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

- Lösung 1: 50mM Glucose
10mM EDTA
25mM TRIS eingestellt auf pH 8 und bei 4°C aufbewahrt
- Lösung 2: 0,2M Natriumhydroxid
1% SDS jeweils frisch herstellen
- Lösung 3: 60ml 5M Kaliumacetat
11,2ml Eisessig
28,5ml Wasser bei 4°C aufbewahrt
- TE-Puffer: 10mM TRIS pH 7,4
1mM EDTA pH 8,0
Ein Gemisch beider Lösungen (je 10ml) auf pH 7,5 einstellen.

3.2. Liposomen

3.2.1. Liposomenpräparationen

Im Rahmen dieser Arbeit kam es zur Anwendung verschiedener Herstellungsmethoden für Liposomen. Der jeweilige Gesamtlipidgehalt, die Lipidzusammensetzung, inklusive Kopplungsanker und PEG-Anteil für die Herstellung von Stealth[®]-Liposomen, sowie die eingeschlossenen Stoffe und Fluoreszenzlabel variierten je nach Versuchsanordnung und sind deshalb unter der jeweiligen Methode näher erläutert.

3.2.1.1. Hydratationsmethode

Für die Herstellung der notwendigen Liposomen im Rahmen der Bindungs- und Internalisierungsstudien wurde die Hydratationsmethode angewendet, wobei diese auch als Dispersions- bzw. Filmmethode bezeichnet werden kann. Diese Form der Liposomenherstellung beschrieb erstmals Bangham [Bangham et al. (1965)].

Hierzu wurden die entsprechenden Mengen der in Chloroform gelösten Lipide in einem 10ml Rundkolben vereinigt. Jetzt folgte bei 35°C das Entfernen des Lösungsmittels am Vakuumrotationsverdampfer. Der Lipidfilm wurde für eine Stunde im Exsikkator über P₂O₅ getrocknet. Durch Zugabe der verschiedenen wässrigen Dispersionsflüssigkeiten wurde der Film hydratisiert, wobei die Dispergierung mit Hilfe von Glasperlen gefördert wurde. Die Liposomenbildung wurde durch manuelles Schütteln für 10 Minuten bei 60°C weiterhin unterstützt. Anschließend wurden die Dispersionen für 16h einer maschinellen Schüttelprozedur (100 Bewegungen pro min) bei Raumtemperatur unterworfen. Die daraus resultierenden großen multilamellaren Vesikel wurden sechsmal durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopore[®], Costar, Bodenheim, Deutschland) mit einem Porendurchmesser von 200nm extrudiert (Extruder, Lipex Biomembrane, Vancouver, Kanada). Die gleiche Prozedur folgte mit Membranen der Porengröße 100nm und 50nm. Eine Extrusionsfolge nach absteigender Porengröße garantiert sehr kleine Liposomen, die für in-vitro-Versuche besonders wichtig sind.

3.2.1.2. Phasenumkehrmethode

Bei dieser Herstellungsart kam es zwischen chloroformhaltiger Lipidphase und wässrigem Dispersionsmedium (Puffer) zur anfänglichen Phasenseparation. Durch Ultraschallung bildete sich eine Pseudoemulsion. Ein langsames quantitatives Entfernen des Lösungsmittels führte zur Phasenumkehr der W/O- zur O/W-Pseudoemulsion. Liposomen hoher Einschlusseffizienz resultieren aus dieser Technik, die erstmals 1978 detailliert erwähnt wurde [Szoka et al. (1978)].

Hierzu wurden die chloroformhaltigen Lipide im entsprechenden Verhältnis mit der adäquaten Menge Puffer in einem 10ml Rundkolben vereinigt und auf dem Vortexer (Reax 2000, Heidolph, Schwalbach, Deutschland) kurz intensiv vermischt. Diese Mischung wurde einer Behandlung am Ultraschallstab (Bandelin elektronik, Berlin) unterzogen. Ein unerwünschtes Erwärmen während der zwei Minuten wurde durch Eiskühlung verhindert. Danach war die Einphasendispersion milchig homogen und wies eine ausreichende Stabilität vor

erneuter Separation auf. Der Rundkolben mit der Mischung wurde am Vakuumrotationsverdampfer befestigt und unter milden Bedingungen (200mbar, 20°C, 60 RPM) weiterbehandelt. Nachdem ein Großteil des Lösungsmittels entfernt wurde, kam es durch die restlichen Lipide zur Ausbildung eines viskosen klaren Gels und in weiteren 15 Minuten zur Entstehung einer wässrigen Suspension (Phasenumkehr). Während der gesamten Zeit kam es zur regelmäßigen intensiven, mechanischen Beanspruchung der Lipide am Vortexer. Abschließend wurden Reste von Chloroform durch Erhöhung des Vakuums aus der Liposomensuspension entfernt. Ein reduziertes Endvolumen wurde durch Pufferzugabe auf das Anfangsvolumen ausgeglichen.

3.2.1.3. Detergenzmethode

Diese Methode eignete sich gut für den Einschluss temperaturempfindlicher Stoffe (Proteine, DNA etc.) in Liposomen. Die Lipide lagen hierbei in mizellarer Lösung vor. Als Detergenz kam im Rahmen dieser Arbeit Oktylglykosid in einer Konzentration von 0,2M zum Einsatz. Durch langsamen Detergenzentzug kam es zur Liposomenbildung. Das zugesetzte Detergenz konnte durch verschiedene Mechanismen entfernt werden. Zu diesem Zweck kam sowohl die Dialyseapparatur [Helenius et al. (1977)] als auch die Gelfiltration [Brunner et al. (1976)] zum Einsatz. Bei der Vesikelbildung durch Dialysieren kam die Dialysemembran Servapor[®] (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) zur Anwendung. Ein vorhandener Porendurchmesser innerhalb der Membran von 25Å ließ nur einen Durchtritt von Stoffen zu, die ein maximales Molekulargewicht von 14000g/mol nicht überschritten. Eingespannt in eine Dialyseapparatur kam es nun zum Auswaschen der Detergenzlösung. Dafür wurde die Dialysekammer mit der in ihr befindlichen mizellaren Lösung der Lipide rundum mit Pufferlösung umspült. Es kam zu einem kontinuierlichen Austausch an Oktylglykosid. Nach 12 Stunden wurde der Puffer (154mM Natriumchlorid, 5mM HEPES, pH 7,4) durch frische Dialysierlösung ersetzt. Für die Einschlussmenge und die Partikelgröße der Liposomen waren die Dialysierzeit (insgesamt 36 Stunden) und die Geschwindigkeit des umströmenden Puffers (250ml/h) von großer Bedeutung. Für die Abtrennung des Oktylglykosids durch Gelfiltration kam eine mit Sephadex[®] G 50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) gefüllte Säule (Länge 12cm, Durchmesser 1cm) zum Einsatz. Die gebildeten Liposomen wurden in Eppendorfgefäßen aufgefangen.

3.2.2. Kopplung von Antikörpern an Liposomen

Zur Funktionalisierung der Liposomen sollten entsprechende Antikörper an die Oberfläche der Liposomen gekoppelt werden. Für diesen Zweck wurden zwei verschiedene Antikörperkopplungsmethoden ausgewählt. Beide Techniken bewirken durch Ausbildung einer kovalenten Bindung die Anbindung der Antikörper an die Liposomen. Unterschieden wurde hierbei die Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung mit Carbodiimidaktivierung bei neutralem pH-Wert mit dem Kopplungsanker N-Glut-PE (Typ 1) gegenüber der Kopplung mit Cyanur-PEG-PE ohne Aktivierung im basischen pH-Bereich (Typ 2). Bei beiden Kopplungsmethoden wurde ein eingesetztes molares Verhältnis zwischen Lipid und Protein von 1000:1 beibehalten [Hansen et al. (1995)].

3.2.2.1. N-Glut-PE als Lipidanker

Trotz variabler Lipidzusammensetzungen blieb der Anteil des Lipidankers bei konstanten 5mol% des Gesamtlipidgehaltes. Zur Herstellung der Liposomen wurde PBS mit pH 7,4 eingesetzt. So wurde die Voraussetzung, unter neutralen Bedingungen zu koppeln, erfüllt. Für die Aktivierung des Ankerlipids wurden 1,2mg (0,8 μ mol) EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid pro 0,1 μ mol N-Glut-PE benötigt. Es folgte eine Inkubation für 6h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurde das überschüssige EDC durch Gelchromatografie auf einer Sephadex[®] G-50-Säule (Länge 12cm, Durchmesser 1cm) abgetrennt. Danach wurde der entsprechende Anteil Antikörper in Form einer konzentrierten Lösung in PBS dazugegeben. Erneut wurde bei Raumtemperatur für 12h auf dem Schüttler inkubiert [Ezpeleta et al (1996)]. Als Letztes schloss sich eine gelchromatografische Abtrennung der ungebundenen Antikörper über eine Sepharose[®] CL-4B-Säule (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Länge 12cm, Durchmesser 1cm) mit PBS als Elutionsmittel an. Die mit dieser Methode gekoppelten Immunliposomen werden innerhalb der Arbeit als Typ 1 bezeichnet.

3.2.2.2. Cyanur-PEG-PE als Lipidanker

Auch hier betrug der Einsatz des Kopplungsankers konstant 5mol% des Gesamtlipidgehalts der Liposomen. Für diese Kopplungsvariante wurden die Liposomen in 0,15M Natriumchlorid hergestellt. Der zuzusetzende Antikörper wurde zuvor in einem Boratpuffer (Na₂B₄O₇, Reachim, Münsbach, Luxemburg) mit pH 8,8 aufgelöst. Die konzentrierte Proteinlösung wurde zur Liposomensuspension hinzugegeben. Eine Inkubation über 16h bei Raumtemperatur unter Schütteln schloss sich an [Bendas et al. (1999)]. Die Aufreinigung von nicht gebundenen Antikörpermolekülen erfolgte auch hier in Form einer Gelchromatografie über eine Sepharose[®] CL-4B-Säule mit PBS.

3.2.3. Charakterisierung

3.2.3.1. Partikelgrößenbestimmung

Zur Messung der mittleren Liposomengröße wurde das Verfahren der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) angewendet. Diese Methode ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen [Uzgiris (1981)]. Dafür wurden jeweils 2ml des entsprechenden Puffers steril filtriert (Sterilfilter Satorius, 0,22 μ m) und in Küvetten gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 μ l bis 50 μ l der Liposomendispersion. Danach wurde die dynamische Lichtstreuung durch Erfassen der Intensitätsverteilung in zwei Zyklen am Malvern Autosizer 2c (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien) gemessen. Der gemessene Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung lag dabei unter 0,2 und konnte somit als Zeichen der Monodispersität der Liposomen gewertet werden.

3.2.3.2. Proteinquantifizierung

Zur Bestimmung der gekoppelten Antikörpermenge an die Oberfläche der funktionalisierten Liposomen kam der Peterson-Lowry-Assay [Peterson (1977)] zum Einsatz. Hier bestand der Vorteil darin, dass mitanwesende Phospholipide innerhalb der Probe keinen störenden Einfluss auf die Proteinquantifizierung hatten. Es konnte direkt der Proteinanteil bestimmt werden. Das Prinzip des Peterson-Lowry-Assays beruht auf der Kombination der Biuretreaktion mit der Folin-Reaktion. Diese Verknüpfung stellt eine Erhöhung der Empfindlichkeit dar, da die unspezifische Biuretreaktion (rot-blau gefärbter Komplex der alkalischen Eiweißlösung mit Kupfer) mit einer Indikatorreaktion gekoppelt wird. Hierbei kommt es durch das im Protein enthaltene Tyrosin zur Reduktion der zugesetzten Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure.

Für die spätere Erstellung der Kalibrierkurve wurde zu Beginn eine Verdünnungsreihe vorbereitet. Eine BSA-Standard-Lösung diente als Ausgangssubstanz und wurde auf den Bereich von 1 bis 12µg Protein verdünnt. Die Einzelproben wurden ebenso wie die zu prüfenden Liposomenpopulationen in Eppendorf-Gefäße gegeben. Mit destilliertem Wasser wurde auf 1000µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 50µl 0,3% Natriumdeoxycholat-Lösung kam es zur Lyse der Liposomen. Es wurde sorgfältig gemischt (vorgetext) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 100µl 70% Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben. Nach dem vorsichtigen Mischen wurden die Proben zentrifugiert (11000RPM, 4°C, 20 min) und dekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 1ml der Lösung 4 aufgenommen. Einer nun folgenden Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur schloss sich die Zugabe von 50µl der Lösung 3 an. Danach wurde die Lösung gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss im Dunkeln zur Farbentwicklung gelagert. Abschließend erfolgte eine Absorptionsmessung am Spektrophotometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 750nm. Die Quantifizierung wurde anhand einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

Lösung 1: 4,0g Natriumhydroxid
20,0g Natriumcarbonat
0,2g Natriumtartrat
10,0g Natriumdodecylsulfat ad 1000ml dest. Wasser

Lösung 2: 0,5g Kupfersulfat-5-Hydrat ad 100ml dest. Wasser

Lösung 3 : Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagens (Sigma)

Lösung 4: Mischung aus 49 Anteilen Lösung 1 und 1 Anteil Lösung 2

BSA-Standard-Lösung: 400µg Protein/ml Lösung (Sigma)

0,3% Natriumdeoxycholat-Lösung

70% Trichloressigsäure

Alle Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

3.2.3.3. Phosphatquantifizierung

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der Liposomenpräparationen wurde anhand des Bartlett-Assays durchgeführt [Bartlett (1959)]. Prinzipiell muss dafür die Phosphorsäure-esterbindung vor der Messung gespalten werden. Dazu war es nötig, das entsprechende Kohlenstoffgrundgerüst zu zerstören. Dieser Oxidationsvorgang geschah durch Zugabe von Perchlorsäure, wobei das vorliegende Phosphat der Phospholipide zu Phosphorsäure oxidiert wurde. Phosphat bildete in stark saurer Lösung in Gegenwart von Ammoniumionen mit Molybdänsäure einen bei niedrigen Phosphatkonzentrationen löslichen Komplex. Durch Zugabe eines Reduktionsmittels kam es zur Bildung des Molybdänblaus. Als Reduktionsmittel diente Ascorbinsäure. Eine Kalibrierkurve wurde aus der Verdünnungsreihe einer Phosphat-Standard-Lösung erstellt. Der Bereich des Phosphatgehaltes lag dabei zwischen 2 und 65nmol Phosphat. Sowohl diese Proben als auch die Proben der zu untersuchenden Liposomenchargen wurden in verschließbare Mikroreagenzgläser gebracht. Jede Probe wurde nun mit 200µl 70% Perchlorsäure versetzt. Die Röhrchen wurden vorsichtig mit Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurden sie für 30 Minuten in einem Heizblock auf 180 bis 190°C erhitzt. Es schloss sich eine Abkühlphase auf Raumtemperatur an. 2ml des Molybdat-Reagenzes wurden danach hinzugegeben. Nach dem Versetzen mit 250µl 10% Ascorbinsäurelösung und sorgfältigem Vortexen der Mischung wurden die Proben für 10 Minuten in siedendes Wasser gestellt. Nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser konnte die Absorption bei 812nm gemessen werden. Jede Probe wurde dreifach hergestellt und vermessen.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

Molybdat-Reagenz: 2,2g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$
 14,3ml konz. Schwefelsäure ad 1000ml dest. Wasser

10% Ascorbinsäure-Lösung (frisch herstellen)

70% Perchlorsäure (Sigma)

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

Alle Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

3.2.3.4. Bestimmung der Einschlussrate

Für die Berechnung der Einschlussraten wurden die Liposomen entsprechend Kapitel 3.2.1. nach den verschiedenen Methoden hergestellt. Dabei kam als wässrige Phase eine 0,1M 6-CF-Lösung zum Einsatz (pH 7,4). Nach der Herstellung wurden die Liposomen durch säulenchromatografische Trennung an einer Sephadex[®] G 50 Säule mit PBS vom nicht eingeschlossenen Anteil befreit. Zur Bestimmung der Einschlussrate wurden 10µl dieser Vesikel mit 10ml PBS verdünnt. Die Fluoreszenz wurde am Fluostar (Ex. 487nm/Em. 520nm) bestimmt. Es erfolgte eine quantitative Auswertung über eine Bezugsgerade zwischen 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-9} mol/l 6-CF in PBS (pH 7,4). Es fluoresziert lediglich der nicht eingeschlossene und nicht durch Gelchromatografie trennbare Farbstoff. Dieser Wert war äußerst gering und wurde nach Konzentrationsbestimmung als c_{Start} bezeichnet. Anschließend wurden 10µl Liposomen in 10ml 1% Triton-X-100-Lösung aufgenommen. Dabei kam es zur voll-

ständigen Zerstörung der Vesikel und zur kompletten Freigabe des verkapselten Farbstoffs. Die nun gemessene deutlich höhere Fluoreszenz wurde über die Kalibrierkurve in Konzentration umgerechnet und als c_{Lyse} bezeichnet. Aus der Differenz der beiden 6-CF-Konzentrationen errechnete sich der liposomal eingeschlossene Markeranteil nach folgender Formel:

$$\% \text{Einschluss} = (c_{Lyse} - c_{Start} / f \times c_{6-CF}) \times 100\%$$

f = Verdünnungsfaktor der Liposomen (10µl auf 10ml)

3.2.4. Fluoreszenzmarkierung

Die Liposomen können sowohl mit hydrophilen als auch mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Im ersten Fall nimmt man den ausgewählten Marker (100mM 6-CF, 100mM Calcein, 10mM 4-MU-β-D-Glykosid) in wässrigem Puffermedium auf und folgt den erwähnten Herstellungsvorschriften. Zum Ende schließt sich eine säulenchromatografische Reinigung vom nicht eingeschlossenen Fluoreszenzmarker über eine Sephadex[®] G-50-Säule (Länge 12cm, Durchmesser 1cm) an. Zur Markierung der Liposomenmembran als lipophile Komponente kann zwischen einer symmetrischen und einer asymmetrischen lipophilen Verteilung des Fluoreszenzmarkers (2mol% NBD-PE, 2mol% Rhod-PE, 0,5mol% DiO) unterschieden werden.

3.2.4.1. Symmetrische Verteilung

Die Markierung der Liposomen mit lipophilen Fluoreszenzmarkern innerhalb der Liposomenmembran vollzieht sich gewöhnlich in symmetrischer Verteilung zwischen Außen- und Innenlipidschicht. Dazu wurden die verwendeten Marker (NBD-PE, DiO, Lissamine[®] Rhodamine-PE) in chloroformhaltiger Stammlösung aufbewahrt und bei der Herstellung direkt zu der Mischung der einzelnen Lipidkomponenten gegeben. Der Marker verteilte sich dabei gleichmäßig in der inneren und in der äußeren Monoschicht der Bilayer.

3.2.4.2. Asymmetrische Verteilung

Für die spezifische Anreicherung der lipophilen Fluoreszenzmoleküle in der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht der Liposomen bedurfte es einer neuen Herstellungstechnik. Eine anwendbare Methode beschrieben erstmals McIntyre und Sleight [McIntyre et al. (1991)], wobei für die Art der Zugabe des Fluoreszenzmarkers die Technik der Ethanolinjektion [Kremer et al. (1977)] gewählt wurde. Es entstanden so genannte „outside only“ labeled Liposomen, d.h. der Fluoreszenzfarbstoff war ausschließlich in der äußeren Monolayer lokalisiert. Hierfür wurde die benötigte Menge chloroformhaltiger NBD-PE-Stammlösung in einen 10ml Glaskolben gebracht und am Rotationsverdampfer vollständig vom Lösungsmittel befreit. Der dünne Film wurde mit Ethanol aufgenommen. Das Volumen der zugesetzten Menge an Ethanol durfte maximal 1% des späteren Gesamtvolumens der Liposomenpräparation betragen. Höhere Ethanolanteile wirkten sich störend auf die Stabilität der Liposomen aus. Die hochkonzentrierte Ethanolösung wurde nun mit Hilfe einer Mikro-

literspritze aufgezogen und in die schon fertige unmarkierte Liposomensuspension gebracht. Um einen transmembranären Austausch zu minimieren, wurde das Zuspritzen erst kurz vor Versuchsbeginn durchgeführt und die Liposomen im Anschluss kühl gelagert.

3.3. Zellkultivierung

3.3.1. Gewinnung humaner Nabelschnurendothelzellen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der humanen Endothelzellen dienen Nabelschnüre. Der Bezug lief freundlicherweise über das Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle / Wittenberg. Die Isolierung erfolgte spätestens 24h postnatal. Für die Aufbewahrung der Nabelschnüre und den anschließenden Transport in das Zelllabor wurde ein Transportpuffer eingesetzt. Dieser Puffer (250ml) setzte sich aus 12,5ml Transportpufferkonzentrat, 2,5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1% (c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland) und 235ml autoklaviertem Wasser (Milli-Q) zusammen. Das Pufferkonzentrat bestand aus 82g Natriumchlorid, 3g Kaliumchlorid, 19,8g D-Glucose und 2,38g HEPES gelöst in 500ml Milli-Q. Kultiviert wurden die isolierten Zellen in einem Medium folgender Zusammensetzung: 500ml Medium M199 mit Earlés Salzen (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Kat-No. 31150022), welchem 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1% (c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 5ml essentielle Aminosäuren-Mischung 1% (c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 5ml 1% Pyruvatlösung, 5ml HEPES (10mM pH 7,2), 2,5ml Schutzfaktor (Biotect Protection Medium, Biochrom KG, Berlin, Deutschland, Kat-No. L3010) und 100ml FKS (fötales Kälberserum, c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland) zugesetzt wurden.

Die Präparation der Nabelschnüre erfolgte nach folgendem Protokoll: Alle Präparationsschritte wurden unter einer Laminar-Air-Flow-Box (Uni-Flow UV 1200) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden vor Beginn im Brutschrank auf 37°C erwärmt und entsprachen den sterilen Anforderungen. Zu Beginn wurde die Nabelschnur mit 70% Ethanol von außen gereinigt. Dann erfolgte eine gründliche Untersuchung auf Verletzungen und Punktionseinstiche. Beim Auftreten solcher Beschädigungen wurde der entsprechende Teil der Nabelschnur entfernt. Jetzt wurde jeweils am Ende 1cm abgeschnitten und verworfen. Anschließend musste die Vene identifiziert werden. Darin erfolgte mit Hilfe einer Knopfkanüle die spätere Katheterisierung, wobei die Kanüle durch Nahtmaterial sehr fest fixiert werden musste. Die präparierte Schnur wurde nun dreimal mit 50ml isotonischer Kochsalzlösung durchgespült. Festsitzende Thromben wurden durch leichtes Massieren gelöst und herausgespült. Danach erfolgte ein zweiter Spülvorgang mit 50ml PBS-Puffer, der jedoch zusätzlich 100mg/L Calcium- und Magnesiumchlorid enthielt. Währenddessen wurden 10ml einer 0,1% Chymotrypsinlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in PBS incl. Ca^{2+} und Mg^{2+} hergestellt. Nach weiterem Spülen mit Luft wurde die Schnur auf einer Seite mit einem Kombi Stopper verschlossen (Heiland, Hamburg, Deutschland). Die Chymotrypsinlösung wurde durch einen Sterilfilter (Satorius, 0,22 μm) hindurch in die Nabelschnur gefüllt. Das Einfüllen erfolgte bis zur prallen Füllung der Vene, was sich in einem „Gerade-Werden“ der Schnur äußerte. Nun musste die andere Seite der Nabelschnur mit einem Kombi Stopper verschlossen werden. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 an. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Schnur vorsichtig geschwenkt und massiert. Dabei sollte der Inhalt von der einen zur anderen Seite laufen. Dadurch kam es zusätzlich zur Trypsineinwirkung noch zu verstärkten Ablöse-

prozessen der Endothelschicht innerhalb der Nabelschnur. Der Inhalt wurde nun in ein steriles 50ml Falconröhrchen abgelassen. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde die Schnur zweimal mit FKS-haltigem Medium gespült. Die vereinigten Lösungen wurden bei 1400 RPM, 7 Minuten und 20°C zentrifugiert (Hettich Universal 30 F, Tuttlingen, Deutschland). Das entstandene Zellpellet wurde nun mit frischem Medium aufgenommen und in eine 5ml Kulturflasche (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Nach 3 Stunden wurde das Anhaften der Zellen am Boden beobachtet. Deshalb konnten sich Spülvorgänge anschließen. Dabei wurden die Endothelzellen von vorhandenen Erythrozyten, die nicht adhären waren und während der Präparation mit in die Trypsinlösung gelangten, befreit. Anschließend folgte ein erster Mediumwechsel. 3 bis 5 Tage später konnte ein konfluentes Wachstum festgestellt werden. Für spätere Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passage 2 und 3 verwendet.

Eine 20-fach vergrößerte (Axiovert 100 TV, Zeiss, Deutschland) Aufnahme zeigt das untere Bild, wobei die typischen Formen der Endothelzellen gut erkennbar sind:

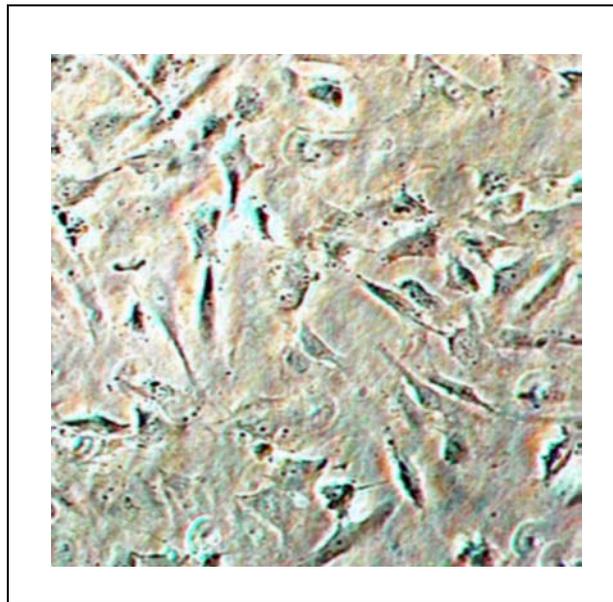


Abb. 2: HUVEC, 3 Tage nach Präparation

3.3.2. SRB-Assay zur Bestimmung der Wachstumsraten

Für die durchzuführenden Transfektionsexperimente war es von großer Bedeutung zu wissen, in welcher Plattendichte (Zellanzahl je well) die humanen Nabelschnurendothelzellen ihr größtmöglichstes Wachstum aufweisen würden (Kapitel 3.7.5.). Dafür wurde ein modifizierter SRB-Assay [Papazisis et al. (1997)] verwendet. Der SRB-Assay stellt eine sehr empfindliche und einfach durchzuführende kolorimetrische Methode dar, um den Gesamtproteingehalt einer Zelle ermitteln zu können. Bei der Absorptionmessung der Konzentration des an den Zellproteinen anhaftenden Sulforhodamins wird indirekt die Zellanzahl/well ermittelt. Zwischen der Absorption bei 500nm und der Zellanzahl besteht über einen großen Bereich eine lineare Beziehung [Skehan et al. (1990)]. Die Wachstumsraten sollten über einen Zeitraum von 6 Tagen bestimmt werden. Deshalb wurden die Zellen in 6 transparente 96-well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesetzt. Die Belegung der Platten war gleich. Die Belegung mit Zellen pro well betrug 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 und 50000. Alle wells wurden mit 200µl Medium versetzt und im Brutschrank bei

37°C kultiviert. Während dieser Zeit fand der Mediumwechsel jeden Tag statt. Die erste Platte wurde noch am selben Tag weiterbehandelt. Eine Wartezeit von 3h musste jedoch eingehalten werden, um eine feste Adhäsion der zuvor abtrypsinisierten Zellen gewährleisten zu können. Es folgten ein Spülvorgang mit PBS und die Zellfixierung mit TCA. Dazu wurden vorsichtig in jedes well 50µl 10% TCA hinzugegeben. Eine Inkubation von 1h bei 4°C schloss sich an. Danach wurde fünfmal mit destilliertem Wasser gespült und die Platte über Nacht an der Luft getrocknet. Dieser Vorgang wiederholte sich nun jeden weiteren Tag für die entsprechende Platte. Die fertigen Platten wurden in der Zwischenzeit im Kühlschrank zwischengelagert. Die Färbung folgte nach Fixierung aller Platten. Dafür wurden in jedes well der 6 Platten 100µl 0,4% SRB-Lösung (in 1% Essigsäure) gegeben und eine Inkubation von 20 Minuten bei 20°C abgewartet. Um freies SRB herauszuwaschen, wurde fünfmal mit 1% Essigsäure gespült. Anschließend konnte mit 200µl 10mM TRIS der am Boden anhaftende Farbstoff gelöst werden. Nach 30 Minuten auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 490nm am Fluostar (Fluostar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) gemessen.

Verwendete Lösungen:

10% Trichloressigsäure (TCA)

0,4% Sulforhodamin B-Lösung in 1% Essigsäure

1% Essigsäure

3.4. Bindungsuntersuchungen

Für die Bindungsstudien sind verschiedene Liposomenpräparationen zum Einsatz gekommen. Innerhalb dieser Teilarbeit wurden die Liposomen durch die Hydrationsmethode dargestellt. Die Lipidzusammensetzung blieb durchweg konstant und bestand aus SPC/Chol im Verhältnis 7:3. Der Gesamtlipidgehalt lag bei 10µmol/ml. Der lipophile Fluoreszenzmarker DiO wurde mit 0,5mol% eingesetzt. Weitere Anteile an Kopplungsankern, Fluoreszenzlabel und PEG-Ketten zur Untersuchung des Stealth®-Effektes gingen auf Kosten des SPC-Anteiles. Die Versuche wurden an HUVEC der 2. und 3. Passage durchgeführt. Für die Bindungsuntersuchungen wurden die Nabelschnurendothelzellen bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Es folgte eine Trypsinisierung der Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) aus den entsprechenden Kulturschalen. Pro Kulturflasche konnten so bis zu 1×10^6 HUVEC geerntet werden. Diese Zellen wurden in schwarze 96-well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesetzt und über Nacht weiter im Brutschrank kultiviert. Pro well wurden ca. 20000 HUVEC ausplattiert. Aufgrund der Tatsache, dass es bei den HUVEC nicht zu einer konstitutiven sondern nur zu einer temporären Expression des E-Selektins kommt, wurde ein genauer Stimulationsvorgang entwickelt, der dies berücksichtigt. Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte 3 Stunden vor Versuchsbeginn mit dem rekombinanten humanen Interleukin-1β (aus Escherichia coli, IL-1β, Boehringer Mannheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1g/ml. Mittels fluoreszenzmarkierter E-Selektin-Antikörper (Anti-Human-E-Selektin-Antikörper, FITC-markiert, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) konnte im Rahmen vorheriger Bindungsstudien in der Arbeitsgruppe um PD Dr. Rothe, Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg die maximale E-Selektin-Expression nachgewiesen werden. Nach der Stimulation wurde das IL-1β durch Spülen mit PBS entfernt. Es folgte die Zugabe der funktionalisierten

Liposomen (Fluoreszenzmarkierung 1 mol% DiO). Entsprechend der zu untersuchenden Parameter wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt. Es fanden alle Bindungsuntersuchungen bei Inkubationstemperaturen von 4°C statt. Als Blindwerte dienten Zellen ohne Liposomenbehandlung. Nach erfolgter Inkubation wurde vorsichtig mit PBS gespült, um die nicht gebundenen Liposomenanteile zu entfernen. Anschließend wurde die Fluoreszenz (Ex. 485nm/Em. 520nm) am Plattenreader gemessen.

3.5. Internalisierungsuntersuchungen

3.5.1. Dithionit-Technik

Mit dieser Methode lässt sich der internalisierte Liposomenanteil quantitativ erfassen. Um später genaue Interpretationen vornehmen zu können, musste im Vorfeld die Technik an Liposomen näher charakterisiert werden.

Reduktion von NBD-PE in Liposomen:

Basierend auf der Fluoreszenzlöschung des NBD durch Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe durch Dithionitzusatz musste gezeigt werden, dass das molare Verhältnis des Dithionits gegenüber dem NBD für eine erfolgreiche komplette Reduktion aller Nitrogruppen ausreichend ist. Dazu wurden über die Hydratationsmethode Liposomen der Zusammensetzung SPC/CHOL im Verhältnis 7:3 hergestellt. Die Fluoreszenzmarkierung mit 2mol% NBD erfolgte durch die Ethanolinjektionsmethode asymmetrisch (Kapitel 3.2.4.2.). Die Liposomen wurden mit verschiedenen Mengen Dithionit versetzt. Folgende Verhältnisse zwischen NBD und Dithionit wurden untersucht: 1:50000, 1:100000, 1:150000. Die Fluoreszenzauslöschung innerhalb der schwarzen 96-well-Platten wurde über 5 Minuten am Fluostar in Abständen von 30 Sekunden verfolgt. Um eine Lyse der Liposomen zu erreichen, wurde anschließend in jedes well Triton-X-100 gegeben (1% Endkonzentration). Eine letzte Fluoreszenzmessung schloss sich an.

Anwendung der Methode als Zellinternalisierungsassay:

Für die Internalisierungsversuche kamen HUVEC der 2. und 3. Passage zum Einsatz. Sie wurden nach einem konfluenten Wachstum mittels Trypsinbehandlung geerntet und in schwarze 96-well Platten mit einer Zellanzahl von 20000 HUVEC je well ausplattiert. Zum Anwachsen und Ausbreiten der HUVEC auf dem Plattenboden blieben die Zellen über Nacht in den Platten im Brutschrank. Je nach Versuchsdurchführung wurde ein entsprechender Teil der Zellen mit IL-1 β stimuliert. Die Inkubationsparameter wurden wie in den Bindungsuntersuchungen entsprechend variabel gestaltet und auf ihre Bedeutung hin später näher untersucht. Zur Erfassung der Internalisierungsrate musste sich nach Liposomenzugabe und Abwarten der Inkubationszeit für die Bindung und dem darauf folgenden Spülen ein weiterer Inkubationsvorgang anschließen. Während dieser Zeit hatten die gebundenen Liposomen die Möglichkeit, durch die Zellmembran hindurch in das Zytosol zu internalisieren. Danach wurde die Aufnahme durch Lagerung bei 4°C abgestoppt und die Zellen fluorimetrisch am Fluostar vermessen. Der erste Messwert symbolisierte sowohl gebundene als auch internalisierte Liposomen. Die Unterscheidung war nach Zugabe der Dithionitlösung (1,5M Dithionit, 1M TRIS, pH 10) möglich. Die zweite Fluoreszenzmessung

folgte im Anschluss daran. Eine deutliche Abnahme resultierte aus der Fluoreszenzlöschung der oberflächlich gebundenen Liposomen. Eine Restfluoreszenz charakterisierte den internalisierten Liposomenanteil. Zum Schluss wurde Triton-X-100 (1% Endkonzentration) als Detergenz hinzugegeben und eine weitere Fluoreszenzmessung durchgeführt. Das Ergebnis wurde als Hintergrundwert interpretiert und berücksichtigt.

3.5.2. Aufklärung der Internalisierungsmechanismen

Alle Zellinternalisierungsstudien wurden auf isolierte humane Nabelschnurendothelzellen bezogen. Die einzelnen Versuchsprotokolle sind in den folgenden Kapiteln näher beschrieben. Unterscheidungen aktiver und passiver Aufnahmeprozesse können durch temperaturabhängige Inkubationen getroffen werden. Die metabolischen Aktivitäten der Endothelzelle variieren dabei stark. Passive Aufnahmewege (Fusionsprozesse) treten schon bei 4°C auf. Dahingegen weisen Zellen Endozytoseprozesse und andere aktive Transportmechanismen erst bei höheren Temperaturen (37°C) auf.

3.5.2.1. Passive Aufnahmemechanismen

Fusionsnachweis mit Calcein:

Fusionserscheinungen als Zeichen passiver Aufnahmemechanismen durch Endothelzellen lassen sich leicht quantifizieren. Aus diesem Grunde wurde diese Internalisierungsstudie bei 4°C durchgeführt. Um die Beladungskapazität der Liposomen zu erhöhen, wurden diese über die Phasenumkehrmethode hergestellt. Als wässrige Pufferphase kam eine 100mM Calceinlösung (pH 7,4) zum Einsatz. Nach Abtrennung des nicht eingeschlossenen hydrophilen Fluorophors mittels Säulenchromatografie und Funktionalisierung der Liposomen mit Antikörpern wurden die Zellen mit den Liposomen entsprechend folgender Protokolle inkubiert.

- 60 Min. 4°C, Spülen, „Acid-wash“, 1.Messung, Triton, 2.Messung
- 60 Min. 4°C, Spülen, 60 Min. 4°C, „Acid-wash“, 1.Messung, Triton, 2.Messung
- 60 Min. 4°C, Spülen, 60 Min. 37°C, „Acid-wash“, 1.Messung, Triton, 2. Messung

Als „Acid-wash“-Methode versteht man eine Inkubation der Zellen mit sauren Pufferlösungen. Oberflächlich gebundene Liposomen werden dadurch zerstört und zum Teil von der Zelloberfläche abgelöst [Mastrobattista et al. (1999)]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die HUVEC nach erfolgter Liposomentargetierung 10 Minuten mit einem Zitronensäurepuffer (40mM Zitronensäure, 120mM Natriumchlorid, pH 3,0) inkubiert. Anschließend wurde wieder mit PBS gespült und die Fluoreszenz (Ex. 485nm/Em. 520nm) innerhalb der schwarzen 96-well-Platten am Fluostar gemessen (1.Messung). Nach Detergenzzugabe (Triton-X-100, 1% Endkonzentration) wurde erneut gemessen (2.Messung).

3.5.2.2. Aktive Aufnahmemechanismen

Inhibierung aktiver Transportprozesse:

Um aktive Aufnahmeprozesse näher charakterisieren zu können, muss während der Versuchsdurchführung im Gegensatz zur passiven Fusion eine Temperaturkonstanz von 37°C gewährleistet sein. Die Auswirkungen metabolischer Inhibitoren stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen. Des Weiteren sollen die Auswirkungen von Spindelgiften und die Blockade rezeptorvermittelter Aufnahmemechanismen in Bezug auf die Internalisierungsfähigkeit der Zellen näher untersucht werden.

Verwendete Inhibitoren:

Antimycin A	1µg/ml in Ethanol (Endkonz. max. 1%)
Cytochalasin D	20µg/ml in DMSO (Endkonz. max. 1%)
Formaldehyd	2%
Natriumazid	0,1%
Kaliumentzug	„hypotonic shock procedure“

Das Verfahren des Kaliumentzugs stammt von Larkin [Larkin et al. (1983)] und blockiert selektiv nur rezeptorgesteuerte Aufnahmevorgänge. Dafür wurden die HUVEC dreimal mit Puffer A (50mM HEPES, 100mM Natriumchlorid, pH 7,4) gespült, 5 Minuten im hypotonischen Medium (M199 incl. Zusätze: Milli Q 1:1) inkubiert und anschließend einer weiteren Inkubation von 10 Minuten in Puffer A überlassen. Alle anderen Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen in Medium M199 hergestellt. Zum Schutz der HUVEC erfolgte damit eine Präinkubation von 30 Minuten.

3.6. pH-sensitive Immunoliposomen

3.6.1. pH-abhängiges Freisetzungsverhalten

Die pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft drückt sich grundlegend in einer besonderen Lipidzusammensetzung aus. Anstelle von SPC/Chol wurde für diese Liposomen die Zusammensetzung DOPE/CHEMS gewählt. Sie lagen in einem molaren Verhältnis von 6:4 vor. Als pH-insensitive Lipidmischung (Blindprobe) wurde DPPC/CHEMS (6:4) verwendet. Alle anderen Parameter (Antikörper, PEG-PE 1-5 mol%, Kopplungsanker) fanden weiterhin ihre Berücksichtigung und wurden zusätzlich zum molaren Verhältnis der Grundlipide hinzugegeben. Beide Lipidzusammensetzungen wurden mit einem Gesamtlipidgehalt von 10µmol/ml über die Phasenumkehrmethode hergestellt. Für diese Untersuchungen wurde 100mM Calceinlösung hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Liposomen wurden zuvor entsprechend der Vorgaben mit Anker-molekülen für spätere Antikörperkopplungen und PEG-Anteilen modifiziert. Nach Abtrennung von freiem unverkapseltem Calcein durch eine Sephadex[®]-G-50-Säule bzw. von ungebundenen Antikörpern durch eine Sepharose[®]-4B-Säule konnten die Liposomen in schwarzen 96-well-

Platten fluorimetrisch am Fluostar vermessen werden. Es wurden Zitronensäure-Phosphat-Pufferlösungen nach McIlvain über einen pH-Bereich von 6,0 bis 4,0 hergestellt. Die Freisetzung des Liposomeninhaltes wurde durch Fluoreszenzmessung (Ex. 485nm/Em. 520nm) des verdünnten Calceins innerhalb der Puffermedien bestimmt. Der Inkubationszeitraum erstreckte sich über 60 Minuten. Die erste Fluoreszenzmessung (Inkubation 0 Minuten) wurde als 0% Freigabe gewertet. In Abständen von je 15 Minuten wurden erneut die Fluoreszenzwerte gemessen. Als weiterer Bezugspunkt galt der Messwert nach Detergenzzugabe am Ende der Inkubationszeit. Hierfür wurden die Liposomen mit Triton-X-100 (1% Endkonzentration) versetzt. Die Liposomen wurden dabei komplett zerstört und gaben den noch restlichen Inhalt frei. Die so gemessene Fluoreszenz entsprach einer Freigabe von 100%. Nach Abzug der Grundfluoreszenz (Startwert) wurden die Messwerte mit den Endwerten nach Tritonzugabe ins Verhältnis gesetzt und die prozentuale Freigabe ermittelt.

3.6.2. Serumstabilität

In Hinblick auf eine erfolgreiche therapeutische Anwendung muss für spätere in-vivo-Versuche eine hinreichende Serumstabilität der Liposomen gewährleistet sein. Deshalb wurde die Stabilität der pH-sensitiven Immunliposomen unter physiologischen Bedingungen getestet [Black et al. (1976)]. In Analogie zu erwähnten Freisetzungsstudien wurden die gleichen Liposomen in 40% Serum in schwarzen 96-well-Platten bei 37°C inkubiert und auf ihr Freigabeverhalten hin untersucht. Eine zeitliche Betrachtung von bis zu 2 Stunden wurde gewählt. Die Herstellung der Liposomen, die Verkapselung und Abtrennung der Calceinlösung (100mM) und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog der Freisetzungsstudien pH-sensitiver Liposomen (Startwert entsprach 0% Freigabe, Endwert nach Detergenzzugabe entsprach 100% Freigabe).

3.6.3. Fusionsnachweis mit endosomalen Vesikeln

Für die Untersuchung von Fusionsprozessen kann neben den klassischen Fusionsassays mit Calcein und 6-CF auch die Anwendung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) dienlich sein. Es können dadurch Erkenntnisse zum Fusionsverhalten, aber auch zur Membranfluidität gewonnen werden [Morgan et al. (1983)]. Auf dem Gebiet der FRET-Untersuchungen existieren zwei verschiedene Varianten (Dilution-Assay, Mixing-Assay), wobei hier der Dilution-Assay Anwendung fand [Struck et al. (1981), Rosenberg et al. (1983)]. Dadurch war es möglich, Fusionsprozesse neben gleichzeitig stattfindenden Adsorptionsvorgängen getrennt voneinander erfassen zu können. Für die Durchführung wurden drei verschiedene Lipidzusammensetzungen benötigt.

- pH-sensitive Immunliposomen
DOPE/CHEMS 6:4
- pH-insensitive Immunliposomen
DPPC/CHEMS 6:4
- endosomale Vesikel (Endosomen)
Lipoid-SPC / DMPE/Lipoid-EPS / POPC 5:2:2:1

Die Immunoliposomen wurden mit N-Glut-PE und unspezifischen humanen Antikörpern funktionalisiert. Als FRET-Marker kamen Lissamine[®] Rhodamine-B-DPPE und NBD-DPPE zum Einsatz. Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden gemeinsam in die Immunoliposomen zu je 1mol% über die Phasenumkehrmethode symmetrisch eingebaut. Die künstlichen Endosomen kamen ungelabelt zum Einsatz. In die wells wurden je nach Versuchsaufbau ungelabelte und gelabelte Liposomen zur Reaktion gebracht. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei pH 7,4 und pH 4,4 in schwarzen 96-well-Platten durchgeführt. Mit Hilfe des Fluostars wurde bei folgenden Wellenlängen gemessen:

- Ex.485nm/Em. 520nm
- Ex.485nm/Em. 590nm

Die Veränderung der Messwerte wurde über 60 Minuten erfasst und ausgewertet. Zur Berechnung der prozentualen Fusionsereignisse wurde im Anschluss Triton-X-100 (1% Endkonzentration) hinzugegeben, wobei der resultierende Fluoreszenzwert als 100%-ige Fusion interpretiert wurde.

3.6.4. In-vitro-Studien

3.6.4.1. Targetierung und fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Für die Versuche wurden pH-sensitive und pH-insensitive Liposomen bekannter Lipidzusammensetzung verwendet. Um die Beladungskapazität zu erhöhen, wurde die eingesetzte 100mM Calceinlösung (pH 7,4) mit Hilfe der Phasenumkehrmethode in die Liposomen gebracht. In einer weiteren Liposomenpopulation wurde NBD-PE in die Membran als Fluoreszenzmarker eingebaut. An die Liposomen wurde über N-Glut-PE der spezifische humane Anti-E-Selektin-Antikörper gekoppelt. Gelchromatografische Reinigungsschritte mit Sephadex[®] bzw. Sepharose[®] folgten. Die verwendeten humanen Nabelschnurendothelzellen der 2. bzw. 3. Passage wurden durch Trypsinisieren aus den Kulturschalen geerntet. Es schloss sich ein Ausplattieren auf dünnen Glasplättchen an. Die Plättchen hatten eine Dicke von 0,5mm. Pro Glasplättchen wurden 200000 HUVEC benötigt. Die Zellen wurden auf den Glasplättchen im Brutschrank über Nacht kultiviert und bildeten dabei eine konfluente Monolayer. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulierung mit IL-1 β . Danach wurden die Zellen mit Liposomen in einem Verhältnis von 2 μ mol Lipid / 1 \times 10⁶ Zellen im Brutschrank für 90 Minuten inkubiert. Ein Spülvorgang mit PBS zur Abtrennung ungebundener Liposomen folgte im Anschluss. Daran schloss sich eine Betrachtung der Zellen im konventionellen Modus eines Fluoreszenzmikroskops an. Da das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) in Kombination mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410 invert, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) eingesetzt werden konnte, folgte anschließend eine Betrachtung im konfokalen Modus, wobei Einzelbilder in Schnittebenen zu je 0,5 μ m entstanden. Die Fluoreszenz des NBD-PE bzw. des freigesetzten Calceins innerhalb der Endothelzellen konnte durch eine Anregungswellenlänge von 488nm gut sichtbar gemacht werden.

3.6.4.2. Auswirkung von Äquilibrierungsreagenzien

Zur quantitativen Unterscheidung der Markerfreisetzung schlossen sich Versuche in schwarzen 96-well-Platten an. Dafür wurden Nabelschnurendothelzellen aus Kulturschalen abtrypsinisiert und in einer Anzahl von je 20000 pro well in Platten ausplattiert. Diese wurden mit 50nmol pH-sensitiver/pH-insensitiver Immunliposomen für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Spülvorgängen mit PBS wurde die Fluoreszenz des Calceins am Fluostar bestimmt. Eine erneute Messung folgte nach Detergenzzugabe (Triton-X-100, 1% Endkonzentration), wobei noch intakte Liposomen innerhalb der Zelle zerstört wurden. Dieser Versuchsablauf wiederholte sich anschließend mit einer geringen Modifikation. Einem Teil der Endothelzellen wurde Ammoniumchlorid als Äquilibrierungsreagens hinzugegeben. Dadurch wurde die Azidifizierung der Endosomen/Lysosomen blockiert [Maxfield (1982)]. Das Ammoniumchlorid wurde zu 20mM in Medium gelöst und den Zellen 30 Minuten als Präinkubation hinzugegeben. Die Menge der zugesetzten pH-sensitiven/pH-insensitiven Immunliposomen blieb unverändert. Auch die Zugabe des Detergenz zur Lyse aller Bestandteile blieb gleich. Im Anschluss daran wurden diese Ergebnisse mit den Versuchen ohne Äquilibrierungsreagenz verglichen.

3.6.4.3. Einschluss von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid

Um das intrazelluläre Schicksal der pH-sensitiven Immunliposomen abschließend beurteilen zu können, folgte ein Versuch mit lysosomalen Substraten [Yoshimura et al. (1995)]. Das zu verkapselnde Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid wurde als 10mM Pufferlösung über die Phasenumkehrmethode in die Liposomen gebracht. Als Blindprobe wurde wieder die pH-insensitive Lipidmischung ausgewählt (DPPC/CHEMS). Es folgte eine Kopplung des spezifischen Antikörpers über N-Glut-PE an die Liposomenoberfläche und anschließend die Abtrennung freier Antikörpermoleküle über eine Sepharose[®]-4B-Säule.

In schwarze 96-well-Platten wurden HUVEC ausplattiert (20000 je well) und der IL-1 β -Stimulation unterzogen. Die Immunliposomen wurden auf die Zellen gegeben und für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Fluoreszenzmessung alle 10 Minuten. Da die Hintergrundfluoreszenz relativ hoch war, mussten die betroffenen wells vor jeder Messung mit PBS gespült und dann vermessen werden. Die Wellenlänge am Fluostar betrug Ex. 320nm und Em. 390nm.

3.7. Gentransfer mit pH-sensitiven Immunliposomen

Für einen erfolgreichen selektinvermittelten Gentransfer durch pH-sensitive Immunliposomen am entzündeten Endothel stellt die Verkapslungsrates des Genmaterials den limitierenden Faktor dar. Deshalb müssen die Liposomen in Bezug auf ihre Einschlusseffizienzen entsprechend der jeweiligen Herstellungsmethode (Kapitel 3.2.1.) näher überprüft werden. Auf die Hydratationsmethode soll hier nicht weiter eingegangen werden, da die ermittelten Verkapslungsrates dort nie 4% überschreiten und somit für den Einsatz hochwertiger Plasmid-DNA inakzeptabel sind. Im Rahmen folgender Untersuchungen sollen sowohl Detergenz- als auch Phasenumkehrmethode durch Modifizierungen in ihrer Einschlussrate optimiert und auf ihre Transfektionsfähigkeit hin untersucht werden.

3.7.1. Liposomenpräparationen

Die Herstellung gentherapeutisch nutzbarer Liposomenarten in Kombination mit pH-Sensitivität und „Selektiv“-Spezifität soll nun vorgestellt werden. Einfluss fanden dabei die Arbeiten von Pagnan [Pagnan et al. (2000)] zu den CCL (cationic coated liposomes) und die von Wheeler [Wheeler et al. (1999)] zu den SPLP (stabilized plasmid lipid particles).

Herstellung von CCL:

Das Herstellungsprinzip der CCL's hat die Phasenumkehrmethode von Szoka et al. (Kapitel 3.2.1.) als Basis. Das einzusetzende Genmaterial wurde dafür in der wässrigen Phase gelöst (50µg Plasmid in 250µl Wasser). Durch Zusatz von 0,45µmol DOTAP (in 250µl Chloroform) sollte eine Lipoplexbildung herbeigeführt werden. Um innerhalb dieses Zwei-Phasen-Systems (org. Phase DOTAP/wässr. Phase Plasmid) eine Komplexbildung zwischen negativ geladenem Plasmid und kationischem Lipid (DOTAP) zu erreichen, musste ein Ein-Phasen-System gebildet werden. Dazu wurden 500µl Methanol hinzugegeben. Dadurch entstand nach Bligh und Dyer eine Monophase [Bligh et al. (1959)]. Nachdem dieser Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur „reifen“ konnte, kam es durch Zugabe von 250µl Chloroform und 250µl Wasser zur erneuten Zwei-Phasen-Bildung. Jetzt befanden sich die hydrophoben Partikel aus Plasmid und kationischem Lipid konzentriert in der Chloroformphase. Zur Abtrennung schloss sich eine Zentrifugation der Eppendorfgefäße für 7 Minuten bei 4000 RPM an. Der wässrige Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden zur organischen Phase die chloroformhaltigen Lipide der bekannten pH-Sensitivität hinzugegeben (3µmol DOPE, 2µmol CHEMS, 0,25µmol Cyanur-PEG-PE). Es folgte die Addition von 500µl Wasser als wässrige Phase. Eine kurze milde Ultraschallbehandlung (30 Sekunden) zur Ausbildung einer stabilen W/O-Pseudoemulsion schloss sich an. Im Rahmen der Phasenumkehrmethode (Kapitel 3.2.1.2.) erfolgten nun das langsame Entfernen des Chloroforms am Vakuumrotationsverdampfer und die Bildung liposomaler Vesikel. Eine Volumenabnahme der wässrigen Phase während der Herstellung wurde durch Wasserzusatz ausgeglichen. Die Prozedur der Antikörperkopplung (Kapitel 3.2.2.1.) schloss sich an. Die Liposomen wiesen eine Größe von 100nm auf. Ein Reinigungsschritt nicht verkapselter Plasmid-DNA und freier Antikörpermoleküle über eine Sepharose[®]-4B-Säule beendete die Herstellung.

Herstellung von SPLP:

Die Präparation der SPLP stellte im Grunde eine modifizierte Liposomenherstellung nach der Detergenzmethode (Kapitel 3.2.1.3.) dar. Die Entfernung des verwendeten Alkylglykosids wurde im Rahmen der SPLP-Methode durch eine Dialyseapparat vorgenommen [Mimms et al. (1981)]. Alle benötigten Substanzen wurden in konzentrierter Oktylglykosidlösung (0,2M OG in 150mM Natriumchlorid, 5mM HEPES pH 7,4) aufgenommen und gelöst. Die Plasmid-DNA (50µg) wurde mit der entsprechenden Menge DOTAP (0,45µmol DOTAP) in 250µl 0,2M OG-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3µmol DOPE, 2µmol CHEMS und 0,25µmol Cyanur-PEG-PE als 0,2M OG-Lösung zu der Plasmid-DOTAP-Mischung hinzugegeben und auf 500µl Endvolumen mit der Detergenzlösung aufgefüllt. Die Lipid-Plasmid-Mischung wurde gegen einen HEPES-Puffer (5mM HEPES in 150mM Natriumchlorid pH 7,4) dialysiert. Innerhalb der nächsten 48 Stunden wurde zweimal der Puffer ausgetauscht. Danach erfolgte die Antikörperkopplung (Kapitel 3.2.2.1.) mit E-Selektiv-Antikörpern. Es schloss sich eine gelchromatografische Abtrennung des nicht eingeschlossenen Plasmidanteils und freier Antikörpermoleküle über eine Sepharose[®]-4B-Säule an. Die entstandenen Liposomen besaßen

eine Größe von 50nm. Die liposomenhaltigen Fraktionen der Gelchromatografie enthielten neben den plasmidhaltigen Liposomen noch einen großen Anteil leerer plasmidfreier Vesikel. Das Vorhandensein beider Populationen war durch die Herstellungsmethode erklärbar [Mimms et al. (1981)]. Die leeren Vesikel wiesen eine geringere Dichte als die SPLP's auf. Aus diesem Grund konnte für eine erfolgreiche Trennung die Ultrazentrifugation unter Anwendung eines Dichtegradienten [Holloway et al. (1975)] herangezogen werden. Die zu trennenden Liposomen wurden auf einen Dichtegradienten gegeben. Dieser setzte sich aus gleichen Anteilen 1%-, 2,5%- und 10%-iger Saccharoselösung zusammen. Es folgte für 2,5 Stunden eine Ultrazentrifugation (Beckman Coulter Optima L90K ultracentrifuge, Beckmann Instruments GmbH, München) bei 20°C und 28000 RPM mit dem Rotor SW28.1. Die plasmidhaltigen SPLP's wanderten dabei in die Grenzschicht zwischen 2,5%- und 10%-iger Saccharoselösung und konnten dort entnommen werden. Zur Reinigung schloss sich eine weitere Dialyseprozedur über 12 Stunden gegen einen HEPES-Puffer (5mM HEPES in 150mM Natriumchlorid pH 7,4) an. Das Ladungsverhältnis zwischen Plasmid-DNA und DOTAP betrug sowohl bei den CCL als auch bei den SPLP konstant 3.

Berechnung der Ladungsverhältnisse:

- Ein Basenpaar innerhalb der Plasmid-DNA besitzt 2 Phosphatgruppen und wiegt durchschnittlich 618g/mol.
- In 309g Plasmid-DNA ist 1 Mol Phosphat enthalten.
- 1g Plasmid-DNA beinhaltet $3,24 \times 10^{-3}$ mol Phosphat.
- 1µg Plasmid-DNA enthält $3,24 \times 10^{-9}$ mol Phosphat (negative Ladung).

$$\mu\text{g DOTAP} = \frac{\text{Menge Plasmid-DNA } [\mu\text{g}] \times \text{Menge Phosphat } [\text{mol}] \times \text{Ladungsverhältnis}}{\text{Konz. d. DOTAP } [\text{mol}/\mu\text{l}]}$$

- z.B. müssen für ein Ladungsverhältnis von 3 (N/P = +/-) bei 50µg Plasmid-DNA-Einsatz und einer DOTAP-Konz. von 10µmol/ml 48,6µl der Lösung verwendet werden.

3.7.2. Liposomencharakterisierung

Für die Bewertung späterer Transfektionsergebnisse war es wichtig, den Anteil eingeschlossener Plasmid-DNA innerhalb der Liposomen zu bestimmen. Zusätzlich zur quantitativen Aussage sollte der Versuch unternommen werden, den Unterschied plasmidhaltiger Liposomen gegenüber leeren Vesikeln elektronenmikroskopisch darzustellen. Da hier zum ersten Mal die Herstellung der CCL bzw. SPLP in Kombination mit der liposomalen Eigenschaft der pH-Sensitivität gezeigt werden konnte, schlossen sich Versuche zur Charakterisierung dieser neuen Formulierungen an. Dazu wurden Serumstabilität und pH-abhängiges Freisetungsverhalten dieser neuen Transportsysteme untersucht und mit den Ergebnissen der über die Phasenumkehrmethode hergestellten pH-sensitiven Immunoliposomen verglichen.

3.7.2.1. DNA-Quantifizierung

Die Menge der eingeschlossenen komplexierten Plasmid-DNA konnte mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst® 33258 bestimmt werden [Xu et al. (1999)]. Dabei kommt es zu einer spezifischen Anlagerung des Farbstoffes an den Basen Adenin und Thymin innerhalb der

Desoxyribonukleinsäure [Latt et al. (1976)]. Dazu wurde eine Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich 1µg bis 100µg/ml erstellt. Von diesen Konzentrationen wurden je 100µl mit 100µl Hoechstfarbstofflösung (10µg/ml) versetzt. Die Fluoreszenz wurde bei den Wellenlängen Ex. 355nm und Em. 460nm am Fluostar Plattenreader bestimmt. Für diesen Versuch wurden schwarze 96-well-Platten verwendet. Zur Lyse der Vesikel wurde Triton-X-100 (1% Endkonzentration) eingesetzt.

3.7.2.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die hergestellten CCL's und SPLP's sollten hinsichtlich ihres komplexierten Inhaltes strukturell charakterisiert werden. Die Aufnahmen basierten auf der Basis der Elektronenmikroskopie. Alle mikroskopischen Bilder wurden am Institut für Ultrastrukturforschung des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena aufgenommen. Die Arbeiten standen unter der Leitung von Dr. W. Richter, dem ich an dieser Stelle nochmals danken möchte. Für die Probenpräparationen kamen Einrichtungen zum schnellen Einfrieren (dadurch veränderungsfrei) zum Einsatz. Transmissionselektronische Messungen (TEM) wurden mit einem Philips CM 120 durchgeführt. Die Gefrierbruch-Präparate („freeze-fracture“) wurden mit Hilfe der Balzers BAF 400T-Anlage (Balzers, Lichtenstein) erstellt. Präparate für die „cryo-TEM“ wurden als ultradünne Flüssigkeitsschicht sofort in flüssigem Ethan eingefroren. Anschließend wurden die Proben unter flüssigem Stickstoff mit einem Gatan-Cryo-Halter (Einrichtung für die direkte Untersuchung von Objekten in dünnen Eisfilmen an einem Elektronenmikroskop) in ein Philips CM 120 Elektronenmikroskop überführt und näher untersucht.

3.7.2.3. Serumstabilität

In Analogie zur Bestimmung der Serumstabilität bei den pH-sensitiven Immunoliposomen in Kap. 3.6.2. wurde auch hier 40% Serum eingesetzt. Die CCL's und SPLP's wurden entsprechend Kap. 3.7.1. hergestellt und mit Antikörpern funktionalisiert. Sowohl von den CCL's als auch von den SPLP's wurden plasmidhaltige und leere Vesikel präpariert und in den Untersuchungen gegenübergestellt. Damit sollte der Einfluss verkapselter Lipoplexe auf eine eventuell auftretende Seruminstabilität untersucht werden. Da in diesem Teilabschnitt der Arbeit die Stabilität der Vesikel und nicht deren Targetspezifität im Vordergrund stand, wurde bei der anschließenden Kopplung von Antikörpern auf die kostengünstigere Variante des Einsatzes unspezifischer Antikörper zurückgegriffen. Die Präparationen erfolgten jeweils in einer 100mM Calceinlösung pH 7,4. Die Liposomen wurden nach Abtrennung von freien Antikörpern (Sephrose®) und Calceinlösung (Sephadex®) in schwarze 96-well-Platten pipettiert. Abschließend wurde dort ihr Freisetzungsverhalten in Serum über 2 Stunden bei 37°C entsprechend Kap. 3.6.2. ermittelt.

3.7.2.4. pH-abhängiges Freisetzungsverhalten

Die verwendeten liposomalen Trägersysteme CCL und SPLP wurden entsprechend Kap. 3.7.1. hergestellt. Es wurden jeweils plasmidgefüllte und leere Vesikel beider Populationen gegenübergestellt und ausgewertet. Parallel zur Überprüfung der Serumstabilität kam als wässrige Phase eine zuvor auf pH 7,4 eingestellte 100mM Calceinlösung zum

Einsatz. Nach Abtrennung freier unverkapselter Calceinanteile durch eine Sephadex[®]-G-50-Säule bzw. ungebundener Antikörper durch eine Sepharose[®]-4B-Säule konnten die Liposomen in schwarzen 96-well-Platten fluorimetrisch am Fluostar vermessen werden. Die verwendeten Zitronensäure-Phosphat-Pufferlösungen (McIlvain) erstreckten sich über einen Bereich von pH 4,0 bis pH 6,0. Die Liposomen wurden in die entsprechenden Pufferlösungen pipettiert. Die Fluoreszenzerscheinungen durch freigesetztes verdünntes Calcein wurden am Fluostar gemessen (Ex. 485nm/Em. 520nm). Die Startmessung zu Beginn wurde als 0% Freigabe gewertet. In Zeitabständen von je 15 Minuten folgten fluorimetrisch Messungen. Als zusätzlicher Bezugspunkt galt der Messwert nach Detergenzzugabe am Ende der Inkubationszeit nach 60 Minuten. Hierfür wurden die Vesikel mit Triton-X-100 (1% Endkonzentration) versetzt. Die Liposomen wurden dabei komplett zerstört und gaben den noch restlichen Inhalt frei. Die abschließende Auswertung entsprach Kap. 3.6.1..

3.7.3. Transfektionsversuche an *E. coli*

Die hier verwendeten CCL's und SPLP's hatten die Lipidzusammensetzung der pH-sensitiven Immunoliposomen. Eine Kopplung erfolgte aus Kostengründen mit unspezifischem Antikörper. Das isolierte Plasmid (Kapitel 3.1.3.) wurde in der Liposomen verkapselt. Da dem Medium für Transfektionsversuche konstitutiv Ampicillin zugesetzt wird, das sonst ein Wachstum verhindert, stellt das Vorkommen von Kolonien auf Agar-Platten einen erfolgreichen Einbau der liposomalen Plasmid-DNA in den Zellkern der *Escherichia coli* dar. Dazu wurden die Bakterien mit unterschiedlichen Mengen Liposomen inkubiert und auf selektivem (ampicillinhaltigem) Agar ausplattiert. Die Platten wurden im Inkubator über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Die gewachsenen Klone wurden anschließend charakterisiert. Für den Vergleich der Transfektionseffizienz, wurden parallel gleiche Mengen Plasmid sowohl in Form liposomaler Vesikel (CCL, SPLP) als auch in freier Form hinzugegeben.

3.7.4. Transfektionsversuche an HUVEC

Anhand des SRB-Assays (Kapitel 3.3.2.) konnte festgestellt werden, dass bei einer bestimmten Zellanzahl je well die Wachstumsrate der Endothelzellen (HUVEC) am höchsten war. Diese Zellanzahl war für den Transfektionsversuch entscheidend [Mortimer et al. (1999)]. Die zur Transfektion von HUVEC verwendeten SPLP's wurden entsprechend der Vorschrift in Kapitel 3.7.1. hergestellt. Dabei erfolgte eine Unterteilung der SPLP in drei Gruppen: SPLP-Nr.1 mit spez. Anti-E-Selektin-Antikörper und mit pH-sensitiven Eigenschaften; SPLP-Nr. 2 ohne spez. Anti-E-Selektin-Antikörper und mit pH-sensitiven Eigenschaften; SPLP-Nr. 3 mit spez. Anti-E-Selektin-Antikörper und ohne pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft. Weiterhin wurde eine Präparation pH-insensitiver Immunoliposomen über die Phasenumkehrmethode hergestellt. Alle vier Typen wurden mit gleichen Ausgangsmengen an GFP beladen. Als Plasmid wurde dabei das pMCV1.4-EGFP (Mologen) eingesetzt. Das Plasmid beinhaltet den Promoter des Cytomegalivirus und die humanisierte Sequenz für das Grün Fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“ = GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Nach erfolgter Synthese und Faltung erscheint eine erfolgreich transfizierte Endothelzelle grün fluoreszierend. 5000 HUVEC wurden nach dem Abtrypsinisieren aus den Kulturschalen in die wells der 96-well-Platten ausplattiert. Nach dem Anheften und einer Kultivierung über Nacht im Brutschrank wurden die Zellen zur E-

Selektin-Expression für 3 Stunden mit IL-1 β stimuliert. Nach der Stimulation wurde zweimal mit Medium M199 gewaschen und die Liposomen auf die Zellen gebracht. Das Verhältnis entsprach 15–50pg DNA/HUVEC. Die Zellen wurden für 8 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Medium M199 enthielt auch während dieser Zeit den üblichen Anteil an Serum und anderen Komponenten. Nach der Inkubationszeit wurde zweimal mit PBS gewaschen und Medium hinzugegeben. Die HUVEC wurden weitere 48 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde erneut mit PBS gespült. Es schloss sich eine Zellfixierung an. Dafür wurden die Zellen für 15 Minuten mit 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach doppeltem Spülvorgang mit PBS wurden die wells mit einer Mowiol/Propylgallatlösung [Longin et al. (1993)] bedeckt. Über Nacht erfolgte die Trocknung dieser Schutzlösung. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei Ex. 485nm/Em. 520nm.

Mowiol-Mounting-Medium:

- 5g Mowiol (Polyvinylalkohol) 488 mit 20ml PBS über Nacht rühren
- 10ml Glycerol zusetzen und über Nacht rühren
- Zentrifugation bei 15000 RPM für 1h
- Überstand bei 4°C aufbewahren

FITC-Anti-Fading:

- 0,625g n-Propylgallat mit 12,5ml PBS und 12,5ml Glycerol über Nacht rühren
- bei 4°C aufbewahren (Haltbarkeit 6 Wochen)

Die fertige Lösung besteht aus 3 Teilen Mowiol und 1 Teil FITC-Anti-Fading.

4. Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der intensiven Erforschung der Entzündungsreaktion im Organismus kann auf ein breites Wissen der mechanistischen Hintergründe zurückgegriffen werden. Der molekularbiologische Ablauf der Leukozytenadhäsionskaskade als Bestandteil der zellulären Immunabwehr wurde weitgehend aufgeklärt und zeigt verschiedene neuartige Ansatzpunkte für eine antiinflammatorische Therapie auf. Der lokale Prozess der Endothelaktivierung ist auch durch die Expressierung verschiedener Zell-Adhäsions-Moleküle gekennzeichnet. Diese stellen aufgrund ihrer direkten zeitlichen und räumlichen Bindung ihrer Expressierung an das Entzündungsgeschehen am Endothel hervorragende Zielstrukturen für liposomale Drug Delivery Systeme dar. Die Selektine bilden eine solche Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Das E-Selektin wurde dabei als Zielstruktur favorisiert. Liposomen als Arzneistoffträger zeichnen sich besonders durch ihre vielfältige Funktionalisierung und leichte Herstellung aus. Dabei können sie sowohl lipophile als auch hydrophile Arzneistoffe aufnehmen und transportieren. Die Liposomen könnten im Gesamtkonzept einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie Anwendung finden. Demnach sollten Liposomen zum Einsatz kommen, die eine Targetspezifität durch gekoppelte Anti-E-Selektin-Antikörper aufweisen. Die Optimierung dieses Systems verlief über mehrere Zwischenschritte. Dabei sollte eine exponierte Lage der Antikörper auf der Liposomenoberfläche nach der Kopplungsprozedur garantiert sein. Nur so kann eine verstärkte selektive Targetierung ermöglicht werden. Auf der anderen Seite muss auch eine sterische Stabilisierung dieser Immunliposomen erreichbar sein. Die sterische Stabilisierung der Liposomen durch Polyethylenglykolketten brachte jedoch bisher stets Verluste der Targetspezifität mit sich. Für spätere in-vivo-Versuche ist das Erreichen akzeptabler Zirkulationshalbwertzeiten der Immunliposomen an eine sterische Stabilisierung dieser verknüpft. Die Diskrepanz sollte durch den Einsatz eines neuen Kopplungsankers beseitigt werden. Die Umsetzung der erfolgreichen „PEG-ylierung“ ohne Verlust der Targetspezifität stellt heute eine Voraussetzung für eine spätere in-vivo-Anwendbarkeit liposomaler Transportsysteme dar.

Durch Bindungs- und Internalisierungsstudien sollten die Wechselwirkungen zwischen funktionalisierten Liposomen und Zellen des entzündeten Endothels näher charakterisiert werden. Dabei sollten neben der quantitativen Erfassung der Vorgänge auch die Aufklärung der Internalisierungsmechanismen durch die Zelle Beachtung finden. Mit dem Wissen der Aufnahmemechanismen könnten wiederum Rückschlüsse auf die Optimierung der liposomalen Trägersysteme gezogen werden. Darauf aufbauend sollte in einem weiteren Schritt die intrazelluläre Freigabe des Liposomeninhaltes verfolgt und optimiert werden (pH-sensitive Immunliposomen). Spätere Wirkstoffe im Inneren der Liposomen besäßen bei stabilen Formulierungen den Nachteil der Wirkungslosigkeit. Sie würden intrazellulär in den Lysosomen abgebaut werden. Um diesem lysosomalen Schicksal zu entgehen, sollte eine neue Lipidzusammensetzung getestet werden. Solche Liposomen würden in schwach saurer Umgebung instabil werden und somit ihren Inhalt freigeben. Intrazellulär wäre dies durch das Vorhandensein saurer Zellkompartimente möglich. In Versuchen sollte die Effizienz dieser pH-abhängigen Freigabe getestet werden.

Im Hinblick auf eine spätere Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie sollten als Arzneistoffe nicht nur bereits bekannte zugelassene Wirkstrukturen, sondern auch bisher nur in der Forschung eingesetzte Stoffe Anwendung finden. Der sich ständig weiterentwickelnde Bereich der Gentherapie als völlig neuer Therapieansatz vieler bisher nicht behandelbarer Erkrankungen sollte dabei berücksichtigt werden. Der limitierende Faktor für den Einsatz als „Arzneimittelfracht“ liposomaler Transportsysteme liegt in der Natur des Genmaterials. Plasmide als hocheffiziente „Wirkstoffe“ sind äußerst empfindlich gegenüber jeglicher physikalischer und chemischer

Beanspruchung. Deshalb darf es durch die Herstellungsprozedur der Liposomen und der späteren Funktionalisierung durch Antikörperkopplung nicht zu Strukturveränderungen der eingesetzten Plasmid-DNA kommen. In Anbetracht der entstehenden Kosten für eine solche Therapie muss auch gleichzeitig eine möglichst vollständige Verkapselung der eingesetzten Plasmide in die sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen garantiert sein. Der Beweis der vollen Wirksamkeit der eingeschlossenen Plasmid-DNA kann jedoch nur mit Hilfe von Transfektionsexperimenten erbracht werden. Deshalb sollten abschließend alle Ergebnisse im Rahmen von Transfektionsversuchen an den schwer transfizierbaren Endothelzellen Anwendung finden.

4.1. Charakterisierung der Liposomen

Im Hinblick auf ein erfolgreiches Drug Targeting stellen sich an ein liposomales System bestimmte Bedingungen. Für ein optimales Erkennen der Zielstrukturen auf der Oberfläche des entzündeten Endothels muss der gekoppelte Antikörper an den Liposomen gut positioniert sein. Die Kopplungsausbeute als Maß für die Anzahl der auf der Liposomenfläche befindlichen Antikörper stellt auch im Rahmen späterer Bindungsprozesse mit der Zelle eine wichtige Größe dar. Des Weiteren muss für ein neues liposomales Transportsystem auch der größtmögliche Durchtritt durch die Zellmembran gewährleistet sein. Deshalb wurde neben der Kopplungsausbeute auch die Größe der Liposomen näher charakterisiert.

Kopplungseffizienz:

Die vorgestellten Kopplungstechniken (Kapitel 3.2.2.) bewirken eine kovalente Anbindung der Antikörper an die Liposomenoberfläche. Die Auswahl der Antikörperkopplung über N-Glut-PE und Cyanur-PEG-PE hat gegenüber anderen Techniken den Vorteil, dass vorherige Derivatisierungsschritte der Antikörper entfallen können [Hansen et al. (1995)]. Beide Kopplungsmethoden unterscheiden sich grundlegend in der Anordnung der gekoppelten Antikörper auf der Liposomenoberfläche.

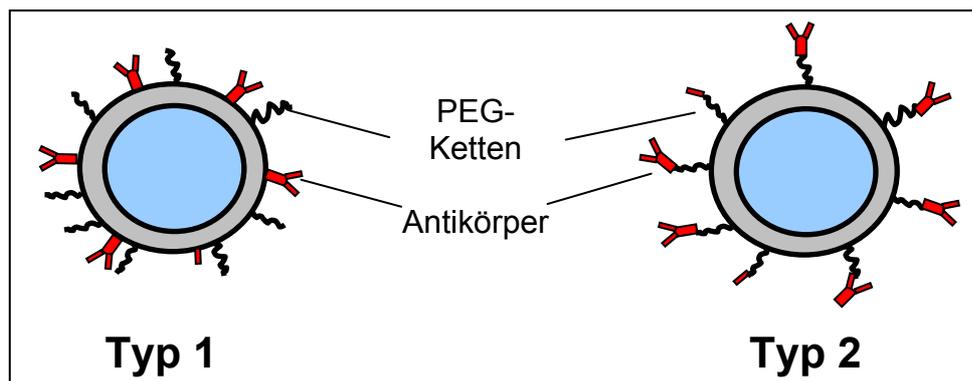


Abb. 3: Schematische Darstellung und Vergleich der Antikörper-Kopplung an Liposomen

Die über die Kopplungsmethode mit N-Glut-PE als Lipidanker hergestellten Immunoliposomen stellen den Typ 1 dar. Die Ausrichtung und Anbindung der Antikörpermoleküle wird innerhalb des Schemas sichtbar. Der Einsatz der Polyethylenglykolketten war für die Verlängerung späterer (bei einer in-vivo-Applikation der Liposomen) in-vivo-Zirkulationszeiten notwendig. Die Immunoliposomen vom Typ 2 entstehen bei der Verwendung von

Cyanur-PEG-PE als Kopplungsanker. Eine weitere sterische Stabilisierung ist in diesem Fall nicht notwendig, da der Anker innerhalb des Moleküls schon Polyethylenglykoleinheiten aufweist. Da beide Typen von Immunoliposomen durch unterschiedliche Lipidanker charakterisiert sind, wurden sie hinsichtlich ihrer Kopplungsrate gegenüber gestellt. Die Effizienz einer Proteinkopplungsmethode wird im liposomalen Bereich in μg Protein je μmol Phospholipid angegeben. In der Abbildung 4 sind die erreichten Kopplungsausbeuten dargestellt. Mit fast $60\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ zeigt der Anker N-Glut-PE deutlich seine Vorteile gegenüber dem Cyanur-PEG-PE. Die dort erreichten Kopplungsergebnisse von $42\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ liegen aber im Vergleich zu etablierten Methoden der Antikörperbindung immer noch in einem Bereich, der effektives Drug Targeting ermöglicht und Bindungsvorteile durch Antikörperinsatz zulässt. In der Darstellung wird auch die Abhängigkeit der Kopplungsausbeute an den Typ 1 Liposomen in Bezug auf gleichzeitig vorhandene PEG-Ketten sichtbar. Nach Einbau von 3mol% PEG-PE ist ein rascher Abfall der gebundenen Proteinmenge zu erkennen. Eine weitere Erhöhung der Polyethylenglykoleinheiten auf 5mol% des Gesamtlipidgehalts weist sogar eine Reduzierung anfänglicher Kopplungsmengen um bis zu 65% auf (von $58\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ohne PEG-PE auf $20\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ nach Einbau von 5mol% PEG-PE).

Die Notwendigkeit einer sterischen Stabilisierung wurde in ersten in-vivo-Versuchen mit Liposomen Ende der 80er Jahre deutlich. Konventionelle Liposomen erreichten maximale Halbwertszeiten von 1 Stunde [Senior (1987)]. Durch die sterische Stabilisierung mit Polyethylenglykol kommt es auf der Liposomenoberfläche zur Ausbildung einer Schutzschicht [Woodle et al. (1994)] und der damit verbundenen Halbwertszeitverlängerung. Ein Anteil von 5mol% PEG-PE zeigte dabei die besten Ergebnisse [Maruyama et al. (1991), Klibanov et al. (1991)] und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

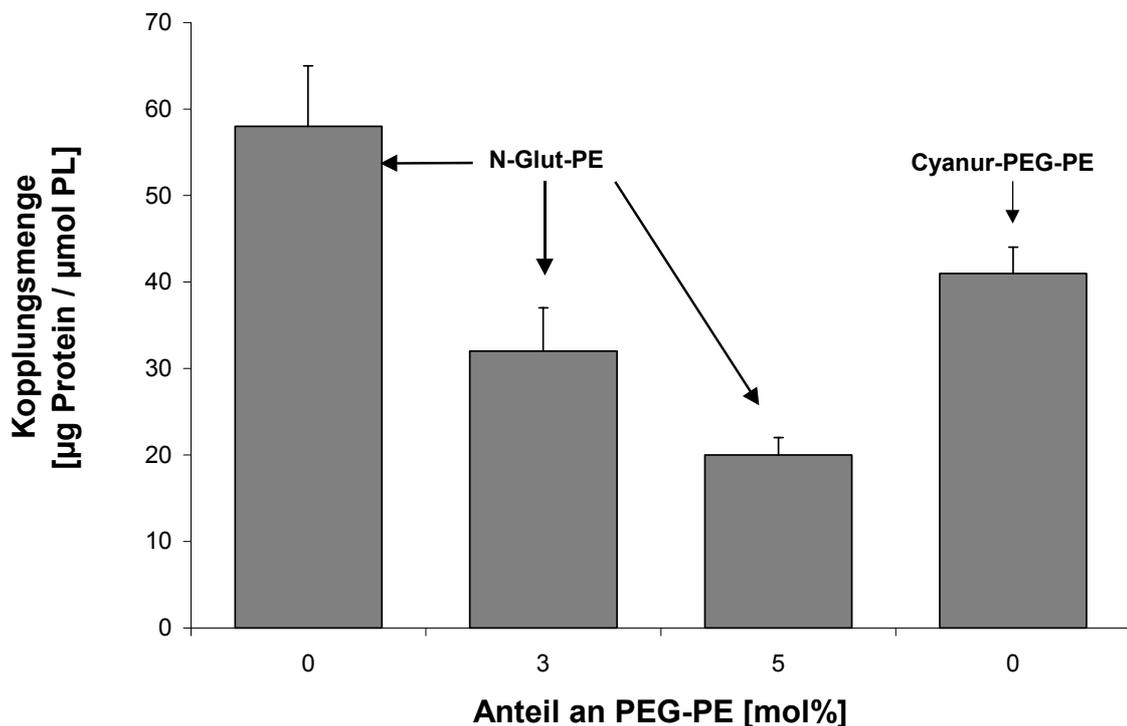


Abb. 4: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute in Anwesenheit von PEG-PE

Die eingesetzten 5mol% PEG-PE zeigen neben der deutlich sichtbaren Abnahme der Kopplungsmenge [Bendas et al. (1999)] auch noch einen weiteren Nachteil. Hinsichtlich der parallelen Anordnung von Antikörpermolekülen und Polyethylenglykolketten kommt es zu einer gewissen räumlichen Abschirmung der Antikörper. Die voluminösen und flexiblen

PEG-Ketten stehen späteren Bindungsprozessen womöglich entgegen. Durch die sterische Stabilisierung von Immunoliposomen des Typs 1 sind die Funktionen von Antikörpern sowohl quantitativ (Abnahme der Kopplungsmenge) als auch qualitativ (Behinderung der Bindungsbildung) beeinträchtigt. Der Einsatz neuer Kopplungsanker war nötig. Durch die Anwendung von Cyanur-PEG-PE konnten sterisch stabilisierte Immunoliposomen des Typs 2 hergestellt werden [Bendas et al. (1999)]. Dabei befindet sich der gekoppelte Antikörper an einer gut zugänglichen exponierten Lage. Die Kopplung an den PEG-Terminus führte neben einer verbesserten Antikörpererkenntlichkeit gleichzeitig zu einer höheren Antikörperflexibilität [Zalipsky (1993)], was bei schwach affinen Bindungsprozessen von Vorteil ist. Der Kopplungsanker Cyanur-PEG-PE vereint effektive Kopplungsraten von 40µg Protein/µmol Phospholipid mit Vorteilen der sterischen Stabilisierung ohne Kopplungs- bzw. spätere Bindungseinbußen herbeizuführen. Für ein Drug Targeting am entzündeten Endothel wurden sowohl N-Glut-PE mit 5mol% PEG-PE (25µg/µmol) als auch Cyanur-PEG-PE (40µg/µmol) getestet und gegenübergestellt.

Liposomengröße:

Im Hinblick auf ein erfolgreiches Drug Targeting am entzündeten Endothel muss die Größe der verwendeten Liposomen so gering wie möglich sein. Es ist bekannt, dass die Liposomengröße erheblichen Einfluss auf den Erfolg eines liposomalen Carrier-Systems besitzt. Die Menge der auf der Zelloberfläche gebundenen Immunoliposomen hängt von der Anzahl der gekoppelten Antikörper ab, das Ausmaß der Aufnahme der Liposomen steht jedoch im direkten Zusammenhang mit der Liposomengröße [Abra et al. (1981)]. In Bezug auf resultierende Liposomengrößen zeigten sich innerhalb der drei Herstellungsmethoden (Kapitel 3.2.1.) große Unterschiede auf. Die Hydratationsmethode brachte relativ große multilamellare Vesikel (MLV) hervor, deren Größenverteilungen sehr heterogen waren [Woodle et al. (1989)]. Um dennoch eine Größe von 100nm zu erhalten, mussten weitere Schritte folgen. Mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung [Huang (1969)] von 2 Minuten und entsprechender Eiskühlung konnten die anfänglichen Vesikelgrößen von 200nm bis 2µm auf ca. 150nm reduziert werden. Nachteilig wirkte sich aber immer noch die heterogene Größenverteilung der Präparation aus. Deshalb wurde eine Reduzierung der Liposomengröße durch Extrusion favorisiert. Das mehrmalige Hindurchpressen der Liposomen durch einen Membranfilter bestimmter Porengröße stellte eine mildere und sanftere Prozedur dar. Mit hohem Druck wurden die MLV durch einen Nucleopore[®] Membranfilter (Porengröße: 200nm, 100nm, 50nm) aus Polycarbonat gepresst. Die Liposomen zeigten danach eine enge Größenverteilung um 100nm.

Herstellungsart	Vesikelgröße [nm]
Hydratationsmethode	102±15
Phasenumkehrmethode (REV)	89±5
Detergenzmethode	56±6

Abb. 5: Abhängigkeit der Liposomengröße von der Herstellungsmethode

Für spätere Bindungsstudien stellte die Hydratationsmethode die Präparationstechnik der Wahl dar. Die Methode war technisch unkompliziert, robust und sicher in ihrer Durchführung. Die Phasenumkehrmethode brachte hinsichtlich der Vesikelgröße und der Größenverteilung der Liposomen Vorteile. Die Liposomen waren 90nm groß und wiesen innerhalb der PCS-Messungen einheitliche Populationen auf. Nachteilig wirkten sich der relativ hohe technische Aufwand und die Empfindlichkeit dieser Herstellungsmethode aus. Aus diesem Grund wurden nur Liposomen für spätere Freisetzungs- bzw. Fusionsuntersuchungen über die Phasenumkehrmethode hergestellt. Besonders bei ihnen war eine hohe Einschussrate der zu verkapselnden Stoffe (Calcein etc.) gewünscht. Raten von bis zu 10% [Szoka et al. (1978)] gegenüber 4% der Hydratationsmethode zeigten klare Vorteile. Die Detergenzmethode kam erst im Rahmen der Verbesserung des Einschusses von Plasmid-DNA in SPLP's (Kapitel 3.7.2.) zur Anwendung. Hier liegen die Lipide in einer hochkonzentrierten Detergenzlösung (0,2M Oktylglykosid) in mizellarer Form vor. Durch Dialysieren kam es zum Detergenzentzug und damit verbunden zum Wachsen der Mizellen. Durch Transformations- und Fusionsprozesse kam es zur Vesikelbildung, wobei durch die Intensität des Detergenzentzuges die resultierende Liposomengröße gesteuert werden konnte. Die Vesikel wiesen im Vergleich zu anderen Herstellungsmethoden die geringste Größe auf. Bei einer einheitlichen Größenverteilung innerhalb der PCS-Messungen waren die Liposomen im Durchschnitt nur 55nm groß.

4.2. In-vitro-Studien von Liposomen an Endothelzellen

Nachdem die Charakterisierung der Liposomen als Carriersystem in Bezug auf Vesikelgröße und Kopplungsausbeute erfolgte, muss nun die Aufklärung von Liposomen-Zell-Wechselwirkungen im Vordergrund stehen. Im Rahmen einer späteren therapeutischen Anwendung am entzündeten Endothel ist der maximale Transport von späteren Arzneistoffen in das Zytosol der Endothelzelle notwendig. Dabei sind folgende Interaktionen zwischen Liposom und Zelle möglich:

- Intermembrantransfer
- Kontaktabhängige Freigabe
- Bindung/Adsorption
- Internalisierung (Phagozytose/Endozytose)
- Fusion

Für die zur Anwendung kommenden sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen sind besonders zwei der Wechselwirkungen von Bedeutung. Durch die Funktionalisierung der Liposomenoberfläche mit monoklonalen Antikörpern wird der Bindungsvorgang der Liposomen innerhalb bestimmter Zielstrukturen auf der Zelloberfläche zunehmen. Studien an liposomal targetierten Zellen haben gezeigt, dass Fusions- und Intermembrantransferprozesse durch Bindungsvorgänge zurückgedrängt werden können und eine Internalisierung immer durch das Ausmaß der vorherigen Bindung begrenzt wird [Lee et al. (1992)]. Der limitierende Schritt bei der späteren Aufnahme von Arzneistoffen ist demnach die Bindungskapazität bzw. das Bindungsvermögen der jeweiligen Zielzelle. Deshalb sollte bei den Liposomen, die hier mit Anti-E-Selektin-Antikörpern gekoppelt sind, vorrangig der Bindungsvorgang untersucht werden. Da als Ziel ein anwendbares liposomales Carriersystem im Rahmen einer antiinflammatorischen Therapie formuliert wurde, musste im Anschluss daran das weitere Schicksal der gebundenen Liposomen untersucht werden. Die Aufklärung der Aufnahmemechanismen durch die Zelle steht hierbei im Vordergrund. In Bezug auf einen

späteren Einsatz können anschließend durch Kenntnis der Bindungs- und Internalisierungsraten Rückschlüsse auf eine Optimierung der pH-sensitiven Immunliposomen gezogen werden.

4.2.1. Bindungsuntersuchungen

Der Adsorptionsvorgang von Liposomen an der Zelloberfläche findet einerseits durch das Auftreten unspezifischer Adsorptionskräfte andererseits aber auch durch die Bindungsbildung zwischen Liganden auf der Liposomenmembran (Antikörper) und spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche statt. In Bezug auf Immunliposomen ist es eindeutig, dass die Adsorption der Liposomen nur durch eine vorherige Bindung an spezifische Zelloberflächenproteine erklärbar sein kann [Pagano et al. (1977)]. Für einen erfolgreichen Therapieansatz sollten deshalb die eingesetzten Liposomen gegenüber Endothelzellen höchstmögliche Bindungseigenschaften aufweisen. Im Rahmen einer Entzündung kommt es durch die körpereigene Immunabwehr zur Ausbildung bestimmter Oberflächenstrukturen. Das aktivierte Endothel exprimiert in diesem Zustand eine Reihe von Adhäsionsmolekülen. Die Gruppe der Selektine besitzt hier eine besondere Bedeutung, da sie schon in der Frühphase der Entzündung gebildet werden. Sie vermitteln die Leukozytenadhäsion am Endothel. Die zeitliche und örtliche Begrenzung ihrer Expressierung macht sie zu hervorragenden Zielstrukturen für ein liposomales Targeting in einer antiinflammatorischen Therapie. Durch die Anbindung spezifischer Anti-E-Selektin-Antikörper an die Liposomenoberfläche könnte damit der Adsorptionsprozess deutlich gesteigert werden. Durch Aktivierung der Endothelzellen mit Interleukin kann die Stimulation der Zelle und damit die Ausbildung des E-Selektins auf der Endotheloberfläche erreicht werden. Aus diesem Grund wurden alle Zellversuche an aktivierten (stimulierten) HUVEC durchgeführt. Um eine klare Differenzierung zwischen den Bindungs- und Aufnahmeprozessen von Liposomen durch die Endothelzelle zu erhalten, ist es nötig, die zellulären Aufnahmemechanismen zu unterbinden. Der Bindungsvorgang als Wechselwirkung zwischen Immunliposomen und Zelloberfläche stellt einen energieunabhängigen Vorgang dar. Für die Quantifizierung der Bindungsanteile müssen nun die äußeren Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass die Energieunabhängigkeit als Bindungsmerkmal ausgenutzt werden kann. Ein in-vitro-Versuch bei 4°C erfüllt diese Voraussetzung [Huang et al. (1983)]. Energieabhängige Aufnahmeprozesse finden dabei nicht statt und wirken bei der Erfassung der Bindungsereignisse deshalb nicht störend. Bindungsunterschiede bestehen auch in der Klassifizierung der Zellen während der Kultivierung. Zellen können während ihrer Kultivierung in adhärenente Zellen bzw. Zellen die in Suspension gehalten werden eingeteilt werden. Das Ausmaß von Bindungs- und Internalisierungsvorgängen ist ungeachtet aller anderen Faktoren bei adhärenenten Zellen deutlich erhöht. Es wird diskutiert, dass die adhärenent wachsenden Zellen mit der Ausbildung einer Monoschicht bis zum konfluenten Wachstum besser und mehr hochaffine Bindungsstellen auf ihrer Oberfläche exprimieren können, als dies bei Suspensionszellen der Fall ist [Lee et al. (1993)]. Da humane Endothelzellen nur in adhärenenter Form kultivierbar sind und dies auch deutlich stärker den physiologischen Gegebenheiten entspricht, ist hier ein klarer Vorteil gegenüber Suspensionszellen erkennbar.

In der Abbildung 6 werden mehrere Aussagen deutlich. Die Bindungsraten der beiden Typen von Immunliposomen (Typ 1 N-Glut-PE, Typ 2 Cyanur-PEG-PE) an stimulierten Endothelzellen sind annähernd gleich. Es bestehen auf keiner Seite Bindungsvorteile. Der Vorteil des Typs 2 wird aber nach Einbau von 5mol% PEG-PE im Typ 1 sichtbar. Bei den verwendeten Liposomen vom Typ 1 wird unabhängig vom Antikörperstatus (ungekoppelt, unspez. Antikörper gekoppelt, Anti-E-Selektin-Antikörper gekoppelt) nach einer sterischer

Stabilisierung eine deutliche Abnahme der Bindungsereignisse sichtbar. Dieses Phänomen wurde auch in Studien beschrieben [Vertut-Doi et al. (1996), Slepushkin et al. (1997), Spragg et al. (1997)].

In den Untersuchungen sind abhängig von den eingesetzten Volumenanteilen an PEG-PE innerhalb der Liposomenmembran die Bindungen auf bis zu 30% des Normalwertes zurückgegangen (10mol% PEG-PE). Typisch sind auch die in der Abbildung 6 dargestellten maximalen Abnahmen der spezifisch gekoppelten Immunoliposomen. Dort fand eine Reduzierung von 40% gegenüber den PEG-freien Immunoliposomen mit N-Glut-PE statt.

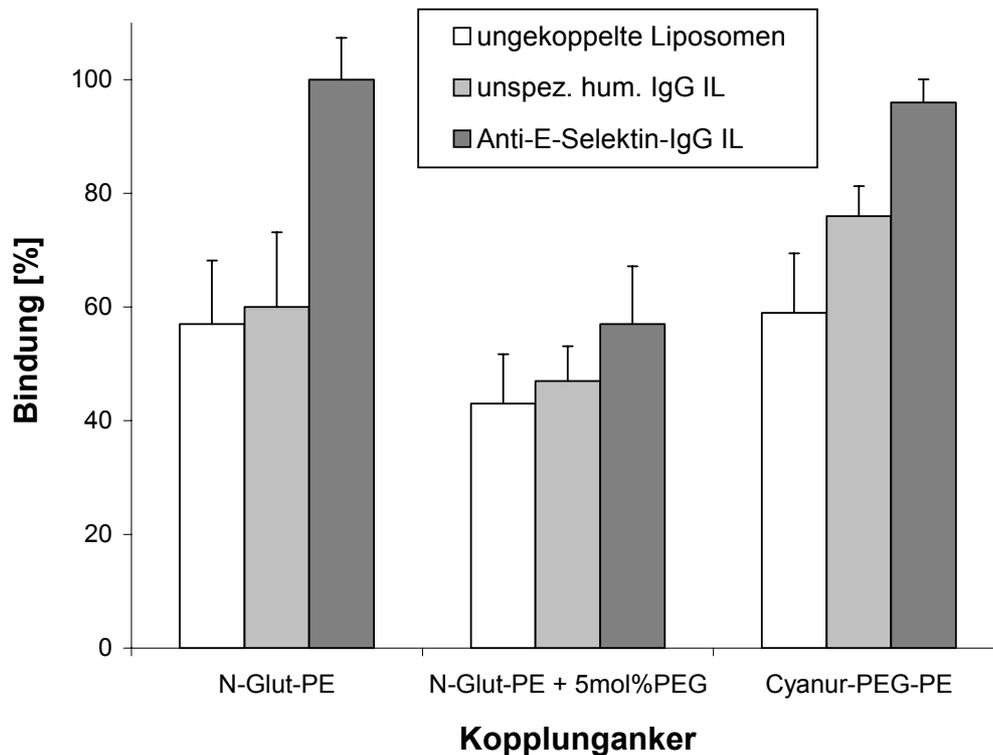


Abb. 6: Abhängigkeit der Bindungsereignisse zw. Liposomen und stimulierten HUVEC von der Art des eingesetzten Kopplungsankers und Antikörpers

Bei den ungekoppelten Liposomen und den Immunoliposomen mit den unspezifisch gerichteten Antikörpern trat diese Abnahme nur in einer Größenordnung von max. 15% auf. Die Ursache dafür liegt in der sterischen Abschirmung der spezifischen Antikörper durch die PEG-Ketten (Immunoliposomen Typ 1). Die Bindungsereignisse der spezifisch gekoppelten Immunoliposomen werden am stärksten durch den PEG-Anteil gestört, da dort der Kontakt zur Zelloberfläche durch Ausbildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes stattfindet. Dies bedingt eine spezifische Oberflächenstruktur, die durch die störenden PEG-Ketten (TYP 1) in ihren Eigenschaften verändert wird [Vertut-Doi et al. (1996)]. Dadurch ist der Erkennungsvorgang erschwert und Bindungsprozesse laufen vermindert ab. Innerhalb der Bindungsstudien ist weiterhin deutlich geworden, dass ein Großteil der Bindungen spezifischer Natur ist. Unabhängig vom verwendeten Lipidanker und PEG-Einsatz sind die Immunoliposomen mit dem spezifisch gerichteten Antikörper den anderen beiden Liposomenarten um bis zu 45% überlegen. Besonders bei den zielgerichteten Immunoliposomen ist jedoch aber die Abnahme der Bindung durch die sterische Stabilisierung am stärksten. Die Spezifität der Bindung innerhalb der Immunoliposomen wurde durch ein

weiteres Experiment belegt. Eine identische Versuchsdurchführung wurde deshalb an unstimulierten Endothelzellen durchgeführt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse. Dabei stellte sich heraus, dass der erhöhte Bindungsanteil der spezifisch gerichteten Immunliposomen fast gänzlich verschwand. Er betrug nur noch 10%. Diese Abnahme zeigte eindeutig die zwingende Notwendigkeit des Vorhandenseins von E-Selektin auf der Oberfläche der Endothelzellen, um ein erfolgreiches Drug Targeting erreichen zu können.

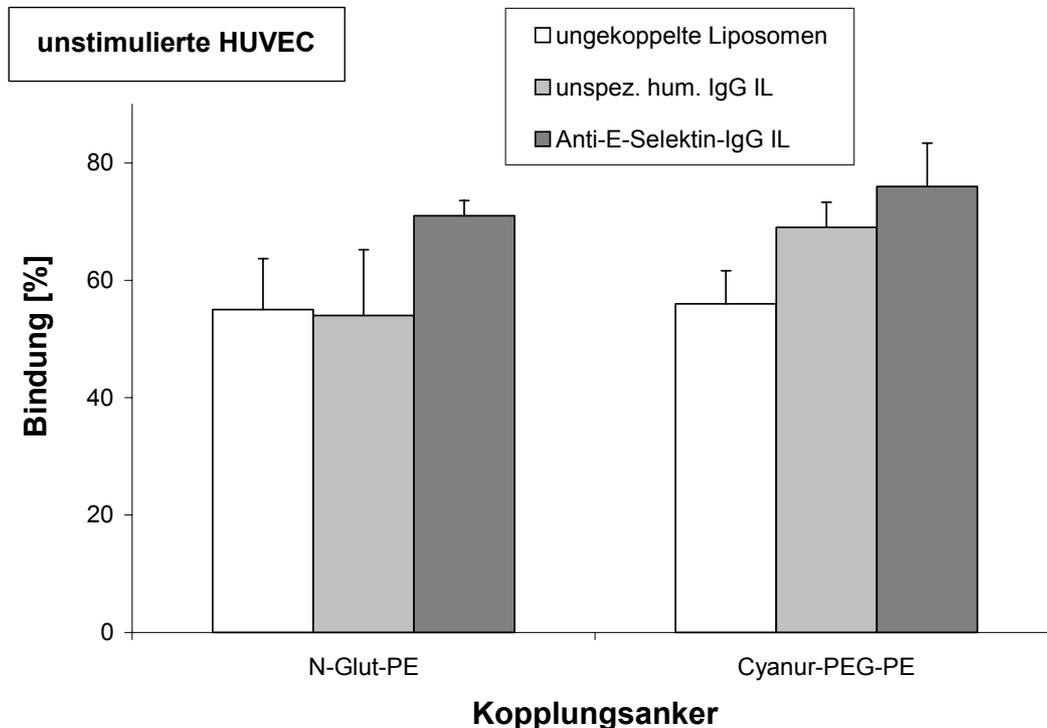


Abb. 7: Abhängigkeit der Bindungsereignisse zw. Liposomen und unstimulierten HUVEC von der Art des eingesetzten Kopplungsankers und Antikörpers

Ein weiterer Beweis dafür, dass die erhöhten Bindungsanteile der spezifisch gerichteten Immunliposomen direkt von der Anwesenheit des E-Selektins auf der Endothelzelloberfläche abhängig sind, zeigen Bindungsversuche in Anwesenheit freier E-Selektin-Antikörper. Dazu wurde der spezifische monoklonale Antikörper Anti-Human-E-Selektin (mAB-BBA 26) den Zellen innerhalb einer Vorinkubation von 30 Minuten zugesetzt (50µg/ml). Danach schloss sich ein normaler Bindungsversuch an. Auch bei dieser Durchführung ging der Bindungsvorteil der spezifisch gekoppelten Immunliposomen nahezu verloren. Die Bindungsstelle auf der Zellmembran für die gekoppelten Antikörper der Immunliposomen ist durch den zugegebenen freien Antikörper schon besetzt gewesen [Spragg et al. (1997)]. Bei den ungekoppelten Liposomen kam es trotz der Vorinkubation mit freiem Antikörper nicht zu einer Veränderung der Bindungswerte (nicht dargestellt). Die besseren Bindungsergebnisse der spezifisch gerichteten Immunliposomen sind somit auf Zielorientiertheit und Aktivierungsstatus zurückzuführen.

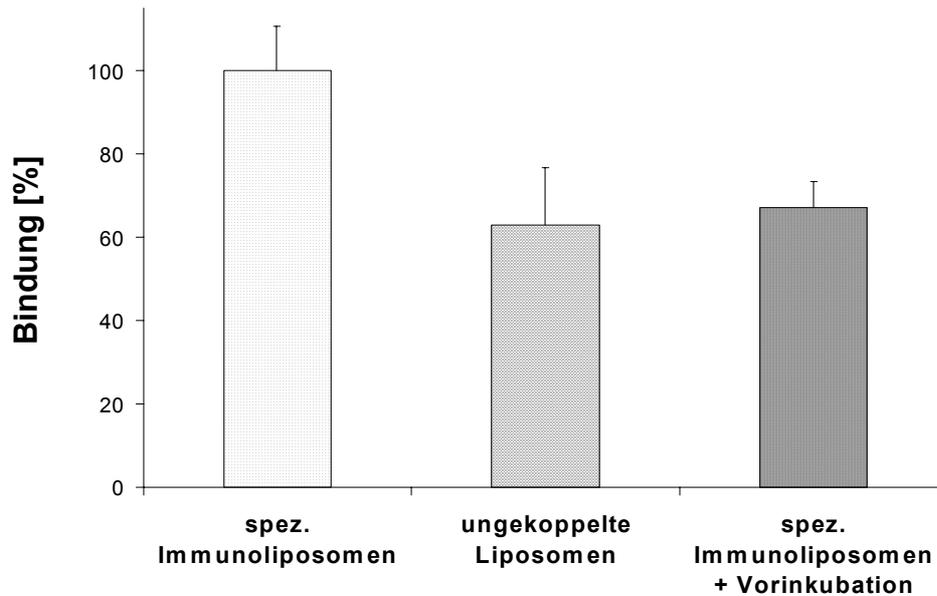


Abb. 8: Abhängigkeit der Liposomenbindung von der Anwesenheit freier Antikörper

Des Weiteren sollte der Einfluss der Inkubationszeit, der zugegebenen Liposomenmenge und des FKS-Status der Zellen auf Bindungsprozesse hin untersucht werden. Für die Ermittlung der Mengenabhängigkeit wurden die Zellen jeweils mit unterschiedlichen Mengen Immunoliposomen inkubiert. Der Bereich der zugegebenen Volumina erstreckte sich von 5 μ l bis 80 μ l pro well, was einem Lipidgehalt von 10 bis 160nmol Lipid entsprach.

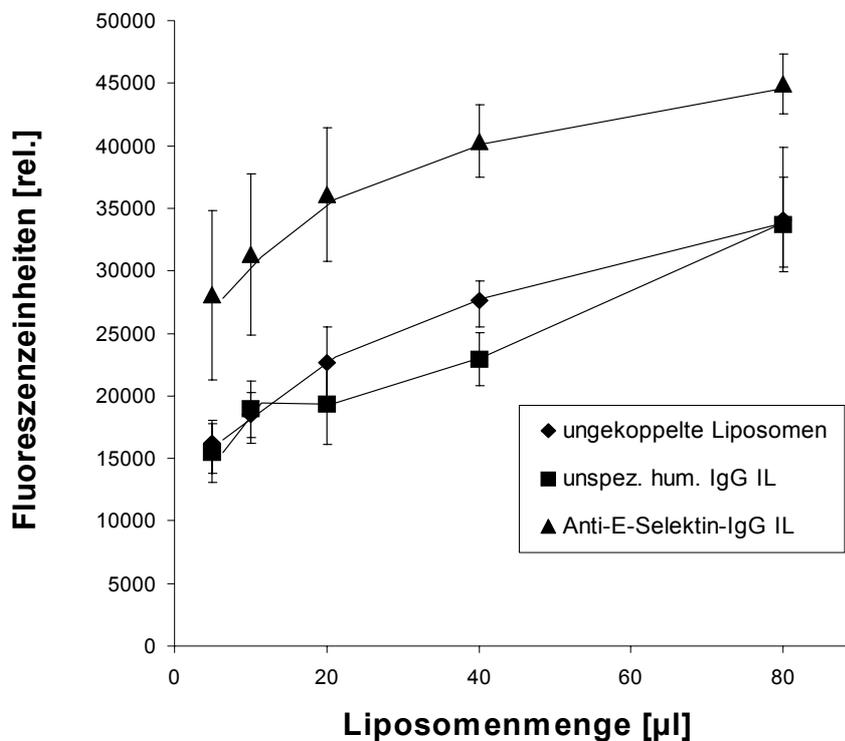


Abb. 9: Abhängigkeit der Bindung von der zugesetzten Liposomenmenge

In obiger Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzwerte als Merkmal der Bindungsstärke mit zunehmender Liposomenmenge nur geringfügig zunehmen. Eine kontinuierliche Steigerung ist zu erkennen, doch steht diese nicht im Verhältnis zu der dafür erforderlichen Liposomenmenge [Mastrobattista et al. (1999)]. So bewirkt eine Erhöhung der Liposomenmenge um den Faktor 8 im Durchschnitt nur eine Steigerung der Bindung um den Faktor 1,5 bis 2. Diese Diskrepanz lässt sich mit der begrenzten Anzahl von Oberflächenrezeptoren erklären. Ab einer gewissen Konzentration liposomal gebundener Anti-E-Selektin-Antikörper bewirkt eine zusätzliche Erhöhung keine weiteren Bindungsereignisse mehr. Die absolute Menge assoziierter Liposomen wächst dann durch unspezifische Bindung nur noch geringfügig. Aus diesem Grund haben wir für spätere Versuche nur noch 25µl Liposomen-suspension pro well eingesetzt. Das entsprach 50nmol/20000 HUVEC, was bei einer Liposomengröße von 70nm einer Anzahl von 7×10^{11} Liposomen bzw. $3,5 \times 10^7$ Liposomen pro Zelle gleichkommt. Ein weiterer Betrachtungspunkt des Bindungsvorganges war die Ermittlung der Inkubationszeit, die die höchsten Bindungsraten hervorbringt. Dazu wurden alle anderen Faktoren (Liposomenmenge, Art des Kopplungsankers etc.) konstant gehalten und die Inkubationszeit von 15 bis 60 Minuten variiert. Hier konnte deutlich erkennbar nachgewiesen werden, dass der Bindungsvorgang schnell abläuft. Eine Verlängerung des Inkubationszeitraumes brachte bei keiner Liposomenart Vorteile. Im Vergleich zu den assoziierten Anteilen nach 15 Minuten betrug die maximale Bindungssteigerung nach 60 Minuten nur geringe 8% (nicht dargestellt). Eine Verlängerung der Inkubationszeit würde nur in Kombination mit Internalisierungsprozessen Wirkung zeigen, da dann wieder freie Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche für neue Bindungsereignisse zur Verfügung stehen würden.

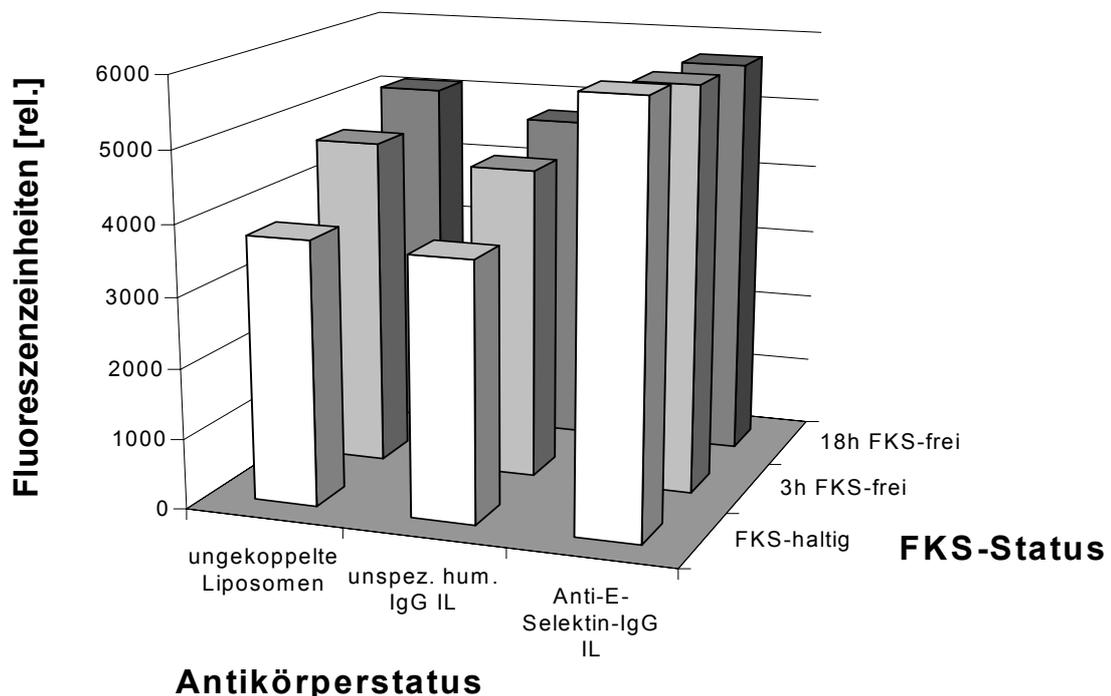


Abb. 10: Abhängigkeit der Liposomenbindung vom FKS-Status der Endothelzellen

Wie in obiger Abbildung 10 zu erkennen ist, sollte als ein letzter Punkt der Betrachtungen die Abhängigkeit des zellulären Bindungsvermögens in Bezug auf den FKS-Status untersucht werden. Die Begründung dafür liegt in der häufig schlechten Überein-

stimmung von in-vitro-Daten gegenüber später ermittelten in-vivo-Ergebnissen. Viele Bindungs- und Internalisierungsergebnisse basieren auf Versuchsanordnungen, die die Zellen in serumfreier Umgebung zeigten. Der Zustand einer Zelle entspricht aber dort nicht den späteren in-vivo-Bedingungen. Innerhalb eines serumfreien Zeitraumes verändert die Zelle ihre Stoffwechselaktivität. Sie gerät sozusagen in einen „Hungerzustand“. Zellen, die sich in einem solchen serumfreien Status befinden, weisen stark veränderte Bindungs- und Aufnahmekapazitäten auf, was in Abb. 10 gut zu erkennen ist. Als deutlichste Veränderung ist erkennbar, dass sich die Bindungsraten aller Liposomenarten anzugleichen versuchen. Die ungekoppelten Liposomen werden von den „FKS-freien“ Zellen um bis zu 30% verstärkt adsorbiert. Die spezifischen Bindungsprozesse gehen dagegen etwas zurück. Erklärbar ist dies mit der aktuellen Stresssituation, in der sich die Zelle befindet. [Hoekstra et al (1981)]. Sie ist bestrebt, soviel Nährstoffe wie nur irgend möglich aufzunehmen und geht dabei verstärkt den Weg der unspezifischen Aufnahme. Der Nachteil, der dadurch für die Immunliposomen sichtbar wird, hebt sich jedoch auf, da in späteren in-vivo-Experimenten am entzündeten Endothel ohnehin kein serumfreier Zustand herrscht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindungsraten der spezifisch gerichteten Immunliposomen am höchsten sind. Der Bindungsanteil dieser Immunliposomen wurde jeweils als 100% Standard gesetzt. Von den zugesetzten Liposomen ($50\text{nmol}=3,5 \times 10^7$ pro HUVEC) konnten dabei ca. 8800 gebundene Vesikel pro Zelle festgestellt werden. Die Überlegenheit der spezifisch gegen das E-Selektin gerichteten Immunliposomen gegenüber ungekoppelter Liposomen bzw. unspezifisch gerichteter Immunliposomen bleibt im Vergleich zu anderen Studien [Bloemen et al. (1995)] jedoch auf einem relativ niedrigen Niveau. Der Bindungsvorgang ist nur zu geringen Anteilen dosis- und zeitabhängig. Deutlicher wird die Abhängigkeit in Bezug auf eine sterische Stabilisierung der Liposomen. Die Abnahme ist hier besonders im Bereich der Immunliposomen vom Typ 1 groß, was für die Anwendung der Immunliposomen des Typs 2 spricht. Essentiell für das Erreichen eines Bindungsvorteils ist und bleibt der Stimulus durch IL-1 β . Ohne diesen Reiz bleibt die Expressierung des E-Selektins auf der Oberfläche der Endothelzellen aus und jegliche Spezifität ist gegenstandslos. Für ein Erfolg versprechendes liposomales Transportsystem sind demnach mehrere Bedingungen ableitbar. Die Anbindung der Liposomen an die Zelloberfläche stellt den ersten Schritt für eine spätere therapeutische Wirkung dar. Um diesen so effizient wie möglich zu gestalten, müssen die Liposomen funktionalisiert werden. Durch die Kopplung spezifischer Antikörper an die Liposomen, die einen Bindungsprozess zwischen Liposom und Endothelzelle nur im entzündeten Gebiet gestatten, kann ein liposomales System geschaffen werden, das an Quantität und Selektivität kaum zu übertreffen ist. Die Immunliposomen vom Typ 2 besitzen gleichzeitig die erforderliche sterische Stabilisierung für einen späteren in-vivo-Einsatz.

4.2.2. Internalisierungsuntersuchungen

Für eine potentielle therapeutische Anwendung der targetierten Liposomen ist es erforderlich, das Verhalten der Liposomen nach der Bindung aufzuklären. Ein erfolgreiches Targeting allein bewirkt noch keinen therapeutischen Effekt. Die mögliche Liposomenaufnahme durch die Endothelzellen ist anzustreben, da nur dadurch die späteren Wirkstoffe in das Zellinnere gelangen können. Ein Ansatz in der Behandlung entzündlicher Prozesse mittels liposomaler Systeme schließt deshalb die Kenntnis der Aufnahmemechanismen durch die Endothelzelle ein. Hierbei bildet neben der Ermittlung der Aufnahmeprozesse durch die Zelle auch die quantitative Analyse dieses Vorganges einen Schwerpunkt der folgenden Arbeiten. Die Charakterisierung der Aufnahmemechanismen und die Ermittlung der tatsächlich

internalisierten Liposomenmenge durch die Zelle sind essentiell, da nur mit ihnen belegbare Aussagen über eine spätere Wirkung erstellt werden können. Wirksam ist immer nur der erfolgreich aufgenommene Liposomenanteil, da nur er dem zellulären Stoffwechsel zur Verfügung stehen kann.

4.2.2.1. Quantitative Studien

Für die Quantifizierung des Internalisierungsvorganges wurde die Dithionit-Methode angewendet. Diese im Kapitel 3.5.1. vorgestellte Technik erlaubt es, nur den tatsächlich im Zellinneren vorliegenden Liposomenanteil zu erfassen. Basis dieses Assays ist der Fluoreszenzfarbstoff NBD (7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl). In dieser Form vorliegend stellt er ein starkes Fluorophor dar. Mit Natriumdithionit reagiert das NBD und wird dabei zum nicht-fluoreszierenden ABD (7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) reduziert. Da das NBD in Form eines Phosphatidylethanolamins erhältlich ist (NBD-PE), konnte es ohne Schwierigkeiten in die Liposomenmembran eingebaut werden. Die chemische Grundlage der Methode ist die in Abbildung 11 dargestellte Reduktion der Nitroverbindung zur korrespondierenden Aminoverbindung.

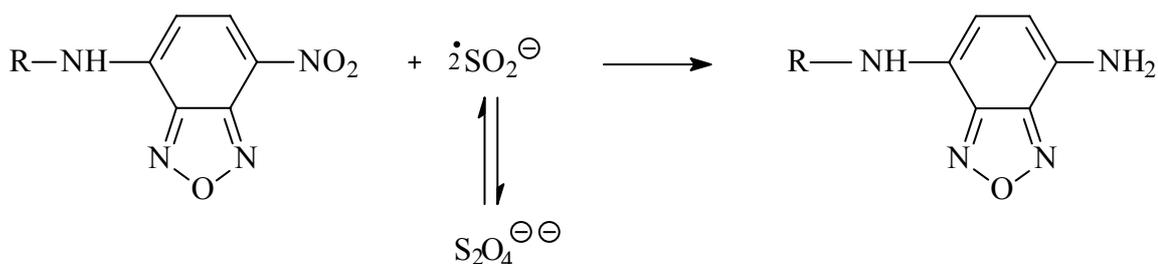


Abb. 11: Dithionit-vermittelte Reduktion des 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl zum 7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl

Dabei wird deutlich, dass die elektronenziehenden Effekte der Nitrogruppe während der Reaktion verloren gehen. Diese Eigenschaft fördert aber die Delokalisierung der π -Elektronen im konjugierten Ringsystem und ist für ein Fluoreszenzsignal unentbehrlich. Dies hat zur Folge, dass die gebildete Aminoverbindung keine Fluoreszenzeigenschaft mehr aufweist. Während der Reaktion liegt das Dithionit-Ion (S₂O₄²⁻) im Gleichgewicht mit dem SO₂^{•-}-Radikal vor. Das Radikal ist ein Reaktionszwischenprodukt innerhalb dieser Nitroreduktion [Wasmuth et al. (1964), Gutch et al. (1966)]. Da sowohl das Ion als auch das Radikal eine Ladung tragen, sind beide nicht in der Lage durch die Lipidbilayer und damit durch Membranen zu permeieren [McIntyre et al. (1991)].

Die hier vorgestellte Technik findet breiten Einsatz in der Erforschung von asymmetrischen Membranverteilungen innerhalb der Phospholipide der Lipidbilayer. Erwähnt werden muss auch die Tatsache, dass die Reduktion durch Dithionit nicht die Strukturen und damit die Eigenschaften von vorhandenen Proteinen beeinflusst [McIntyre et al. (1990)]. Eine Differenzierung zwischen zellinternalisierten und oberflächlich gebundenen Liposomen ist aufgrund der Ladung des Dithionits und der asymmetrisch fluoreszenzgelabelten Liposomen möglich. Dafür mussten die Liposomen nach einer gesonderten Herstellungsverfahren mit dem Fluoreszenzfarbstoff versetzt werden. Mit Hilfe der Ethanolinjektionsmethode (Kapitel 3.2.4.2.) entstanden so genannte „outside only“-gelabelte Vesikel, wobei der Fluorophor nur

in der äußeren Monolayer integriert wurde. Die auf der Außenseite der Liposomen befindlichen fluoreszierenden NBD-PE-Moleküle waren für gelöstes Dithionit sehr leicht zugänglich. Falls sich Farbstoffmoleküle in der inneren Monolayer der Liposomen befinden würden, wären diese für Dithionit nicht erreichbar. In gleicher Weise stellte auch die Zellmembran als Lipidbilayer eine solche Barriere dar und lässt das geladene Dithionit nicht hindurch. Nach einer Inkubation der aktivierten Endothelzellen mit asymmetrisch markierten Immunliposomen und einer anschließenden Dithionitbehandlung verloren nun die gebundenen Liposomenanteile ihre Fluoreszenzeigenschaften, währenddessen sich die NBD-PE-Moleküle der Außenmonolayer der internalisierten Liposomen noch fluorimetrisch erfassen lassen.

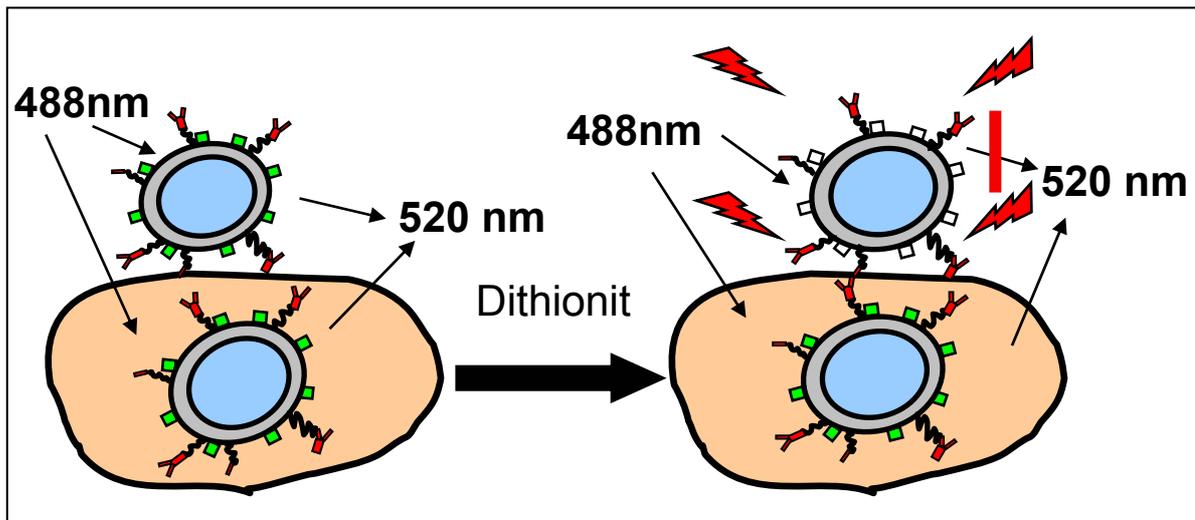


Abb. 12: Unterscheidung zwischen gebundenen und internalisierten Liposomen durch Dithionit-Technik

Anhand der Abbildung 12 soll dieser Internalisierungsassay noch einmal vereinfacht dargestellt werden. Eine Quantifizierung lässt sich daraus ableiten, indem man die Fluoreszenzwerte vor und nach Dithionitzugabe vergleicht und dementsprechend die prozentualen Internalisierungsraten berechnet. In einer Studie von McIntyre [McIntyre et al. (1991)] wurde eine Zytotoxizität von Dithionit in einem Konzentrationsbereich bis 100mM ausgeschlossen. Es wurde dort stets mit einem 100000-fachen Überschuss an Dithionit gegenüber NBD gearbeitet. Der Überschuss muss in einer gewissen Größenordnung gewährleistet sein, da nur so die komplette Fluoreszenzauslöschung aller auf der Zelloberfläche befindlichen NBD-Moleküle durch gebundene Liposomen garantiert werden kann. Es sollte nun innerhalb eines Vorversuches gezeigt werden, dass ein Überschuss von 50000 für eine komplette Reduktion des zur Verfügung stehenden NBD ausreichend ist. Getestet wurden je 50nmol Liposomen. Gleichzeitig sollte die Zeitabhängigkeit der Reduktion kontrolliert werden, um für spätere in-vitro-Versuche die idealen Inkubationsbedingungen zu kennen. Es wurde mit einem Dithionitüberschuss von 50000, 100000 und 150000 über einen Zeitraum von 5 Minuten gearbeitet, wobei die Fluoreszenz aller 30 Sekunden bestimmt wurde. Da Dithionit innerhalb saurer pH-Werte einer spontanen Zerstörung unterliegt, befand sich die verwendete Dithionitlösung in einer gepufferten Lösung von pH 10.

Aus den in der Abbildung 13 dargestellten Kurven lassen sich folgende Schlüsse ziehen. Bei allen drei gewählten Verhältnissen zwischen NBD und Dithionit kommt es zur fast vollständigen Fluoreszenzauslöschung. Die Abnahme verlief innerhalb kürzester Zeit, so dass

eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Dithionit keinen Vorteil brachte. Innerhalb der ersten 2 Minuten kam es zu einer nahezu 80%-igen Reduzierung der Ausgangsfluoreszenz. Weitere 3 Minuten ließen diesen Anteil auf maximal 90% ansteigen. Die Einteilung der Reaktion in eine schnell und eine langsam ablaufende Phase wurde in anderen Studien unternommen [McIntyre et al. (1991)]. Gründe dafür waren einerseits die erste schnelle Reduktionsphase, in der die Fluoreszenz der Farbstoffmoleküle innerhalb der Außenmonolayer der Liposomen sofort gelöscht wurden und andererseits die langsam verlaufende Reaktion der Dithionitpassage durch die Lipidmembran hindurch zur inneren Monolayer.

Dort sollten sich normalerweise keine NBD-Moleküle befinden. Durch den permanent stattfindenden intermembranären Lipidaustausch kommt es aber auch zur Lokalisierung von Fluorophoren innerhalb der Innenmonolayer. Der Flip-Flop-Mechanismus ist bekannt und nimmt mit steigender Temperatur zu. Um den absoluten Betrag an NBD in der inneren Phospholipidschicht so gering wie möglich zu halten, wurden die Liposomen erst kurz vor Versuchsbeginn hergestellt und sofort weiterverwendet. Bei Wartezeiten bis zum Zell-experiment wurden die Liposomen im Kühlschrank aufbewahrt.

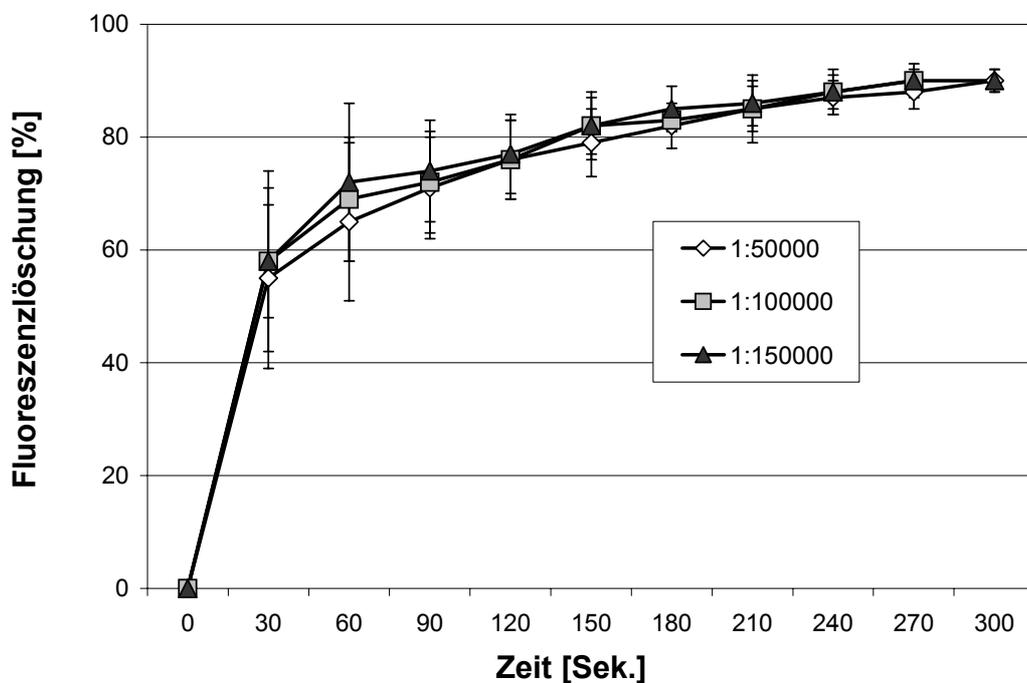


Abb. 13: Zeitabhängigkeit der NBD-Fluoreszenzlöschung durch Dithionit

Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde ein Verhältnis von 1:50000 gewählt. Ein Überschuss an Dithionit war auch aus dem Grund garantiert, da bisher davon ausgegangen wurde, dass alle zugesetzten Liposomen an der Zelloberfläche haften bleiben (komplette 50nmol) würden. Aus den vorangegangenen Bindungsstudien war aber bekannt, dass nur etwa 0,025% der zugesetzten Liposomen wirklich eine Bindung eingingen. Deshalb war an dieser Stelle noch einmal ein Überschuss um den Faktor 4000 gegeben, da der Großteil der Liposomen nach der Inkubation für die Bindung bei 4°C und vor der Inkubation für die Internalisierung bei 37°C abgespült wurde. Anschließend konnte mit den eigentlichen Internalisierungsuntersuchungen begonnen werden. Dazu wurden die Liposomen wieder mit unterschiedlichen Antikörpern funktionalisiert. Die Gegenüberstellung erfolgte analog den Bindungsstudien. Wie im Dithionit-Vorversuch erwähnt, wurden die Endothelzellen mit den

Liposomen bei 4°C für stattfindende Bindungsprozesse inkubiert. Entsprechend der geringen Zeitabhängigkeit (Kapitel 4.2.1.) wurde diese Inkubation nach 30 Minuten abgestoppt. Nach dem Abspülprozess nichtassoziierter Anteile wurde im Brutschrank weiter inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde die Fluoreszenz das erste Mal gemessen. Der so ermittelte Liposomenanteil setzte sich aus assoziierten und internalisierten Liposomen zusammen. Um den gebundenen Anteil zu eliminieren, wurde nun die Dithionit-Technik angewendet. Zugegebenes Dithionit reduzierte alle frei zugänglichen Farbstoffmoleküle. Die oberflächlich gebundenen Immunliposomen mit ihren in der Außenmonolayer verteilten NBD-Anteilen wurden deshalb in ihrer Fluoreszenz gelöscht. Die zweite Fluoreszenzmessung symbolisierte den aufgenommenen Anteil an Immunliposomen. In der Abbildung 14 sind diese Internalisierungsraten dargestellt.

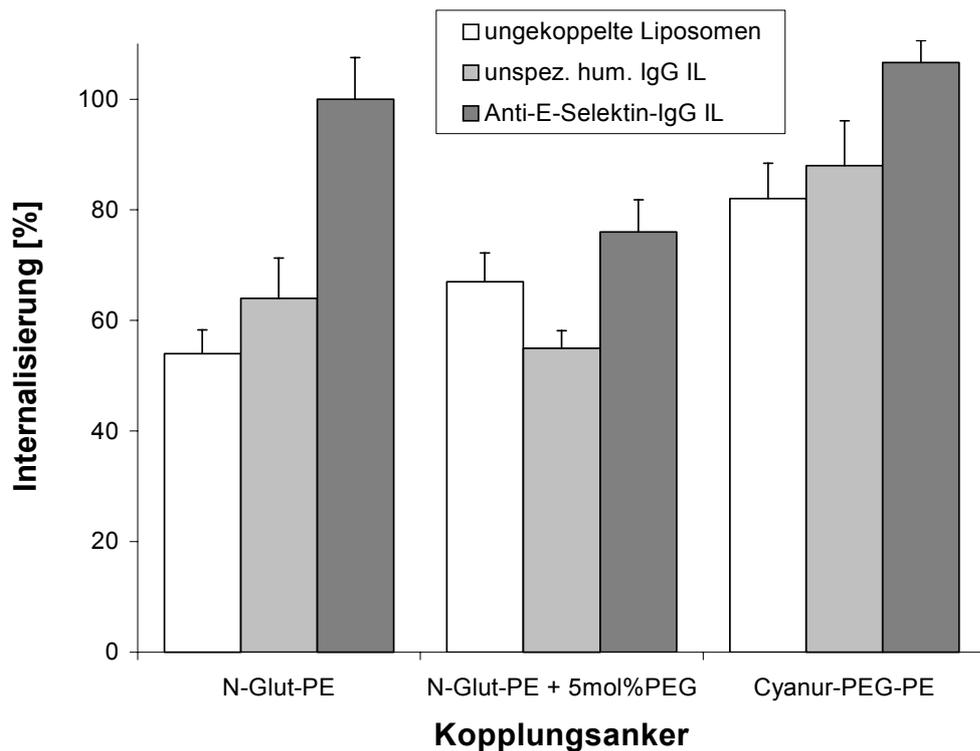


Abb. 14: Abhängigkeit der Internalisierung von Kopplungsanker und Antikörper

Wenn man diese Ergebnisse mit den Bindungsraten in Abbildung 6 vergleicht, so sind in der Grundtendenz keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen. Das Verhältnis untereinander bleibt bestehen (spez. Immunliposomen mit N-Glut-PE = 100%). Aus diesen Erkenntnissen kann geschlussfolgert werden, dass sich das reine Internalisierungsverhalten der Endothelzellen gegenüber den Liposomen nicht verändert. Die quantitative Aufnahme ist vom eingesetzten Kopplungsanker und Antikörper unabhängig für alle Liposomen nahezu gleich. Die hier erkennbaren Aufnahmeunterschiede resultieren aus den vorher stattgefundenen Bindungen. Im Vergleich zur quantitativen Erfassung der Bindungsereignisse konnte eine insgesamt 25%-ige Aufnahme der gebundenen Immunliposomen festgestellt werden. Das bedeutet, dass von den 8800 gebundenen Immunliposomen 2200 Vesikel das Innere einer jeden Endothelzelle erreicht haben. Eine spätere therapeutisch angestrebte Wirkung kann nur von diesem Anteil ausgehen.

Aus den Aufnahmeversuchen wird weiterhin deutlich, dass die Kopplung eines Antikörpers an ein Liposom keinen Aufnahmevorteil bewirkt. Das spricht gegen eine aktive

Beteiligung des IgG innerhalb des Internalisierungsprozesses und der vermuteten Internalisierungsrolle des Fc-Rezeptors [Pan et al. (1999)]. Damit wird auch klar, dass das E-Selektin keine Rolle als möglicher Internalisierungsfaktor besitzt. In welchem Ausmaß Immunoliposomen internalisiert werden, hängt hier von anderen Faktoren ab. So haben auch Liposomengröße [Daleke et al. (1990)], Lipidzusammensetzung [Spragg et al. (1997)], Zelltyp [Lee et al. (1993)] und Zielrezeptor [Vingerhoeds et al. (1996)] entscheidenden Einfluss auf die Internalisierungsausmaße. Mit der hier durchschnittlich erreichten 25%-igen Internalisierung zeigten die HUVEC noch ein durchaus akzeptables Aufnahmeverhalten. Die Aufnahmeraten vieler Krebszelllinien sind bedeutend höher. Auch Versuche an bronchialen Epithelzellen mit Immunoliposomen gerichtet gegen ICAM-1 zeigten eine Internalisierung von bis zu 60% und liegen damit im höchsten Aufnahmebereich [Mastrobattista et al (1999)].

Mit der Erkenntnis, dass ca. 25% aller gebundenen Liposomen durch die Endothelzellen internalisiert werden, kann man trotzdem von einer „E-Selektin“-vermittelten Aufnahme sprechen. Begründet werden kann diese Aussage mit den schon erläuterten Bindungsvorteilen innerhalb der spezifisch gerichteten Immunoliposomen gegenüber unfunktionalisierter Liposomen. Die Rolle des E-Selektins wird in der quantitativen Betrachtung der Internalisierung nicht deutlich. Unterschiede in der selektinvermittelten Aufnahme sind aber in den folgenden qualitativen Untersuchungen erkennbar gewesen.

4.2.2.2. Qualitative Studien

Um die Bedeutung des E-Selektins für eine therapeutische Anwendung komplett erfassen zu können, musste auch dessen Einfluss auf den zellulären Aufnahmemechanismus für selektingerichtete Immunoliposomen betrachtet werden. Weitere Studien im Rahmen der liposomalen Aufnahme durch HUVEC sollten deshalb der Aufklärung zellulärer Internalisierungsmechanismen dienen. Bereits in der Mitte der 70er Jahre wurden erste Aufnahmestudien durchgeführt [Poste et al. (1976)]. Die zellulären Aufnahmemechanismen können grundsätzlich in zwei große Bereiche eingeteilt werden. Einerseits kann die Zelle durch passive Prozesse (Fusion) Stoffe von außen aufnehmen, andererseits ist es ihr über energieabhängige aktive Prozesse möglich, Stoffe gezielt in das Zellinnere aufzunehmen. Dazu zählen Prozesse wie Phagozytose, Pinozytose und „coated pit“-Endozytose. Die Pinozytose (Aufnahme gelöster Stoffe) spielt nur eine untergeordnete Rolle. Es konnte im Gegensatz zur Pinozytose gezeigt werden, dass die Aufnahme des gleichen gelösten Stoffes als Inhalt von Liposomen eine 10-fach höhere Aufnahme erfährt [Lee et al. (1993)].

Die Pinozytose zeigt weiterhin den Nachteil des schnellen zellulären Effluxes, was die Bedeutung der Flüssig-Phasen-Pinozytose als Internalisierungsmechanismus für Liposomen noch mehr in den Hintergrund geraten lässt. Die Hauptaufnahmemechanismen für Liposomen stellen demnach Phagozytose und rezeptorvermittelten Endozytose“ dar. Das Ausmaß von Fusion als passiver Prozess spielt in der Aufnahme von Liposomen nur eine untergeordnete Rolle. Der Fusionsprozess besitzt als liposomaler Aufnahmemechanismus maximal die Bedeutung der Pinozytose.

Fusionsnachweis mit Calcein (passive Aufnahme):

Trotz der geringen Bedeutung sollen vor der Aufklärung der aktiven Internalisierungsmechanismen die Liposom-Zell-Wechselwirkungen auf Fusionsbasis untersucht werden.

Die Betrachtungen dazu fanden bei 4°C (passiver Prozess) statt. Die Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.5.2.1. mit Immunoliposomen inkubiert. Als Fluoreszenzmarker des klassischen Fusionsassays [Weinstein et al. (1980)] können Carboxyfluorescein bzw. Calcein verwendet werden. Bei beiden Stoffen treten in hohen Konzentrationen self-quench-Effekte auf, die sich in einer Fluoreszenzlöschung bemerkbar machen.

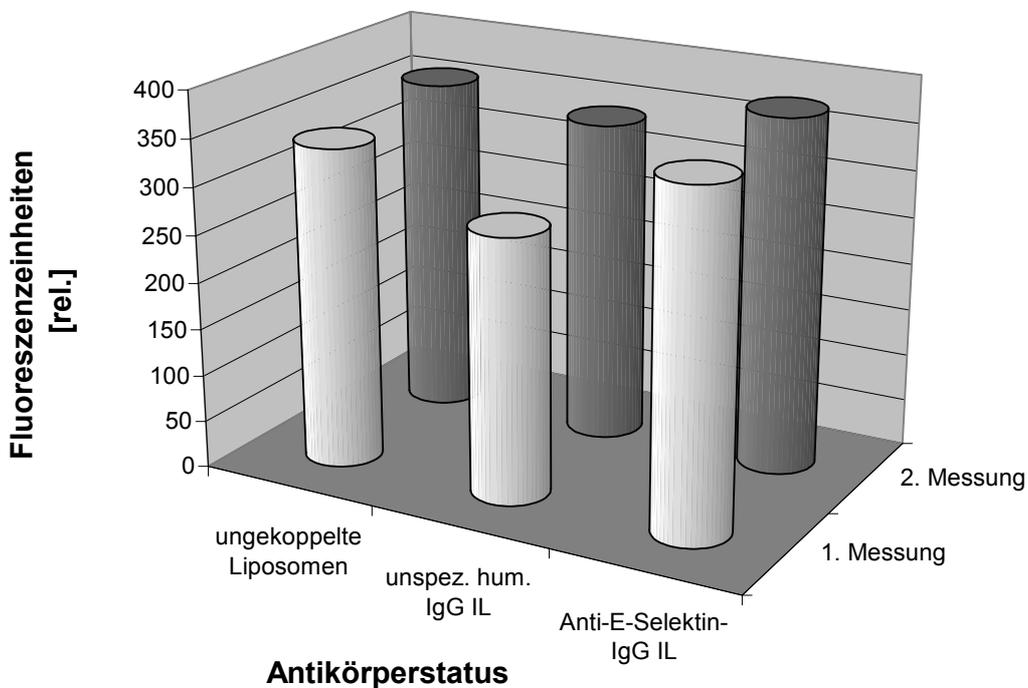


Abb. 15: Fusionsnachweis zw. Immunoliposomen und stimulierten HUVEC nach 60 Minuten bei 4°C

In Abbildung 15 ist die Fluoreszenz der Liposomen sichtbar, die schon bei 4°C eine Wechselwirkung mit den Endothelzellen eingegangen sind. Der fusionierte Anteil steht als Symbol dafür. Um gebundene Liposomen auszuschließen, wurde die „Acid-wash“-Methode (Kapitel 3.5.2.1.) angewendet, durch welche oberflächlich assoziierte Liposomen von der Zellmembran abgelöst werden konnten. Voraussetzung für die Anwendbarkeit innerhalb dieser in-vitro-Studie ist jedoch, dass die physiologische Barrierefunktion der Zellmembran durch die angewendete „Acid-wash“-Prozedur nicht beeinträchtigt werden [Matthay et al. (1986), Suziki et al. (1991)]. Ein Nachweis für die Funktion dieser Technik stellte die zweite Messung dar. Sie wurde nach Tritonzugabe durchgeführt. Falls noch gebundene Liposomen an der Zelloberfläche angehaftet gewesen wären, hätte die Fluoreszenz ansteigen müssen (konzentrierte CF-Lösung im Inneren der gebundenen Liposomen würde sich nach Lyse der Vesikel durch Triton stark verdünnen und zusätzlich fluoreszieren). Der Vergleich beider Messungen zeigt jedoch einen kaum interpretierbaren Fluoreszenzanstieg. Eine weitere Erhöhung wäre auch durch phagozytierte bzw. endozytierte Liposomen vorstellbar gewesen. Hierbei wäre die konzentrierte Farbstofflösung in Form kompletter Vesikel ins Zellinnere gelangt und hätte nach Zelllyse durch Triton den Fluoreszenzanstieg bewirkt. Da dies innerhalb der zweiten Messung nicht deutlich wurde, kann ein solcher Prozess bei 4°C sicher ausgeschlossen werden. Die Aussage, dass solche Vorgänge als energieabhängige zelluläre Aufnahmemechanismen bei 4°C nicht von Bedeutung sind, haben auch andere Studien gezeigt [Huang et al. (1983), Lee et al. (1993)]. Des Weiteren beweist die Übereinstimmung

der gemessenen Fluoreszenzwerte auch, dass Fusionsprozesse von der Anwesenheit bzw. der Art der gekoppelten Antikörper unabhängig stattfinden. Sowohl die ungekoppelten Liposomen als auch die spezifisch gerichteten Immunliposomen werden gleich stark über Fusionsprozesse aufgenommen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 120 Minuten erbrachte keinen weiteren Fluoreszenzanstieg (nicht dargestellt). Als Kontrolle des Fusionsassays wurde eine weitere Inkubation der Zellen mit Liposomen durchgeführt. Die Endothelzellen hatten bei 4°C 60 Minuten Zeit, um Fusions- und Bindungsprozesse (energieunabhängig) eingehen zu können. Nach dem Entfernen der nicht gebundenen Anteile folgte eine weitere Inkubation bei 37°C.

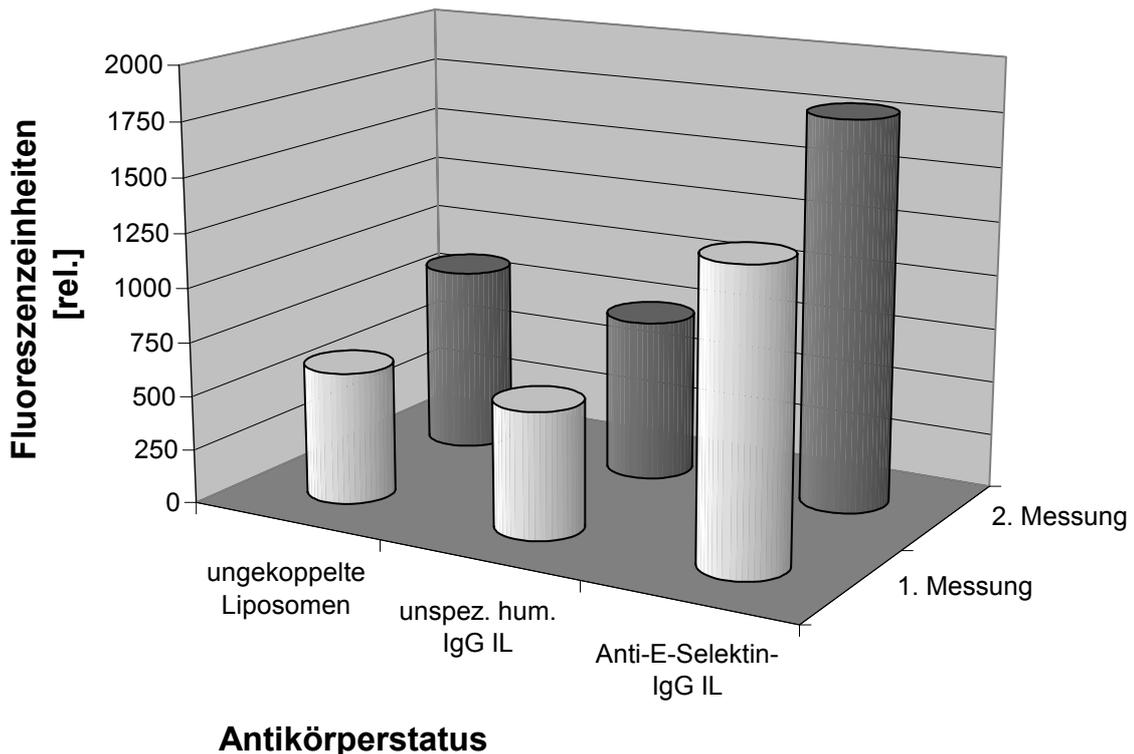


Abb. 16: Fusionsnachweis zw. Immunliposomen und stimulierten HUVEC nach 60 Minuten bei 4°C und weiteren 60 Minuten bei 37°C

Anhand der Abbildung 16 sind die bekannten Unterschiede der Immunliposomen wieder zu erkennen. Die gebundenen Liposomen hatten während dieser ersten Inkubation (4°C 60 Minuten) die Möglichkeit Fusions- und Bindungsvorgänge einzugehen. In dieser Inkubationsfolge schloss sich aber vor einem „Acid-wash“ ein weiterer Inkubationsschritt bei 37°C an. Nun konnten die Endothelzellen, entgegen eines üblicherweise ablaufenden Fusionsassays, Liposomen durch aktive Transportprozesse internalisieren. Dabei wurde die schon bekannte gleichmäßig starke Aufnahme aller Liposomen mit ca. 25% des gebundenen Anteiles betrachtet. Die erste Messung zeigt eine deutlich höhere Fluoreszenz auf der Seite der spezifisch gerichteten Immunliposomen. Erklärbar ist dies durch die schon erwähnte stärkere spezifische Bindung durch die HUVEC. Die gebundenen Liposomen hatten danach weitere 60 Minuten Zeit, zu internalisieren. Während dieses Zeitraumes wurde ihr Liposomeninhalt zum Teil ins Zytosol freigegeben, was sich in dem hohen Fluoreszenzwert der ersten Messung widerspiegelt. Dass noch nicht alle spezifisch gerichteten Immunliposomen innerhalb dieser Zeit intrazellulär abgebaut wurden, beweist die zweite Fluoreszenzmessung.

Nach Zusatz von Triton kam es durch nicht freigegebenes Calcein zu einer Zunahme der Fluoreszenz nach Verdünnung. Innerhalb der ungekoppelten Liposomen und der unspezifisch gerichteten Immunliposomen ist dieser Zuwachs gleichfalls erkennbar, so dass auch hier aktive Internalisierungsmechanismen während der Inkubation bei 37°C beteiligt gewesen sein mussten. Der klassische Fluoreszenzassay in Abbildung 15 zeigt somit, dass auch die Fusion zu den Aufnahmemechanismen zählt, über die Liposomen in die Zelle gelangen können. Eine Differenzierung nach Art des auf der Liposomenoberfläche befindlichen Antikörpers findet dabei nicht statt. Der Anteil der passiv verlaufenden Fusionsprozesse gegenüber aktiven Internalisierungsmechanismen ist äußerst gering.

Inhibierung aktiver Transportprozesse (aktive Aufnahme):

Die Aufnahme der Immunliposomen in die Zelle ist aus quantitativer Sicht bei allen Liposomen unabhängig ihrer Spezifität (Art der gekoppelten Antikörper) gleich hoch gewesen. Die Aufklärung der beteiligten Internalisierungsmechanismen scheint dennoch interessant zu sein, da die Zelle über spezifische und unspezifische aktive Aufnahmeprozesse verfügt und diese unterschiedlich stark in die Liposomeninternalisierung eingreifen. Gerade der Einfluss des E-Selektins könnte hier unterschiedliche Mechanismen fördern bzw. hemmen. Die Einteilung der aktiven zellulären Aufnahmemechanismen wird innerhalb der Literatur kontrovers diskutiert. Begriffe wie Endozytose und Phagozytose werden zum Teil als ineinander fließend betrachtet. Die Differenzierung zur Aufklärung der liposomalen Internalisierung wurde deshalb bewusst einfach gehalten und gliedert sich, wie in Abbildung 17 dargestellt, in drei Bereiche (Kapitel 2.3.3.).

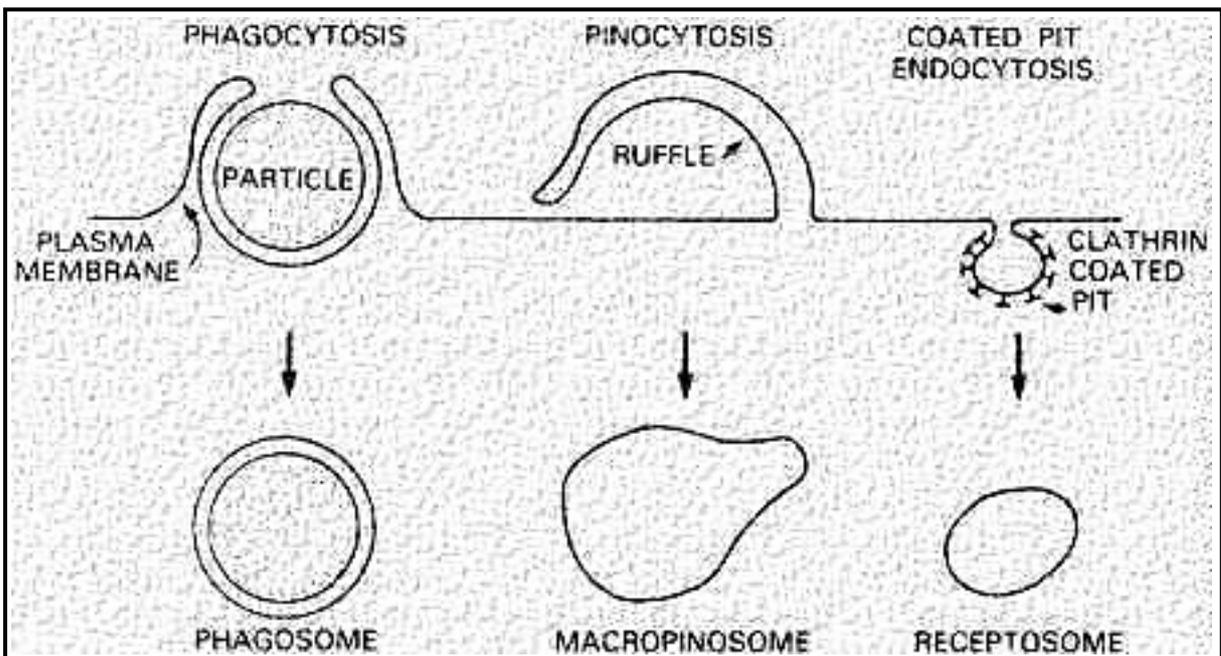


Abb. 17: Hauptaufnahmemechanismen der Zelle

Die Darstellung [Pastan and Willingham (1985)] zeigt sehr anschaulich die verschiedenartigen Möglichkeiten, die der Zelle für Aufnahmewecke zur Verfügung stehen und die daraus hervorgehenden intrazellulären Vesikel. Für den Fall der liposomalen Internalisierung ist die Pinozytose weniger von Bedeutung [Lee et al. (1993)], da hierbei nur vollständig bzw.

kolloidal gelöste Stoffe aufgenommen werden können. So erscheint die Einteilung der aktiven zellulären Internalisierungsmechanismen für Liposomen in unspezifische (Phagozytose) und spezifische („Coated Pit“-Endozytose) Prozesse als sinnvoll. Es liegt an der Auswahl der einzusetzenden Inhibitoren, welcher dieser Prozesse selektiv gehemmt wird.

Cytochalasin ist ein Mykotoxin, das Aktinfilamente auflöst. Es wird auch verwendet, um die Fortbewegungsvorgänge von Zellen zu studieren. Dabei blockiert es als Inhibitor aktinabhängiger Polymerisationsprozesse die Phagozytose und Pinozytose [Salisbury et al. (1983), Paccaud et al. (1992), Zhou et al. (1994), Zelphati et al. (1996), Matsui et al. (1997)]. Rezeptorgesteuerte Prozesse werden dadurch nicht beeinflusst [Ishiwata et al. (1998), Simoes et al. (1999)]. Formaldehyd, Antimycin A und Natriumazid kommen in zellulären Aufnahmeuntersuchungen häufig als Inhibitoren der metabolischen Aktivität zur Anwendung. Dabei wirken sie gleichsam auf alle Internalisierungsprozesse [Blumenthal et al. (1987), Lee et al. (1993), Slepshkin et al. (1997), Simoes et al. (1999)] und blockieren rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Prozesse gleichzeitig. Einen differenzierten Einfluss auf nur rezeptorvermittelte Internalisierungsvorgänge erhält man durch intrazellulären Kaliumentzug [Larkin et al. (1986), Heuser et al. (1989), Colin et al. (2000)]. Dadurch kommt es zur Ablösung der Clathrinstruktureinheiten auf der Innenseite der Zellmembran. Diese sind als Grundbaustein für die Bildung der Clathrin-coated Pits essentiell. Es kommt dadurch nicht zur Abschnürung der rezeptorgebundenen Immunoliposomen, die dann später als Vesikelinhalt im Inneren der Endothelzelle vorliegen würden. Clathrinunabhängige Aufnahmeprozesse werden dadurch nicht beeinflusst.

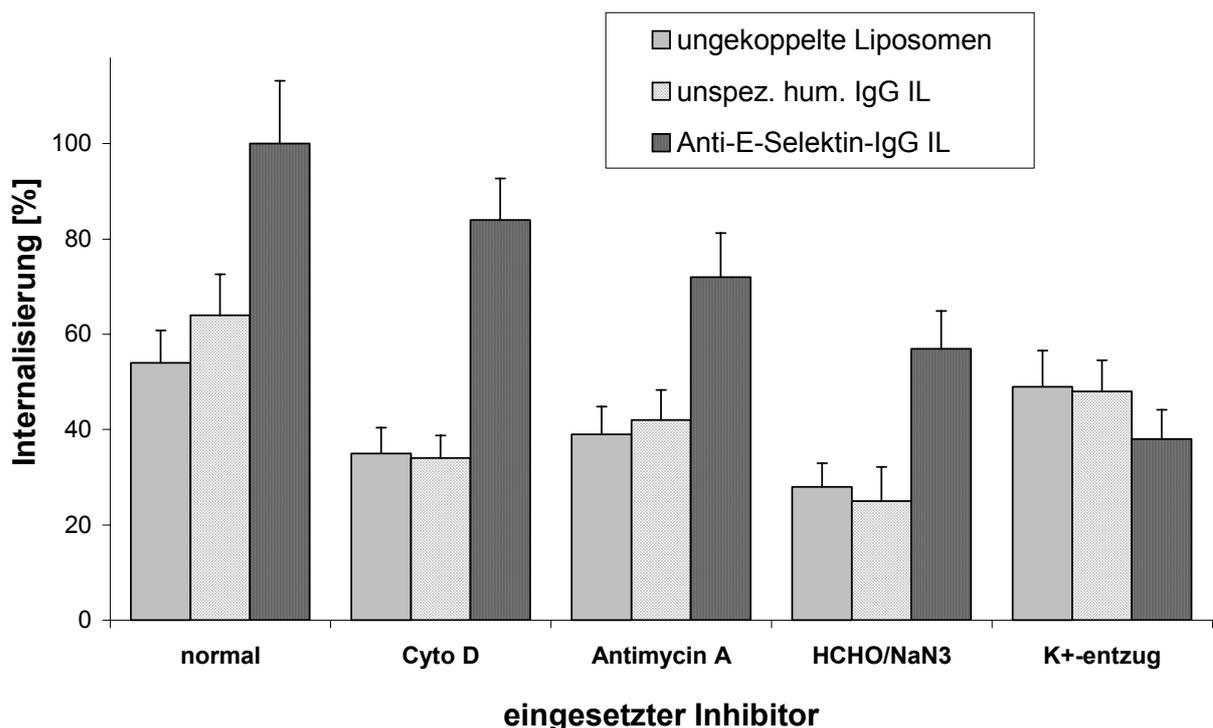


Abb. 18: Abnahme der zellulären Internalisierung durch Inhibitoren

In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse aller Inhibierungsversuche zusammenfassend dargestellt. Zu Beginn der Untersuchungen muss jedoch die Auswirkung dieser Inhibitoren auf das Bindungsverhalten der Liposomen gegenüber der Endothelzelle untersucht werden. Da das Vorhandensein dieser Substanzen keine quantitativen Bindungsveränderungen verursacht hat (nicht dargestellt), können Unterschiede im Internalisierungsverhalten direkt

mit dem eingesetzten Inhibitor in Zusammenhang gebracht werden. Der Einsatz von Cytochalasin bewirkte bei den ungekoppelten Liposomen und bei den unspezifisch gerichteten Immunoliposomen eine beachtliche Reduzierung der zellulären Aufnahme um bis zu 50%, wohingegen die Abnahme der spezifisch gerichteten Immunoliposomen nur bei knapp 15% lag. Es wird dadurch zum ersten Mal deutlich, dass Unterschiede im Internalisierungsmechanismus bestehen. Die Immunoliposomen, die ihre Bindungsereignisse hauptsächlich über spezifische Rezeptor-Antikörper-Komplexe ausüben, werden nicht so stark über aktinabhängige Phagozytoseprozesse aufgenommen. Nichtfunktionalisierte Liposomen werden dahingehend vermehrt über diesen Aufnahmemechanismus internalisiert. Die Betrachtung der Aufnahmeraten nach erfolgter Reduzierung der zellulären metabolischen Aktivität zeigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen nahezu bei allen Liposomenarten eine 30%-ige Abnahme der Aufnahme durch die Zelle. Diese Abhängigkeit wurde schon häufig untersucht und spiegelt sich in vielen Studien liposomaler Versuche wider [Lee et al. (1993), Simoes et al. (1999)], wobei klar eine Dosisabhängigkeit dieser Aufnahmereduzierung festgestellt werden konnte. Hier kann sogar geschlussfolgert werden, dass die Gesamt- abnahme der Internalisierung durch beide Ergebnisse (Antimycin A und Formaldehyd/Natriumazid) addiert werden kann. So würde die Abnahme durch metabolische Inhibitoren, die sowohl unspezifische als auch spezifische Internalisierungsprozesse hemmen können, fast 70% betragen. Eine vollständige Hemmung aller Aufnahmemechanismen durch die metabolischen Inhibitoren wurde nie gezeigt, was an der Höhe der dafür notwendigen Konzentration liegt.

Eine Unterscheidung der rezeptorvermittelten spezifischen Internalisierung von der Phagozytose ist durch die Hemmung der physiologischen Funktion einzelner Clathrinmoleküle möglich. Normalerweise kommt es durch Bindung eines Liganden an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche zur Anreicherung von Clathrin aus dem Zytoplasma innerhalb dieser Bereiche. Es folgt die Bildung so genannter "Coated Pits". In einem weiteren Schritt werden clathrinabhängig Einschnürungen „Clathrin-coated Pits Vesicles“ entstehen. Ein Kaliumentzug verhindert die Entstehung eines „Clathrin-coated Pits Vesicles“ und damit die rezeptorgesteuerte Aufnahme der oberflächlich gebundenen Immunoliposomen. Studien an humanen Fibroblasten zeigten nach einer Kaliumverarmung eine 90%-ige Hemmung der LDL-Internalisierung [Larkin et al. (1985)]. Bei der Anwendung der Methode innerhalb der Liposomenaufnahme durch Endothelzellen wurde deutlich, dass vorrangig spezifisch gerichtete Immunoliposomen auf diesem Weg in das Zellinnere gelangen. Einer Reduzierung um 60% stand nur eine minimale Abnahme um 10-15% auf der Seite der ungekoppelten Liposomen gegenüber. Die Abnahme der Internalisierung der spezifischen Immunoliposomen auf das Niveau der ungekoppelten Liposomen machte deutlich, dass nur die spezifischen Immunoliposomen durch rezeptorvermittelte Aufnahmeprozesse internalisiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Endothelzellen im Vergleich zu anderen Zelllinien (Makrophagen, Krebszellen etc.) eine relativ schlechte Aufnahmetendenz zeigen. Die Internalisierung von Liposomen kann zellulär durch verschiedene Prozesse gesteuert werden. Rezeptorgebundene Immunoliposomen werden einerseits durch rezeptorvermittelte Endozytose, unspezifisch assoziierte Liposomen andererseits durch Phagozytose aufgenommen. Die Bedeutung der Selektine lässt einen Schwerpunkt in der Bindungsentstehung erkennen, wohingegen im Aufnahmeprozess kein quantitativ, selektinvermittelter Vorteil erkennbar ist.

4.2.3. pH-sensitive Immunoliposomen

Für die Anwendung von Liposomen als Drug Targeting Systeme ist es das Ziel, Wirkstoffe intrazellulär zur Wirkung zu bringen. Die verstärkte Bindung spezifischer Immunoliposomen an der Oberfläche entzündeter Endothelzellen und deren aktive Aufnahme in das Zellinnere durch E-Selektin konnte in den vorangegangenen Kapiteln eindrucksvoll deutlich gemacht werden. Das erfolgreiche Heran- und Hineinbringen liposomaler Systeme an die Zelloberfläche bzw. in das Zellinnere bedeutet nicht gleichzeitig das Auftreten eines therapeutischen Effekts. Für einen Erfolg in der antiinflammatorischen Therapie müssen die internalisierten Immunoliposomen ihren Inhalt dem Zellstoffwechsel zur Verfügung stellen können. Durch intrazellulären Abbau in Lysosomen kann jedes erfolgreich aufgenommene Liposom wirkungslos gemacht werden. Dies würde jeglichen Einsatz sinnlos erscheinen lassen. Aus diesem Grund muss jetzt versucht werden, die targetierten und internalisierten Immunoliposomen vor einem lysosomalen enzymatischen Abbau zu schützen. Ihr Inhalt in Form antiinflammatorisch wirksamer Substanzen muss dem Zellstoffwechsel zur Verfügung gestellt werden. Damit wird die Notwendigkeit einer Freigabe des internalisierten Liposomeninhalts im Zytosol als Schutz vor lysosomaler Degradation deutlich. Viele Studien zeigen den ineffizienten liposomalen Transport ins Zytosol. Membranundurchlässige, hochmolekulare Stoffe konnten zwar als Liposomeninhalte das Zellinnere erreichen, unterlagen dort aber dem enzymatischen Abbau innerhalb der Lysosomen [Straubinger et al. (1983), Daleke et al. (1990), Lee et al. (1996)].

Durch den Einsatz einer speziellen Lipidzusammensetzung können pH-sensitive Liposomen erhalten werden. Diese bestehen aus dem Grundlipid DOPE, das im physiologischen Bereich protoniert vorliegt und aufgrund seiner Molekülform zu einer Inversmizellbildung neigt. Für eine Liposomenbildung muss es dementsprechend mit einem anderen Lipid mit einem großen Kopfgruppenbereich kombiniert werden. [Papahadjopoulos (1968)]. Dazu wird als saures Amphiphil innerhalb dieser Arbeiten Cholesterolemisuccinat eingesetzt. Im physiologischen pH-Bereich von 7,4 liegt es negativ und im protonierten Zustand (unter pH 5,5) positiv geladen vor. Damit besitzt es im neutralen pH-Bereich stabilisierenden Einfluss und ermöglicht in Kombination mit dem Grundlipid eine Liposomenbildung [Ellens et al. (1984)]. Andere saure Amphiphile (Fettsäuren, doppelkettige Lipide) wurden nicht eingesetzt, da ihre Seruminstabilitäten bekannt sind und diese einer späteren therapeutischen Anwendung liposomaler Carriersysteme entgegenstehen [Connor et al. (1986)]. CHEMS sollte diese Instabilität nicht zeigen, was in weiteren Versuchen bewiesen werden sollte. Die Anwendung von sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen erscheint lohnenswert, da die Vorteile der Liposomenanreicherung am Wirkort durch den Einsatz monoklonaler Antikörper mit den Vorteilen der gezielten Wirkstofffreigabe im Inneren der Zelle kombiniert werden können. Der Liposomeninhalt unterliegt somit nicht dem Schicksal der lysosomalen Degradation, was einem Verlust aller bisherigen Vorteile gleich käme. Im Hinblick auf spätere Studien mit DNA-Plasmiden als Liposomeninhalte der „E-Selektin“-gerichteten Immunoliposomen ist ein intrazellulärer Transport zum Zellkern für resultierende Expressionsvorgänge auch unbedingt notwendig [Wang et al. (1987)].

4.2.3.1. Serumstabilität, pH-abhängige Freigabe, FRET

Die genaue Charakterisierung dieser Liposomen wurde notwendig, da die Kombination der pH-Sensitivität mit der sterischen Stabilisierung durch Polyethylenglykol für Immunoliposomen bisher nicht untersucht wurde. Vor der Anwendung sterisch stabilisierter pH-

sensitiver Immunoliposomen für eine antiinflammatorische Therapie muss vor ersten in-vivo-Versuchen deshalb die genauere Erforschung dieser Vesikel stehen. Dabei soll die Kontrolle einer eventuellen Seruminstabilität, wie sie bei älteren Arbeiten pH-sensitiver Liposomen auftrat, im Vordergrund stehen. Danach wurde das liposomale Freisetzungsverhalten in einem Bereich von pH 4 bis pH 7 untersucht. Fluoreszenzmessungen im Rahmen eines Resonanzenergietransfers zwischen pH-sensitiven Immunoliposomen und endosomalen Vesikeln sollten spätere intrazelluläre Wechselwirkungen in einem Modellversuch deutlich werden lassen.

Serumstabilität:

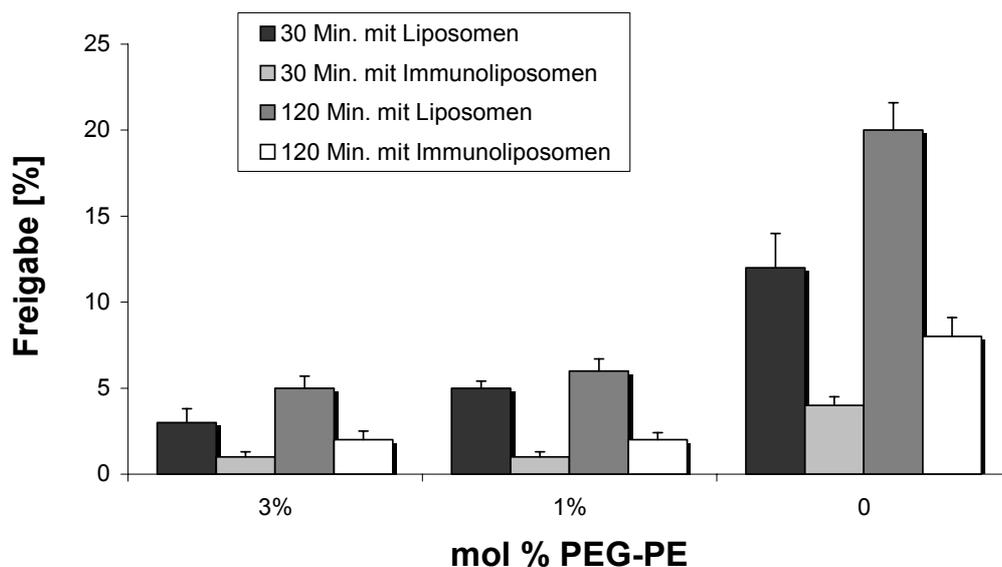


Abb. 19: Stabilität pH-sensitiver Liposomen (Typ1) in 40% Serum

Die Serumstabilität der hergestellten pH-sensitiven Immunoliposomen sollte untersucht werden. Entsprechend Kapitel 3.6.1. wurden sowohl pH-sensitive als auch pH-insensitive Immunoliposomen des Typs 1 und des Typs 2 hergestellt. Neben der Serumstabilität der normalen Grundlipidmischung wurde auch der Einfluss gekoppelter Antikörper untersucht. Deshalb wurden für die Stabilitätsstudien sowohl gekoppelte als auch ungekoppelte Liposomen verwendet. Durch den Einbau verschiedener Mengen an PEG sollten Rückschlüsse auf Instabilitäten gezogen werden. Anhand der Daten lassen sich sehr gut stabilisierende Wirkungen ableiten. Die Instabilitäten im Serum werden auch als seruminduzierte Freigabe in der Literatur bezeichnet. Die Interaktionen zwischen Liposomen und im Serum enthaltenen Stoffen sind einfache Ladungs- und/oder hydrophobe Wechselwirkungen. Die größte Bedeutung besitzt hier die Gruppe der Lipoproteine. Sowohl die Erhöhung der PEG-Anteile auf der Oberfläche der Liposomen als auch die Anwesenheit von Antikörpermolekülen bewirkte eine Verringerung der Wechselwirkungen mit Serumproteinen. Die Ergebnisse anderer Studien [Ng et al. (2000)] zeigten ebenfalls diesen Stabilisierungseffekt durch PEG. Es wurde deutlich, dass die Polyethylenglykolketten für spätere in-vivo-Versuche nicht nur Vorteile in Bezug auf Zirkulationszeitverlängerungen, sondern auch verbesserte Serumstabilitäten erbringen. Für diesen stabilisierenden Effekt genügte der Einbau von 1mol% PEG-PE. Eine weitere Zunahme der PEG-Anteile auf die sonst üblichen 5mol% brachte keine nennenswerte Verbesserung und wurde deshalb hier

nicht dargestellt. Die Liposomen vom Typ 2 zeigten nach zwei Stunden Freisetzungen von 7%. Ein weiterer Einsatz von PEG-PE war nicht notwendig, da die sterische Stabilisierung schon durch den Lipidanker (Cyanur-PEG-PE) gewährleistet war (Kapitel 4.1.2.).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Vorteile der sterisch stabilisierten Liposomen ganz deutlich auf der Seite der Antikörper gekoppelten Liposomen liegen (Immunoliposomen). Antikörper und PEG-Ketten schirmen die Bilayer vor Wechselwirkungen mit Lipoproteinen wirkungsvoll ab. Die Vorteile der Immunoliposomen als Vesikel für ein späteres Drug Targeting, kombiniert mit der hier gezeigten Serumstabilität, lassen diese Systeme zu hoffnungsvollen Arzneistoffträgern werden. Die „Serum-induzierte“ Lyse der CHEMS-haltigen Liposomen wurde im Gegensatz zu älteren pH-sensitiven Liposomen (z.B. mit Ölsäure) nicht beobachtet. Der Einsatz unter physiologischen Bedingungen erscheint deshalb hoffnungsvoll, da die „E-Selektin“-gerichteten, sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen in biologischen Medien die größte Stabilität zeigten.

pH-abhängige Freigabe:

Die pH-sensitiven Immunoliposomen sollten auf ihre Freigabefähigkeit in sauren Puffermedien untersucht werden. Hier stand neben der Freisetzungsabhängigkeit in Bezug auf die Azidität ($4 < \text{pH} < 7,4$) auch der kinetische Aspekt der Freisetzung im Vordergrund. Aus physiologischen Gründen wurden Freisetzungsstudien unterhalb pH 4 nicht durchgeführt, da sie intrazellulär nicht von Relevanz sind [Ohkuma et al. (1978)]. Die Freisetzungsraten sind in Abbildung 20 vorgestellt.

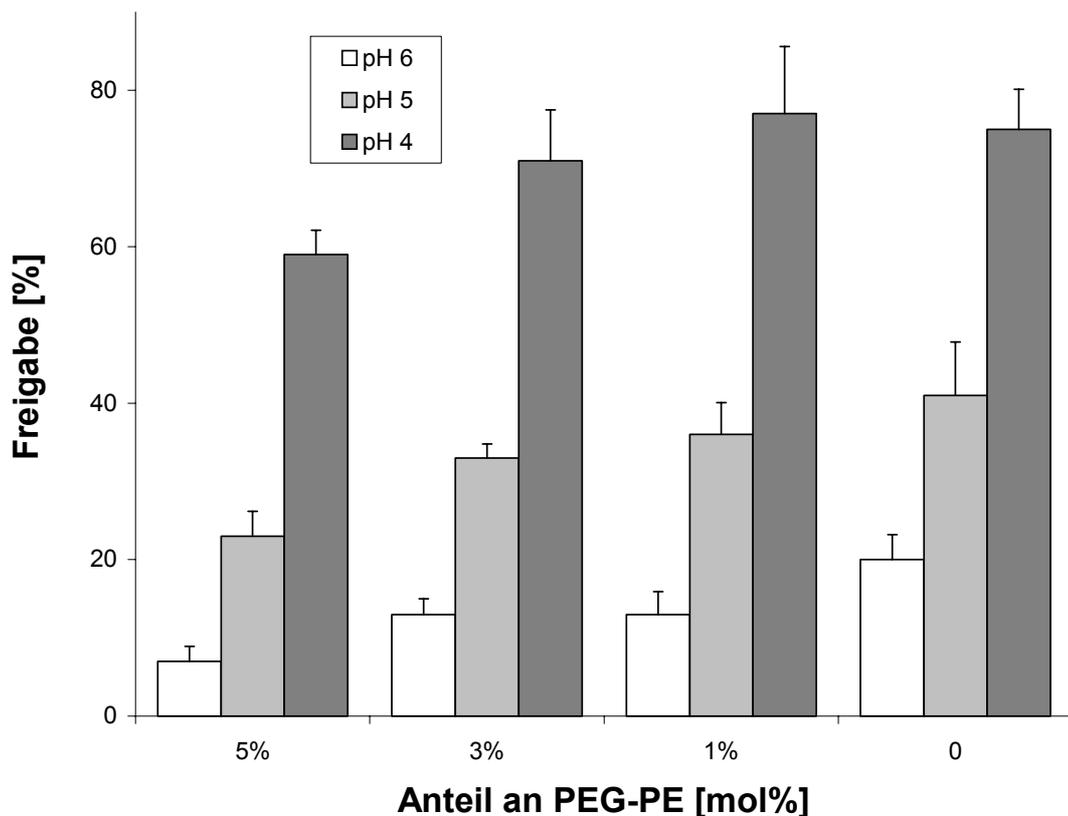


Abb. 20: Freisetzungsverhalten pH-sensitiver Immunoliposomen nach 15-minütiger Inkubation

Es ist erkennbar, dass sich der pH-Sprung von pH 4 zu 5 deutlicher auf das veränderte Freisetzungverhalten auswirkt, als der pH-Sprung von 5 nach 6. Die Azidität im schwach sauren Bereich bewirkt bereits nach 15 Minuten Inkubation eine Freigabe von 40%. Sobald PEG-PE-Anteile hinzukommen, verschlechtert sich diese Rate enorm (5mol% PEG-PE, pH 5 =24% Freigabe). Im Hinblick auf eine notwendige sterische Stabilisierung für die Verbesserung der Zirkulationszeiten der Liposomen in-vivo zeigte sich, dass ein Bereich von $4 < \text{pH} < 5$ notwendig war, um pH-sensitive Immunliposomen effektiv zur Lyse zu bringen. Die Freisetzungsrates bei pH 4 für 3mol% PEG-PE-haltige Liposomen betrug nach 15 Minuten schon 74%. Eine Steigerung des Polyethylenglykolanteils auf 5mol% zeigte eine noch befriedigende Freisetzungsrates von 57%. Damit wird deutlich, dass die PEG-Ketten auch einen stabilisierenden Einfluss auf das pH-abhängige Freisetzungverhalten besitzen [Slepushkin et al. (1997)] und dieses damit schlechter wird.

Die Instabilität der Bilayer nach Protonierung der Lipidkomponenten wird durch Polyethylenglykoleinfluss negativ beeinflusst. Somit steht die notwendige sterische Stabilisierung des Typs 1 der Immunliposomen einer effektiven pH-abhängigen Freisetzung entgegen. Mit dem Einsatz von 3mol% PEG-PE, was in Bezug auf eine notwendige Halbwertszeitverlängerung sinnvoll erscheint, kann eine hinreichende Freigabe von 70% bei pH 4 erreicht werden. Es sei darauf hingewiesen, dass der pH-Wert in den frühen Endosomen bei 6,0–6,5, in den späten Endosomen bei 5,0–6,0 und in den Lysosomen bei 4,0–5,0 liegt. Eine weitere Messung wurde nach 60 Minuten durchgeführt und zeigte eine geringfügige Erhöhung aller Freisetzungswerte (max. um 15%). Damit wurde deutlich, dass es sich bei der pH-abhängigen Destabilisierung der Bilayer um eine schnell ablaufende Reaktion handelt. Eine zügige liposomale Destabilisierung im Zellinneren ist erwünscht, da es nach erfolgter Endozytose innerhalb von 30 Minuten zu einer lysosomalen Degradation mit Vakuolenbildung kommt [Tycko et al. (1982)]. In diesem Fall wäre ein liposomales System wirkungslos. Eine separate Betrachtung der Typ 1 und Typ 2 Immunliposomen zeigte, dass die pH-abhängigen Freisetzungsrates beider Arten geringfügig unterschiedlich waren. Hier wurden die Vorteile der Immunliposomen vom Typ 2 deutlich. Sie benötigten bekanntlich keine sterische Stabilisierung mehr und wiesen das unveränderte Freisetzungverhalten der PEG-freien Immunliposomen auf. Die für die Messungen verwendeten pH-insensitiven Liposomen bestehend aus DPPC und CHEMS zeigten nach 60 Minuten im pH 4-haltigen Medium eine Freisetzung von 11%, was die Vorteile der pH-sensitiven Immunliposomen noch einmal verdeutlicht (Freigabe von 80%).

FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer):

Die gute Serumstabilität und die ausreichende Freigabe des Liposomeninhaltes der sterisch stabilisierten Immunliposomen in schwach sauren Medien führte zu dem Schluss, dass die Wechselwirkungen zwischen endosomaler Membran und Liposomen innerhalb des Destabilisierungsprozesses genauer untersucht werden müssten. Um zu überprüfen, inwieweit die intrazelluläre Freisetzung auf Fusionsprozesse zurückzuführen ist, musste ein Fusionsassay zwischen Immunliposom und Endosomenmembran entwickelt werden. Mit Hilfe der Kenntnis der membranären Zusammensetzung der Endosomen und Lysosomen [(Kobayashi et al. (1998))] konnten intrazelluläre Untersuchungen folgen. Dadurch wurde es möglich, Fusionsprozesse in einem in-situ-Modell quantitativ zu erfassen. Nach Herstellung der endosomalen Vesikel (Kapitel 3.6.3.) wurden diese auf mögliche Wechselwirkungen mit sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunliposomen untersucht. Ziel war es, nur Fusionsprozesse erfassen zu können. Vorangegangene Bindungs- und Adhäsionsereignisse sollten auf die Messergebnisse keinen störenden Einfluss haben, da sie für die pH-abhängigen Instabilitäten innerhalb der Liposomenmembran nicht verantwortlich sind.

Das Prinzip des FRET beruht auf Interaktionen zwischen zwei Fluorophoren. Dabei überlappt das Emissionsmaximum des Donors das Absorptionsmaximum des Akzeptors. Die Wechselwirkung kommt nur bei räumlicher Nähe beider Partner zustande. Prinzipiell kann innerhalb des Resonanzenergie transfers zwischen zwei verschiedenen Assays unterschieden werden. Ausgehend von zwei Liposomenarten und NBD-PE als Donor und Rhodamin-PE als Akzeptor [Struck et al (1981)] können diese Marker sowohl getrennt als auch gemeinsam innerhalb einer Bilayer integriert werden. Im „Dilution-Assay“ [Struck et al. (1981), Rosenberg et al. (1983)] sind beide Fluorophore auf einer Population untergebracht. Die zweite Liposomenart ist ungelabelt. Bei Wechselwirkungen wird ein Fluoreszenzanstieg des NBD-PE beobachtet. Die Ursache liegt in der Verringerung des FRET durch Abnahme der räumlichen Nähe der Partner zueinander. Im „Mixing-Assay“ [Hoekstra (1982)] beinhaltet jede Charge der Liposomen einen Fluoreszenzmarker. Während der Messung kommt es bei Wechselwirkungen (Annäherung, Fusion) untereinander zum Quenchen der Fluoreszenz des Donors (NBD-PE) und zum Fluoreszenzanstieg auf der Seite des Akzeptors (Rhodamin-PE). Da die Abnahme des FRET durch Aggregations-, Adhäsions- und Fusionsprozesse begründet sein kann, wurde für die Untersuchung der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen der Dilution-Assay angewendet. Hier bewirken allein Fusionsprozesse eine Abnahme des FRET. Das folgende Schema veranschaulicht die Abnahme des Resonanzenergie transfers beim verwendeten „Dilution-Assay“.

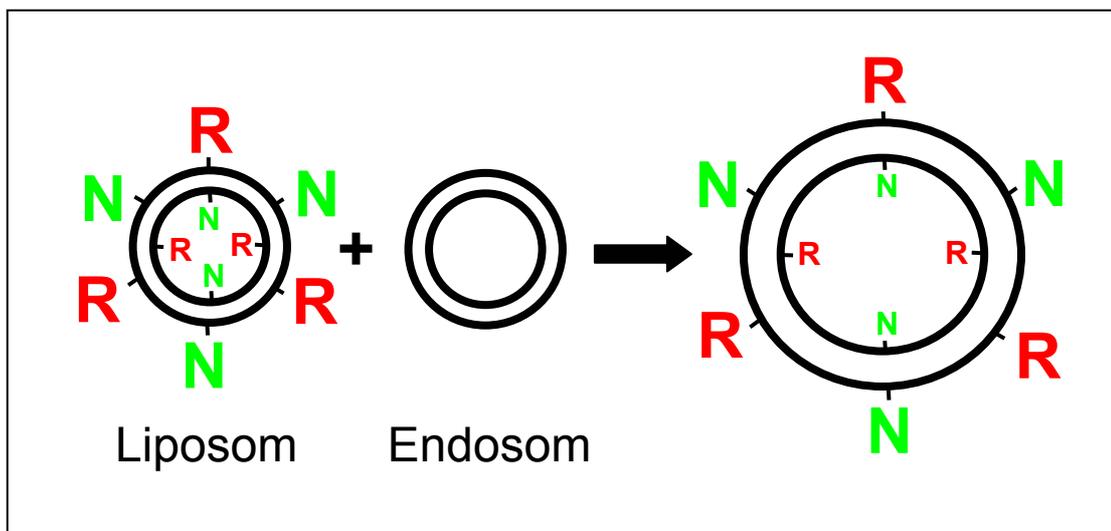


Abb. 21: Veränderung des FRET während des Fusionsprozesses

Hierbei wird deutlich, dass die gemessene Fluoreszenz für das NBD-PE während des Fusionsprozesses größer werden musste. Genauso sollte durch den geringer werdenden Resonanzenergie transfer die Fluoreszenz des Rhodamin-PE sinken. Die sich veränderten Fluoreszenzwerte (NBD-PE Ex. 485nm/Em. 520nm, Rhodamin-PE Ex. 485nm/Em. 590nm) sind als prozentuale Fusion nachfolgend dargestellt.

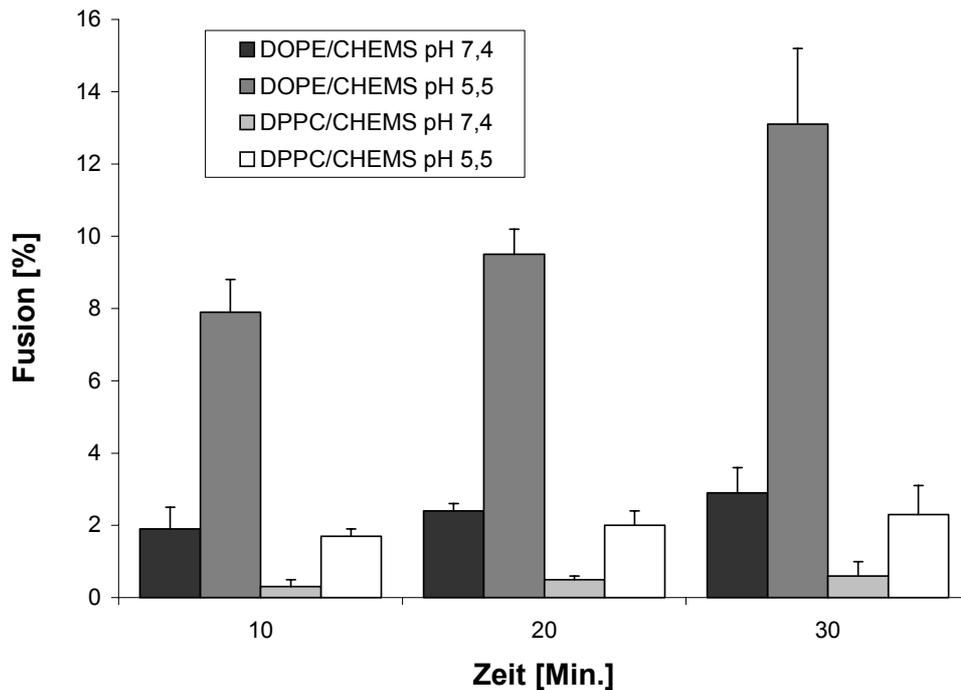


Abb. 22: Fusion zwischen pH-sensitiven Immunliposomen und endosomalen Vesikeln

Die Daten zeigen, dass es wirklich zu Fusionsprozessen zwischen Liposomen und endosomaler Membran kommt. Eine weitere Zeitbetrachtung war nicht nötig, da die intrazelluläre Destabilisierung sofort nach Kontakt mit den sauren Zellkompartimenten erfolgte. Die entsprechende Zeitverzögerung bei späteren in-vivo-Versuchen bis zur säureabhängigen Lyse der Liposomen resultiert aus dem zurückgelegten Weg der Liposomen intrazellulär. Bei den hier verwendeten sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunliposomen war die Fusions-tendenz deutlich erkennbar. Die Fusionsprozesse nahmen innerhalb der Inkubationszeit stark zu. Die relativ hohe Anzahl an Fusionsanteilen der pH-sensitiven Liposomen im neutralen pH-Bereich war z. T. durch die Lipidzusammensetzung erklärbar. Im Gegensatz zu den pH-insensitiven Liposomen (DPPC/CHEMS) enthielten die pH-sensitiven Liposomen 60mol% DOPE. Dieses Lipid besitzt einen deutlich fusogeneren Charakter als andere Lipide [Ellens et al. (1984), Leventis et al. (1987), Brown et al. (1989)], was sich in den Ergebnissen widerspiegelt. Anhand der Ergebnisse des FRET zwischen sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunliposomen und endosomalen Vesikeln wurde es möglich, die späteren intrazellulären Wechselwirkungen zu simulieren.

In Kombination mit den vorangegangenen Freisetzungsstudien zeigen diese Ergebnisse, dass sterisch stabilisierte pH-sensitive Immunliposomen sehr effektive Drug Targeting Systeme darstellen und wirkungsvoll in einer Therapie eingesetzt werden können. Die Stabilität in biologischen Medien ist genauso wie das gezielte intrazelluläre Freisetzen des Liposomeninhaltes vorhanden. Der spätere Wirkstoff im Inneren dieser Transportvesikel ist auf dem Weg zum Zielort vor Abbau geschützt und gelangt unverändert in das Innere der Endothelzellen, wo er intrazellulär seine therapeutische Wirkung entfalten kann.

4.2.3.2. Einfluss von Äquilibrierungsreagenzien

Um die o.g. Experimente zur pH-Sensitivität direkt auf die Situation in den Endothelzellen zu übertragen sollten in-vitro-Untersuchungen folgen. Gleichzeitig wurde der Vergleich ungekoppelter Liposomen und spezifisch gerichteter Immunliposomen vorgenommen.

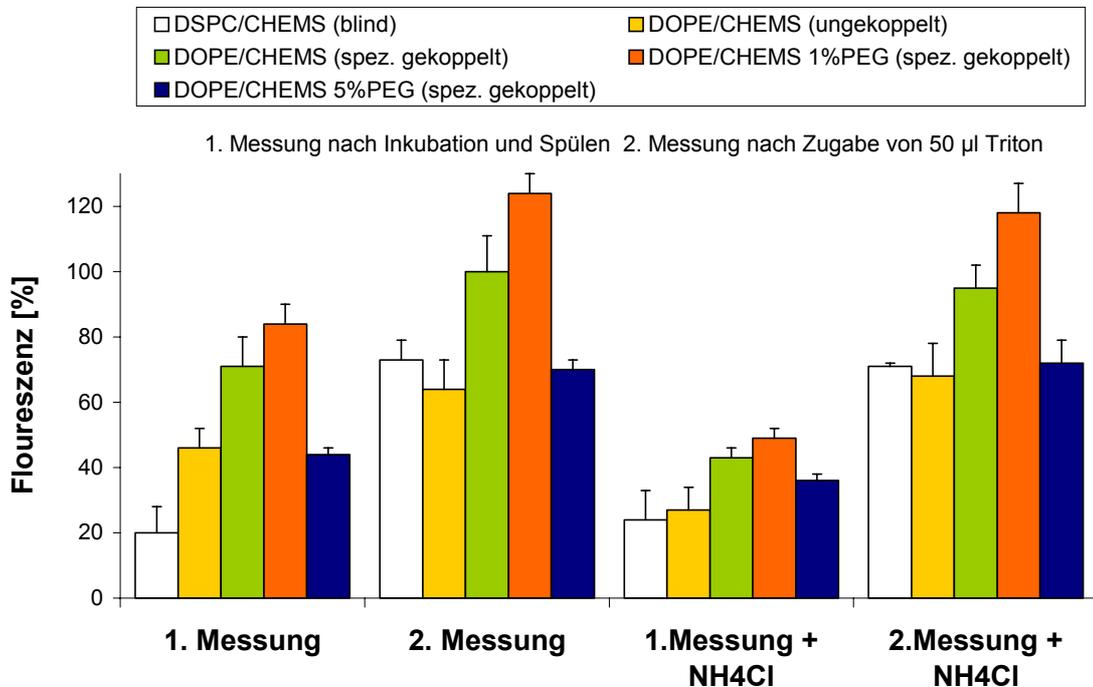


Abb. 23: Veränderung der pH-sensitiven Freigabe in HUVEC durch NH₄Cl

Als Fluoreszenzmarker kam eine 100mM Calceinlösung zum Einsatz. Innerhalb der Studien wurde deutlich, dass sich die ermittelte pH-abhängige Freigabe auch auf in-vitro-Versuche übertragen ließ. In Abbildung 23 sind die Unterschiede zwischen pH-sensitiven und pH-insensitiven Liposomen durch die gemessene Fluoreszenz nach einer Inkubation bei 37°C gut zu erkennen. So weisen die Blindliposomen gegenüber den pH-sensitiven Liposomen bei der ersten Messung nur eine halb so starke Fluoreszenz auf. Das bedeutet nicht sofort, dass sie schlechter internalisiert wurden, sondern weist vielmehr auf ein Vorhandensein der pH-insensitiven Liposomen innerhalb endosomaler Vesikel hin. Innerhalb dieser Kompartimente befinden sich die Liposomen in relativ kleinen Räumen. Durch enzymatischen Abbau werden diese Liposomen zwar zerstört, können ihre „volle“ Fluoreszenz aber dabei nicht zum Ausdruck bringen, da die relativ kleinen Volumina keine starke Verdünnung der hoch konzentrierten Calceinlösung zulassen. Einen weiteren Beweis gleicher Internalisierungstendenzen lieferte der zweite Messwert. Nach Tritonzugabe wurden Fluoreszenzwerte gleichen Ausmaßes sichtbar. Dies beweist, dass insgesamt gleich viele Liposomen durch die Endothelzelle aufgenommen wurden. Das Calcein der pH-sensitiven Liposomen konnte sich nach erfolgter Internalisierung und Destabilisierung im gesamten Zytosol ausbreiten und erfuhr dadurch eine starke Verdünnung, was mit dem kompletten Verlust des „self-querch-Effektes“ verbunden war. Dies wurde anhand der erhöhten Fluoreszenzwerte deutlich. Die Fluoreszenzunterschiede der ersten Messung innerhalb der pH-sensitiven Liposomen im Diagramm waren auf das unterschiedliche Ausmaß vorangegangener Bindungsprozesse

zurückzuführen. Entsprechend vorheriger Bindungsquantifizierungen (Kapitel 4.2.2.1.) wurde der Bindungsvorteil bei den spezifisch gerichteten Immunoliposomen sichtbar. So waren die spezifisch gerichteten pH-sensitiven Immunoliposomen (70%) den pH-insensitiven ungekoppelten Liposomen (20%) in der Freigabe ihres Inhaltes im Zytosol um den Faktor 3 überlegen.

Bei Einbau von PEG-PE für die sterische Stabilisierung der Immunoliposomen wurde die schon erwähnte schlechtere Bindungsrate in Form geringerer zweiter Messwerte sichtbar. So zeigte die Anwesenheit von 5mol% PEG-PE im Gegensatz zur PEG-freien Formulierung sowohl in der ersten als auch in der zweiten Messung nur halb so starke Fluoreszenzwerte. Die Abnahme war zu erwarten, deckt sich mit den Literaturdaten [Slepushkin et al. (1997), Spragg et al. (1997)] und beweist auch die Ergebnisse der Bindungsuntersuchungen aus Kapitel 4.2.1.. Was jedoch verwunderte war die Tatsache, dass die pH-sensitiven Immunoliposomen mit 1mol% PEG-PE keine Abnahme der Fluoreszenz zeigten, sondern eine Verstärkung der intrazellulären Fluoreszenzsignale aufwiesen. Die Verbesserung der intrazellulären Freigabe (1. Messung) um 20% und in den Gesamtbindungsanteilen (2. Messung) um 30% gegenüber PEG-freier Vesikel kann nur schwer erklärt werden. Es bestätigt sich die Aussage, dass in-situ- und in-vitro-Versuche zum Teil erhebliche Unterschiede aufweisen.

Im in-situ-Versuch war das saure Medium für die pH-sensitiven Immunoliposomen sofort zugänglich, wohingegen im Zellinneren die endosomale Membran als Barriere auftauchte. Eine mögliche Erklärung der besseren pH-sensitiven Freigabe nach Einbau von 1mol% PEG-PE wäre die Phasenseparation der PEG-PE-Anteile und die dadurch verursachte stärkere Instabilität. Ähnliche Aussagen machten auch Slepushkin et al. (1997) innerhalb ihrer in-vivo-Versuche von sterisch stabilisierten pH-sensitiven Liposomen in Ratten. Dies würde diese These unterstützen. Der Einsatz von Cyanur-PEG-PE als Kopplungsanker brachte in den intrazellulären Freisetzungstudien keine nennenswerten Unterschiede. Die Daten erreichten jedoch das Niveau der PEG-freien pH-sensitiven Immunoliposomen vom Typ 1. Dies zeigt deutlich den Vorteil des Typs 2. Eine sterische Stabilisierung muss demnach einer pH-abhängigen Freigabe nicht mehr entgegenstehen.

Die Freigabe der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen nach erfolgter Endozytose und Kontakt mit sauren Zellkompartimenten sollte durch Vorinkubation mit Ammoniumchlorid, einem Inhibitor der endosomalen Azidifizierung, gehemmt werden [Maxfield (1982), Straubinger et al. (1990), Yoshimura et al. (1995), Slepushkin et al. (1997), Kirpotin et al. (1997)]. Damit kann die pH-abhängige Freigabe auch intrazellulär gezeigt werden. Die Azidifizierung kann weiterhin auch mit Bafilomycin A, einem Toxin aus Streptomyces-Bakterien, das gezielt H^+ -ATPasen hemmt [Yoshimori et al. (1991)] und Chloroquin [Connor et al. (1985), Koning et al. (1999)] blockiert werden. Die zweite Messung nach Ammoniumchloridinkubation beweist in Abbildung 23, dass die Anwesenheit von Äquilibrierungsreagenzien keinen Einfluss auf Bindung und Internalisierung besitzt. Die Fluoreszenzwerte stimmten mit denen ohne Vorinkubation überein. Die Veränderung durch Ammoniumchlorid wurde aber in der ersten Messung deutlich. Hier zeigte sich deutlich, dass alle pH-sensitiven Immunoliposomen unabhängig ihres PEG-PE-Anteils in endosomalen Vesikeln verblieben. Die Calceinfluoreszenz der internalisierten Liposomen war unabhängig der pH-Sensitivität gleich groß. Damit ist der Zusammenhang zwischen der pH-sensitiven Freisetzung und dem Vorhandensein saurer Zellkompartimente eindeutig erbracht und verdeutlicht die Vorteile pH-sensitiver Immunoliposomen gegenüber konventionellen Vesikeln.

4.2.3.3. Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glykosid

In weiteren in-vitro-Experimenten sollte das Schicksal pH-sensitiver Liposomen in Endosomen und Lysosomen innerhalb der Endothelzelle nach erfolgreicher Internalisierung gezeigt werden. Es ist bekannt, dass sich Liposomen nach Bindung und Internalisierung in lysosomalen Vakuolen konzentrieren und dort abgebaut werden [Straubinger et al. (1983), Daleke et al. (1990)]. Normalerweise erreicht dieses internalisierte Material dann über frühe und späte Endosomen die lysosomalen Vesikel [Mellman et al. (1986)]. Mit der Kenntnis der enzymatischen Aktivität dieser verdauenden Zellkompartimente konnte durch Anwendung lysosomaler Substrate auf einer eleganten Art und Weise der Verbleib internalisierter Liposomen innerhalb der Lysosomen gezeigt werden. Ein messbarer Effekt wird dadurch erhalten, indem man ein nichtfluoreszierendes Substrat verwendet, das nach lysosomaler Metabolisierung fluoreszent wird. Liposomen, die einen solchen Stoff beinhalten, werden bei Aufnahme ins Lysosom abgebaut und bewirken eine Fluoreszenzerscheinung. Innerhalb des Versuches wurde 4-MU- β -D-Glykosid eingesetzt. Nach Abspaltung durch Glykosidasen entstand das freie Fluorophor 4-Methylumbelliferon (4-MU), das im Gegensatz zur gebundenen Form fluoresziert (320-366nm).

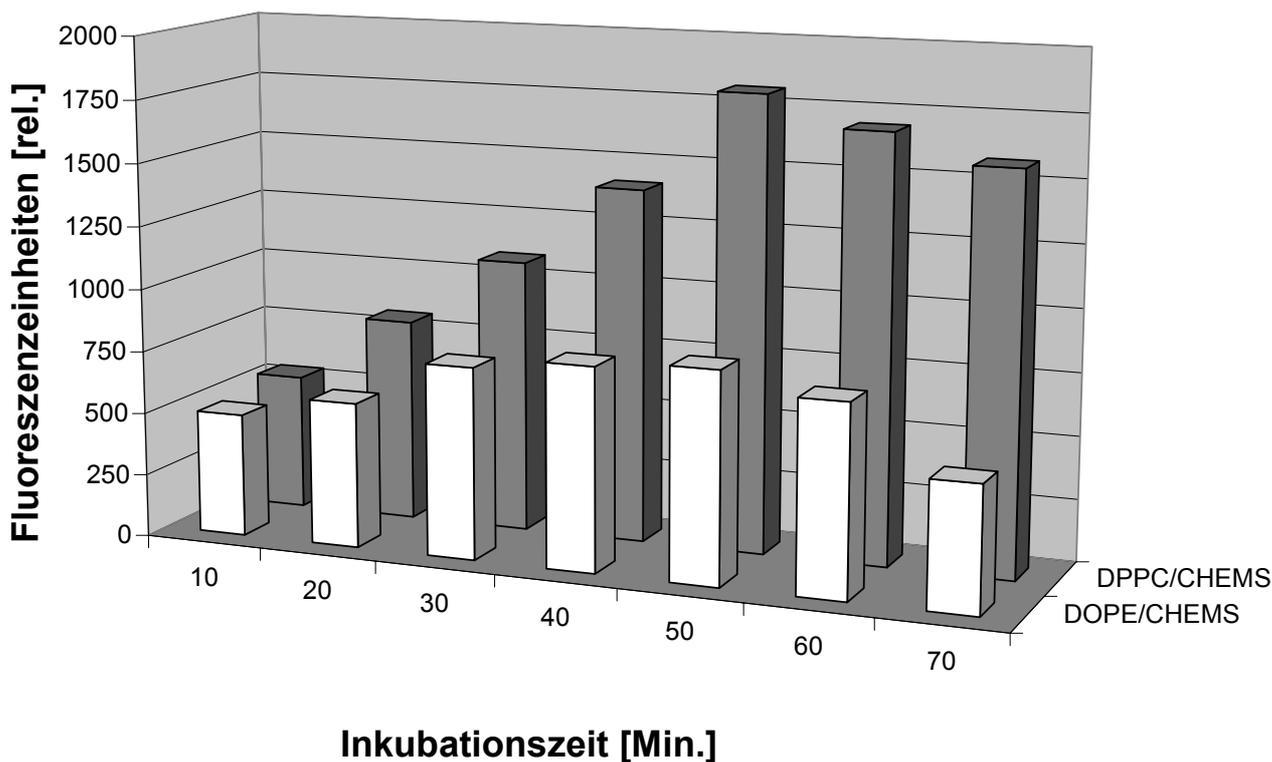


Abb. 24: Fluoreszenzentwicklung durch freies 4-Methylumbelliferon

In der Abbildung 24 sind deutlich die Unterschiede zwischen pH-sensitiven und pH-insensitiven Immunliposomen zu erkennen. Trotz der anfänglichen Grundfluoreszenz war nach 30 Minuten bei den pH-insensitiven Liposomen eine stärkere Fluoreszenzentwicklung sichtbar. Das bedeutete, dass sie sich im Innenraum lysosomaler Vesikel befanden und dort

metabolisiert wurden. Ein gewisser Anstieg ist auch innerhalb der pH-sensitiven Immunoliposomen zu erkennen. Auch diese Liposomen wurden trotz pH-Sensitivität zu einem gewissen Teil in Lysosomen abgebaut. Im Vergleich fällt dies aber eher gering aus. Eine weitere Aussage wurde durch die Zeitabhängigkeit möglich. Nach ca. 50 bis 60 Minuten hatte der Fluoreszenzanstieg innerhalb beider Liposomenarten seinen Maximalwert erreicht. Dies könnte als Schätzwert für die Dauer eines Vorganges, der sich aus Bindung, Internalisierung und intrazellulärem Transport ins Lysosom zusammensetzt, gewertet werden. Anhand dieses Versuches konnte wiederholt das unterschiedliche Schicksal der pH-sensitiven und pH-insensitiven Immunoliposomen gezeigt werden, was die Vorteile der pH-Sensitivität erneut bestätigt.

4.2.3.4. Mikroskopische Aufnahmen

Die Lokalisierung der pH-insensitiven Immunoliposomen in endosomalen Kompartimenten sollte anhand mikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden. Dazu wurde nach erfolgter Inkubation eine einzelne Nabelschnurendothelzelle fluoreszenzmikroskopisch im konfokalen Modus beobachtet. Unter konfokal versteht man die Eigenschaft, nur die fokussierte Ebene isoliert darstellen zu können. Mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie war es somit möglich, nur die gewählte Ebene zu betrachten und das emittierte Fluoreszenzlicht aus den Ebenen darüber und darunter auszublenden.

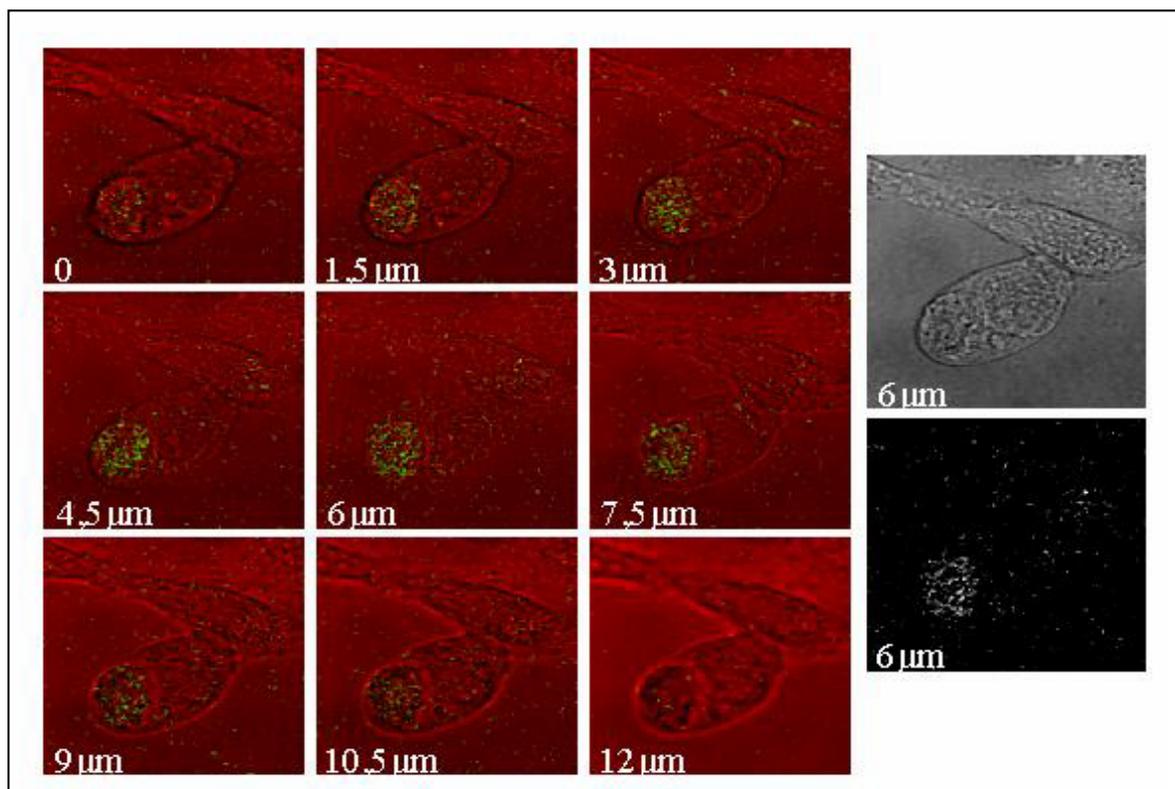


Abb. 25: z-Scan durch eine Endothelzelle nach Internalisierung pH-insensitiver Immunoliposomen (NBD-PE)

Während der Betrachtung wurde die ausgewählte Zelle nichtinvasiv optisch zerschnitten. Je nach Dicke der Zelle wurden dabei Aufnahmen in Schritten von 1 bis 2µm Tiefenabstand gemacht. Dieses Durchfokussieren konnte anschließend nebeneinander dargestellt werden, wobei ein räumlicher Eindruck entstand. Anhand der Bilderfolge in Abbildung 25 ist es möglich, die intrazellulären Aufenthaltsorte der internalisierten Immunoliposomen anschaulich darzustellen. Bei dieser Liposomenpräparation wurde NBD-PE als Marker verwendet. Es sind innerhalb der Zelle die punktförmigen Fluoreszenzsignale gut zu erkennen. Man sieht auch eine deutliche Separation der eingeschlossenen Vesikel innerhalb festgelegter endosomaler bzw. lysosomaler Kompartimente, was die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.3.1. und 4.2.3.2. untermauert. Es ist zu erkennen, dass pH-insensitive Immunoliposomen intrazellulär in lysosomalen Bereichen konzentriert vorliegen.

Entsprechend andere Aufnahmen konnten bei der Inkubation mit Liposomen pH-sensitiver Lipidzusammensetzung gemacht werden. Zur Verdeutlichung der Verteilung des Vesikelinhaltes im gesamten Zytoplasma wurde jedoch mit Calcein als Fluoreszenzmarker gearbeitet. Abbildung 26 zeigt eine einzelne Endothelzelle nach Inkubation mit calcein-beladenen pH-sensitiven Immunoliposomen.

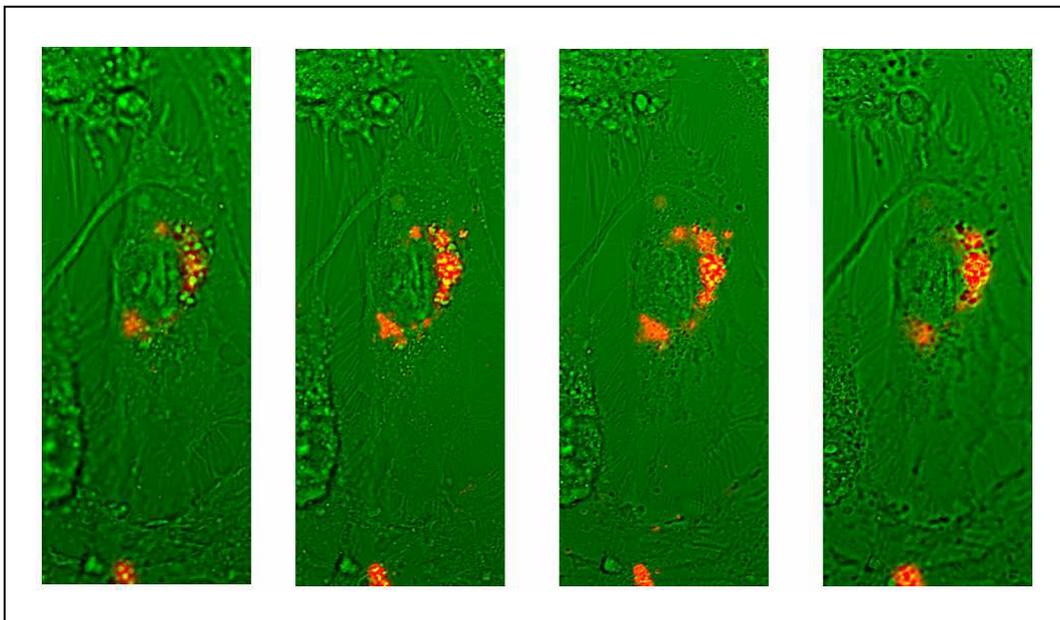


Abb. 26: z-Scan (je 3µm) durch eine Endothelzelle nach Internalisierung pH-sensitiver Immunoliposomen (Calcein)

Es ist deutlich die Verteilung des liposomalen Inhaltes im Zytoplasma zu erkennen. Das Calcein fluoresziert nicht in einzelnen Lysosomen, sondern breitet sich um den Zellkern aus. Die Ausparung des Zellkerns ist typisch für eine Aufnahme direkt nach der Inkubation [Krause (2000)], da der Transport in den Zellkern mehr Zeit in Anspruch nimmt. Der spätere Arzneistoff im Zytoplasma steht somit der Endothelzelle für intrazelluläre therapeutische Wirkungen zur Verfügung. Damit sind die Vorteile der pH-sensitiven Immunoliposomen bildlich eindrucksvoll nachgewiesen.

4.3. Sterisch stabilisierte pH-sensitive Immunoliposomen als Transfektionssystem

Im Hinblick auf eine therapeutische Relevanz musste nun der Versuch einer erfolgreichen Beladung der Vesikel mit späteren Arzneistoffen unternommen werden. Ziel ist es, mit Hilfe der intensiv untersuchten (Bindung, Internalisierung, Freisetzung, intrazelluläres Schicksal) sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen einen erfolgreichen Gentransfer in humane Endothelzellen realisieren zu können. Probleme, wie ungenügende Einschlusseffizienz der DNA in Liposomen und die relativ niedrige Transfektionsrate der Endothelzellen müssen dabei überwunden werden.

4.3.1. Herstellung und Charakterisierung plasmidhaltiger Liposomen

Die Herstellung plasmidhaltiger Vesikel stellt grundsätzlich keine Probleme dar. Jedoch sind die Voraussetzungen, die an liposomale Trägersysteme für einen Gentransfer gestellt werden, ziemlich hoch. Entsprechend der Kosten gentechnisch hergestellter Plasmide wird klar, dass die Grenzen für eine Anwendung im Bereich der Verkapslungsraten liegen. Den üblichen Herstellungsmethoden (Kapitel 3.2.1.) stehen ihre inakzeptablen Einschussquoten gegenüber. Je nach Art der Herstellung variieren die Einschussmengen stark [Szoka et al. (1980)]. Die Filmmethode (Hydratationsmethode) verliert mit maximal 4% Einschuss ihre Bedeutung innerhalb des Gentransfers völlig. Weitaus interessanter scheinen die Phasenumkehr- und die Detergenzmethode zu sein. Je nach Art der einzuschließenden Stoffe wurden dort Verkapslungsraten von 10% ermittelt. Ein großer Fortschritt war die Erkenntnis, dass man plasmidhaltige DNA durch Einsatz von Polykationen zur Kondensation bringen konnte [Gruner et al. (1985)]. Mit der Verwendung kationischer Lipide zur Liposomenherstellung wurde es möglich, Komplexe zwischen Liposomen und DNA herzustellen [Felgner et al. (1989)]. Erfolgreiche Transfektionsversuche wurden mit diesen Lipoplexen bzw. Genosomen erstmals möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Lipidzusammensetzung der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunoliposomen für das spätere liposomale Transfektionssystem übernommen werden. Die Lipoplexbildung musste dabei im Vorfeld ausgeschlossen werden, da es sonst zu unvorhersehbaren Wechselwirkungen zwischen kondensierter DNA und funktionalisierten Antikörpermolekülen kommen konnte. Außerdem wurden Komplexgröße, vorhandene Ladung, heterogene Struktur und nichtspezifische Zytotoxizität der Lipoplexe innerhalb mehrerer Studien für Transfektionen als problematisch angesehen [Thierry et al. (1992)] und galten deshalb nicht als zukunftsfruchtig. Es musste eine Liposomenpräparation gefunden werden, die im Rahmen der Herstellung zuerst eine effiziente Verkapslung von DNA garantiert und im Nachhinein eine Antikörperkopplung zulässt. Die Herstellungsmethoden der CCL und der SPLP zeigen Lösungsansätze.

CCL:

Die CCL (cationic coated vesicles) wurden erstmals von Pagnan beschrieben [Pagnan et al. (2000)]. Da sich die pH-sensitiven Eigenschaften deutlich als Vorteil herausstellten, wurden jetzt im Gegensatz zu Pagnan nicht HSPC und DSPE-PEG, sondern DOPE, CHEMS

und Cyanur-PEG-PE als Mantellipide eingesetzt. Die Effizienz des DNA-Einschlusses ist in der Kombination aus Herstellungsmethode und vorherigen Lipoplexbildung begründet. Die Plasmid-DNA wurde zuvor in Wasser gelöst und mit dem kationischen Lipid DOTAP zur Komplexierung gebracht. Um diesen Vorgang gewährleisten zu können, musste aus dem Zwei-Phasen-System ein Ein-Phasen-System gebildet werden. Durch Methanolzugabe entstand eine Monophase. Durch eine anschließende Blich- und Dyer-Extraktion konnten sich zwischen kationischem Lipid und Plasmid-DNA hydrophobe Komplexe ausbilden [Reimer et al. (1995)]. Innerhalb einer entsprechenden Inkubationszeit kam es zur Reifung dieser Komplexe. Nach Phasenseparation durch Zugabe von Wasser und Chloroform, welches die späteren Mantellipide der Liposomen enthielt, schloss sich die Durchführung der Phasenumkehrmethode an (Kapitel 3.7.1.). Innerhalb der 100nm großen Vesikel konnten durchschnittlich 40% der eingesetzten Plasmidmenge quantifiziert werden (Hoechst-Assay). Die Funktionalisierung mit Antikörpern gestaltete sich in den beschriebenen Kopplungsausbeuten als unproblematisch. Sie lagen im Bereich von 40µg Protein/µmol Phospholipid und waren mit den Kopplungsergebnissen aus Kap. 4.2.1. vergleichbar. Die pH-sensitiven Eigenschaften der hergestellten CCL wurden anhand von Freisetzungsversuchen nachgewiesen und bestätigten die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.3.1.. Die prozentual freigesetzten Mengen des vorher eingeschlossenen Calceins in den unterschiedlichen pH-Bereichen sind in der Abb. 28 dargestellt und werden gemeinsam mit dem Freisetzungsverhalten der SPLP erläutert. Für die Anwendung der CCL als erfolgreiches pH-sensitives Transfersystem musste zusätzlich noch die erforderliche Serumstabilität nachgewiesen werden. Man musste davon ausgehen, dass die Stabilität der Lipidbilayer durch die verkapselten Lipoplexe gestört sein könnte. Eine zusätzliche Wechselwirkung mit Serumproteinen könnte eine komplette Instabilität herbeiführen. Dies würde zu einem vollständigen extrazellulären Austritt des Liposomeninhaltes führen. Ein gezielter Transport von Genmaterial in die entzündungsrelevanten Endothelzellen wäre somit nicht möglich und würde einem Therapieansatz entgegenstehen. Bei den Untersuchungen der CCL konnten jedoch keine Instabilitäten festgestellt werden. Sowohl die leeren als auch die plasmidhaltigen Liposomen zeigten die schon in Kap. 4.2.3.2. ermittelten Serumstabilitäten der pH-sensitiven Immunoliposomen.

SPLP:

Eine weitere Präparation, die die Vorteile der Lipoplexbildung mit denen der Liposomenbildung vereint, war die der SPLP (stabilized plasmid lipid particles) [Wheeler et al. (1999)]. In den Untersuchungen von Wheeler wurde zusätzlich zum DOPE auch noch PEG-Ceramid als Grundlipid eingesetzt. Erklärbar ist dies durch die Kontraindikation des reinen PEG-PE innerhalb der Lipidmischung in Beisein von Lipoplexen. Es würde zu Aggregationserscheinungen innerhalb der Herstellungsprozedur kommen, da die PEG-PE-Einheiten mit ihren negativen Ladungen das Ladungsverhältnis zwischen DOTAP und Plasmid-DNA stark verändern und sich an die positiv geladenen DOTAP-Moleküle anlagern würden. Dadurch fehlen die positiven Lipidanteile auf der Plasmidoberfläche, was sich in einer gestörten Lipoplexbildung äußert. Der Einsatz des reinen PEG-PE zeigt somit nicht nur deutliche Nachteile in Bezug auf das Bindungsverhalten von Liposomen gegenüber zellulärer Oberflächenstrukturen (Kap. 4.2.1. Abb. 6), sondern auch abnehmende Transfektionsraten bei in-vivo-Untersuchungen [Hong et al. (1997)]. Bei den SPLP handelt es sich im engeren Sinne um eine Art Liposomenherstellung durch Detergenzentzug. Die Komplexbildung und -reifung zwischen DOTAP und Plasmid-DNA wurde auch hier durch eine Inkubationszeit unterstützt. Zur Anwendung kamen DOPE und CHEMS als pH-sensitive Lipidmischung. Mit dem Einsatz von Cyanur-PEG-PE als Kopplungsanker konnten sowohl die von Wheeler beschriebenen Schwierigkeiten während der Präparation als auch die absinkenden Bindungs-

ereignisse durch den Einsatz reiner PEG-Ketten vermieden werden. Nach Detergenzentzug durch Dialysieren wurden Vesikel erhalten, die mit 50nm extrem klein waren. Mit Hilfe einer Dichtegradientenultrazentrifugation konnten gefüllte von leeren Vesikeln abgetrennt werden. Die Quantifizierung der eingeschlossenen DNA-Menge wies mit 85% neben dem Größenvorteil einen weiteren Vorteil gegenüber den CCL auf. Weiterführende Versuche der Antikörperkopplung und der Gewährleistung pH-sensitiven Freigabeverhaltens im Rahmen der Lipidzusammensetzung der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Immunliposomen zeigt Abb. 27. Hier sind CCL und SPLP gegenüber dargestellt. Beide lagen in plasmidhaltiger und leerer Form vor. Damit sollte der Einfluss der komplexierten DNA auf das pH-abhängige Freigabeverhalten der Liposomen untersucht werden. Die CCL weisen untereinander keine nennenswerten Unterschiede auf. Sowohl plasmidhaltige als auch ungefüllte Vesikel zeigen bekannte Freisetzungstendenzen der pH-sensitiven Immunliposomen aus Kap. 4.2.3.. Innerhalb der zweiten Liposomenart (SPLP) zeigen sich jedoch Unterschiede. Die plasmidhaltige Formulierung weist im Vergleich zur leeren Form in allen pH-Bereichen stets schwächere Freisetzungsraten auf. Die Ergebnisse der Abb. 27 wurden nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten ermittelt. Das um ca. 25% schlechtere pH-sensitive Freigabeverhalten der plasmidhaltigen SPLP im Gegensatz zu plasmidgefüllten CCL relativiert sich in Anbetracht des deutlich effizienteren DNA-Einschlusses auf der Seite der SPLP (85% gegenüber 40%).

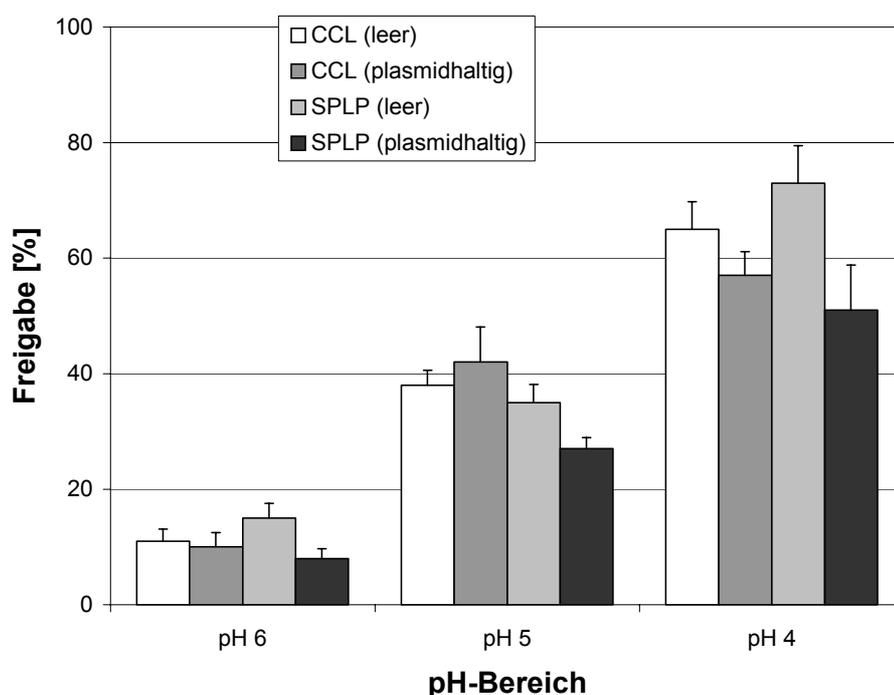


Abb. 27: pH-abhängiges Freisetzungverhalten von CCL und SPLP in Bezug auf Plasmidstatus

Allgemein weist das hier betrachtete Freisetzungverhalten der beiden plasmidgefüllten Präparationen (CCL und SPLP) eine Analogie zu den Eigenschaften der schon bekannten über die Phasenumkehrmethode hergestellten pH-sensitiven Immunliposomen aus Kap. 4.2.3.1. auf. Die SPLP liegen dabei etwas unter den pH-abhängigen Freisetzungsraten der CCL. Die ursprüngliche Entwicklung neuer liposomaler Transportsysteme für die Übertragung von Plasmidmaterial (CCL, SPLP) ging bei Pagnan und Wheeler von HSPC und

DOPE als Grundlipide aus. Eine hocheffiziente Einschussquote sollte mit den besonderen Herstellungsvorschriften erzielt werden und stand demnach im Vordergrund der Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Verknüpfung dieser Methoden mit der pH-Sensitivität als Eigenschaft sterisch stabilisierter Immunliposomen gezeigt werden. Der Einsatz von DOPE und CHEMS konnte erfolgreich mit der Herstellungstechnik der CCL und SPLP kombiniert werden. Im Anschluss an die Realisierung dieser Herstellung schlossen sich Stabilitäts- und Freisetzungsuntersuchungen an. Dieser Schritt wurde nötig, da mit der veränderten Herstellungsart durchaus Veränderungen in der pH-Sensitivität zu erwarten waren. Die Freisetzungsexperimente zeigten aber bei beiden Liposomenarten annähernd gleich gute Ergebnisse, so dass ein Einsatz als liposomales Carriersystem für Transfektionsversuche hoffnungsvoll erscheint. Vor in-vitro-Anwendungen mit Transfektionsversuchen sollte jedoch der Versuch unternommen werden, die Darstellung der Vesikel elektronenmikroskopisch verfolgen zu können. Die Schwierigkeit lag dabei in der Natur der Lipoplex-Darstellung begründet. Durch den Einsatz verschiedener Präparationstechniken (Gefrierbruchtechnik [Sternberg et al. (1994)], Cryo-TEM [Gustafsson et al. (1995)]) wurde es erst möglich, die selten dargestellten Komplexe strukturell näher charakterisieren zu können.

Cryo-TEM:

Die Morphologie der Lipoplexe ist bis heute nicht endgültig geklärt. Zu viele unterschiedliche Anschauungen existieren im Bereich der Untersuchungen. So weisen z. B. manche Komplexe die Form von hexagonal angeordneten DNA-Fragmenten auf, die von einer Lipidbilayer ummantelt sind [Sternberg et al. (1995)]. Andere erkannten, dass die Struktur eng von der Lipidzusammensetzung abhängt. Entsprechend vieler Parameter, wie Ladungsverhältnis und Art des kationischen Lipids, können unterschiedlichste Strukturen auftauchen. In dieser Arbeit sind die CCL und SPLP als Liposomen gut darstellbar gewesen. Nachteilig wirkte sich aber die Eigenschaft der Plasmid-DNA als kontrastarmer Inhalt aus. So gelang es nicht, die im Inneren der gefüllten Liposomen liegenden Lipoplexstrukturen sichtbar zu machen. Auch die Anwendung der Gefrierbruchtechnik brachte keine Vorteile. Es konnte aber auf indirekter Weise das Vorhandensein von Strukturen im Liposomeninneren gezeigt werden.

In Abbildung 28 sind leere Vesikel gefüllten Vesikeln gegenüber gestellt. In der oberen Reihe wurden ungefüllte SPLP betrachtet. Sie entstammten der liposomalen Fraktion, die nach der Dichtegradientenultrazentrifugation im oberen Teil des Zentrifugenröhrchens zu finden war. Es sind unilamellare Liposomen zu erkennen, die gleichmäßig rund erscheinen. In der unteren Reihe sind aus der gleichen Präparation die SPLP zu sehen, die mit Plasmid-DNA-Komplexen gefüllt waren. Der Komplex aus DOTAP und Genmaterial ist nicht als Kontrast sichtbar. Eine Existenz lässt sich aber durch eine sichtbare Strukturveränderung der Liposomen erklären. Sie erscheinen eingedrückt. Innerhalb der beiden unteren Bilder sind auch Vesikel als platt gedrückte Kugeln erkennbar. Dies stellt sozusagen die Seitenansicht dar. Der Lipoplex im Inneren der Vesikel besitzt ziehende Effekte auf die Lipidbilayer und bringt sie dadurch zum Eindrücken. Als Grundfläche bleibt eine Kreisform erhalten. Da die Erythrozyten- bzw. Plättchenform der Vesikel nur innerhalb der gefüllten SPLP auftrat, konnte die strukturelle Veränderung als indirekter Beweis für ein Vorliegen intraliposomaler Komplexe herangezogen werden. Untersuchungen innerhalb der CCL zeigten diese Besonderheit nicht auf und wurden deshalb nicht dargestellt.

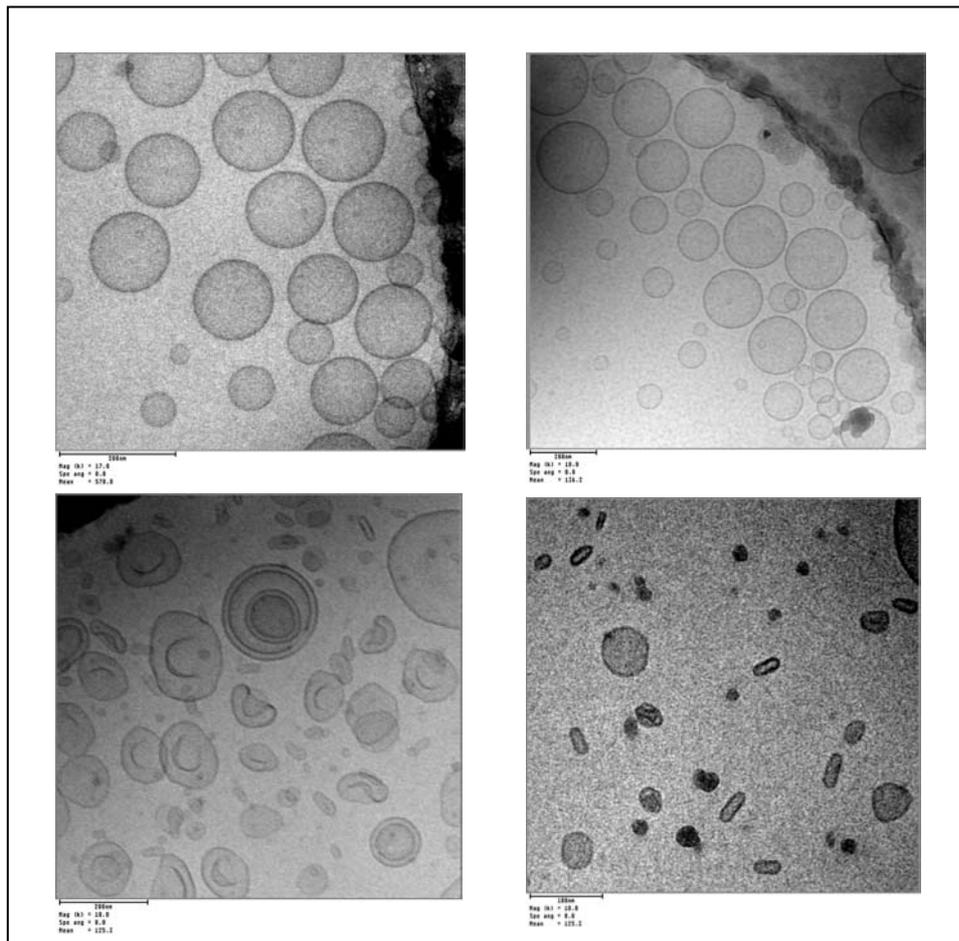


Abb. 28: cryo-TEM-Aufnahmen gefüllter bzw. ungefüllter SPLP

4.3.2. Transfektionsfähigkeit von *E. coli*

Um in ersten Transfektionsuntersuchungen die Wirksamkeit der vorgestellten liposomalen Transfektionsvehikel zu testen, wurde auf ein vereinfachtes bakterielles Versuchssystem zurückgegriffen. *E. coli* erweist sich innerhalb der Gentechnologie als ein relativ leicht zu transfizierendes Bakterium und wurde deshalb als Ziel ausgewählt. Hierbei sollte nicht die Ermittlung der bestmöglichen Transfektionsraten im Vordergrund stehen. Stattdessen sollte der qualitative Beweis für eine erfolgreiche Transfektion erbracht werden. Da das eingesetzte Plasmid erfolgreich transfizierten Zellen eine Ampicillinresistenz verleiht, kann durch Einsatz ampicillinhaltigen Mediums die Auswertung über die Anzahl der gewachsenen Kolonien vorgenommen werden. In der Abbildung 29 sind die Resultate dieser ersten Transfektionsversuche vorgestellt. Die oberen beiden Bilder zeigen *E. coli*, die mit plasmidhaltigen CCL transfiziert (unterschiedliche Plasmidmengen) und anschließend auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Es sind innerhalb beider Konzentrationen kaum erfolgreich transformierte Bakterienstämme zu erkennen. Auf den unteren beiden Bildern sind Kolonien von *E. coli* zu sehen, die zuvor mit SPLP transfiziert wurden. Hier weisen beide Konzentrationen eine beachtliche Anzahl von Bakterienkolonien auf.

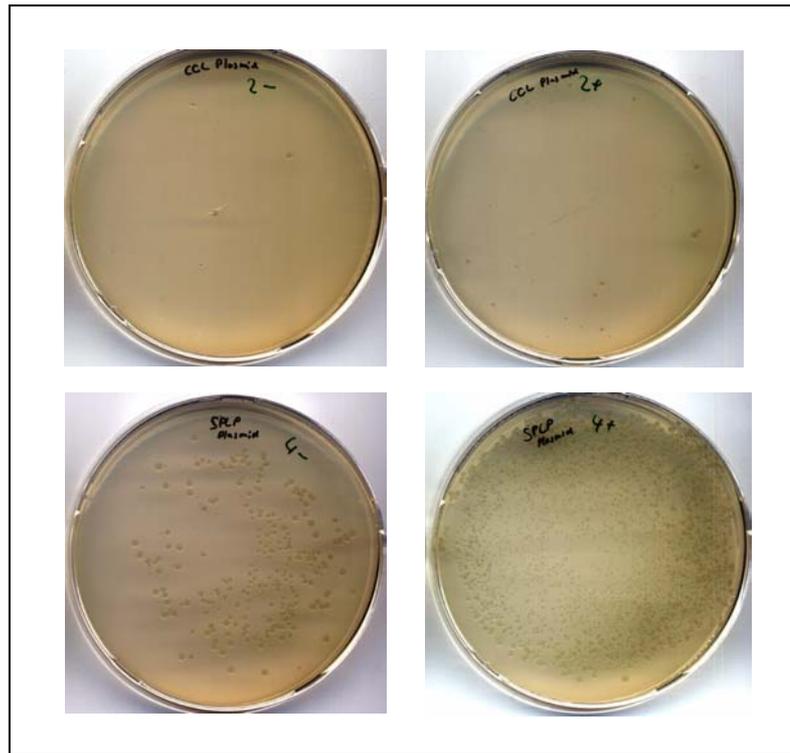


Abb. 29: Transfektion von E. coli durch CCL und SPLP

Ein exakter Vergleich beider Liposomenarten war möglich, da durch vorherige Phosphatbestimmung immer die gleiche Menge Liposomen hinzugegeben werden konnte. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Einschussraten der zugesetzten Plasmidmengen bei beiden Präparationen nicht gleich hoch waren. Die Präparation der CCL enthält mit 30% Einschluss nur ein Drittel der Menge an Plasmid-DNA, die innerhalb der SPLP (85%) wieder zu finden war. Deshalb muss für einen internen Vergleich beider Präparationen die Kolonieanzahl der CCL mit dem Faktor drei multipliziert werden. Dann ist innerhalb der Abbildung 29 ein Vergleich der untereinander stehenden Bilder möglich. Trotz dieser Korrektur sind die SPLP als liposomales Transfektionssystem den CCL weit überlegen.

Mit diesem Experiment konnte der erfolgreiche Gen-Transfer gezeigt werden. Eine Aussage zur verbesserten Aufnahme der Immunoliposomen im Vergleich zu konventionellen Liposomen bzw. Berücksichtigung der pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft lässt sich hier nicht treffen. Ein Vergleich zwischen Ergebnissen bakterieller Testsysteme mit Daten aus humanen Zellexperimenten ist nicht realistisch und verbietet sich daher. Da sich CCL und SPLP in diesem E. coli-Versuch nur in der Menge der komplexierten Plasmid-DNA unterschieden (Lipidzusammensetzung als sterisch stabilisierte pH-sensitive Immunoliposomen war identisch), wurden für weitere Transfektionsversuche nur noch SPLP verwendet. Auf dieser Basis sollte es möglich sein, Transfektionsuntersuchungen an den eigentlichen Zielzellen, den humanen Endothelzellen durchführen zu können.

4.3.3. Transfektionsfähigkeit humaner Endothelzellen

Die Übertragung von Genmaterial und die erfolgreiche Expression in-vitro konnte durch Liposomen vermittelt werden. Der große Nachteil besteht jedoch in der geringen Effizienz der Übertragung [Fraley et al. (1981)]. Mit der Lipoplexbildung zwischen kationischen Lipiden und Plasmid-DNA war ein effizienterer Transport mit Liposomen möglich [Felgner et al. (1989)]. Durch die Kombination der Vorteile der Immunoliposomen mit denen der Lipoplexbildung konnten auch in-vivo höhere Transfektionsraten erzielt werden [Compagnon et al. (1997)]. In diesem Versuch soll die Transfektionsfähigkeit humaner Endothelzellen untersucht werden, die sich durch Stimulation mit IL-1 β in einer Entzündungsphase befinden. Auf der Liposomenoberfläche existierende Antikörper gegen das E-Selektin sollen eine Targetspezifität bewirken, die in den vorherigen Bindungsuntersuchungen hinreichend nachgewiesen wurde. Die Lipidzusammensetzung wurde entsprechend der sterisch stabilisierten pH-sensitiven Liposomen gewählt, so dass die Plasmidfreigabe innerhalb der Endothelzellen verstärkt stattfinden konnte. Neben der Anwendung von β -Galaktosidase [Lim et al. (1989)] findet auch Luciferase [Brassier et al. (1989)] in Form von Plasmid-DNA für Transfektionsversuche Anwendung. Für die folgenden Versuche kam GFP als Plasmid-DNA zum Einsatz. Nach der Inkubation mit den Liposomen schloss sich eine weitere Kultivierung der Endothelzellen für 48 Stunden im Brutschrank an. Dieser Zeitraum war nötig, da die Zellen die zuvor internalisierte DNA erst in ihren Zellkern aufnehmen und in ihr Genom einbauen müssen. Durch Transkriptions- und Translationsprozesse muss dann diese neue Information in die entsprechende Proteinform umgesetzt werden. Das resultierende Protein zeigt die typisch grünliche Fluoreszenz der erfolgreich transfizierten Zelle.

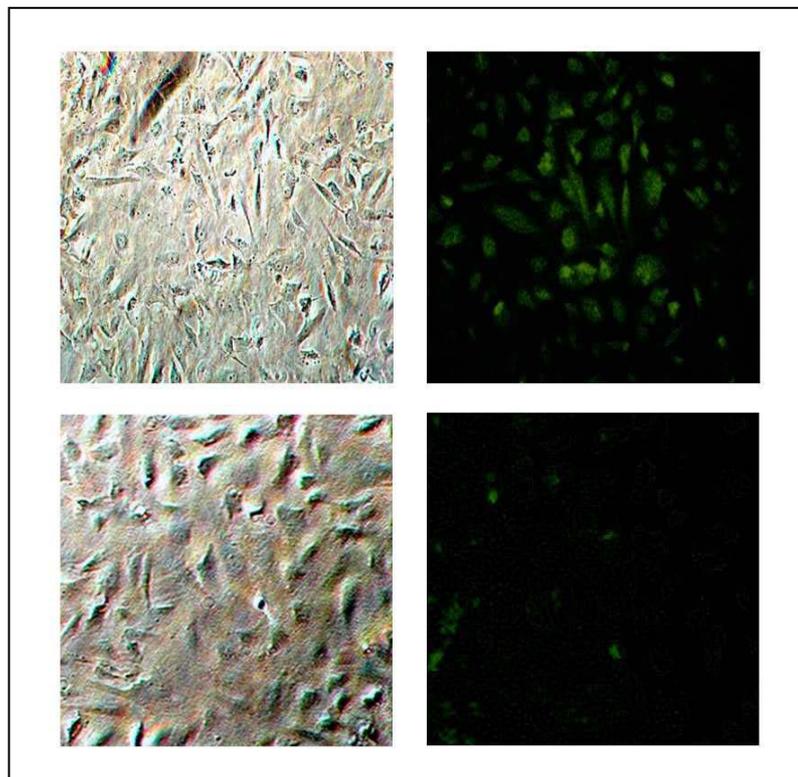


Abb. 30: GFP-Transfektion von HUVEC

Abbildung 30 zeigt Endothelzellen, die einerseits mit konventionellen Immunoliposomen und andererseits mit „E-Selektin“-targetierten pH-sensitiven SPLP transfiziert wurden. Die Bilder wurden bei einem Verhältnis von 50pg Plasmid/HUVEC aufgenommen (auf SPLP bezogen). In der oberen Reihe sind die Endothelzellen zu sehen, die mit den SPLP-Nr.1 transfiziert wurden. Diese besaßen neben dem spez. Anti-E-Selektin-Antikörper (an Cyanur-PEG-PE gekoppelt) zusätzlich pH-sensitive Eigenschaften. Transmissions- und Fluoreszenzmodus sind nebeneinander dargestellt. In der unteren Reihe wurden die HUVEC mit konventionellen Immunoliposomen transfiziert (pH-insensitiv, unspez. IgG, Herstellung über Phasenumkehr). Die Unterschiede in der Fluoreszenzerscheinung sind deutlich zu erkennen. Sie beruhen anscheinend nur auf einer verbesserten Einschussrate des GFP-Plasmids innerhalb der SPLP. Entsprechend der Charakterisierung der SPLP wurden bekanntlich 85% der zugesetzten Plasmidmenge in den resultierenden Liposomen wieder gefunden. Demgegenüber standen nur 8% Einschluss der Plasmidmenge bei den konventionell über die Phasenumkehr hergestellten Immunoliposomen. In weiteren Transfektionsversuchen konnte der Grund dieses Transfektionsvorteils genauer analysiert werden. Die aktivierten HUVEC wurden dazu zusätzlich mit den SPLP-Nr.2 und SPLP-Nr.3 transfiziert, die ebenfalls gleiche GFP-Mengen enthielten. Im Vergleich zu den gut transfizierenden SPLP-Nr.1 fehlte ihnen aber jeweils eine „positive“ Eigenschaft. Bei den SPLP-Nr. 2 wurde während der Kopplungsprozedur nur unspez. humanes IgG verwendet. Die SPLP-Nr. 3 wiesen durch den Austausch von DOPE mit DPPC keine pH-sensitiven Eigenschaften mehr auf. Die Transfektionsergebnisse dieser Liposomen glichen denen der oben dargestellten konventionellen Immunoliposomen in der unteren Reihe des Bildes. Da alle drei SPLP-Formulierungen gleiche Mengen an GFP enthielten, kann das positiv erzielte Transfektionsergebnis nicht nur durch die eingeschlossene Plasmidmenge begründet werden.

Dies lässt deutlich werden, dass die erfolgreiche Transfektion humaner Nabelschnur-endothelzellen nur durch die Kombination mehrerer „Systemvorteile“ möglich ist. Dazu gehört zuerst die effiziente Komplexierung der verwendeten Plasmid-DNA mit kationischen Lipiden. In dieser Arbeit wurde dazu ein Ladungsverhältnis zwischen DOTAP und Plasmid von 3 gewählt. Anschließend muss durch eine gesonderte Herstellungstechnik die möglichst vollständige Verkapselung der entstandenen Lipoplexe in das Innere der Liposomen gewährleistet sein. Hierbei zeigte sich die Überlegenheit der SPLP-Präparation gegenüber der der CCL. Weiterhin ist für die gezielte Targetierung der Liposomen am entzündeten Endothel die Kopplung spezifischer Selektin-Antikörper an der Außenseite der entstandenen SPLP nötig. Als letzte Bedingung mussten diese Liposomen nach erfolgter Bindung und Internalisierung durch die Endothelzelle ihren Inhalt in kürzester Zeit dem Zytosol zur Verfügung stellen können. Nur so kann ein Abbau der internalisierten Liposomen durch lysosomale Enzyme verhindert werden. Diese Voraussetzung erfüllen nur Liposomen mit pH-sensitiven Eigenschaften. Die Transfektionsergebnisse zeigen deutlich, dass alle diese Eigenschaften zusammen in einer Präparation vereint vorliegen müssen. Wird nur eine Voraussetzung nicht erfüllt, wie z.B. die Kopplung unspezifischer Antikörper statt spezifischer Anti-E-Selektin-Antikörper bzw. der Verzicht der pH-Sensitivität als liposomale Eigenschaft, ist das Transfektionsresultat gefährdet. Damit wird klar, dass für die Transfektion aktivierter endothelialer Zellen besondere Bedingungen existieren, die mit liposomalen Transfektionssystemen erfüllt sein müssen. Die hier vorgestellten SPLP-Vektoren zeigen somit die prinzipielle Eignung und ein großes Potential, als systemische DDS in einer zukünftigen Gentherapie von chronischen Entzündungserkrankungen zu wirken. Als Voraussetzung dafür müssen aber, über die hier vorgestellten ersten Untersuchungen hinausgehende Optimierungen der Transfektionssysteme in Hinblick auf hohe Transfektionsraten erfüllt werden.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Targetierung endothelialer Selektine mit Liposomen. Durch das zeitlich limitierte Vorkommen innerhalb begrenzter Gefäßabschnitte stellt das vaskuläre E-Selektin in der Entzündungsphase ein hervorragendes Target dar. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten die Bindungsereignisse der selektingerichteten Immunliposomen an HUVEC untersucht werden. HUVEC dienten dabei als Vertreter humaner Gefäßendothelzellen. Die Bindungsprozesse wurden in vielerlei Hinsicht auf ihre Abhängigkeit gegenüber verschiedenen Parametern untersucht. So wurden aktivierte (stimulierte) HUVEC nicht aktivierten Zellen in Bindungsversuchen gegenübergestellt. Zwei unterschiedliche Arten von Kopplungsankern wurden innerhalb der Bindungsstudien unter Einbeziehung einer späteren sterischen Stabilisierung durch PEG verglichen. Der Antikörper sollte sich gegenüber den Polyethylenglykoleinheiten nach der Kopplungsprozedur in einer exponierten Lage befinden. Der Typ 2 der Immunliposomen konnte dieser Anforderung gerecht werden. Die Bindungsversuche zeigten, dass ein Vorhandensein spezifischer E-Selektin-Antikörper auf der Liposomenoberfläche und ein Entzündungsstatus des Endothels Voraussetzungen für ein selektingerichtetes Drug Delivery System darstellten. Ein erheblicher Bindungsvorteil der selektingerichteten Immunliposomen gegenüber konventionellen Liposomen (ungekoppelt) bzw. unspezifischen Immunliposomen konnte ermittelt werden.

Der Bindungsvorteil separat betrachtet steht nicht gleichzeitig für einen Therapieerfolg. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Internalisierung der gebundenen Liposomen in das Zellinnere der Endothelzellen betrachtet. Der aufgenommene Anteil konnte quantifiziert werden. Des Weiteren war es möglich, die zellulären Aufnahmemechanismen zu bestimmen. Mit den Ergebnissen konnte die Anzahl an Liposomen berechnet werden, die für einen späteren Effekt im Rahmen einer antiinflammatorischen Therapie für die Wirkung verantwortlich sein werden. Nur ein sehr kleiner Anteil gelangt nach erfolgter Bindung in das Zellinnere. Um die Liposomen bzw. ihren späteren Inhalt vollkommen intrazellulär zur Wirkung bringen zu können, sollten weitere Untersuchungen folgen. Der Wirkstoff im Inneren der Liposomen musste dem Zellstoffwechsel verfügbar gemacht werden. Internalisierte Vesikel werden nach kurzer Zeit intrazellulär verdaut und würden dem Metabolismus nicht mehr bereit stehen. In anschließenden in-vitro-Untersuchungen sollte die Anwendung sterisch stabilisierter pH-sensitiver Immunliposomen den lysosomalen Abbau verhindern. Im Vergleich zu pH-insensitiven Liposomen konnte anhand mehrerer Experimente der Vorteil der pH-sensitiven Immunliposomen gezeigt werden. Damit wurde ein späterer Wirkverlust durch lysosomale Degradation verhindert.

Das Gesamtvorhaben dieser Arbeit richtete sich auch auf die erfolgreiche Kombination der zuvor optimierten Teilschritte des liposomalen Endotheltargetings. Als Ausdruck dessen wurde die Realisierung einer Gentransfektion der Endothelzellen durch die Liposomen angestrebt. Die selektingerichteten Immunliposomen sollten am Ort der späteren Entzündung intrazellulär Plasmid-DNA freisetzen können. Zur Kontrolle der Freigabe und des erfolgreichen Einbaus der externen DNA wurden Transfektionsversuche herangezogen. Da die äußerst geringen Einschussraten der Liposomen bisher nicht von Belang waren, mussten die Liposomenpräparationen neu charakterisiert werden. Im Zuge der Untersuchungen konnte eine neue Herstellungsmethode entwickelt werden, die die Vorteile des effizienten Plasmideinbaus durch Lipoplexbildung innerhalb einer Detergenzmethode zur Liposomenherstellung mit der Eigenschaft targetspezifischer pH-sensitiver Immunliposomen verknüpft. Erste Versuche an Bakterien zeigten diese Vorteile. In einem letzten Arbeitsteil sollte die Transfektionsfähigkeit an den sonst schwer transfizierbaren HUVEC gezeigt werden. Hier wurde deutlich, dass eine erfolgreiche Transfektion nur durch die Kombination mehrerer liposomaler Eigenschaften gelingt. Die eingesetzten Liposomen müssen das

Genmaterial in konzentrierter Form beinhalten (Lipoplexbildung). Dieses muss nach der Herstellungsprozedur möglichst quantitativ im Liposomeninneren wieder zu finden sein (Therapiekosten, -effizienz). Die Liposomen müssen sich durch besondere Oberflächenstrukturen selektiv am entzündeten Endothel vermehrt anreichern können (Kopplung des spez. Anti-E-Selektin-Antikörpers). Da der Therapieerfolg nur durch den Einbau des herantransportierten Genmaterials in den Zellkern der aktivierten Endothelzelle erreicht werden kann, muss intrazellulär eine erleichterte liposomale Freigabe ermöglicht werden. Durch den Einsatz pH-sensitiver Liposomen konnte diese Bedingung erfüllt werden.

Zusammenfassend stellen selektingerichtete Immunoliposomen für eine antiinflammatorischen Therapie attraktive Arzneistoffträger dar. Weiterführende Arbeiten sind auf dem Gebiet der Transfektionsfähigkeit dieser liposomalen Trägersysteme nötig. Verschiedene Parameter, wie Inkubationszeit, Ladungsverhältnisse, Plasmidmenge etc. müssen weiter untersucht werden. Dadurch kann die Effizienz der Transfektion zusätzlich gesteigert werden. In fortführenden in-vivo-Versuchen muss die Übertragung der Ergebnisse an den hier vorgestellten Zellmodellen auf ein Entzündungsmodell am Tier gezeigt werden. Nach Umsetzung dieser Weiterentwicklungen ist ein Einsatz als neuartige effiziente antiinflammatorische Therapie mit kausalem Angriff am Menschen nicht mehr fern.

6. Literaturverzeichnis

Abra,R.M., Hunt,C.A. (1981) Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects, *Biochim. Biophys. Acta* 666, 493-503

Allen,T.M., Cleland,L.G. (1980) Serum-induced leakage of liposome contents, *Biochim. Biophys. Acta* 597, 418-426

Allen,T.M., Hansen,C.B., Martin,F., Redemann,C., Yau-Young,A. (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation time in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1066, 29-36

Allen,T.M. (1994) The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 13, 285-309

Allen,T.M., Brandeis,E., Hansen,C.B., Kao,G.Y., Zalipsky,S. (1995) A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1237, 99-108

Aragón,D., Leserman,L.D. (1986) Immune clearance of liposomes inhibited by an anti-Fc-receptor antibody in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2699-2703

Arnaout,M.A., Lanier,L.L., Faller,D.V. (1988) Relative contribution of the leukocyte adhesion molecule MAC-1, LFA-1 and p150,95 (LeuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue- and stimulus-specific, *J. Cell Physiol.* 137, 305-309

Aydt,E., Wolff,G. (2003) *Pathobiology* 70, 297-301

Baca,M., Presta,G.L., O'Connor,S.J., Wells,J. (1997) Antibody humanization using monovalent phage displays, *J. Biol. Chem.* 272, 10678-10684

Bangham,A.D., Standish,M.M., Watkins,J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13, 238-252

Bartlett,G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234, 466-468

Bendas,G., Krause,A., Bakowsky,U., Vogel,J., Rothe,U. (1999) Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique, *Int. J. Pharm.* 188, 79-93

Bevilacqua,M.P., Stengelin,S., Gimbrone,M.A., Seed,B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins, *Science* 243, 1160-1165

Biancone,L., Araki,M., Araki,K., Vassalli,P., Stamenkovic,I. (1996) Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo, *J. Exp. Med.* 183, 581-587

- Birnboim,H.C., Doly,J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic. Acids Res.* 7, 1513-1523
- Black,C.D., Gregoriadis,G.** (1976) Interaction of liposomes with blood plasma proteins, *Biochem. Soc. Trans.* 4, 253-256
- Bligh,E.G., Dyer,W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917
- Bloemen,P.G., HenricksP.A., van Bloois.L, van den Tweel,M.C., Bloem,A.C., Nijkamp,F.P., Crommelin,D.J., Storm,G.** (1995) Adhesion molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug-delivery, *FEBS Lett.* 357, 140-144
- Blume,G., Cevc,G.** (1990) Liposomes for the substained drug release, *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 91-97
- Blumenthal,R., Bali-Puri,A., Walter,A., Covell,D., Eidelman,O.** (1987) pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells – measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence, *J. Biol. Chem.* 262, 13614-13619
- Bonfanti,R., Furie,B., Furie,B.C., Wagner,D.D.** (1989) PADGEM is a component of Weibel-Palade bodies in endothelial cells, *Blood* 73, 1109-1112
- Bonte,F., Juliano,R.L.** (1986) Interaction of liposomes with serum lipoproteins, *Chem. Phys. Lip.* 40, 359-372
- Bonte,F., Hsu,M.J., Papp,A., Wu,K., Regen,S.L., Juliano,R.L.** (1987) Interaction of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blod components: relevance to biocompatibility, *Biochim. Biophys. Acta* 900, 1-9
- Brasier,A.R., Tate,J.E., Habener,J.F.** (1989) Optimized used of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines, *Biotechniques* 7,1116-1122
- Brown,P.M., Silvius,J.R.** (1989) Stability and fusion of lipid vesicles containing headgroup-modified analogues of phosphatidylethanolamine, *Biochim. Biophys. Acta* 980, 181-190
- Bruehl,R.E., Springer,T.A., Bainton,D.F.** (1996) Quantitation of L-Selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.* 44, 835-844
- Brunner,J., Skrabal,P., Hauser,H.** (1976) Single bilayer vesicles prepared without sonification. Physico-chemical properties, *Biochim. Biophys. Acta* 455, 322-331
- Carter,Y.M., Thomas,R., Bargatze,R., Poppa,V., Jutila,M., Murry,C.E., Allen,M.D.** (2002) Intracoronary E-/L-selectin blockade reduces neutrophil infiltration in heart transplantation, *Ann. Thorac. Surg.* 74, 2064-2071
- Citovsky,V, Blumenthal,R., Loyer,A.** (1985) Fusion of Sendai virions with phosphatidylcholine-cholesterol liposomes reflects the viral activity required for fusion with biological membranes, *FEBS Lett.* 193, 135-140

Clement,N.R., Gould,J.M. (1981) Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles, *Biochemistry* 20, 1534-1538

Cohnheim,J. (1889) Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students, *The New Sydenham Society, London*

Colin,M., Maurice,M., Trugnan,G., Kornprobst,M., Harbottle,R.P., Knight,A., Cooper,R.G., Miller,A.D., Capeau,J., Coutelle,C., Brahimi-Horn,M.C. (2000) Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells, *Gene Therapy* 7, 139-152

Collins,D., Maxfield,F., Huang,L. (1989) Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytotic pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 987, 47-55

Collins,D., Litzinger,D.C., Huang,L. (1990) Structural and functional comparison of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols, *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 234-242

Collins,T., Read,M.A., Neish,A.S., Whitley,M.Z., Thanos,D., Maniatis,T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers, *FASEB J.* 10, 899-909

Compagnon,B., Moradpour,D., Alford,D.R., Larsen,C.E., Stevenson,M., Mohr,L., Wand,J., Nicolau,C. (1997) Enhanced gene delivery and expression in human hepatocellular carcinoma cells by cationic immunoliposomes, *J. Liposome Res.* 7, 127-141

Connor,J., Yatvin,M.B., Huang,L. (1984) pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1715-1718

Connor,J., Huang,L. (1985) Efficient cytoplasmic delivery of a fluorescent dye by pH-sensitive immunoliposomes, *J. Cell Biol.* 101, 582-589

Connor,J., Huang,L. (1986) pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs, *Cancer Res.* 46, 3431-3435

Connor,J., Norley,N., Huang,L. (1986) Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 884, 474-481

Daleke,D.L., Hong,K., Papahadjopoulos,D. (1990) Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1024, 352-366

Derksen,J.T., Morselt,H.W., Kalicharan,D., Hulstaert,C.E., Scherphof,G.L. (1987) Interaction of immunoglobulin-coupled liposomes with rat liver macrophages in vitro, *Exp. Cell Res.* 168, 105-115

Dijkstra,J., van Galen,W.J., Hulstaert,C.E., Kalicharan,D., Roerdink,F.H., Scherphof,G.L. (1984) Interaction of liposomes with Kupffer cells in vitro, *Exp. Cell Res.* 150, 161-176

- Dijkstra,J., van Galen,M., Regts,D., Scherphof,G.** (1985) Uptake and processing of liposomal phospholipids by Kupffer cells in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 813, 287-297
- Ehrlich,P.** (1906) The relations existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action, in: *Collected studies on immunity*, John Wiley and sons, Ltd., New York, 404-443
- Elangbam,C.S., Qualls,C.W.Jr., Dahlgren,R.R.** (1997) Cell adhesion molecules—update, *Vet. Pathol.* 34, 61-73
- Ellens,H., Bentz,J., Szoka,F.C.** (1984) pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact, *Biochemistry* 23, 1532-1538
- Etzioni,A., Jonas,P.** (1997) The in-vivo role of selectin-lessons from Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD) II, in: Vestweber,D. (ed.), *The Selectins*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 117-125
- Ezpeleta,F.J., Irache,J.M., Stainmese,S., Chabenat,C., Gueguen,J., Orecchioni,A.M.** (1996) Preparation of lectin-vicilin nanoparticles conjugates using the carbodiimid coupling technique, *Int. J. Pharm.* 142, 227-233
- Felgner,P.L., Ringold,P.M.** (1989) Cationic liposome-mediated transfection, *Nature* 337, 387-388
- Finbloom,D.S., Martin,J., Gordon,R.K.** (1987) Endocytosis of particulate and soluble IgG immune complexes: differential effects of cytoskeletal modulating agents, *Clin. Exp. Immunol.* 67,205-210
- Fischer,T.H., Lasic,D.D.** (1984) A detergent depletion technique for the preparation of small vesicles, *Mol. Cryst. Liq. Lett.* 102, 144-153
- Forsen,E., Willis,M.** (1998) Ligand-targeted liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 29, 249-271
- Fraley,R., Subramani,S., Berg,P., Papahadjopoulos,D.** (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells, *J. Biol Chem.*, 255, 10431-10435
- Fraley,R., Straubinger,R.M., Rule,G., Springer,L., Papahadjopoulos,D.** (1981) Liposome-mediated delivery of DNA to cells: enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions, *Biochemistry* 20, 6978-6987
- Fung,B.K., Stryer,L.** (1978) Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer, *Biochemistry* 17, 5241-5248
- Gershon,H., Ghirlando,R., Guttman,S.B., Minsky,A.** (1993) Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection, *Biochemistry* 32, 7143-7151

- Gilbreath,M.J., Nacy,D.L., Hoover,D.L., Alving,C.L., Swartz,G.M., Meltzer,M.S.** (1985) Macrophage activation for microbicidal activity against *Leishmania major*: inhibition of lymphokine activation by phosphatidylcholine-phosphatidylserine liposomes, *J. Immunol.* 134, 3420-3425
- Gregoriadis,G., Neerunjun,T.** (1975) Homing of liposomes to target cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 537-544
- Gregoriadis,G.** (1976) The carrier potential of liposomes, *New. Eng. J. Med.* 295,704-710
- Gruner,S.M., Cullis,P.R., Hope,M.J., Tilcock,C.P.** (1985) Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases, *Ann. Rev. Biophysics Biophysical Chem.* 14, 211-238
- Gustafsson,J., Arvidson,G., Karlsson,G., Almgren,M.** (1995) Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM, *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 305-312
- Gutch,C.J.W., Waters,W.A.** (1966) The effects of solvents on the E.S.R. spectra of the radical-anions of aromatic dinitro-compounds, *Chem. Comm.* 2, 39-41
- Hansen,C.B., Kao,G.Y., Moase,E.H., Zalipsky,S., Allen,T.M.** (1995) Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures, *Biochim. Biophys. Acta* 1239, 133-144
- Hauser,H.** (1971) The effect of ultrasonic irradiation on the chemical structure of egg lecitin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1049-1055
- Haylett,T., Thilo,L.** (1986) Limited and selective transfer of plasma membrane glycoproteins to membrane of secondary lysosomes, *J. Cell. Biol.* 103, 1249-1256
- Helenius,A., Fries,E., Kartenbeck,J.** (1977) Reconstitution of Semliki forest virus membrane, *J. Cell Biol.* 75, 866-880
- Heltianu,C., Simionescu,M., Simionescu,N.** (1982) Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules, *J. Cell Biol.* 93, 357-364
- Heuser,J.E., Anderson,R.G.W.** (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation, *J. Cell. Biol.* 108, 389-400
- Ho,R.J.Y., Rouse,B.T., Huang,L.** (1986) Target-sensitive immunoliposomes; preparation and characterization, *Biochemistry* 25, 5500-5506
- Hoekstra,D., Yaron,A., Carmel,A., Scherphof,G.** (1979) Fusion of phospholipid vesicles containing a trypsin-sensitive fluorogenic substrate and trypsin: a new method to study membrane fusion activity in a model system, *FEBS Lett.* 106, 176-180
- Hoekstra,D., van Renswoude,J., Tomasini,R., Scherphof,G.** (1981) Interaction of phospholipid vesicles with rat hepatocytes: further characterization of vesicle-cell surface interaction; use of serum as a physiological modulator, *Membr. Biochem.* 4, 129-147

- Hoekstra,D.** (1982) Role of lipid phase separations and membrane hydration in phospholipid vesicle fusion, *Biochemistry* 21, 2833-2840
- Hoepfner,M., Alban,S., Schumacher,G., Rothe,U., Benas,G.** (2003) Selectin-blocking semisynthetic sulfated polysaccharides as promising anti-inflammatory agents, *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 697-706
- Holloway,P.W., Katz,J.T.** (1975) Effect of cytochrome b5 on the size, density, and permeability of phosphatidylcholine vesicles, *J. Biol. Chem.* 250, 9002-9007
- Hong,K., Zheng,W., Baker,A., Papahadjopoulos,D.** (1997) Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly (ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery, *FEBS Letters* 400, 233-237
- Huang,C.** (1969) Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics, *Biochemistry* 8, 344-352
- Huang,K.J., Luke,K.F.S., Baumier,P.L.** (1980) Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4030-4034
- Huang,A., Kennel,S.J., Huang,L.** (1983) Interactions of immunoliposomes with target cells, *J. Biol. Chem.* 258, 14034-14040
- Ishiwata,H., Sato,S.B., Kobayashi,S., Oku,M., Vertut-Doi,M., Miyajima,K.** (1998) Poly (ethylene glycol) derivative of cholesterol reduces binding step of liposome uptake by murine macrophage-like cell line J774 and human hepatoma cell line HepG2, *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1907-1913
- Juliano,R.L., Stamp,D.** (1975) Effect of particle size and charge on the clearance of liposomes and liposome-encapsulated drugs, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 63, 651-658
- Kamps,J.A.A.M., Morselt,H.W.M., Swart,P.J., Meijer,D.K.F., Scherphof,G.L.** (1997) Massive targeting of liposomes, modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11681-11685
- Keller,P.M.,Person,S., Snipes,W.** (1977) A fluorescence enhancement assay of cell fusion, *J Cell Sci.* 28, 167-177
- Kenworthy,A.K., Simon,S.A., Mc Intosh,T.J.** (1995) Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly (ethyleneglycol), *Biophys. J.* 68, 1921-1936
- Kimelberg,H.K.** (1976) Differential distribution of liposome-entrapped [3H]methotrexate and labelled lipids after intravenous injection in a primate, *Biochim. Biophys. Acta* 448, 531-550
- Kirby,C., Clarke,J., Gregoriadis,G.** (1980) Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro, *Biochem. J.* 186, 591-598

Kirpotin,D., Park,J.W., Hong,K., Zalipsky,S., Li,W.L., Carter,P., Benz,C.C., Papahadjopoulos,D. (1997) Sterically stabilized Anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro, *Biochemistry* 36, 66-75

Klibanov,A.L., Maruyama,K., Beckerleg,A.M., Torchilin,V.P., Huang,L. (1991) Activity of amphipatic poly (ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target, *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 142-148

Kobayashi,T., Stang,E., Fang,K.S., Moerloose,P., Parton,R.G., Gruenberg,J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function, *Nature* 392, 193-197

Koning,G.A., Morselt,H.W.M., Velinova,M.J., Donga,J., Gorter,A., Allen,T.M., Zalipsky,S., Kamps,J.A.A.M., Scherphof,G.L. (1999) Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1420, 153-167

Koning,G.A., Morselt,H.W.M., Gorter,A. Allen,T.M., Zalipsky,S., Kamps,J.A.A.M., Scherphof,G.L. (2001) Pharmacokinetics of differently designed immunoliposome formulations in rats with or without hepatic colon cancer metastases, *Pharm. Res.* 9, 1291-1298

Krause,A. (2000) Herstellung und Charakterisierung E-Selektin-gerichteter Immunoliposomen zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie, *Promotionsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kremer,J.M.H., Esker,M.W.J., Pathmamanohan,K., Wiersema,P.H. (1977) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method, *Biochemistry* 16, 3932-3935

Larkin,J.M., Brown,M.S., Goldstein,J.L., Anderson,R.G.W. (1983) Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts, *Cell.* 33, 273-285

Larkin,J.M., Donzell,W.C., Anderson,R.G.W. (1985) Modulation of intracellular potassium and ATP: effects on coated pit function in fibroblasts and hepatocytes, *J. Cell. Physiol.* 124, 372-378

Larkin,J.M., Donzell,W.C., Anderson,R.G.W. (1986) Potassium-dependent assembly of coated pits: new coated pits form as planar clathrin lattices, *J. Cell. Biol.* 103, 2619-2627

Lasic,D.D. (1988) The mechanism of vesicle formation. A review, *J Biochem.* 256, 1-11

Lasic,D.D., Martin,F.J., Gabizon,A., Huang,S.K., Papahadjopoulos,D. (1991) Sterically stabilizes liposomes: a hypothesis on the origin of extended circulation times, *Biochim. Biophys. Acta* 1070, 187-192

Lasky,L.A. (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 113-139

- Latt,S.A., Stetten,G.** (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis, *J. Histochem. Cytochem.* 24, 24-31
- Lee,K.D., Hong,K., Papahadjopoulos,D.** (1992) Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density, *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 185-197
- Lee,K.D., Nir,S., Papahadjopoulos,D.** (1993) Quantitative analysis of liposome-cell interactions in-vitro-: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes, *Biochemistry* 32, 889-899
- Lee,K.D., Oh,Y.K., Portnoy,D.A., Swanson,J.A.** (1996) Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from listeria monocytogenes, *J. Biol. Chem.* 271, 7249-7252
- Leventis,R., Diacovo,T., Silvius,J.R.** (1987) pH-dependent stability and fusion of liposomes combining protonatable double-chain amphiphiles with phosphatidylethanolamine, *Biochemistry* 26, 3267-3276
- Lim,K, Chae,C.B.** (1989) A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase, *Biotechniques* 7, 576-579
- Longin,A, Souchier,C, Ffrench,M, Bryon,P.A.** (1993) Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study, *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1833-1840
- Machy,P., Truneh,A., Gennaro,D., Hoffstein,S.** (1987) Endocytosis and de novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies, *Eur. J. Cell Biol.* 45, 126-136
- Mahato,R.I., Kawabata,K., Nomura,T., Takakura,Y., Hashida,M.** (1995) Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid-DNA / cationic liposome complexes, *J. Pharmacol. Sci.* 84, 1267-1271
- Maruyama,K., Yuda,T., Okamoto,A., Ishikura,C., Kojima,S., Iwatsura,M.** (1991) Effect of molecular weight in amphipatic poly (ethylene glycol) on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1620-1622
- Maruyama,K., Takizawa,T., Yuda,T., Kennel,S.** (1995) Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly (ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies, *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 74-80
- Mastrobattista,E., Storm,G., van Bloois,L., Reszka,R., Bloemen,P.G.M., Crommelin,D.J.A., Henricks,P.A.J.** (1999) Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1419, 353-363

- Matsui,H., Johnson,L.G., Randell,S.H., Boucher,R.C.** (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 272, 1117-1126
- Matthay,K.K., Heath,T.D., Badger,C.C., Bernstein,I.D., Papahadjopoulos, D.** (1986) Antibody-directed liposomes: comparison of various ligands for association, endocytosis, and drug delivery, *Cancer Res.* 46, 4904-4910
- Maxfield,F.R.** (1982) Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts, *J. Cell Biol.* 95, 676-681
- Mayorga,L.S., Bertin,F., Stahl,P.D.** (1991) Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell free system, *J. Biol. Chem.* 266, 6511-6517
- McEver,R.P.** (1997) Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis, *Glycoconj. J.* 14, 585-591
- McIntyre, J.C., Schroeder,F., Behnke,W.D.** (1990) Synthesis and characterization of the dansyltyrosine derivatives of porcine pancreatic colipase, *Biochemistry* 29, 2092-2101
- McIntyre,J.C., Sleight,R.G.** (1991) Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry, *Biochemistry* 30, 11819-11827
- Mellman,I., Fuchs,R., Helenius,A.** (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways, *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-700
- Mimms,L.T., Zampighi,G., Nozaki,Y., Tanford,C., Reynolds,J.A.** (1981) Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside, *Biochemistry* 20, 833-840
- Morgan,C.G., Thomas,E.W., Yianni,Y.P.** (1983) The use of fluorescence energy transfer to distinguish between poly(ethylene glycol)-induced aggregation and fusion of phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 728, 356-362
- Morigi,M., Angioletti,S., Imberti,B., Donadelli,R., Micheletti,G., Figliuzzi,M., Remuzzi,A., Zoja,C., Remuzzi,G.** (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion, *J. Clin. Invest.* 101, 1905-1915
- Mortimer,I., Tam,P., MacLachlan,I., Graham,R.W., Saravolac,E.G., Joshi,P.B.** (1999) Cationic lipidmediated transfection of cells in culture requires mitotic activity, *Gene Therapy* 6, 403-411
- New,R.R.C.** (1990a) Characterization of liposomes, in: *Liposomes – a practical approach*, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo
- New,R.R.C.** (1990b) Liposomes in biological systems, in: *Liposomes – a practical approach*, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo

- Ng,K., Zhao,L., Liu,Y., Mahapatro,M.** (2000) The effects of polyethylenglycol (PEG)-derived lipid on the activity of target-sensitive immunoliposome, *Int. J. Pharm.* 193, 157-166
- Ohkuma,S., Poole,B.** (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 3327-3331
- Ohmoto,H., Nakamura,K., Inoue,T., Kondo,N., Inoue,Y., Yoshino,K., Kondo,H., Ishida,H., Kiso,M., Hasegawa,A.** (1996) Studies on selectin blocker. 1. Structure-activity relationships of sialyl Lewis X analogs, *J. Med. Chem.* 39, 1339-1343
- Olson,F., Hunt,C.A., Szoka,F.C., Vail,W.J., Papahadjopoulos,D.** (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 557, 9-23
- Paccaud,J.P., Siddle,K., Carpentier,J.L.** (1992) Internalization of the human insulin receptor – the insulin-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 267, 13101-13106
- Pagano,R.E., Takeichi,M.** (1977) Adhesion of phospholipid vesicles to chinese hamster fibroblasts - role of cell surface proteins, *J Cell Biol.* 74, 531-546
- Pagnan,G., Stuart,D.D., Pastorino,F., Raffaghello,L., Montaldo,P.G., Allen,T.M., Calabretta,B., Ponzoni,M.** (2000) Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD₂-targeted immunoliposomes: antitumor effects, *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 253-
- Pan,L, Kreisle,R.A., Shi,Y.** (1999) Expression of endothelial cell IgG Fc receptors and markers of various cultures, *Chin. Med. J.* 112, 157-161
- Papahadjopoulos,D.** (1968) Surface properties of acidic phospholipids: interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bi-valent metal ions, *Biochim. Biophys. Acta* 163, 240-254
- Papahadjopoulos,D., Hui,S., Vail,W.J., Poste,G.** (1976) Studies of membrane fusion. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecitin, proteins and dimethylsulfoxide, *Biochim. Biophys. Acta* 448, 254-264
- Papazisis,K.T., Geromichalos,G.D., Dimitriadis,K.A., Kortsaris,A.H.** (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay, *J. Immunol. Methods* 208, 151-158
- Park,R.D., Sullivan,P.C., Storrie,B.** (1988) Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments, *J. Cell. Physiol.* 135, 443-450
- Pastan,I., Willingham,M.C.** (1985) *Endocytosis, Plenum Press, N.Y.*
- Patel,K.R., Li,M.P., Baldeschweiler,J.D.** (1983) Suppression of liver uptake of liposomes by dextran-sulfate 500, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6518-6522
- Patel,T.P., Goelz,S.E., Lobb,R.R., Parekh,R.B.,** (1994) Isolation and characterization of natural protein – associated carbohydrate ligands for E-selectin, *Biochem.* 33, 14815-14824

- Peterson,G.L.** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83, 346-356
- Phillips,M.L., Nudelman,E., Gaeta,F.C.A., Perez,M., Singhal,A.K., Hakomori,S.I., Paulson,J.C.** (1990) ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl Lev^X, *Science* 250, 1130-1132
- Phong,M.C., Gutwein,P, Kadel,S., Hexel,K., Altevogt,P., Linderkamp,O., Brenner,B.** (2003) Molecular mechanism of L-selectin-induced co-localization in rafts and shedding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 563-569
- Pinnaduwege,P., Huang,L.** (1992) Stable target-sensitive immunoliposomes, *Biochemistry* 31, 2850-2855
- Reimer,D.L., Zhang,Y.P., Kong,S., Wheeler,J.J., Graham,R.W., Bally,M.B.** (1995) Formation of novel hydrophobic complexes between cationic lipids and plasmid DNA, *Biochemistry* 34, 12877-12883
- Roberts,W.G., Palade,G.E.** (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated, *Cancer Res.* 57, 765-772
- Rosenberg,J., Düzgünes,N., Kayalar,C.** (1983) Comparison of two liposome fusion assays monitoring the intermixing of aqueous contents and of membrane components, *Biochim. Biophys. Acta* 735, 173-180
- Rünegeler,P., Lyß,G., Merfort,I.** (1999) Transkriptionsfaktor NF-κB: Zentraler Mediator im Immunsystem und Entzündungsgeschehen, *Pharm. Ztg.* 144, 100-108
- Salisbury,J.L., Keller,G.A.** (1983) Structural investigation on the role of microfilaments in ligand translocation, *Methods Enzymol.* 98, 368-375
- Schmid,S.L., Fuchs,R., Male,P., Mellman,I.,** (1988) Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes, *Cell* 52, 73-83
- Schmittler,H.J., Wilke,A., Gress,T.** (1990) Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium, *J. Physiol.* 431, 379-401
- Segal,A.W., Gregoriadis,G., Lavender,J.P., Tarin,D., Peters,T.J.** (1976) Tissue and hepatic subcellular distribution of liposomes containing bleomycin after intravenous administration to patients with neoplasms, *Clin. Sci. Mol. Med.* 51, 421-425
- Senior,J.** (1987) Fate and behaviour of liposomes in vivo : a review of controlling factors, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 3, 123-193
- Senior,J., Delgado,C., Fisher,D., Tilcock,C., Gregoriadis,G.** (1991) Influence of surface hydrophobicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with the poly(ethylene glycol)-coated vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 77-82

- Setiadi,H., Disdier,M., Green,S.A., Canfield,W.M., McEver,R.P.** (1995) Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-Selectin, *J. Biol. Chem.* 270, 26818-26826
- Simionescu,M., Simionescu,N.** (1991) Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis, *Cell. Biol. Rev.* 25, 1-80
- Simoës,S., Slepishkin,V., Pires,P., Gaspar,R., Pedroso de Lima,M.C., Düzgünes,N.** (1999) Mechanism of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides, *Gene Therapy* 6, 1798-1807
- Skehan,P., Storeng,R., Scudiero,D., Monks,A., McMahon,J., Vistica,D., Warren, J.T., Bokesch,H., Kenney,S., Boyd,M.R.** (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 1107-1112
- Slepishkin,V.A., Simoës,S., Dazin,P., Newman,M.S., Guo,L.S., Pedroso de Lima,M.C., Düzgünes,N.** (1997) Sterically stabilized pH sensitive Liposomes – intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo, *J. Biol. Chem.* 272, 2382-2388
- Smith,C.W., Marlin,S.D., Rothlein,R., Toman,C., Anderson,D.C.** (1989) Cooperative interaction of LFA-1 and MAC-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro, *J. Clin. Invest.* 83, 2008-2017
- Spragg,D.D., Alford,D.R., Greferath,R., Larsen,C.E., Lee,K.D., Gurtner,G.C., Cybulsky,M.I., Tosi,P.F., Nicolau,C., Gimbrone,M.A.** (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8795-8800
- Springer,T.A.** (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and lymphocyte emigration, *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827-872
- Sternberg,B., Sorgi,F.L., Huang,L.** (1994) New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy, *FEBS Lett.* 356, 361-366
- Straubinger,R.M., Hong,K., Friend,D.S., Papahadjopoulos,D.** (1983) Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles, *Cell* 32, 1069-1079
- Straubinger,R.M., Duzgunes,N., Papahadjopoulos,D.** (1985) pH-sensitive liposomes mediate cytoplasmic delivery of encapsulated macromolecules, *FEBS Lett.* 179, 148-154
- Straubinger,R.M., Papahadjopoulos,D., Hong,K.** (1990) Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe, *Biochemistry* 29, 4929-4939
- Straubinger,R.M.** (1993) pH-sensitive liposomes for delivery of macromolecules into cytoplasm of cultured cells, *Method Enzymol.* 221, 361-376

- Struck,D.K., Hoekstra,D., Pagano,R.E.** (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion, *Biochemistry* 20, 4093-4099
- Suzuki,H., Zelphati,O., Hildebrand,G., Lesermann,L.** (1991) CD4 and CD7 molecules as targets for drug delivery from antibody bearing liposomes, *Exp. Cell. Res.* 193, 112-119
- Szoka,F.Jr., Papahadjopoulos,D.** (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reversed-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4194-4198
- Szoka,F.C., Papahadjopoulos,D.** (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 467-508
- Takigawa,M., Danno,K., Furukawa,L.** (1987) Effects of colchicine and cytochalasin B on distribution of concanavalin A receptors in isolated and cultured guinea pig epidermal cells, *Arch. Dermatol. Res.* 279, 392-397
- Thanaporn,P, Myers,D.D., Wroblesky,S.K., Hawley,A.E., Farris,D.M., Wakefield,T.W., Henke,P.K.** (2003) P-selectin inhibition decreases post-thrombotic vein wall fibrosis in a rat model, *Surgery.* 134, 365-371
- Thierry,A., Dritschilo,A.** (1992) Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity, *Nucleic Acids Res.* 20, 5691-5698
- Trudel,P., Giquaud,C.,** (1985) Endocytosis of liposomes by *Entamoeba histolytica* and transport of encapsulated molecules toward the cytoplasm, *Eur. J. Cell Biol.* 38, 27-33
- Tycko,B., Maxfield,F.R.** (1982) Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha 2-macroglobulin, *Cell* 28, 643-651
- Uzgiris,E.E.** (1981) Probing immune reactions by laser light scattering spectroscopy, *Methods Enzymol.* 74 Pt C, 177-198
- Vargas,J.L., Knecht,E., Grisolia,S.** (1990) Endocytosis of liposomes containing lysosomal proteins increases intracellular protein degradation in growing L-132 cells, *Eur. J. Biochem.* 188, 99-109
- Vertut-Doi,A., Ishiwata,H., Miyajima,K.** (1996) Binding and uptake of liposomes containing a poly(ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: influence of PEG content and its molecular weight, *Biochim. Biophys. Acta* 1278, 19-28
- Vidal,M., Sainte-Marie,J., Philippot,J.R., Bienvenue,A.** (1987) The influence of coupling transferrin to liposomes or minibeads on its uptake and fate in leukemic L2C cells, *FEBS Lett.* 216, 159-163
- Vingerhoeds,M.H., Steerenberg,P.A., Hendriks,J.J., Dekker,L.C., van Hoesel,Q.G., Crommelin,D.J.A., Storm,G.** (1996) Immunoliposome-mediated targeting of doxorubicin to human ovarian carcinoma in vitro and in vivo, *Br. J. Cancer* 74, 1023-1029

- Vora,D.K., Fang,Z.T., Liva,S.M., Tyner,T.R., Parhami,F., Watson,A.D., Drake,T.A., Territo,M.C., Berliner,J.A.** (1997) Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression, *Circ. Res.* 80, 810-818
- Von Tschanner,V., Radda,G.K.** (1981) The effect of fatty acids on the surface potential of phospholipid vesicles measured by condensed phase radioluminescence, *Biochim. Biophys. Acta* 643, 435-448
- Wang,C.Y., Huang,L.** (1987) pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 7851-7855
- Wasmuth,C.R., Edwards,C., Hutcherson,R.** (1964) Participation of the SO_2^- radical ion in the reduction of *p*-nitrophenol by sodium dithionite, *J. Phys. Chem.* 68, 423-425
- Weinstein,J.N., Yoshikami,S., Henkart,P., Blumenthal,R., Hagins,W.A.** (1977) liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science.* 195, 489-492
- Weinstein,J.N., Magin,R.L., Cysyk,R.L., Zaharko,D.S.** (1980) Treatment of solid L1210 murine tumors with local hyperthermia and temperature-sensitive liposomes containing methotrexate, *Cancer Res.* 40, 1388-1395
- Weissig,V.** (1999) Methoden zur Darstellung funktionalisierter Liposomen mit Adjuvanseffekt, *Habilitationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Weyrich,A.S., Ma,X.Y., Lefer,D.J., Albertine,K.H., Lefer,A.M.** (1993) In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia reperfusion injury, *J. Clin. Invest.* 91, 2620-2629
- Wheeler,J.J., Palmer,L., MacLachlan,I., Graham,R.W., Zhang,Y.P., Hope,M.J., Scherrer,P., Cullis,P.R.** (1999) Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization, *Gene Therapy* 6, 271-281
- Williams,S.K.** (1983) Vesicular transport of proteins by capillary endothelium, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 416, 457-467
- Woodle,M.C., Papahadjopoulos,D.** (1989) Liposome preparation and size characterisation, *Meth. Enzym.* 171, 193-217
- Woodle,M.C., Lasic,D.D.** (1992) Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 171-199
- Woodle,M.C., Newman,M.S., Cohen,J.A.** (1994) Sterical stabilized liposomes: physical and biological properties, *J. Drug Targeting* 2, 397-403
- Xu,Y., Hui,S.W., Frederik,P., Szoka,F.C.Jr.** (1999) Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes, *Biophys. J.* 77, 341-353

Yang,L.C., Wang,C.J., Lee,T.H., Lin,F.C., Yang,B.Y., Lin,C.R., Lee,T.C. (2002) Early diagnosis of deep vein thrombosis in female patients who undergo total knee arthroplasty with measurement of P-selectin activation, *J. Vasc. Surg.* 35, 707-712

Yoshimori,T., Yamamoto,A., Moriyama,Y., Futai,M., Tashiro,Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells, *J. Biol. Chem.* 266, 17707-17712

Yoshimura,T., Shono,M., Imai,K., Hong,K. (1995) Kinetic analysis of endocytosis and intracellular fate of liposomes in single macrophages, *J. Biochem.* 117, 34-41

Zalipsky,S. (1993) Synthesis of endgroup functionalized poly (ethylene glycol)-lipid conjugates for preparation of polymer-grafted liposomes, *Bioconjug. Chem.* 4, 296-299

Zelphati,O., Szoka,F.C.Jr. (1996) Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids, *Pharm. Res.* 13, 1367-1372

Zhou,X., Huang,L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 195-203

Zimmermann,G.A., McIntyre,T.M., Prescott,S.M. (1997) Adhesion and signalling in vascular cell-cell-interactions, *J. Clin. Invest.* 98, 1699-1701

Lebenslauf

geboren: 25.01.1976
in Staßfurt

Familienstand: ledig

Schulbildung:

09.1982 - 07.1985 Grundschole W.I.Lenin Staßfurt

09.1985 - 07.1990 Grundschole Albert Stierwald Staßfurt

09.1990 - 07.1994 Erweiterte Oberschole Hermann Matern,
Abschluss 12. Klasse

Studium:

10.1994 - 09.1998 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg, Ablegen des 1. und 2. Abschnittes
der Pharmazeutischen Prüfung

10.1998 - 03.1999 Pharmaziepraktikum in der Markus Apotheke Bremen

04.1999 - 10.1999 Pharmaziepraktikum in der Krankenhausapotheke
des Kreiskrankenhauses Aschersleben-Staßfurt

10.1999 Ablegen des 3. Abschnittes der Pharmazeutischen
Prüfung, Erlangung der Approbation

Beruf:

11.1999 – 09.2003 Tätigkeit als Doktorand im Institut für Pharmazeu-
tische Chemie am Fachbereich Pharmazie

seit 10.2003 Apothekenleiter der Krankenhausapotheke des
Klinikums „Mansfelder Land“ in Eisleben

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

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

Halle (Saale), April 2004

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. habil. P. Nuhn für die Möglichkeit, im Rahmen eines Stipendiums am Institut der Pharmazeutischen Chemie des Fachbereiches Pharmazie diese Arbeit anfertigen zu können.

Herrn PD Dr. habil. U. Rothe möchte ich für die Möglichkeit der Nutzung der Zelllabore seiner Arbeitsgruppe und der verschiedenen Fluoreszenzmikroskope sowie sein Interesse am Gelingen der Arbeit danken.

Ich bedanke mich ganz herzlich für die freundliche und kompetente Hilfe auf dem Gebiet der Zellkultivierung bei seiner Mitarbeiterin U. Goder.

Herrn Dr. W. Richter vom Institut für Ultrastrukturforschung des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena gilt mein Dank für die umfangreichen Bemühungen bei der Entstehung elektronenmikroskopischer Aufnahmen der plasmidhaltigen Vesikelsysteme.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. D. Glanz für die Bereitstellung transformierter E.coli-Stämme, der exzellenten Hilfe bei der Plasmidisolierung und den Transfektionsversuchen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. habil. G. Bendas für die umfassende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit. Für die tägliche kollegiale Zusammenarbeit im Labor und den unzähligen Anregungen sei an dieser Stelle auch Frau Apothekerin B. Hartung gedankt.